



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOM. DICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

FUNCIÓN DE ULT1 EN EL DESARROLLO DE LA RAÍZ DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

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

PRESENTA:
DIEGO ARTURO ORNELAS AYALA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MA. DE LA PAZ SÁNCHEZ JIMÉNEZ
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:
DRA. ADRIANA GARAY ARROYO
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
DR. JESÚS CHIMAL MONROY
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO DE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



PDCB/IE/0003/2021

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

Dr. Víctor Hugo Anaya Muñoz

Director de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e.

Nos permitimos informarle que el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su sesión **485** del **24 de febrero de 2021** designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **ORNELAS AYALA DIEGO ARTURO**, con número de cuenta: **306144406**, con la tesis titulada: "**Función de ULT1 en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana***", dirigida por la **Dra. Ma. De La Paz Sánchez Jiménez**.

Presidente: Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles
Secretario: Dra. Ma. De La Paz Sánchez Jiménez
Vocal: Dr. Luis Cárdenas Torres
Vocal: Dr. Juan Miranda Ríos
Vocal: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

A t e n t a m e n t e

"Por mi raza hablará el espíritu"

Ciudad Universitaria, Cd. Mx, a 26 de febrero de 2021

DRA. AÚREA OROZCO RIVAS
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p: Expediente alumno

Agradecimientos personales

Primero que nada, quiero agradecer a mi tutora la Dra. MaryPaz por su total compromiso con todos sus alumnos, y por siempre mostrar su disponibilidad e interés por los múltiples proyectos que dirige. También le agradezco por compartir toda su experiencia como científica y por todo el apoyo, no sólo académico, brindado a lo largo de estos años. Las siguientes personas a las cuales quiero agradecer, siendo las más importantes en mi vida, son a mis padres y a mi hermano. Gracias por acompañarme desde siempre, brindar su apoyo en todos los sentidos y por mostrar un genuino interés en mi formación y mis aspiraciones. El laboratorio es un espacio en donde el ambiente y la convivencia es esencial para una buena formación, por lo que agradezco (especialmente a lxs epichicxs) a todxs lxs integrantes y exintegrantes del laboratorio de genética molecular, y no sólo por las críticas, comentarios y consejos académicos, sino también por las charlas y los buenos ratos. Finalmente agradezco a la UNAM por brindarme la oportunidad de hacer un posgrado en sus instalaciones y de seguir perteneciendo a esta gran, gran universidad.

Agradecimientos académicos

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Ma de la Paz Sánchez Jiménez, en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la coordinación académico-científica de las Dras. Elena Álvarez-Buylla Roces, Adriana Garay Arroyo y Berenice García Ponce de León, y la coordinación administrativa, técnica y logística de la Dra. Diana Belén Sánchez Rodríguez; así como el apoyo de Laura Rodríguez y la Dra. Teresa Romero, en la preparación de soluciones, medios, y materiales diversos importantes para realizar la investigación de esta tesis.

Quiero agradecer a mi comité académico conformado por el Dr. Jesús Chimal Monroy y la Dra. Adriana Garay Arroyo por el intenso seguimiento y las incontables críticas dadas durante el desarrollo de este proyecto, así como al Programa de doctorado en ciencias biomédicas y su administración por todo el apoyo brindado.

Agradezco al CONACYT por el apoyo brindado a través la beca de posgrado que me fue asignada, así como al PAPIIT por la beca otorgada por el proyecto IN203220 titulado “Función de ULT1 en el mantenimiento del meristemo apical de la raíz de *Arabidopsis thaliana*”.

También quiero agradecer al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) por otorgarme los ingresos necesarios para asistir a mi primer congreso internacional Plant Biology 2019 en San José, California.

El financiamiento para insumos, secuenciación, y materiales usados en esta investigación provino de los proyectos de investigación: UNAM-DGAPA-PAPIIT IN203220, IN206220, IN200920, IN211721 y CONACyT 102987,102959

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	1
2. RESUMEN	3
3. INTRODUCCIÓN	4
3.1 EPIGENÉTICA: DEFINICIÓN Y FUNCIÓN	4
3.2.1 <i>Metilación del DNA</i>	5
3.2.2 <i>RNAs largos no codificantes</i>	7
3.2.3 <i>Modificaciones postraduccionales de las histonas</i>	8
3.3 EL COMPLEJO TRxG: DESCUBRIMIENTO, MECANISMO Y FUNCIÓN	10
3.3.1 <i>Descubrimiento y definición de TrxG</i>	10
3.3.2 <i>Composición del complejo TrxG en plantas y sus homólogos en animales</i>	11
3.3.3 <i>Mecanismo de acción de TrxG en plantas</i>	15
3.4 DESARROLLO DEL RAM Y SU REGULACIÓN	18
3.4.1 <i>Función de TrxG en el RAM</i>	18
3.4.2 <i>Otros Factores que regulan el RAM en Arabidopsis</i>	21
3.4.3 <i>Regulación de las hormonas en el RAM</i>	22
3.5 ULTRAPETALA1 Y SU PAPEL EN EL DESARROLLO DE ARABIDOPSIS	23
3.5.1 <i>Estructura y conservación de ULTRAPETALA1</i>	23
3.5.2 <i>ULT1 como un componente del complejo TrxG</i>	26
3.5.3 <i>Otras funciones de ULT1</i>	27
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
5. HIPÓTESIS	29
6. OBJETIVOS	29
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y MÉTODOS	30
7.1 PLANTAS UTILIZADAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	30
7.2 GENOTIPIFICACIÓN DE LAS PLANTAS MUTANTES <i>ULT1-3</i>	31
7.3 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE RAÍZ	32
7.4 TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS CON <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	34
7.5 CRUZAS DE PLANTAS <i>ULT1-3</i> CON PLANTAS CON REPORTEROS	34
7.6 ENSAYOS DE GUS	35
7.7 ENSAYOS DE INCORPORACIÓN DE EDU (5-ETINIL-2'-DESOXIURIDINA)	36
7.8 TRATAMIENTOS CON AUXINAS	36
7.9 EXTRACCIÓN DE RNA Y qPCRS	37
8. RESULTADOS	37
8. 1 GENOTIPIFICACIÓN DE LAS MUTANTES <i>ULT1-3</i>	37
8.2 PATRÓN DE EXPRESIÓN DE <i>ULT1</i> EN LA RAÍZ DE ARABIDOPSIS	41
8.3 FENOTIPO DE LA MUTANTE <i>ULT1-3</i> EN LA RAÍZ DE ARABIDOPSIS	43
8.4 FUNCIÓN DE <i>ULT1</i> EN LA RAÍZ Y SU RELACIÓN CON <i>ATX1</i>	49
8.5 FUNCIÓN DE <i>ULT1</i> EN LA SEÑALIZACIÓN DE AUXINAS	51
8.6 FUNCIÓN DE <i>ULT1</i> EN EL MANTENIMIENTO DEL SCN	54
8.7 FUNCIÓN DE <i>ULT1</i> EN LA DIVISIÓN DEL QC	55
9. DISCUSIÓN	57
9.1 LA EXPRESIÓN DE <i>ULT1</i> EN RAÍZ	57
9.2 LA ACTIVIDAD DE <i>ULT1</i> EN LA ORGANIZACIÓN E IDENTIDAD DEL SCN DEL RAM	60
9.3 LA FUNCIÓN DE <i>ULT1</i> EN LA RESPUESTA A AUXINAS	61

9.4 LA FUNCIÓN DE ULT1 EN EL MANTENIMIENTO DEL QC	64
9.5 LA RELACIÓN ENTRE ATX1 Y ULT1 Y SU POSIBLE FUNCIÓN EN EL COMPLEJO TrxG	67
9.6 ¿FUNCIONA ULT1 COMO UN INTERRUPTOR EPIGENÉTICO?	70
9.7 LA ACTIVIDAD DE ULT1 EN LOS PROCESOS DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN	71
10. CONCLUSIONES	75
11. PERSPECTIVAS	75
12. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	77
12. REFERENCIAS	85
13. ANEXO	93

1. ABREVIATURAS

BSA: Bovine Serum Albumin (Suero bovino de albúmina).

CIC: Columella Initial Cells (Células iniciales de la columela).

DCC: Differentiated Columella Cells (Células diferenciadas de columela).

Col: Columbia. Ecotipo de *Arabidopsis thaliana*.

DNA: DeoxyriboNucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico).

DNMT: DNA MethylTransferase (DNA metiltransferasa).

dps: Días post-siembra.

Edu: 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (5-Etinil-2'-desoxiuridina). En el texto hace referencia al ensayo que involucra la incorporación de este compuesto al DNA como un análogo a timidina.

GUS: β -glucuronidase. En el texto hace referencia al ensayo en donde se usa a la enzima como sistema reportero.

HAT: Histone AcetylTransferase (Histona acetil transferasa).

HDAC: Histone deacetylases (Histona desacetilasa).

HMT: Histone MethylTransferases (Histona metiltransferasa).

IAA: Indole-3-acetic acid (ácido indol 3 acético). Auxina endógena.

Ler: Landsber *Erecta*. Ecotipo de *Arabidopsis thaliana*.

lncRNA: Long non-coding RNA (RNA largo no codificante).

mRNA: RNA mensajero.

MS: Medio de cultivo Murashige & Skoog.

NAA: 1-Naphthaleneacetic Acid (Ácido 1-naftalenacético). Auxina sintética.

NAT: Natural Antisense Transcript (Transcritos naturales antisentido).

NPA: Naphthylphthalamic acid (ácido naftiltalámico). Inhibidor de transporte de auxinas.

PBS: Phosphate-buffered saline (Buffer de fosfatos salino).

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).

PFA: Paraformaldehído.

PIC: Pre-Initiation Complex (Complejo de preiniciación de la replicación).

PRC: Polycomb Repressive Complex (Complejo represivo Polycomb).

PS-IP: Pseudo-Schiff Propidium Iodide (Tinción de Pseudo-Schiff con yoduro de propidio).

QC: Quiescent center (Centro quiescente).

qPCR: Quantitative-PCR (PCR cuantitativa).

RAM: Root Apical Meristem (Meristemo apical de la raíz).

RdDM: RNA-directed DNA methylation (Metilación de DNA dirigida por RNA).

RNA: RiboNucleic Acid (Ácido ribonucleico).

SAM: Shoot Apical Meristem (Meristemo apical del brote).

SCN: Stem Cell Niche (Nicho de células troncales).

siRNA: small interfering RNA (RNA pequeño interferente).

TrxG: Trithorax Group (Grupo Trithorax).

Ws: Wassilewskija. Ecotipo de *Arabidopsis thaliana*.

2. RESUMEN

La organogénesis en plantas, a diferencia de en animales, puede ocurrir durante toda su vida debido a la presencia de sus meristemas, los cuales contienen un nicho de células troncales (SCN) que funge como reservorio para la formación de los distintos tipos celulares que conforman a la planta. Como parte de los mecanismos involucrados en la formación, el desarrollo y el mantenimiento de los meristemas se encuentran los factores epigenéticos asociados a modificaciones postraduccionales de las proteínas histonas, en donde el complejo multiproteico El complejo epigenético Trithorax juega un papel fundamental en estos procesos. En *Arabidopsis*, la función de ATX1, una de las principales histonas metiltransferasas del complejo Trithorax, es importante para el mantenimiento del meristemo apical del brote (SAM), así como para el meristemo apical de la raíz (RAM). En la década pasada se postuló a la proteína ULT1 como un coactivador del complejo Trithorax, ya que interacciona físicamente con ATX1, modulando la expresión de genes importantes para el desarrollo del SAM. Debido a la relación funcional entre ULT1 y ATX1 en el mantenimiento del SAM, este trabajo se enfocó en investigar la función de ULT1 en el mantenimiento del RAM, y si esta función involucra a ATX1.

Los resultados muestran que ULT1 se expresa en el RAM, incluyendo el SCN, realizando una función tanto en su organización celular como en el mantenimiento de su identidad. Por el análisis de los fenotipos de dobles mutantes *ult1/atx1*, se determinó genéticamente que los fenotipos observados se deben a la acción independiente de cada proteína; es decir, mientras que ATX1 participa en el crecimiento de la raíz principal y la proliferación de las células meristemáticas del RAM, ULT1 participa en el mantenimiento de la identidad de las células iniciales de la columela y en la respuesta a auxinas. Aunque las mutantes de pérdida de función para cada una de estas proteínas muestran un aumento en la proliferación de las células del centro quiescente, los análisis genéticos en la doble mutante sugieren que sus funciones son independientes, contrario a lo que pasa en el SAM. Este trabajo establece a ULT1 como un nuevo componente involucrado en el mantenimiento del SCN del RAM, además de que propone que esta función es

independiente de ATX1, mostrando así que los mecanismos e interacciones a través de los cuales actúa ULT1 dependen del tejido y el programa de desarrollo.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Epigenética: Definición y función

En el año 350 a.c., Aristóteles en su libro *Περὶ ζῴων γενέσεως* (Generación de los animales) contradice a la escuela preformista diciendo que el desarrollo de los animales es un proceso gradual de materia no formada hacia materia orgánica guiada por algo que llamó “razón vital”, y que este no es un proceso en donde un animal durante su desarrollo temprano ya se encuentra preformado y sólo crece. Aunque este pensamiento ahora nos parece arcaico, realmente la noción de esta “epigénesis” gradual guiada por la ‘razón vital’ se puede retomar y extrapolar a lo que ahora entendemos como los procesos “pre-programados” del desarrollo embrionario, los cuales no son estáticos y se encuentran influenciados por factores como el medio ambiente. Hoy en día ya se sabe que el medio ambiente efectivamente tiene una influencia en el desarrollo embrionario, y no sólo eso, sino que la exposición a ciertas condiciones ambientales genera cambios epigenéticos que tienen consecuencias en la vida adulta del individuo, como es el aumento en la susceptibilidad a algunas enfermedades (Godfrey, Costello and Lillycrop 2015, Bollati and Baccarelli 2010). ¿A qué nos referimos cuando decimos cambios epigenéticos? El término “epigenética” fue generado por Conrad Waddington en 1942 (Waddington 2012), quien lo define como “la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos, generando un fenotipo en el individuo”. En esa época no se sabía que el DNA es la molécula portadora del material genético, y menos aún, que este se encontraba asociado a proteínas formando la cromatina, por lo que esta definición ha cambiado, pero en esencia es la misma. Aunque existen sutiles diferencias entre las definiciones de epigenética, por fines conceptuales prácticos definiremos a la epigenética como “los cambios estables en la expresión génica que pueden transmitirse de manera mitótica y/o meiótica, sin involucrar alteraciones en la secuencia del DNA” (Berger et al. 2009).

3.2 Mecanismos epigenéticos

En eucariontes el DNA se encuentra asociado a proteínas tipo histonas y proteínas no histonas formando la cromatina, de la cual se pueden distinguir principalmente dos conformaciones: Eucromatina y heterocromatina. La eucromatina se caracteriza por tener una conformación más relajada y se localiza en regiones con una transcripción alta, mientras que la heterocromatina presenta una conformación más compacta y se encuentra asociada a regiones en donde la transcripción se silencia dependiendo del contexto celular, para el caso de la heterocromatina facultativa, y a regiones pericentroméricas y teloméricas donde la transcripción está permanentemente silenciada (Bannister and Kouzarides 2011). Dentro de los diferentes mecanismos que hacen referencia a la regulación epigenética y que tienen un impacto en la conformación de la cromatina, se describen principalmente tres: Metilación del DNA, regulación por moléculas de RNA largos no codificantes (lncRNAs) y modificación de proteínas histonas (Goldberg, Allis and Bernstein 2007). La cantidad de información disponible sobre estos mecanismos es inmensa, pero debido a que en esta tesis sólo se aborda la regulación epigenética por modificación de proteínas histonas, los demás mecanismos se describirán de manera breve.

3.2.1 Metilación del DNA

La metilación del DNA es una modificación que corresponde a la adición de un grupo metilo (CH_3) en el carbono 5 de las citosinas, la cual está altamente conservada en plantas y animales. Esta modificación está asociada a represión transcripcional y se encuentra enriquecida principalmente en regiones heterocromáticas como en transposones, secuencias repetidas y en los centrómeros de los cromosomas (Moore, Le and Fan 2013). En mamíferos uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados asociados a metilación del DNA es la impronta genética y la inactivación del cromosoma X en hembras durante el desarrollo embrionario (Hellman and Chess 2007), en el cual se puede apreciar claramente un proceso de silenciamiento genético, estable, heredable y que no involucra un cambio en la secuencia del DNA, criterios que definen a la

epigenética. La metilación del DNA se lleva a cabo por enzimas denominadas DNA Metiltransferasas (Dnmts), las cuales usan S-Adenosil-L-metionina como donador del grupo metilo. Se han descrito dos tipos de Dnmts: las que producen metilación *de novo*, que metilan regiones que no se encontraban metiladas; y las de mantenimiento, que durante la replicación del DNA se encargan de metilar a la cadena hija en la misma región que la cadena madre.

En plantas, a diferencia de animales que sólo presentan metilación en contexto CG, la metilación del DNA puede ocurrir en todos los contextos, es decir en CG, CHG, CHH (en donde H significa cualquier nucleótido menos G). Al igual que en animales, su papel en la regulación transcripcional es de represión. Incluso, existe un mecanismo de metilación *de novo* exclusivo de plantas que involucra a las RNA polimerasas exclusivas de plantas IV y V, así como moléculas pequeñas de RNA (siRNAs). Este complejo mecanismo incluye muchas proteínas accesorias para la producción de siRNAs y su función en la deposición y propagación de metilación y se le denomina RdDM (RNA-directed DNA methylation). La metilación del DNA es un proceso reversible, ya que existe desmetilación mediada por enzimas (desmetilación activa), así como disminución en la metilación dada por los eventos de replicación (desmetilación pasiva), mostrando así el dinamismo de este proceso (Zhang, Lang and Zhu 2018). En *Arabidopsis thaliana* (de aquí en adelante *Arabidopsis*), cerca del 5% de los genes poseen metilación en sus promotores, por lo que no juega un papel muy importante en la regulación transcripcional en genes, fenómeno que se traduce en que la mayoría de las mutantes con baja metilación son lábiles y no presentan fenotipos tan severos (Matzke and Moshier 2014, Zhang et al. 2018); sin embargo en otras plantas con un mayor porcentaje de metilación, como el maíz, es de crucial importancia por lo que mutantes de pérdida de función incluso pueden ser letales (Lang et al. 2017). Se ha observado la función de la metilación en la impronta de ciertos genes en el desarrollo de la semilla, también asociada a la adaptación a distintos hábitats, así como en la respuesta hacia el estrés de tipo biótico como abiótico (López Sánchez et al. 2016). A pesar de que se ha visto que la maquinaria de RdDM está más activa en tejidos meristemáticos que en el hipocótilo o en hojas diferenciadas (Baubec et al. 2014, Kawakatsu et al. 2016), y que en el meristemo de la raíz las células

de la columela presentan mayores niveles de metilación que otras células (Kawakatsu et al. 2016), no se han observado fenotipos obvios en mutantes de RdDM en los meristemas de Arabidopsis. Sin embargo, en otros modelos como arroz y maíz se observan efectos fenotípicos muy evidentes (Wei et al. 2014, Erhard et al. 2009), sugiriendo que la metilación podría tener una función importante en la función meristemática aunque aún es desconocida.

3.2.2 RNAs largos no codificantes

Otro mecanismo de regulación epigenética es el relacionado a RNA largos no codificantes (lncRNA). Los lncRNAs son moléculas de RNA no traducidas de más de 200 nucleótidos, los cuales se pueden categorizar dependiendo de su origen, como son intrónicos, transcritos naturales antisentido (NAT), sobrepuestos (que se originan de regiones codificantes) y largos intergénicos (Rinn and Chang 2012). Los lncRNAs pueden tener un impacto en la expresión genética a través de modificaciones en la cromatina. El primer lncRNA descubierto a inicios de los 90 fue *X-inactive specific transcript (Xist)*, involucrado en la inactivación del cromosoma X a través del reclutamiento de los complejos represivos de Polycomb (PRC) 1 y 2, los cuales colocan las marcas de represión H2AK119Ub y H3K27me3 en las proteínas histonas para su represión transcripcional (Loda and Heard 2019). En plantas uno de los mecanismos de silenciamiento por lncRNA más descrito es el relacionado con el proceso de vernalización (el cuál consiste en la exposición a periodos prolongados de frío previos a la floración) en donde los lncRNAs *COOLAIR* y *COLD AIR* se encargan de reprimir la expresión del gen *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, un factor transcripcional que reprime la floración. *COOLAIR* es un lncRNA antisentido poliadenilado de *FLC* que se origina en el 3' del gen, cuya expresión se activa durante vernalización y su acumulación minimiza la expresión de *FLC*. Existe una relación entre el incremento de la poliadenilación de *COOLAIR* y la represión de *FLC*, además de que *COOLAIR* es capaz de inducir la desmetilación de la marca de activación transcripcional H3K4me2 en el gen (marca de activación transcripcional). *COLD AIR*, por otro lado, es un lncRNA codificado en sentido, a partir del primer intrón, cuya función es reprimir la expresión de *FLC*, y se propone que es a

través de la formación de un asa de cromatina en asociación con el complejo PRC2 (Kim and Sung 2017). Se ha determinado que *COLDAIR* regula la represión de *FLC* durante la vernalización, mientras que la acumulación de *COOLAIR* está más relacionada con el mantenimiento de una represión estable (revisado en Wang and Chekanova 2017). Otro ejemplo de lncRNAs en el desarrollo de plantas es el del lncRNA *auxin-regulated promoter loop (APOLO)* el cual se expresa 5 kb río arriba del gen *PINOID (PID)* y regula su expresión. El gen *APOLO* forma un asa de cromatina en el promotor de *PID* controlando su expresión, el cual está enriquecido con metilación de DNA y la proteína LIKE HETROCHROMATIN PROTEIN1 (LHP1). Cuando incrementa la concentración de auxinas, incrementa la desmetilación en esta región, el asa se deshace y facilita la transcripción de ambos genes, *APOLO* y *PID*. Posteriormente, la producción de siRNAs dada por la RNA pol IV/V ayuda a la metilación del locus de *APOLO* por el mecanismo de RdDM, mecanismo que junto con el reclutamiento de PRC1 por los lncRNA de *APOLO* ayudan a estabilizar el asa para reprimir de nuevo la transcripción de *PID* (Ariel et al. 2014). A pesar de que este es un mecanismo rápido, en donde no está muy claro si existe una transmisión mitótica de los cambios transcripcionales para que podamos considerarlo como regulación epigenética, nos muestran los posibles mecanismos que tienen los lncRNA para modificar la cromatina.

3.2.3 Modificaciones postraduccionales de las histonas

Otro mecanismo de regulación epigenética descrito es el mediado por la modificación postraducciona de proteínas histonas. Estas modificaciones se llevan a cabo principalmente en el N-terminal de las histonas, lo cual puede tener efectos en la interacción entre los nucleosomas y la estructura de la cromatina. Sin embargo, las modificaciones en las histonas no tienen un efecto en la transcripción por sí solas, sino que es su efecto radica en el reclutamiento de proteínas a estos *loci*, como pueden ser remodeladores de la cromatina, factores transcripcionales, así como la maquinaria de la transcripción. Existe una gran cantidad de modificaciones postraduccionales ya descritas de las cuales sólo se discutirán las más estudiadas.

La acetilación de histonas es una modificación postraduccional reversible efectuada sobre los residuos de lisina de manera antagónica por enzimas histonas acetil transferasas (HATs) e histonas desacetilasas (HDACs) (Bannister and Kouzarides 2011). Esta modificación tiene un efecto directo sobre la cromatina, ya que al reducir la carga positiva de las histonas interfiere con sus interacciones electroestáticas de las histonas y el DNA, lo cual tiene como consecuencia una relajación de la cromatina. La acetilación está asociada con eucromatina, y se da principalmente en regiones de enhancers y promotores. La acetilación puede ocurrir en numerosos sitios como H3K9, H3K14, H3K18, H4K5, H4K8 y H4K12, por nombrar algunos (Kouzarides 2007).

Por otro lado, la metilación en histonas es una modificación postraduccional que se da en los residuos de lisina y arginina. A diferencia de la acetilación, la metilación no tiene un impacto en las cargas electroestáticas de las histonas y se da en un gran número de residuos, entre los que tenemos H3K4, H3K27, H3K9, H3K20, entre otros. La metilación en los residuos de lisinas puede darse en tres contextos, mono, di y trimetilación, aumentando la complejidad en las posibles combinaciones de las modificaciones postraduccionales de las histonas. El efecto que tiene la metilación en la actividad transcripcional varía dependiendo del residuo y de la cantidad de grupos metilo depositados. Por ejemplo, la trimetilación en el residuo H3K4 (H3K4me3) está relacionada con actividad transcripcional, mientras que la trimetilación en el residuo H3K27 (H3K27me3) está asociada con represión transcripcional. Las enzimas responsables de la deposición de esta marca son las enzimas histonas metiltransferasas (HMT), las cuales tienen un dominio proteico denominado SET, que les confiere la actividad enzimática usando como donador de grupos metilo al compuesto S-adenosilmetionina. Al igual que la acetilación, la metilación es una modificación postraduccional reversible realizada por enzimas denominadas histonas desmetilasas (Bannister and Kouzarides 2011). Además de la metilación y la acetilación existen otros tipos de modificaciones como fosforilación, deiminación, β -N-acetylglucosaminación, ubiquitinación, sumoilación, entre otras (Bannister and Kouzarides 2011). Aumentando la complejidad al fenómeno, se sabe que existen interacciones entre las modificaciones postraduccionales de las histonas; por ejemplo: el efecto de una marca puede ser

antagónica sobre otra, como pasa con la H3K27me3 y la H3K27ac. La deposición de una marca puede promover la deposición de otra: la marca H2AK119ub puede estabilizar al complejo que coloca la H3K27me3. La combinación de diferentes marcas puede afectar la unión de distintas proteínas a un locus específico: la unión de la proteína HP1 a la marca H3K9me2/3 se inhibe por la marca de H3S10 (Zhang, Cooper and Brockdorff 2015, Tamburri et al. 2020).

El complejo multiproteico Trithorax (TrxG) está involucrado en la regulación epigenética por modificaciones postraduccionales de histonas en una gran cantidad de procesos del desarrollo, tanto en plantas como en animales. TrxG ejerce su función a través de la activación transcripcional de un gran número de genes y para entender más sobre su papel es importante conocer un poco sobre su historia, composición y mecanismos de acción.

3.3 El complejo TrxG: Descubrimiento, mecanismo y función

3.3.1 Descubrimiento y definición de TrxG

En los años 40, la Dr. Pamela Lewis describió en *Drosophila melanogaster* el primer gen correspondiente al complejo Polycomb (PcG), *Polycomb* (Lewis 1947). Décadas después, su esposo, el Dr. Ed Lewis, determinó que mutaciones en *Polycomb* provocaban una expresión ectópica de los genes homeóticos *Hox*, causando una transformación de los segmentos embrionarios anteriores en posteriores (Lewis 1978). Posteriormente, se encontraron otros genes que causaban fenotipos similares a los ocasionados por las mutaciones en *Polycomb*, describiendo así las primeras proteínas del complejo PcG. Años después se descubrió a la proteína Trithorax, estableciendo que actuaba como regulador de la expresión de genes *Hox* y que su ausencia causaba una transformación de los segmentos embrionarios posteriores en anteriores, efecto que antagoniza el efecto causado por la falta de las proteínas PcG (Ingham 1985). A raíz de este descubrimiento, las proteínas que antagonizan la función de PcG con respecto a la expresión de los genes *Hox* se clasificaron como proteínas TrxG. Con los años se

encontró que además de su función en la regulación de genes *Hox*, PcG y TrxG participan en múltiples procesos, como son la proliferación celular, diferenciación, memoria celular, impronta genética, mantenimiento de la troncalidad, senescencia, entre otros (Schuettengruber et al. 2011). A pesar de haber sido descritos en *Drosophila*, ambos complejos están altamente conservados en la evolución, encontrándose tanto en animales como en plantas.

3.3.2 Composición del complejo TrxG en plantas y sus homólogos en animales

TrxG es un complejo multiproteico cuya función principal es la de activar la transcripción, función antagónica a la del complejo represor PcG. TrxG está compuesto por diferentes tipos de proteínas, entre las que se encuentran enzimas de dominio SET que presentan actividad HMT, enzimas remodeladoras de la cromatina dependientes de ATP y otras proteínas asociadas (Tabla 1) (Sánchez et al. 2015). En la planta de *Arabidopsis* existen 47 enzimas SET, mientras que en humanos se han identificado 50; sin embargo, no todas las enzimas actúan como TrxG (Zhang and Ma 2012). Por análisis de secuencias se ha identificado a ATX1 (ARABIDOPSIS TRITHORAX 1) como el homólogo más cercano a la HMT de humano MLL y a Trx de *Drosophila* (Avramova 2009). Por eventos de multiplicación que ocurrieron antes de la divergencia entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, *Arabidopsis* generó cinco copias de ATX divididas en dos grupos: Uno que contiene a ATX1 y ATX2, y otro que incluye a ATX3, ATX4 y ATX5. *Arabidopsis* también cuenta con siete isoformas de ATXR (ARABIDOPSIS TRITHORAX RELATED); sin embargo, por cuestiones de homología, a la única que se le consideraba como un miembro de TrxG era ATXR7, ortóloga a SET1 en animales (Avramova 2009). En mamíferos existe otra proteína con dominio SET considerada como parte del complejo TrxG llamada ASH1L (Absent, small or homeotic discs1), de la cual *Arabidopsis* tiene cuatro homólogos cercanos denominados: ASHH1, ASHH2, ASHH3 y ASHH4; así como tres ASH1-related ASHR1, ASHR2, ASHR3 (Alvarez-Venegas 2010).

Además de las proteínas histonas metiltransferasas descritas anteriormente, *Arabidopsis* también cuenta con enzimas remodeladoras de la cromatina dependientes

de ATP. Las familias de remodeladores de la cromatina para el complejo TrxG incluyen a CHD, ISWI e INO80 (Poynter and Kadoch 2016). En Arabidopsis se encuentran dos homólogos a SWI/SNF llamados SYD (SPRAYED) y BRM (BRAHMA), y uno perteneciente a la familia de CHD llamado PKL (PICKLE) (Pu and Sung 2015). Por último, existe otra serie de proteínas que forman un complejo (que no pertenecen al grupo de las histonas metiltransferasas ni a remodeladores de la cromatina) denominado COMPASS (Complex Proteins Associated with Set1). Se les denomina COMPASS al complejo que se asocia con la HMT Set1, mientras que a los complejos que se asocian con otras HMT con dominio SET como es el caso de MLL1 en mamíferos, se les denomina COMPASS-like. A pesar de estas diferencias, se sabe que ambos complejos comparten un núcleo en común conformado por las proteínas WDR5, ASH2 y RbBP5 (Poynter and Kadoch 2016, Shilatifard 2008). En Arabidopsis ya se ha caracterizado un complejo COMPASS-like que contiene proteínas homólogas a las descritas en animales llamadas WDR5, ASH2R y RBL (Jiang et al. 2011). En plantas se tiene como un componente de TrxG a las proteínas ULT, las cuales no están presentes en animales y cuentan con un dominio de unión al DNA denominado SAND. A pesar de que en animales también existen proteínas con dominio SAND, ninguna de ellas forma parte del complejo TrxG (Nedelcu 2019), convirtiéndola en una proteína única en su tipo. Debido a la gran cantidad de proteínas del complejo TrxG descritas para mamíferos, en la Tabla 1 sólo se muestran las que están descritas para la planta modelo Arabidopsis y sus homólogos en mamíferos.

Clasificación	Nombre en mamíferos	Nombre en <i>Arabidopsis thaliana</i>	Función	Dominio proteico asociado	Referencia en Arabidopsis
Histona metiltransferasas	MLL1/2/3/4	ATX1	H3K4 HMT	SET	(Napsucialy-Mendivil et al. 2014) (Pien et al. 2008) (Chen et al. 2017, Saleh et al. 2008)
		ATX2/3/4/5	H3K4 HMT	SET	(Berr et al. 2009)

		ATXR3/SDG2	H3K4 HMT	SET	(Guo et al. 2010) (Yao et al. 2013)
	SET1 A/B	ATXR7	H3K4 HMT	SET	(Berr et al. 2009)
	ASH1L	ASHH2/SDG8	H3K36, H3K4 HMT	SET	(Yang, Howard and Dean 2014).
		ASHH1/SDG26	H3K36 HMT	SET	(Liu et al. 2016)
“Core” de COMPASS-Like	WDR5	WDR5a WDR5b	Unión a Histonas	WD40	(Jiang, Gu and He 2009)
	ASH2L	ASH2R	Unión al DNA	Dedo de Zinc	(Jiang et al. 2011)
	RBBP5	RBL	Unión a Histonas	WD40	(Jiang et al. 2011)
Remodeladores de la cromatina	BRM/BRG1	BRM SYD	Remodelador de cromatina dependiente de ATP	Bromodominio	(Farrona et al. 2011) (Kwon, Chen and Wagner 2005)
	CHD1	PKL	Remodelador de cromatina dependiente de ATP	CHD	(Aichinger et al. 2011)
Histona desmetilasas	UTX	ELF6 REF6 JMJ13	H3K27 desmetilasas	jmjC	(Yang, Howard and Dean 2016)
Proteínas con dominio SAND	-	ULT1/2	Coactivador de ATX1	SAND	(Carles et al. 2005) (Carles and Fletcher 2009) Este trabajo

Tabla 1. Componentes de TrxG en Arabidopsis

En mamíferos ya existe una gran cantidad de información bioquímica experimental que avala las interacciones proteicas en los complejos COMPASS y COMPASS-like (Shilatifard 2012); mientras que en plantas no existe suficiente información sobre la composición del complejo. Sólo se cuenta con información de interacciones genéticas y algunas interacciones proteína-proteína aisladas que ha permitido establecer patrones de interacción (Fletcher 2017). Esta falta de información en Arabidopsis ha complicado el conocimiento sobre las proteínas que conforman el complejo TrxG. Por ejemplo, se sabe que ATXR7 es el homólogo a SET1 (Berr et al. 2009), sin embargo, se desconoce si esta proteína interacciona con el complejo COMPASS, siendo ATX1 la única proteína

con dominio SET de la que se conoce que realmente interacciona con COMPASS (Jiang et al. 2009). Otro aspecto importante es que históricamente se consideró a las proteínas TrxG, como a aquellas que son capaces de revertir los fenotipos generados por la desregulación del complejo PcG sobre genes *Hox* (Schuettengruber et al. 2017).

En *Arabidopsis* existe una gran cantidad de proteínas que participan en la regulación de genes importantes para el desarrollo que, por falta de información, no es posible asegurar si forman parte del complejo TrxG. Por ejemplo, la proteína ATXR3/SDG2 que coloca la marca de H3K4me3 y es la principal HMT (la pérdida de función de esta proteína disminuye un 46.4% la marca de H3K4me3 a nivel genómico) (Guo et al. 2010, Chen et al. 2017) también es capaz de regular genes importantes para el desarrollo de la raíz (Yao et al. 2013), considerados como blancos de los remodeladores de la cromatina tipo PKL (Aichinger et al. 2011) y BRM (Yang et al. 2015). Debido a que no se ha descrito un efecto antagónico de ATXR3/SDG2 con el complejo PcG, ni una interacción con alguna proteína del complejo COMPASS, no es completamente certero asegurar que esta HMT funciona como un complejo TrxG, ya que por análisis filogenéticos no es considerada como homólogo a MLL1 o Set1 (Springer et al. 2003). Otro ejemplo de proteínas que podrían ser parte de TrxG en plantas es el de ALP1 (ANTAGONIST OF LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1), la cual antagoniza la función de PcG sobre algunos genes de floración, actuando como un componente de TrxG. Sin embargo, ALP1 no interactúa con miembros de TrxG, sino que se asocia con componentes de PcG, por lo que se propone que esta proteína antagoniza a PcG bloqueando su interacción con otros factores (Liang et al. 2015).

Hasta este punto cabe destacar que las características históricas que definen a una proteína TrxG, como son: su interacción con proteínas del complejo, el antagonismo con el complejo PcG y, para el caso de plantas, su homología con proteínas TrxG de mamíferos, parecen ser muy restrictivas. Por ello, vale la pena preguntarnos si realmente estos requisitos confieren una función TrxG. El caso de las proteínas como SDG2 que pueden colocar la marca de H3K4me3 pero no presentan interacción con proteínas del complejo TrxG, o de proteínas como ALP1 que puede contrarrestar la función de PcG pero sin interactuar con proteínas del complejo TrxG, son un ejemplo de proteínas que

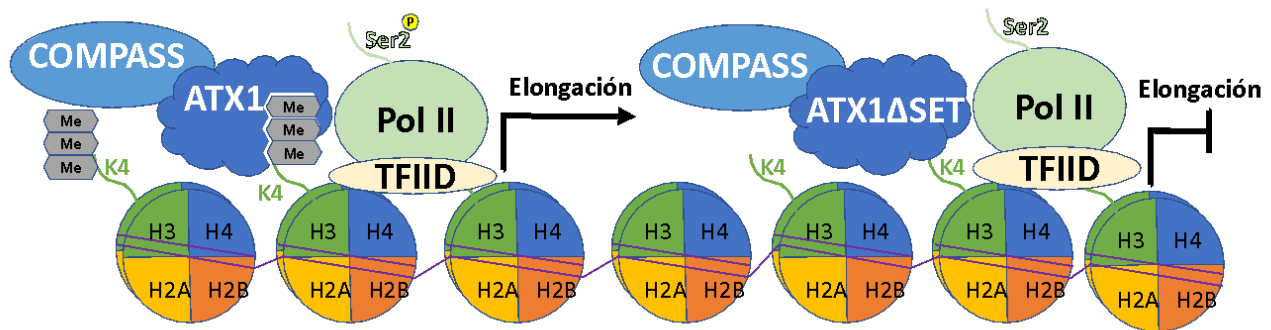
por no cumplir todos los requisitos no se han categorizado en TrxG. Es por eso, que actualmente se está llevando a cabo un cambio de paradigma en relación con las funciones y características que definen a una proteína TrxG o PcG.

3.3.3 Mecanismo de acción de TrxG en plantas

Como se mencionó, la función del complejo TrxG está relacionada con la regulación epigenética, principalmente a través de la modificación postraducciona de H3K4me3, la cual está estrechamente relacionada con activación transcripcional (Bannister and Kouzarides 2011). En plantas, la marca de H3K4me3 se enriquece en las regiones 5' de genes activos y existe una correlación positiva con la presencia de la RNA polimerasa II fosforilada en el residuo de la Ser5, una modificación que corresponde al inicio de la transcripción (Ding, Avramova and Fromm 2011, Ng et al. 2003). Se ha demostrado que la presencia del complejo COMPASS en *Arabidopsis* es necesaria para que el complejo de pre-iniciación de la transcripción (PIC) se una a los promotores regulados por ATX1. Los datos indican que la disminución de los niveles de expresión de los componentes WDR5a/b y ASH2R está asociada a una disminución en la acumulación de Pol II cargada en las regiones 5' del gen, así como en los niveles de TBP (TATA binding Protein) y H3K4me3 (Ding et al. 2012). Utilizando mutantes de ATX1 en el dominio SET demostraron que la actividad de ATX1 no es necesaria para que la Pol II, TBP y los componentes del complejo COMPASS se acumulen, pero sí lo es para llevar a cabo la fosforilación en el residuo de Ser2 en la Pol II, la cual es importante para la elongación transcripcional. Estos estudios indican que el complejo COMPASS/ATX1 sin actividad de HMT es necesario para el inicio de la transcripción, por lo que, en este caso, podría estar funcionando como andamio para posicionar el complejo de PIC. Por otra parte, se requiere de la actividad de HMT de ATX1 para la elongación transcripcional, denotando que es necesario el incremento en la H3K4me3 para este proceso (Ding et al. 2011). ATX1 puede interactuar a través de su C-terminal con la Ser5 fosforilada de la Pol II a ~300pb río arriba del inicio de la transcripción, lo que permite que ATX1 se acumule en este sitio antes de comenzar la elongación (Ding et al. 2011). Este modelo contrasta con lo reportado para mamíferos, en donde se ha observado que MLL1 también participa en

la formación del PIC de la transcripción, a través de la interacción entre la marca de H3K4me3 y el dominio PHD de la subunidad TAF3 de TFIID, por lo que, en este caso, para el posicionamiento del PIC es necesaria la actividad de HMT de MLL1 (Vermeulen et al. 2007). En mamíferos también se sabe que MLL1 interactúa con la Ser5 fosforilada, aunque se desconoce si esta interacción es directa (Milne et al. 2005). Arabidopsis no posee una subunidad TAF3, y el hecho de que ATX1 pueda reclutar al PIC en ausencia de una actividad H3K4me3 HMT implica que esta marca es dispensable para el reclutamiento de COMPASS (Figura 1).

a)



b)

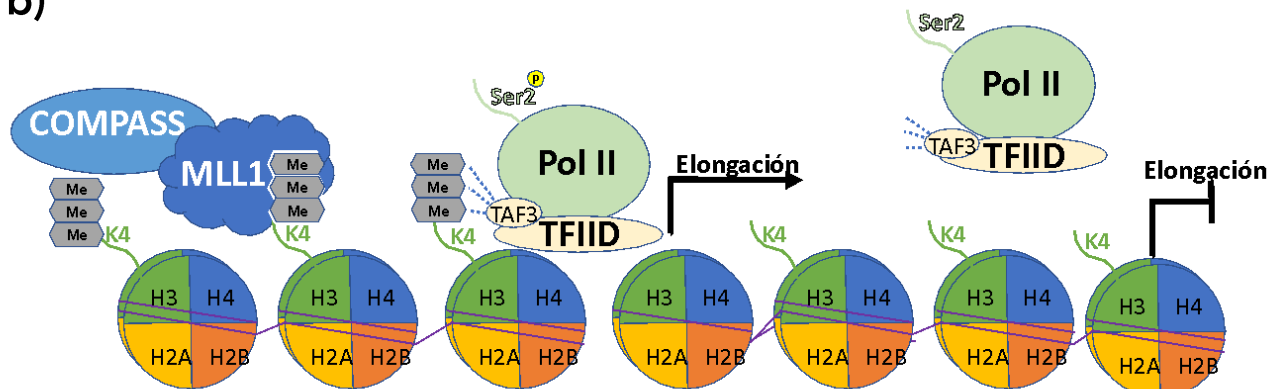


Figura 1. Modelo de cómo actúa TrxG en la elongación de la transcripción en plantas y mamíferos. a) ATX1 de Arabidopsis, con ayuda de COMPASS, coloca la marca de H3K4me3 la cuál promueve la fosforilación de Ser2 de Pol II y comienzo de la elongación. En ausencia del dominio catalítico SET (ATX1ΔSET) ATX1 no coloca su marca de H3K4me3 inhibiendo la elongación, pero aún así es capaz de reclutar a la Pol II. b) MLL1 en mamíferos, con ayuda de COMPASS, coloca la marca de H3K4me3, la cuál es reconocida por la subunidad TAF3 de TFIID para comenzar la elongación. En ausencia de la marca de H3K4me3 no comienza la elongación y tampoco se recluta la Pol II.

3.3.4 Función de TrxG en desarrollo, proliferación y diferenciación

Entre los muchos procesos en los que participa el complejo TrxG se encuentran el mantenimiento de las células troncales, proliferación y diferenciación celular (Schuettengruber et al. 2011). En *Drosophila* se descubrió que mutantes en *Trx* (el homólogo a *MLL1* de mamíferos y *ATX1* de *Arabidopsis*) presentaban cambios fenotípicos como la transformación de halterios a alas, transformación de las primeras patas a segundas, y transformación de los segmentos posteriores a más anteriores (Kennison and Tamkun 1988). En mamíferos la mutación de *MLL1* causa transformaciones homeóticas que se traducen en un desarrollo aberrante en el eje esquelético causado por un cambio en la expresión de genes *Hox* (Yu et al. 1998). En humanos se sabe que cambios en componentes de TrxG están involucrados en síndromes y procesos carcinogénicos. Se estima que el 10% de las leucemias humanas tienen una translocación, duplicación o amplificación en el locus de *MLL1* (Jude et al. 2007), y otras mutaciones en HMT como *MLL2* y *MLL3* se han asociado a diferentes tipos de cáncer (Rao and Dou 2015). También se ha descrito en humanos que existe un síndrome denominado CHARGE causado por mutaciones en el gen *CHD7*, el cual es un remodelador de la cromatina del complejo TrxG con un dominio CHD (Visser et al. 2004). La importancia de los factores TrxG en el desarrollo de mamíferos es tan relevante que muchos de los mutantes de pérdida de función de algunos componentes son letales embrionarios, como es el caso de *MLL1* (Glaser et al. 2009) y *ASH2L* (Stoller et al. 2010). En plantas, las mutaciones en componentes del complejo Trx no son letales, aunque sí pueden generar defectos en la embriogénesis como es el caso de *ASH2R*, en donde la mutante de pérdida de función presenta un arresto en el estado globular en poco menos del 30% de los embriones (Aquea et al. 2010). Existen inclusive mutantes cuádruples de *ATX1/3/4/5* que, a pesar de tener cambios en tamaño y tiempo de floración, son completamente viables (Chen et al. 2017). Esto nos indica que las plantas podrían tener mecanismos epigenéticos más plásticos que les permiten contender con la falta de algunos elementos del complejo TrxG. Sin embargo; se ha observado alteraciones en procesos de proliferación y diferenciación en meristemas en mutantes de pérdida de función de componentes TrxG en *Arabidopsis*. Esto denota su importancia en el

mantenimiento de las células troncales y en su diferenciación (Sánchez et al. 2015). Por ejemplo, los remodeladores de la cromatina BRM y SYD son importantes en el mantenimiento de la actividad celular del meristemo apical del brote (SAM) (Farrona et al. 2004, Kwon et al. 2005). Las histonas metiltransferasas ATX1 y SDG8 también participan en el desarrollo del SAM regulando genes relacionados con su diferenciación (Alvarez-Venegas et al. 2003, Grini et al. 2009), y cada vez existe más información que demuestra que componentes del complejo TrxG también participan en el desarrollo del meristemo apical de la raíz (RAM). Para comprender la función de TrxG en el RAM, es necesario conocer primero las características y los procesos celulares que ocurren en este, así como los componentes involucrados en su mantenimiento.

3.4 Desarrollo del RAM y su regulación

3.4.1 Función de TrxG en el RAM

En plantas, el SAM y el RAM son los dos meristemos principales. El SAM se encarga de dar origen a las estructuras aéreas, como son las hojas, las flores y el tallo, mientras que el RAM genera los tejidos que componen a la raíz (Gaillochet and Lohmann 2015). Ambos meristemos se establecen durante el desarrollo embrionario de la planta y en casi todos los casos se mantienen activos durante todo el ciclo de vida de la planta (ten Hove, Lu and Weijers 2015). Es en los meristemos donde se encuentran los nichos de células troncales (SCNs).

En *Arabidopsis* el RAM está localizado en la punta de la raíz y se caracteriza por su alta tasa de proliferación celular. El RAM, a su vez, se puede dividir en dos dominios (Figura 2a): el dominio de alta proliferación y el dominio de transición (Figura 2), en donde las células comienzan a elongarse, pero su tasa de división celular es más baja (Ivanov and Dubrovsky 2013). Por debajo del dominio de proliferación se encuentra el SCN, conformado por el centro organizador denominado centro quiescente (QC), éste a su vez se encuentra rodeado por un grupo de células troncales indiferenciadas, también llamadas iniciales, que al dividirse asimétricamente dan origen a los diferentes tipos celulares que componen el tejido de la raíz (van den Berg et al. 1997). Las células

iniciales del córtex y endodermis se encargan de dar origen a las células correspondientes a córtex y endodermis; las células iniciales de la columela (CIC) se dividen para dar origen a la columela; las células iniciales del haz vascular generan las células del tejido vascular y, por último, están las células iniciales que dan origen a la epidermis y la cofia lateral (Gaillochet and Lohmann 2015) (Figura 2b).

La organización del RAM requiere de un fino control que se encargue de regular los procesos de diferenciación, proliferación y mantenimiento de la troncalidad en el SCN de la raíz, y es el resultado de una gran red de componentes que involucran múltiples y diversos componentes, entre las que están ciertos factores transcripcionales, la señalización hormonal, factores de regulación epigenética, entre otros. La función de TrxG en los meristemos es particularmente relevante para entender como la epigenética regula procesos de proliferación, diferenciación, establecimiento y mantenimiento de las células troncales.

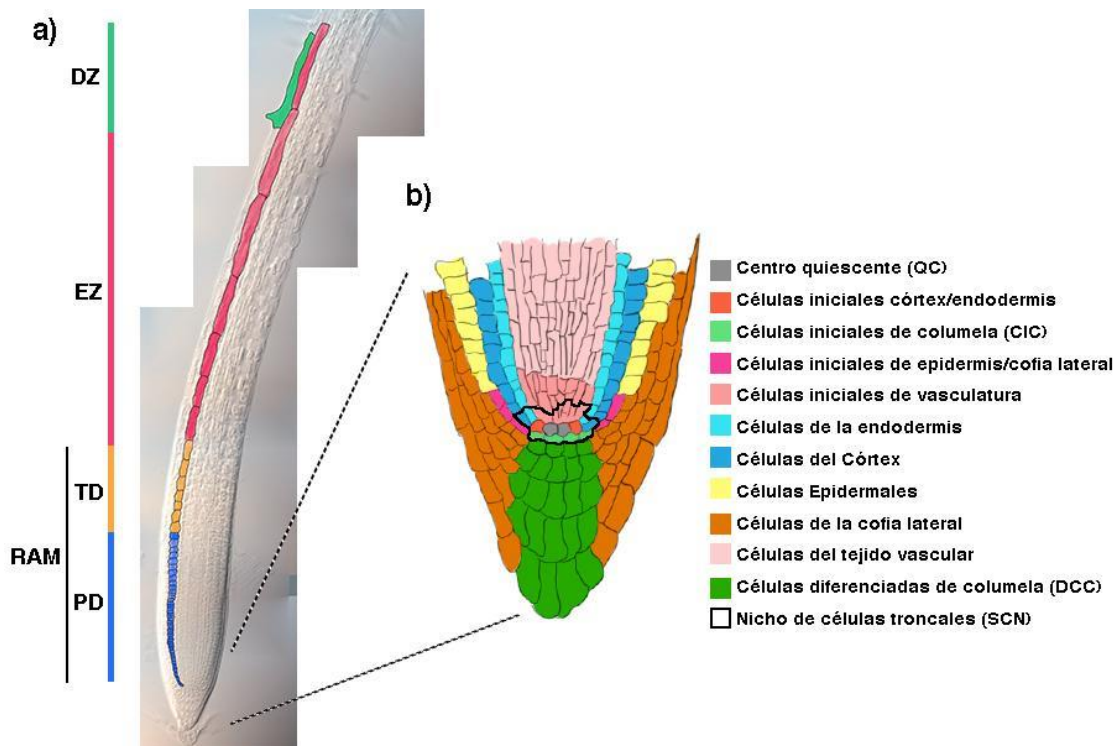


Figura 2. Arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. a) Fotografía de una raíz de *Arabidopsis* en donde se muestran resaltadas en diferentes colores las células del córtex para representar los distintos dominios y zonas que la componen. b) Caricatura realizada a partir de una fotografía de una punta de raíz de *Arabidopsis* en donde se muestran con diferentes colores los distintos tipos celulares que componen al nicho de células troncales del meristemo apical de la raíz. PD= Dominio de proliferación, TD= Dominio de transición, EZ= Zona de elongación, DZ= Zona de diferenciación, RAM= Meristemo apical de la raíz.

Mediante el estudio de mutantes de pérdida de función en *Arabidopsis* ha sido posible determinar que diferentes componentes del complejo TrxG son importantes en el desarrollo de los meristemas. Por el lado de los remodeladores de la cromatina dependientes de ATP en el RAM, se sabe que mutantes en la proteína PKL presentan una raíz más corta, así como un menor número de células meristemáticas, desorganización en el QC y una disminución del marcador de proliferación celular *CYCB1;1:GUS*, ciclina importante para el paso de fase G2 a M. Resulta interesante que los fenotipos de estas mutantes se revierten en la doble mutante de *PKL* y *CLF*, la principal HMT del complejo PcG, demostrando la función antagónica de los complejos TrxG y PcG (Aichinger et al. 2011). Otra proteína del complejo TrxG estudiada en el RAM es SDG2 que, como se mencionó anteriormente, es la HMT que más contribuye a la deposición de la marca H3K4me3 (Guo et al. 2010, Chen et al. 2017). Mutantes en este gen presentan una raíz corta, meristemo con menor número de células, desorganización en el QC, aumento en primordios de raíces laterales en estados tempranos de desarrollo, así como una disminución en la respuesta a la hormona auxina (Yao et al. 2013). El último factor epigenético del complejo TrxG descrito con una función en el RAM es ATX1, la otra HMT ampliamente estudiada. Mutantes de pérdida de función en *ATX1* presentan una raíz más corta, un meristemo con un menor número de células, desorganización en el QC, así como mayor número de primordios de raíces laterales (Napsucialy-Mendivil et al. 2014). En este trabajo se encontró que también existía una disminución en la *CYCB1;1*, y una expansión espacial en el dominio de expresión del gen *WOX5*, un gen marcador del QC. Para ATX1, también se tienen reportes de su función en el SAM, en donde participa en el mantenimiento del estado indiferenciado (Pien et al. 2008), así como en dar identidad a los órganos florales (Alvarez-Venegas et al. 2003). Las HMT ASHH2/SDG8 y ATXR7 también se han caracterizado como factores importantes para mantener el estado indiferenciado del meristemo, aunque estos reportes sólo se limitan al meristemo de parte aérea (Yang et al. 2014, Berr et al. 2009). Para los componentes del complejo COMPASS: WDR5, ASH2R y RBL (Jiang et al. 2009, Jiang et al. 2011) y el remodelador de la cromatina BRM (Farrona et al. 2011), se ha observado que contribuyen a mantener el estado indiferenciado del meristemo aéreo a través de la activación de *FLC*.

3.4.2 Otros Factores que regulan el RAM en Arabidopsis

Además de los factores epigenéticos, el mantenimiento del meristemo depende de una basta cantidad de factores (Drisch and Stahl 2015), de los cuales, para fines prácticos, sólo se mencionarán los más descritos. Uno de ellos es el factor transcripcional *WOX5* (*WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5*), el cual se expresa en el QC y es esencial para mantener el estado indiferenciado de estas células y de las células adyacentes (Sarkar et al. 2007, Kong et al. 2015). Recientemente se describió que a pesar de que *WOX5* sólo se expresa en el QC, el producto proteico puede transportarse hacia las CIC, en donde junto con el represor *TPR1* (*TOPLESS-RELATED 1*) y la histona desacetilasa *HDA19* reprimen la expresión de *CDF4*, un promotor de la diferenciación hacia células de columela (Pi et al. 2015), hablando así de un mecanismo de regulación celular no autónomo, es decir, que el efecto no está dado en las células donde se produce. También se tiene descrito que *WOX5* es capaz de unirse al promotor de *CYCD3;3* para reprimir su expresión y así evitar que se promuevan divisiones en el QC (Forzani et al. 2014). Otros componentes importantes en el mantenimiento del RAM son los factores de transcripción de la familia GRAS: *SHR* (*SHORTROOT*) y *SCR* (*SCARECROW*). *SHR* se transcribe a nivel transcripcional en la vasculatura y su proteína se transporta vía plasmodesma hacia endodermis y QC, mientras que *SCR* no se transporta y sólo se expresa en endodermis y QC (Koizumi & Gallagher, 2013). Se tiene reportado que *SCR* y *SHR* pueden interactuar físicamente y activar la expresión de la *CYCD6;1*, la cual es necesaria para la división asimétrica de la célula inicial de córtex y endodermis (Sozzani et al., 2010). Otros componentes esenciales en el desarrollo del meristemo de la raíz son los factores transcripcionales de la familia con dominio AP2: *PLETHORA* (*PLT*), de los cuales se ha descrito que 4 (*PLT1-4*) se expresan raíz (Galinha et al. 2007). Su expresión se observa desde etapas tempranas del desarrollo embrionario y su dominio de expresión se concentra en el RAM (Aida et al. 2004, Galinha et al. 2007). Los *PLTs* tienen redundancia funcional y son necesarios para el crecimiento de la raíz, la proliferación del meristemo, así como para el mantenimiento del SCN y la identidad del QC (Aida et al. 2004). Su función en el desarrollo de la raíz es tan importante que una sobreexpresión de *PLT2* pueden generar raíces ectópicas a partir del SAM; mientras que las cuádruples mutantes de los *PLTs* son incapaces de desarrollar raíces (Galinha et al. 2007).

En la diferenciación hacia células de columela se han descrito a los factores de transcripción con dominio NAC: SOMBRERO (SMB) y FEZ. Se tiene descrito que FEZ promueve las divisiones de la célula inicial de cofia lateral y epidermis, mientras que SMB reprime estas divisiones. En esta regulación existe un circuito de retroalimentación negativa, en donde FEZ promueve la expresión de *SMB*, y *SMB* a su vez reprime la expresión de *FEZ* (Willemsen et al. 2008). En el paso final de diferenciación normal de las células de columela, estas se desprenden de la raíz a través de un proceso de muerte celular programada; este desprendimiento esta regulado por los factores de transcripción *BEARSKIN1* y *2*, los cuales a su vez son regulados por *SMB* (Kamiya et al. 2016).

También se han descrito dos factores de transcripción (de la familia MADS-box) importantes en el mantenimiento del RAM en *Arabidopsis thaliana*: *AGL12/XAL1* (AGAMOUS-LIKE 12/XAANTAL1) Y *AGL14/XAL2* (AGAMOUS-LIKE14/XAANTAL2). A pesar de que ambos regulan el crecimiento de la raíz y la proliferación del meristemo, lo hacen por distintos mecanismos: Mientras que *XAL1* regula la expresión de algunos componentes del ciclo celular como *CYCB1;1* (García-Cruz et al. 2016), *XAL2* modula la distribución de las auxinas en el RAM a través de la regulación de los transportadores de eflujo *PIN1* y *PIN4* (Garay-Arroyo et al. 2013).

3.4.3 Regulación de las hormonas en el RAM

Además de los factores transcripcionales antes descritos, se sabe que las hormonas vegetales juegan un papel importante en el mantenimiento del RAM. Estas hormonas son moléculas producidas por las plantas que participan en una gran cantidad de procesos del desarrollo y respuestas a estímulos ambientales, ya que forman parte de una compleja red de regulación involucrando múltiples procesos de proliferación y diferenciación (Garay-Arroyo et al. 2012).

Las auxinas, son un grupo de hormonas involucradas en casi todas las etapas del desarrollo de la planta y en la formación de órganos (Teale, Paponov and Palme 2006). Mediante el sistema reportero *DR5:GUS*, (el cual contiene elementos de respuesta a

auxinas acoplados a la enzima glucoronidasa), y modelos computacionales, se ha descrito que existe un flujo de transporte continuo de esta hormona en el RAM con un pico máximo de respuesta en las células del QC, el cuál es necesario para mantener su estado indiferenciado (Di Mambro et al. 2017). También se ha descrito un circuito de regulación entre el represor de ARF (Factores de respuesta a auxinas), IAA17 (indole-3-acetic acid 17), y WOX5, en donde WOX5 ayuda a mantener el pico de respuesta a auxinas en el QC, mientras que IAA17 restringe la expresión espacial de WOX5 (Tian et al. 2014). Los factores PLT pueden controlar el patrón de distribución de los transportadores de eflujo de las auxinas llamados PIN de manera dosis dependiente (Galinha et al. 2007). Los patrones de auxinas se establecen durante la embriogénesis. Un ejemplo de su importancia es que mutantes en *ARF5* o *IAA12*, componentes de la vía de señalización de auxinas que establecen estos patrones, no generan hipófisis y por consiguiente tampoco la raíz primaria (Hamann et al. 2002).

Además de factores de transcripción, componentes de ciclo celular y hormonas, en la última década se descubrió a la proteína ULTRAPETALA1 (ULT1) como un nuevo componente en la red de regulación relacionada con los procesos de proliferación y diferenciación de los meristemas. A pesar de que originalmente se le describió como un miembro del complejo TrxG que participa en la diferenciación del SAM, cada vez existe más evidencia de su capacidad de interacción con diferentes proteínas lo cuál le confiere diferentes funciones dependiendo del contexto del desarrollo en el que actúe.

3.5 ULTRAPETALA1 y su papel en el desarrollo de Arabidopsis

3.5.1 Estructura y conservación de ULTRAPETALA1

ULT1 es una proteína exclusiva de plantas, encontrándose a su vez sólo en angiospermas (Figura 3). En su secuencia de aminoácidos posee un motivo B-box, el cuál se ha caracterizado que permite la interacción proteína-proteína (Torok and Etkin 2001). En arroz se ha visto que el motivo B-box es importante para que OsULT1 pueda

formar homodímeros (Roy et al. 2019). Igualmente contiene un dominio SAND (llamado así por Sp100, AIRE, NucP41/75, DEAF-1), el cuál tiene funciones de interacción con el DNA (Bottomley et al. 2001). Aunque ULT1 no se encuentra en organismos no pertenecientes a las angiospermas, el dominio SAND está presente en otras proteínas de muchos otros grupos de organismos, y generalmente se encuentra en combinación con otros dominios relacionados a interacciones con la cromatina y regulación transcripcional, además de cumplir funciones en el desarrollo (Nedelcu 2019). Por ejemplo, en el alga multicellular *Volvox carteri*, la proteína RegA está involucrada en la diferenciación de las células somáticas (Kirk et al. 1999); mientras que la proteína DEAF-1 (Deformed Epidermal Autoregulatory Factor-1) en *Drosophila melanogaster* es necesaria para su desarrollo embrionario (Veraksa, Kennison and McGinnis 2002), a su vez, su ortólogo en mamíferos participa en la diferenciación de células epiteliales mamarias (Barker et al. 2008). Como último ejemplo, la proteína AIRE, presente en mamíferos es importante para regular procesos autoinmunes en el timo (Abramson et al. 2010), además de que se ha determinado que puede unirse al residuo de H3K4 no metilado a través de su dominio PHD para modular la transcripción (Org et al. 2008).

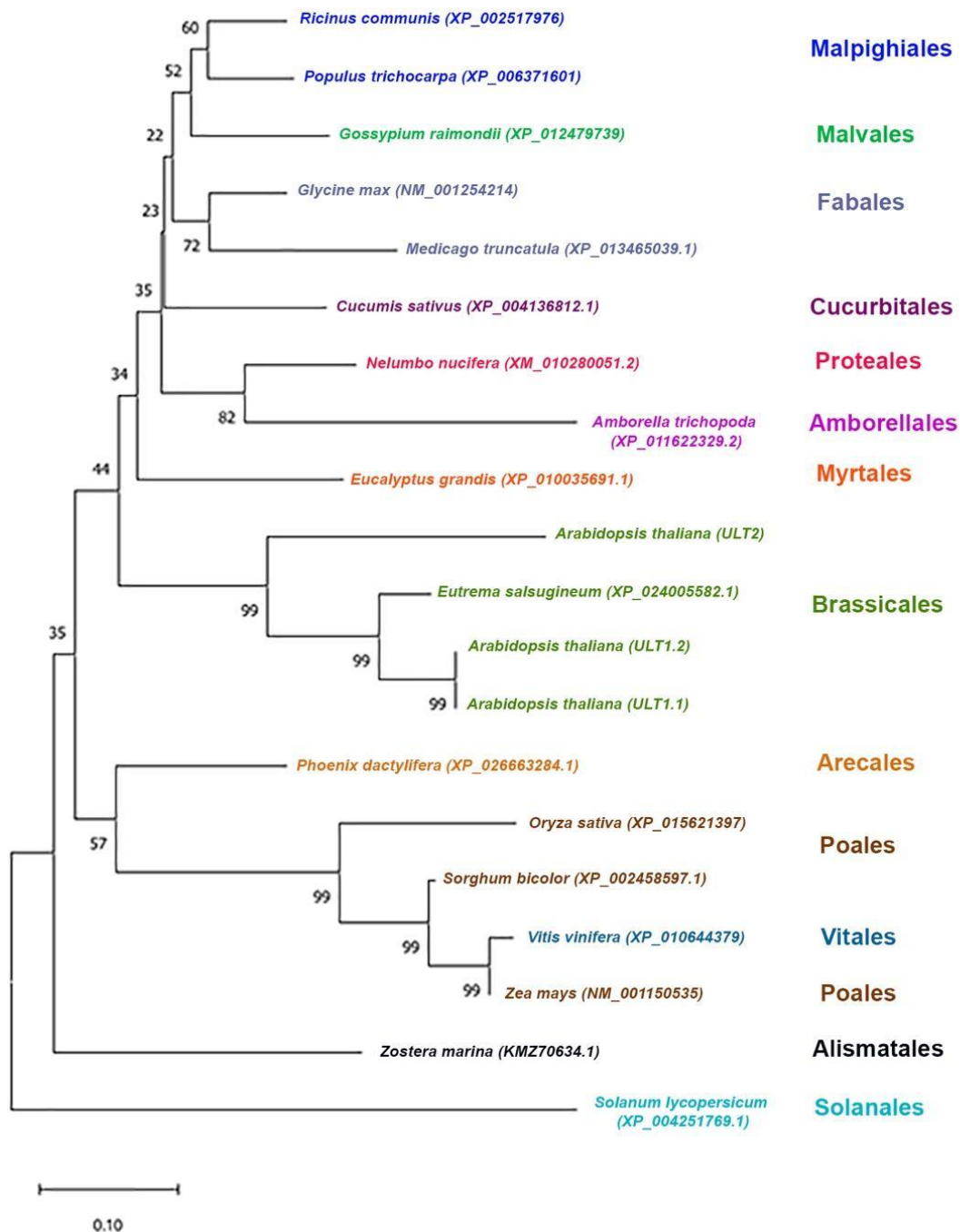


Figura 3. ULT1 en angiospermas. Filogenia de proteínas ULT1 de diferentes especies de angiospermas creado a partir de la secuencia de aminoácidos con el método de vecino más cercano, mostrando entre paréntesis los códigos de las proteínas utilizadas y del lado derecho la familia a la que pertenecen. Los números en la base de las ramas indican el bootstrap obtenido de 10000 muestreos. La escala representa 0.1 sustituciones por sitio. El árbol fue creado con el programa MEGA X.

3.5.2 ULT1 como un componente del complejo TrxG

ULT1 es una proteína que se describió por primera vez como un regulador en la diferenciación del SAM, ya que sus mutantes de pérdida de función presentan más órganos florales, como pétalos y sépalos (Fletcher 2001). Años después se descubrió que ULT1 era capaz de regular de manera positiva la expresión de algunos genes importantes para la floración, y que su expresión se restringía a los meristemas apicales desde el desarrollo embrionario (Carles et al. 2005). En la red de regulación de estos genes de floración ya se había descrito que CLF (una de las HMT del complejo PcG) y ATX1 ejercían un efecto en su transcripción de manera negativa y positiva, respectivamente (Schubert et al. 2006, Alvarez-Venegas et al. 2003). En el 2009 Carles y Fletcher descubrieron que ULT1 era capaz de revertir los fenotipos de floración temprana generados por las mutantes de la CLF, y que esto era debido a que tienen un efecto antagónico sobre la expresión de algunos genes de floración. En este trabajo también se descubrió que la proteína ULT1 interactúa físicamente con ATX1, y que su ausencia provoca una disminución de la marca de H3K4me3 y un aumento de la marca de H3K27me3. Lo interesante es que ULT1 sólo cuenta con un dominio tipo SAND de unión al DNA, pero no cuenta con un dominio de metilación de histonas; y a su vez ATX1, no cuenta con un dominio de unión al DNA, pero sí con un dominio SET de metilación de histonas, por lo que se propuso un modelo mediante el cual ULT1 podría estar reclutando a ATX1 sobre sus genes blanco para que pueda activarlos mediante la marca de la H3K4me3. Así funcionaría como un coactivador de ATX1 y a la vez como un anti-represor, ya que impide que CLF pueda colocar la marca de represión H3K27me3. Por análisis transcriptómicos se ha observado que cerca de una tercera parte de los genes que se expresan diferencialmente en la mutante de ULT1, así como tres cuartas partes de los genes diferencialmente expresados en una sobreexpresora de ULT1 son también regulados de manera opuesta por CLF, mostrando su función antagónica en regular la expresión génica (Tyler, Miller and Fletcher 2019). La interacción física con la HMT ATX1, la regulación antagónica con respecto a PcG y su influencia en las marcas de H3K4me3, son características que permitieron categorizar a ULT1 como un componente del complejo TrxG.

Arabidopsis contiene un parólogo a *ULT1* en su genoma: *ULT2*, el cuál puede interaccionar físicamente con *ULT1*, y por análisis genéticos se ha demostrado que tiene una función redundante con *ULT1* en la diferenciación del SAM, pero que su función no es dominante sobre la de *ULT1* ya que sólo es posible ver fenotipos de *ULT2* en mutantes de pérdida de función dobles (Monfared et al. 2013).

3.5.3 Otras funciones de *ULT1*

Además de su papel en la diferenciación del SAM en conjunto con *ATX1*, se han descrito otras interacciones y funciones para *ULT1*. En el desarrollo del gineceo, el establecimiento del patrón apico-basal y adaxial-abaxial está especificado por los factores de transcripción de tipo GARP KANADI (*KAN*), los cuales pueden interaccionar físicamente tanto con *ULT1* como con *ULT2*. En este sentido se demostró que *ULT1* actúa antagónicamente con *KAN1* en el establecimiento del eje adaxial-abaxial del gineceo, pero ambos actúan en conjunto para establecer el eje ápico-basal a través de la restricción en la expresión del factor transcripcional *SPATULA* (Pires et al. 2014). En hoja también se ha observado que *ULT1* y *KAN1* actúan antagónicamente en el establecimiento del eje adaxial-abaxial (Pires, Shemyakina and Fletcher 2015).

Otra función descrita de *ULT1* es la que tiene en conjunto con la proteína nombrada precisamente por su interacción: ULTRAPETALA INTERACTING FACTOR1 (*UIF1*). Como su nombre lo indica, este factor transcripcional de tipo MYB interactúa físicamente con *ULT1*, y por análisis genéticos y fenotípicos se demostró que participan en la misma vía de regulación. Este factor de transcripción puede unirse al promotor del gen *WUSCHEL*, un factor de transcripción encargado del mantenimiento del SAM, reprimiendo su transcripción. Esto sugiere que *ULT1* en conjunto con *UIF1* actúa como represor transcripcional de *WUS* (Moreau et al. 2016), contrastando con su función activadora en conjunto con *ATX1*, a través de la deposición de H3K4me3 (Carles and Fletcher 2009).

Otra función poco descrita de ULT1 es en la fertilización, ya que mutantes de pérdida de función tienen un aumento en la proporción de óvulos abortados, fenotipo que no se presenta en las mutantes de ULT2 pero que tampoco se exagera en las mutantes dobles, señalando que la redundancia entre ambas proteínas sólo se presenta en algunos contextos del desarrollo (Monfared and Fletcher 2014). Se ha demostrado por microarreglos que ULT1 puede regular una gran cantidad de genes relacionados con las vías del glicosinolato y glucosinolato implicadas en la respuesta al estrés biótico, actuando de manera negativa para genes involucrados en su biosíntesis y catálisis, mientras que CLF los regula de manera positiva, mostrando una vez más un antagonismo entre PcG y TrxG (Tyler et al. 2019). Aunque las funciones antes descritas no descartan la posibilidad de que se lleven a cabo a través de su interacción con ATX1, es importante mencionarlas ya que apunta a que ULT1 puede tener una participación en distintos procesos del desarrollo y que van más allá de su función como un Trithorax en el SAM.

Además de lo antes mencionado se ha descrito que ULT1 también interactúa físicamente con la proteína EMF1, la cual se ha descrito como un componente del complejo PRC1 de PcG (Xu et al. 2018). En este trabajo además se observó que la marca H3K27me3 depositada por PcG sobre algunos genes de desarrollo de semilla, disminuye en la mutante de EMF1. Sorprendentemente esta disminución se hace más pronunciada en la triple mutante *atx1/ult1/emf1*, sugiriendo que ULT1 puede interactuar con EMF1 y ATX1 en un complejo que ayuda a mantener la marca de H3K27me3 y el estado reprimido en ciertos genes, postulando que ULT1 puede tener funciones en la represión transcripcional (Xu et al. 2018). Por otro lado, se ha demostrado que el aumento en la expresión de una gran cantidad de genes y en la marca de H3K4me3 en el SAM, ocasionado por la ausencia de EMF1, se revierten en ausencia de ULT1 (Pu et al. 2013). Esto en conjunto sugiere que el papel antagónico o en conjunto de ULT1 y EMF1 depende de los genes blanco a los que estén regulando, o bien, aunque no este demostrado, por su interacción con otros componentes. Sin embargo, en ambos trabajos citados se reporta un aumento de la expresión de *FLC* en las mutantes sencillas de *EMF1* y *ULT1*, la cuál aumenta aún más en las mutantes dobles, reforzando una vez más la idea sobre el posible papel represor de ULT1.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha establecido que ULT1 regula la expresión de genes importantes en la homeostasis del SAM y que puede asociarse físicamente con ATX1, en donde realiza una función como parte del complejo TrxG. ATX1 también participa en procesos del desarrollo de la raíz, pero el papel de ULT1 en este tejido era desconocido. En este proyecto se planteó estudiar la función de ULT1 en el desarrollo de la raíz, así como su relación funcional con ATX1 en este tejido a través de análisis fenotípicos y genéticos de las mutantes respectivas. Este proyecto permitió generar herramientas que ayudaron a definir que la homeostasis del SAM y del RAM dependiente de la proteína ULT1 está regulada por mecanismos distintos.

5. HIPÓTESIS

ULT1 regula la expresión de genes con funciones importantes en la organización y el mantenimiento del RAM en *A. thaliana*.

6. OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar la función de la proteína ULT1 en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos particulares

- Estudiar la expresión de ULT1 en los diferentes tejidos de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.
- Describir los fenotipos observados en la raíz de plantas mutantes *ult1-3*.
- Determinar que los fenotipos observados en las plantas *ult1-3* se deben a la pérdida de función de *ULT1*.

- Definir mediante marcadores moleculares y expresión de genes clave, las características del SCN en el RAM de mutantes *ult1-3*.
- Evaluar la respuesta a auxinas en la raíz de mutantes *ult1-3* mediante el uso de marcadores moleculares.
- Caracterizar el estado proliferativo de las células del QC en mutantes *ult1-3*.
- Estudiar la relación funcional entre ULT1 y ATX1 en el RAM.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

7.1 Plantas utilizadas y condiciones de crecimiento

En este trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y mutantes para el gen de ULT1 pertenecientes a los ecotipos Col_0 (Columbia) y Ler (Landsberg *erecta*). Las plantas mutantes *ult1-3* en fondo Ler fueron donadas por la Dra. Fletcher (Carles and Fletcher 2009) de la universidad de Berkeley, California; mientras que las plantas mutantes *ult1-3* en fondo Col (SALK_074642 y SALK_074642C) y las plantas *atx1-3* (SALK_105214) se obtuvieron directo del stock center del TAIR (The Arabidopsis Information Resource) y fueron generadas mediante la integración de un T-DNA con *Agrobacterium* (Alonso et al. 2003).

Antes de germinar, las semillas se lavaron en agitación con una solución desinfectante (Hipoclorito de sodio 20%, Tween 0.01%) durante 15 minutos. Posteriormente las semillas se enjuagaron con agua bidestilada estéril y se colocaron en placas de plástico con medio MS (Murashigue y Skoog 0.2X, sacarosa 1%, agar 1%, pH 5.6). Las semillas se estratificaron por 48 horas a 4°C para sincronizar su germinación. Las cajas con semillas estratificadas se pasaron a una cámara de crecimiento con temperatura constante de 22 °C y ciclo de luz correspondiente a día largo (16 h luz y 8 h oscuridad). Las plantas que se utilizaron para amplificar semillas, genotipificar, realizar cruza y hacer transformaciones se pasaron a tierra estéril (Tierra Metro Mix 200) y se crecieron a una temperatura de 22°C en condiciones de día largo.

7.2 Genotipificación de las plantas mutantes *ult1-3*

- Extracción de DNA

Para poder genotipificar las diferentes plantas mutantes se extrajo DNA genómico a partir de tejido de hoja de $\sim 0.5\text{cm}^3$ de plantas de ~ 20 días. Este fragmento fue congelado utilizando nitrógeno líquido y se trituró hasta obtener un polvo fino, al cual se le agregó 700 μl de buffer de extracción (0.2 M Tris HCl, 0.025 M EDTA pH 8, 0.25 M NaCl y 0.5% SDS) y se dejó a temperatura ambiente durante 10 min agitando cada 3 minutos. Posteriormente se le agregó 700 μl de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), se agitó suavemente y se dejó 10 min a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 13000rpm durante 15 min, se tomó el sobrenadante, se le agregó 1 volumen de isopropanol mezclando por inversión y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente se centrifugó a 13000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el DNA precipitado con etanol al 70%. La muestra fue centrifugada a 13000rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante, se dejó secar el DNA y se resuspendió en 20 μl de agua libre de nucleasas. La muestra se guardó a -20°C hasta su utilización. La concentración y calidad final del DNA se determinó con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 para cada una de las muestras.

- Amplificación por PCR

Para identificar que las plantas *ult1-3* y *atx1-3* tuvieran la inserción de T-DNA en su genoma en homocigosis se realizó la siguiente estrategia: Se utilizaron oligos que flanquean la inserción del T-DNA, de tal manera que sólo para las plantas que no tuvieran la inserción, generarían un amplicón (Figura 4). Para identificar que la inserción de T-DNA estaba en la región correcta, se utilizaron oligos específicos para el gen de interés en conjunto con un oligo interno del T-DNA denominado LBC1. En este caso, sólo las plantas que tienen la inserción de T-DNA en su genoma son capaces de generar un amplicón. Los nombres de los oligos utilizados y su secuencia se muestra en la Tabla S1. Para determinar si la mutante *ult1-3* era nula; es decir, que no expresara el mRNA

de *ULT1*, se diseñaron oligos que específicamente fueran capaces de diferenciar transcritos de DNA genómico. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando una mezcla a concentración final de 1x PCR Buffer (Invitrogen), 1.5 mM Mg, 0.2 mM dNTPs, 0.2 mM de oligos y 1 U de Taq polimerasa. Las condiciones fueron 94°C 4 min y 30 ciclos de 94°C 30 seg, 55°C 30 seg y 72°C 1 min. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1% y teñidos con EpiQuik DNA Stain y observados en un fotodocumentador con una excitación de 520 nm.

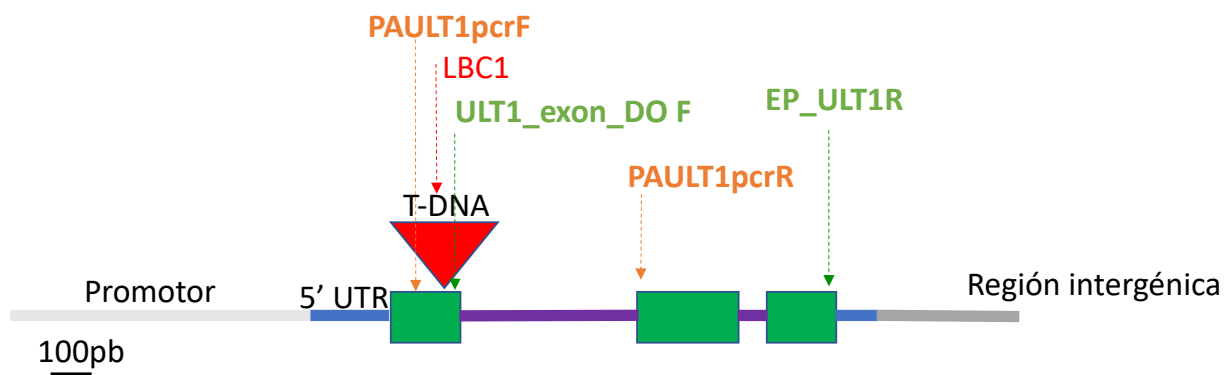


Figura 4. Esquema del gen *ULT1* y localización de los oligos utilizados en la caracterización de las plantas *ult1-3*. Los oligos PAULT1pcrF y LBC1 se utilizaron para amplificar el T-DNA dando un tamaño de 318pb; los oligos PAULT1pcrF y PAULT1pcrR para amplificar el gen endógeno con un tamaño de 662pb; los oligos ULT1_exon_DO_F y EP_ULT1R se utilizaron para amplificar el mRNA con un tamaño de 557pb.

7.3 Análisis morfológico de raíz

- Identificación de células de columela

Para realizar los análisis morfológicos de las células de columela en raíz se utilizaron plantas de 5 días de crecimiento post siembra (dps) en placas. Las raíces se tiñeron con lugol durante 2 min y posteriormente se montaron en un portaobjetos con una solución aclaradora (Hidrato de cloral 80%, glicerol 20%) e inmediatamente fueron observadas al microscopio de luz. Se tomaron fotos digitales a 40X desde la punta de la raíz utilizando un microscopio Olympus BX60.

- Pseudo-Schiff y caracterización del RAM

Para realizar las mediciones de cada una de las células que componen al RAM las raíces fueron tratadas con el método de Pseudo-Schiff yoduro de propidio (PS-IP), el cual nos proporciona un mayor contraste de la pared celular y mantiene la muestra fijada para futuras observaciones. Se utilizaron plantas de 5 dps, crecidas en placas con medio MS que posteriormente se fijaron en una solución de etanol 50% y ácido acético 10% durante un día a 4°C. Al día siguiente se lavaron las muestras 3 veces con agua destilada y se incubaron en ácido peryódico al 1% durante 40 minutos a 37°C. En seguida se lavaron las muestras con agua destilada y se incubaron en reactivo de Schiff (metabisulfito de sodio 100 mM, HCL 0.15 N) con una concentración de yoduro de propidio de 75 µg/ml a temperatura ambiente durante 2 horas. Las muestras se lavaron 3 veces con agua destilada y se dejaron en una solución hidratante de DMSO 2% y glicerol 30% durante 2 días. Finalmente, las muestras se montaron en portaobjetos con una solución de NaI 85% P/V, Na₂S₂O₃ 0.2% P/V en glicerol 65%. Se tomaron imágenes digitales a través de un microscopio de luz a 40x abarcando desde la punta de la raíz hasta las primeras 10 células del córtex arriba del primer pelo radicular. Las imágenes se guardaron en formato Tiff, y mediante el software Fiji se realizaron conteos y mediciones de cada célula del córtex. Los datos obtenidos se vaciaron con un software diseñado para determinar distintos parámetros del RAM (Pacheco-Escobedo et al. 2016).

- Cinética de crecimiento de raíz

Después del proceso de desinfección y estratificación, las placas de MS con semillas fueron colocadas en una cámara de crecimiento con una temperatura constante de 22°C y un fotoperiodo de día largo. Durante 12 días se marcó el crecimiento diario de la raíz principal directamente sobre la placa, y en el día 12 las placas fueron registradas utilizando un escáner para digitalizar las imágenes y analizarlas mediante el software Fiji.

7.4 Transformación de plantas con *Agrobacterium tumefaciens*

Se inoculó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene la construcción *pGWB4:pULT1:ULT1:GFP* (Petrone, 2016) en 3 ml de medio LB con una concentración de 50 µg/ml de Kanamicina y 100 µg/ml de Rifampicina y se incubó en agitación por 24 h a 30°C. Posteriormente el precultivo se vació en 200 ml de medio LB con 50 µg/ml de Kanamicina y 50 µg/ml de Rifampicina y se incubó por 24 hrs a 30 °C. Pasando las 24 hrs, el cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se resuspendió el pellet en una solución de sacarosa 5% y Silwet L-77. Para las transformaciones se seleccionaron plantas *Ler* y *Col* silvestres, así como plantas mutantes *ult1-3* en ambos fondos que tuvieran un escapo floral de, aproximadamente, 2 cm de longitud y que presentaran botones de flores cerrados. Las flores se sumergieron en la solución con *Agrobacterium* durante 90 segundos y se cubrieron de la luz durante 12 hrs. Las plantas fueron crecidas en una cámara con temperatura constante de 22°C y un fotoperiodo de día largo hasta obtener semillas. Las semillas se desinfectaron y se crecieron en un medio selectivo MS con una concentración de 40 µg/ml de Kanamicina para las plantas silvestres transformadas, mientras que para las plantas *ult1-3* transformadas se utilizó higromicina a 25 µg/ml. Finalmente las semillas resistentes a kanamicina e higromicina se seleccionaron y se crecieron en tierra para su posterior caracterización.

7.5 Cruzas de plantas *ult1-3* con plantas con reporteros

Se crecieron plantas *ult1-3* en placa de medio MS durante 10 días y posteriormente se pasaron a tierra. A la par se crecieron plantas *pSCR:GFP*, *pWOX5:GFP*, *DR5:GUS*, *J2341:GFP* y *Q1630:GFP* en placa de medio MS durante 10 días, para después ser pasadas a tierra. Para realizar las cruzas se tomaron flores inmaduras de plantas *ult1-3*, en las cuales aún no se han desarrollado por completo las anteras para evitar la autopolinización. Se les desprendieron los pétalos, sépalos y las anteras inmaduras, dejando solamente el pistilo. En seguida se tomó el polen de las plantas con los marcadores asociados a GFP y con éste se cubrió el estigma de las plantas *ult1-3*. Una vez que se desarrolló el fruto, se tomaron las semillas y se dejaron en bolsas de papel

durante una semana para que se secan completamente. Para los marcadores *Q1630:GFP*, *J2341:GFP* y *QC25:GUS* se realizó una cruce control con plantas WT fondo Col, debido a que estos marcadores se encuentran en el ecotipo Wassilewskija (WS). Las semillas producto de las cruces (T0) se crecieron en placas de medio MS y se tomaron a los 5 dps para observarse al microscopio de fluorescencia, en el caso de los marcadores con GFP, mientras que las cruces con el reportero GUS se analizaron como más adelante se describe. Las plantas positivas para los marcadores se crecieron en tierra hasta que generaron semillas (T1). La generación T1 se creció directamente en tierra. Una vez que desarrollaron hojas, se tomó una muestra y se extrajo DNA genómico utilizando el protocolo ya descrito para caracterizar la presencia de la inserción de T-DNA mediante PCR de punto final. Las plantas que resultaron heterocigotas u homocigotas se dejaron crecer hasta la obtención de semillas, las cuales corresponden a la generación T2. Las raíces fueron fotografiadas utilizando microscopia confocal Nikon Eclipse Ti-E para los reporteros acoplados a GFP. Los niveles de fluorescencia de GFP en el caso de *pWOX5:GFP* y *pSCR:GFP* se midieron utilizando la plataforma Fiji, midiendo la densidad integrada. A partir de los valores obtenidos se realizó un promedio para las plantas silvestres asignándoles el valor de 1 para obtener la intensidad de fluorescencia relativa.

7.6 Ensayos de GUS

Se crecieron plantas *DR5:GUS* y *QC25:GUS* en placas de medio MS 0.2X en agar durante 5 días. Posteriormente las muestras se retiraron y se colocaron en una solución de revelado de GUS (Na_3PO_4 50mM, Ferricianuro 2 mM, Ferrocianuro 2 mM, Tritón 0.1%, X-Gluc 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) durante 3 horas en obscuridad a 37°C. Una vez terminado el tiempo de revelado, las muestras se pasaron a ETOH 100% para parar la reacción; posteriormente, se lavaron con PBS 1X y se montaron en portaobjetos con una solución de PBS1X+Glicerol 65%. Posteriormente, se fotografiaron utilizando el microscopio Olympus BX60.

7.7 Ensayos de incorporación de Edu (5-Etinil-2'-desoxiuridina)

Se crecieron plantas en placas de medio MS en agar durante 4 días. Posteriormente, se traspasaron a MS líquido 0.2X suplementado con Edu a 10 μ M, y se incubaron durante 20 hrs a 22°C en agitación. Posteriormente, las muestras se retiraron del medio líquido y se fijaron en vacío con PFA (Paraformaldehído) al 3.7% durante 15 min. Se retiró la solución de PFA y se lavaron las muestras con PBS (Phosphate-buffered saline) 1X + BSA (Bovine Serum Albumin) 3% dos veces durante 10 min y dos veces más con PBS 1X durante 10 min. Inmediatamente después, las muestras se montaron en portaobjetos cargados Superfrost™ (ThermoFisher) y se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, las muestras se rehidrataron con MTBS (Microtubules stabilizing buffer) 1X durante 15 min. Se retiró la solución del portaobjeto y se permeabilizó la muestra con una solución de PBS 1X+BSA 3%+tritón 0.5% durante 20 min en agitación suave. Se removió la solución de permeabilización y se realizaron 2 lavados con PBS 1X+BSA 3% por 5 min y 10 lavados más con PBS 1X por 5 min. Posteriormente se agregó la solución de revelado Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 555 (ThermoFisher), de acuerdo con las condiciones del fabricante, durante 30 min. Pasado el tiempo de revelado se lavó la muestra con PBS 1X +BSA 3% durante 5 min y con PBS 1X 2 veces más durante 5 min. Se retiró la solución de lavado y se realizó el montaje con una solución antifade de Mowiol. Inmediatamente después, las muestras se fotografiaron utilizando un microscopio confocal Nikon Eclipse TiE.

7.8 Tratamientos con auxinas

Se crecieron plantas en placas de medio MS en agar durante 5 días y posteriormente fueron transferidas a medio MS líquido con ácido 3 Indolacetico (IAA) 200 nM o ácido 1-naftalenacético (NAA) 500 nM dependiendo del experimento. Se incubaron durante 12 hrs y, posteriormente, se revelaron con solución de GUS, como se describió anteriormente.

7.9 Extracción de RNA y qPCRs

Para los experimentos de expresión de genes relacionados a QC se tomaron aproximadamente 0.5 cm de la punta de raíz, mientras que para los genes restantes se tomó la raíz completa de, aproximadamente, 240 plantas, las cuales se guardaron en tubos eppendorf de 1.5ml, para su congelación en nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se trituraron con un mortero estéril hasta obtener un polvo fino. La extracción de RNA se llevó a cabo con el kit *Quick-RNA*TM MiniPrep de ZYMO Research bajo el protocolo sugerido por el fabricante. El RNA se corrió en geles desnaturalizantes de MOPS 1%, Formaldehído 6% y se calibró partiendo de una concentración de 200ng, los cuales se cuantificaron con NANODROP 2000. Una vez calibradas las muestras de RNA, se tomó 1µg de cada muestra y se realizó una retrotranscripción utilizando el kit SuperScriptTMIII Reverse Transcriptase de la compañía Invitrogen, siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su utilización. Las qPCRs se realizaron utilizando MaximaTM SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) de Thermo ScientificTM bajo las instrucciones del fabricante en un termociclador StepOneTM. Los valores CT se calcularon usando el algoritmo Miner (Zhao & Fernald, 2005). La expresión relativa fue calculada con el método de $E^{-\Delta\Delta CT}$ (donde E es la eficiencia de cada oligo calculada con el software Miner (Rao et al. 2013) usando tres réplicas biológicas con un duplicado técnico considerando a RNAH (AT1G58050) y TIP41 (AT4G34270) como genes de referencia.

8. RESULTADOS

8. 1 Genotipificación de las mutantes *ult1-3*

Para la realización de este trabajo, se usaron plantas mutantes de pérdida de función para el gen de *ULT1*, generadas a partir de una inserción de T-DNA. Se usaron las plantas *ult1-3* en el fondo *Ler* (*ult1-3*^{L_{er}}) y su respectiva planta silvestre (WT^{L_{er}}). Así como mutantes *ult1-3* en el fondo *Col*, que fueron nombradas simplemente *ult1-3* para diferenciarlas de las mutantes del fondo *Ler*; en tanto que sus respectivas plantas

silvestres fueron nombradas como WT. Cabe mencionar que las mutantes *ult1-3^{Ler}* se obtuvieron por una serie de tres retrogresiones de *ult1-3* en plantas del fondo *Ler* (Carles et al. 2004), por lo tanto, ambas líneas tienen el mismo alelo mutado, pero en diferente fondo genético. Por ello, primero se comprobó que la inserción de T-DNA estuviera presente en el gen *ULT1* y que estuviera en homocigosis. Para tal fin se realizaron reacciones de PCR con oligos que amplifican el alelo endógeno y la inserción de T-DNA. En la Figura 5 a se muestra un gel representativo resultado de una PCR donde se observa que las plantas WT y WT^{Ler}, sólo tienen el gen endógeno (End), mientras que las plantas mutantes *ult1-3* y *ult1-3^{Ler}* sólo tiene un producto de PCR que corresponde a la inserción de T-DNA, comprobando que ambas plantas mutantes tienen la inserción en homocigosis.

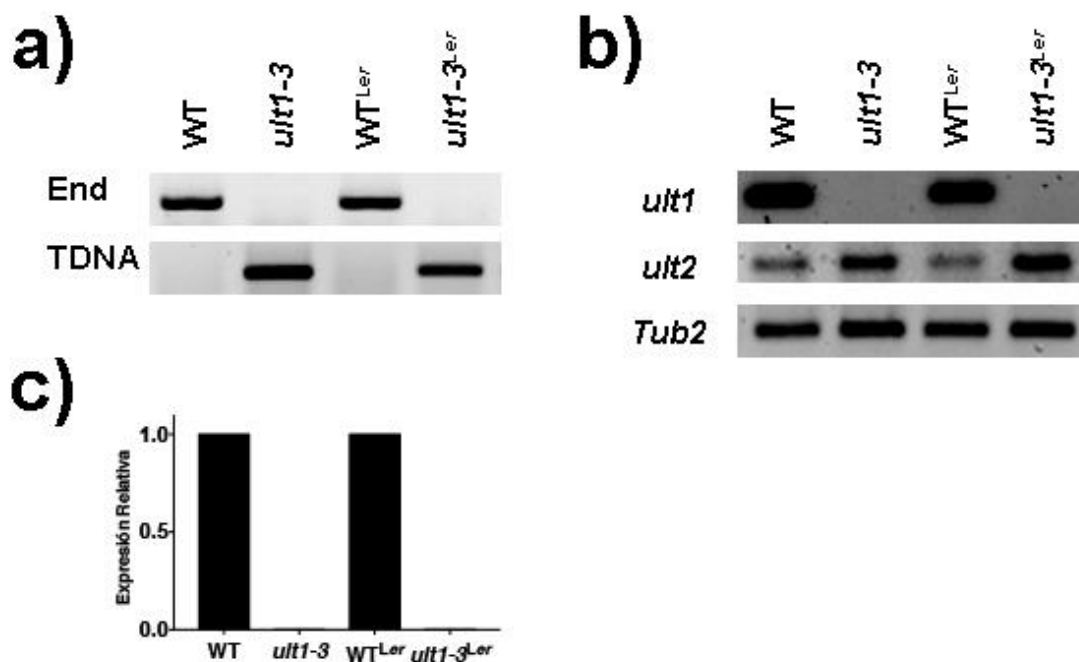


Figura 5. Caracterización de plantas *ult1-3* en fondo *Ler* y *Col*. a) Amplificación por PCR del gen endógeno (End) y la inserción de T-DNA (T-DNA) utilizando DNA genómico de plantas silvestres y mutantes en los fondos *Col* y *Ler*. Amplificación por PCR semicuantitativa de un fragmento del cDNA de b) *ULT1* *ULT2* en plantas silvestres y mutantes en los fondos *Col* y *Ler*, utilizando al gen de *TUBULINA2* (*Tub2*) como control de carga. c) Expresión relativa de *ULT1* en plantas WT y mutantes en ambos fondos calculada mediante qPCR.

Para comprobar que la inserción del T-DNA provoca una pérdida en la expresión del gen *ULT1*, se realizó una PCR semi-cuantitativa utilizando como templado cDNA de raíces de plantas de 5 dps. El ensayo se realizó para WT y WT^{Ler} y para las mutantes *ult1-3* y *ult1-3*^{Ler}. En la Figura 5b se observa que solamente las muestras correspondientes a las plantas silvestres amplificaron un fragmento del cDNA de *ULT1*. El mismo resultado se obtuvo mediante una PCR cuantitativa (Figura 5c). Estos resultados indican que las plantas *ult1-3*, efectivamente, son de pérdida de función en ambos fondos. En los siguientes experimentos se decidió trabajar solamente con el fondo Col debido a que muchos de los marcadores celulares disponibles se encuentran en este fondo, evitando posibles artefactos ocasionados por el uso de híbridos. Durante estos experimentos también se realizó la identificación del gen parálogo *ULT2* en plantas mutantes y WT, encontrando que *ULT2* se expresa en raíz, y que su expresión persiste en los fondos mutantes *ult1-3*, incluso parece que su expresión aumenta un poco en los alelos mutantes con respecto al WT, tanto en el fondo Col como en el fondo *Ler* (Figura 5b).

Previo a la caracterización de la expresión de *ULT1* en los fondos mutantes, se probaron diferentes combinaciones de oligos con lo cual se pudo determinar la presencia de otros RNAs que no corresponden al RNA mensajero del gen de *ULT1* (Figura 6).

Existe un RNA en el gen *ULT1* que se desregula en *ult1-3*

a)

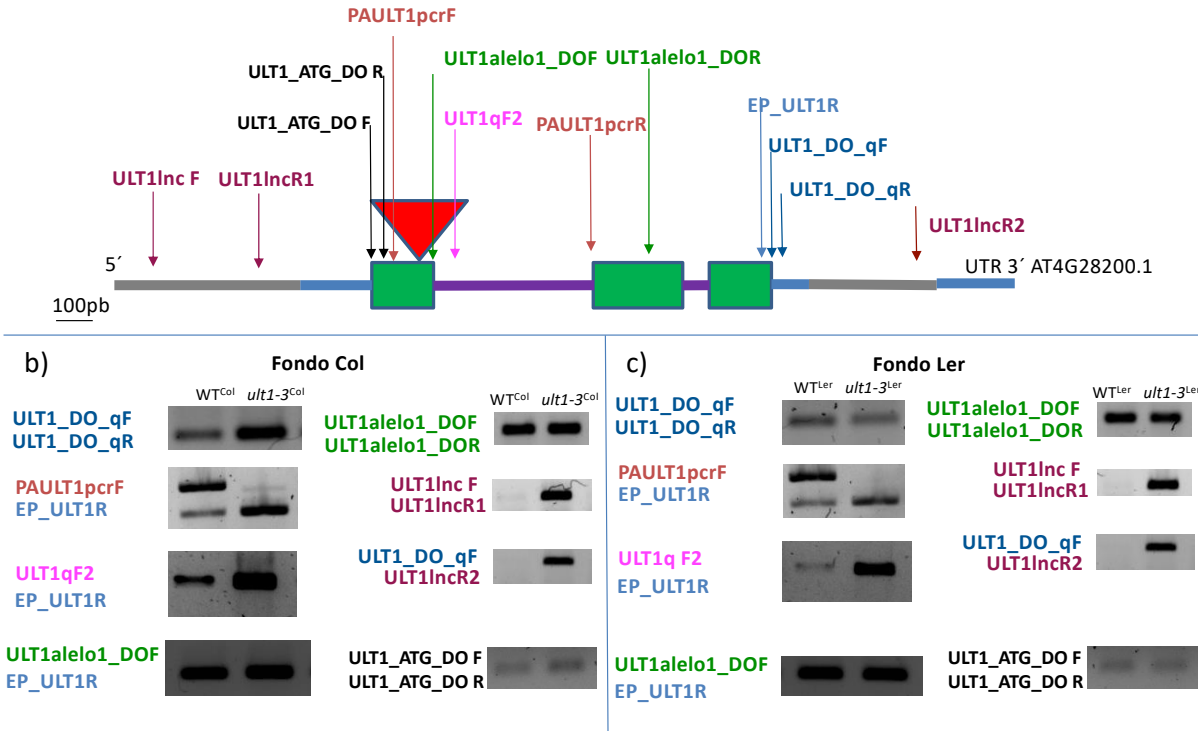


Figura 6. RNA no codificante en el locus de *ULT1*. A) Esquema del gen *ULT1* con las posiciones de los oligos utilizados para su caracterización. Fotos de geles de agarosa con productos de PCR de punto final con diferentes combinaciones de oligos en b) Muestras de plantas Col y c) de plantas Ler. Todas las PCRs se realizaron a partir de cDNA de raíces de 5dps.

Lo primero que se detectó fue una amplificación usando los oligos *ULT1_DO_qF* y *ULT1_DO_qR*, observando un enriquecimiento en las plantas mutantes respecto a las WT de ambos fondos genéticos (Figura 6b, c). Esto resultó contradictorio, ya que se trataba de una mutante, en donde la inserción no permitiría la obtención de este amplicón en las condiciones usadas, puesto que este par de oligos no flanquea ningún intrón. Este resultado no permitía determinar si se trataba de una mutante de pérdida de función o si el amplicón correspondía a otras especies de RNA diferentes al mRNA de *ULT1*. Utilizando los oligos *ULT1qF2* y *EP_ULT1R* se detectó un RNA que se amplificaba a partir del primer intrón y que se extendía hasta el último exón, y que mostró mayores niveles de acumulación en el fondo mutante. A su vez, PCRs con las combinaciones de los oligos *ULT1IncF* y *ULT1IncR*, localizados en la región 5'UTR del gen, mostraron que una especie de RNA contenía la región 5'UTR de *ULT1*, mientras que cuando se usaban los oligos *ULT1_DO_qF* y *ULT1IncR2*, localizados en la región 3'UTR de *ULT1*, también

se detectaba un RNA. Estas especies de RNA sólo se encontraron en los mutantes (Figura 6b, c). Cabe mencionar que para estos ensayos se comprobó que el RNA aislado no contenía contaminación de DNA genómico (Figura S1). Con estos datos pudimos determinar que existe un RNA que se expresa a partir del gen de *ULT1* y que no corresponde con su mRNA, el cuál se transcribe tomando el intrón del gen hasta su último exón. Otro aspecto interesante es que el enriquecimiento de este RNA aumenta en los fondos mutantes, e incluso algunas moléculas de RNA, solo se transcriben en los fondos mutantes. Esto sugiere que la presencia del T-DNA puede tener efectos no sólo abatiendo la expresión del gen endógeno *ULT1*, sino que también puede promover la expresión de otros RNAs e incluso provocar una expresión de RNAs que de manera silvestre no se expresan. Debido a que estos experimentos se realizaron tanto para el fondo Col como para el fondo Ler, se puede observar que este comportamiento no es un artefacto producto del fondo genético; sin embargo, con estos ensayos no es posible determinar si se trata de diferentes especies de RNA o si todas corresponden a una sola molécula, así como tampoco su longitud, y más importante aún, si estas especies tienen alguna función endógena en la planta o si interfieren con la función de *ULT1*.

8.2 Patrón de Expresión de *ULT1* en la raíz de *Arabidopsis*

Para determinar el patrón de expresión de *ULT1* en la raíz, se transformaron plantas WT con la construcción *pULT1:ULT1:GFP* en el plásmido *PGWB4*, el cual contiene el gen completo con sus dos intrones y sus tres exones, con una región promotora de 1295 pb río arriba del inicio de la transcripción. Se decidió usar esta construcción ya que permitía observar por microscopia confocal la localización espacial de la proteína *in vivo* bajo su propio promotor. Las plantas generadas con esta construcción mostraron que la localización de la proteína *ULT1* podría ser nuclear, con cierta proporción también localizada en el citosol (Figura 7). En la raíz, se expresa en el RAM (Figura 7a), en donde su expresión es menor en el haz vascular, comparada con la observada en la endodermis, córtex y epidermis (Figura 7a, c). También se puede apreciar que *ULT1* presenta un gradiente de expresión que disminuye conforme se aleja del dominio de alta proliferación, y que esta expresión se ve concentrada en círculos en el centro de las

células (Figura 7a, b). En la zona de diferenciación, ULT1 se expresa en las células del córtex y endodermis (Figura 7d). En el SCN, ULT1 se expresa en el QC, en las células iniciales del haz vascular, en las células iniciales de córtex/endodermis, y en las células iniciales de columela, pero de manera interesante, ULT1 no se expresa en las células de columela ya diferenciadas (Figura 7b).

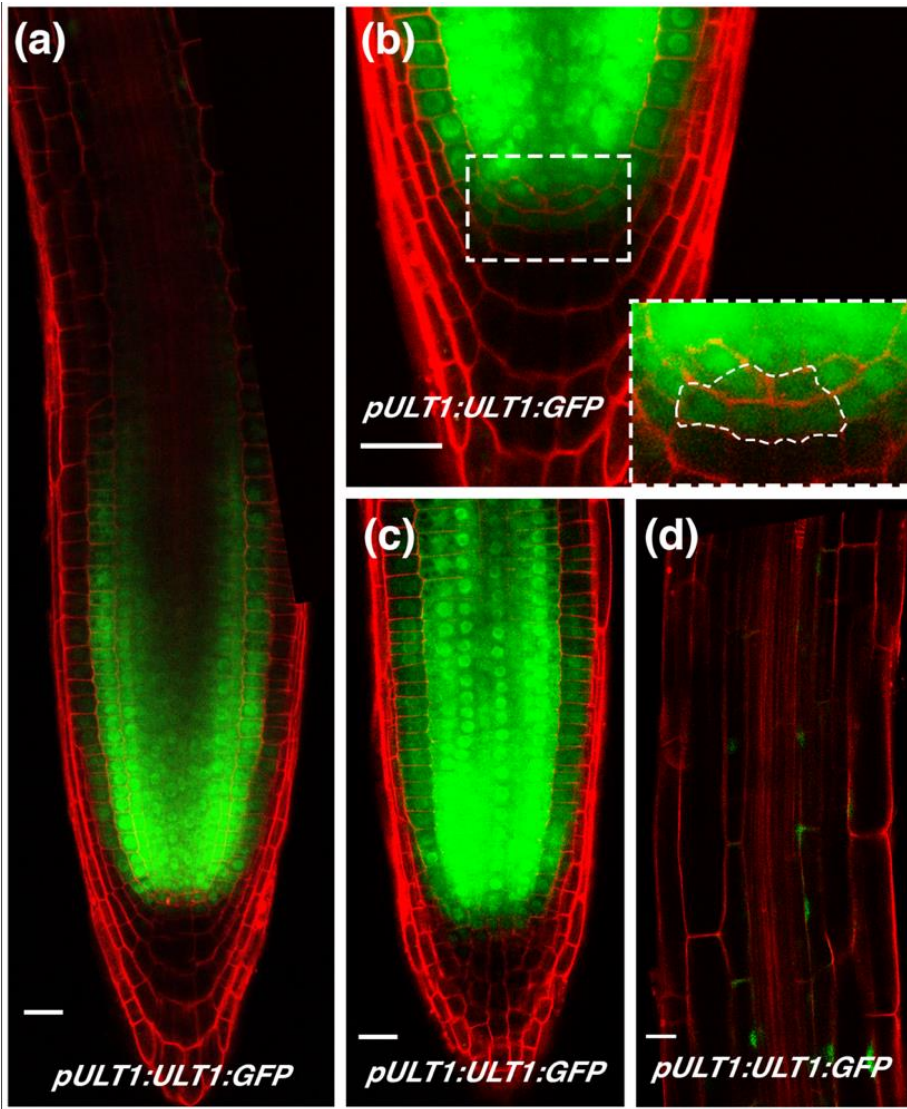


Figura 7. Expresión de ULT1 en raíz. Fotos de raíces *pULT1:ULT1:GFP* de 5dps teñidas con yoduro de propidio y tomadas con microscopía confocal. (a) Expresión de ULT1 en un plano medio del RAM; (b) Expresión de ULT1, en donde se marca el QC y las células iniciales de columela; (c) Expresión de ULT1 en un plano exterior de la raíz; (d) Expresión de ULT1 en plano medio de una zona ya diferenciada. Las barras blancas representan 20μM.

8.3 Fenotipo de la mutante *ult1-3* en la raíz de *Arabidopsis*

- Longitud total de la raíz primaria en *ult1-3*

Para la caracterización de los fenotipos de *ult1-3* se realizaron dos experimentos independientes, en donde se colocaron 32 semillas de WT y 32 semillas de *ult1-3* en placas con medio MS para seguir su crecimiento durante 12 días. No se encontraron diferencias significativas en el tamaño total de la raíz a lo largo de 12 días de crecimiento entre las plantas mutantes *ult1-3* y las plantas WT (Figura 8a, b). Esto concuerda con lo observado en el fondo Ler previamente reportado por Petrone en el 2016 (Datos publicados en Tesis), en donde no encontró diferencias en los tamaños totales de la raíz (Figura 9a, b).

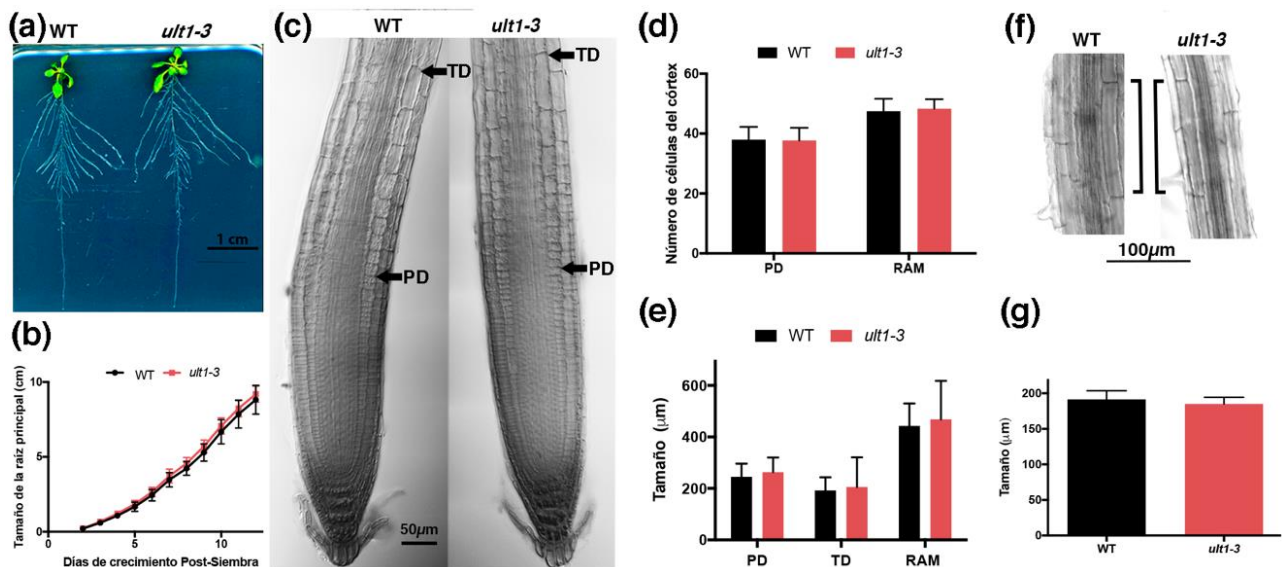


Figura 8. La mutación en *ULT1* no afecta el tamaño de raíz ni el tamaño del RAM. (a) Imagen representativa de raíces WT y *ult1-3* de 12dps. (b) Cinética de crecimiento de la raíz principal de plantas WT y *ult1-3* durante 12 días (n≥80). (c) Imagen representativa tomada con microscopia de campo claro de raíces de plantas WT y *ult1-3* de 5dps tratadas con PS-IP. (d) Número de células corticales del RAM de raíces de plantas WT y *ult1-3* de 5dps (n≥25). (e) Longitud de los dos diferentes dominios que componen al RAM de raíces de plantas WT y *ult1-3* de 5dps (n≥25). (f) Imágenes representativas de células corticales completamente elongadas de raíces de plantas WT y *ult1-3* de 5dps. (g) Tamaño de la célula cortical completamente elongada de raíces de plantas WT y *ult1-3* de 5dps (n≥20). TD= Dominio de transición; PD= Dominio de proliferación.

- Caracterización del meristemo de la raíz en *ult1-3*

Para realizar la determinación de los distintos dominios que constituyen al RAM, en las mutantes *ult1-3*, se fijaron raíces con el método de Pseudo-Schiff (PS-IP) y se obtuvieron imágenes al microscopio. Se cuantificó la longitud de cada célula del córtex, comenzando por la primera célula siguiente a la célula inicial de córtex y endodermis hasta la zona donde ya se encontraban los pelos radicales. Todos los datos fueron analizados con el software diseñado por Pacheco et al. (2016), cuyo algoritmo para delimitar los diferentes dominios del RAM se basa en el cambio de pendientes en los tamaños de las células del córtex. En las Figuras 8c y 9c se muestran imágenes representativas de raíces de 5 dps *ult1-3* y *ult1-3^{Ler}* con sus respectivos controles, indicando con flechas en los bordes de los dominios PD y TD calculados con el programa. Al analizar los distintos parámetros que conforman al RAM, no se encontraron diferencias significativas en el número de células que conforman al RAM, ni en las longitudes de las distintas zonas de la raíz, entre las plantas silvestres y las plantas mutantes *ult1-3*, en ninguno de los dos fondos genéticos Col y Ler (Figura 8d, e; Figura 9d, e). Del mismo modo, no se observaron diferencias en la expresión del marcador de proliferación *CYCB1;1:GUS* (Figura S2), indicando que la mutante en *ULT1* no tiene efectos en la proliferación del RAM.

Debido a que no encontramos diferencias en el meristemo, decidimos explorar si *ULT1* pudiera tener alguna función en la elongación celular. Para esto se midieron las primeras 20 células de córtex hacia la parte proximal de las hojas de raíces de 5 dps, justo donde comienza la zona de diferenciación; es decir, donde aparece el primer pelo radical en las células de la epidermis. No se encontraron diferencias en la longitud de las células completamente elongadas entre raíces WT y *ult1-3* (Figura 8f, g), indicando que *ULT1* tampoco participa en la elongación celular. Además, se realizaron mediciones de los distintos dominios del RAM en el fondo Ler, donde tampoco se encontraron diferencias (Figura 9d, e). Estos datos en conjunto demuestran que *ULT1* no influye en el crecimiento de la raíz principal, ni en el número de las células que componen al RAM.

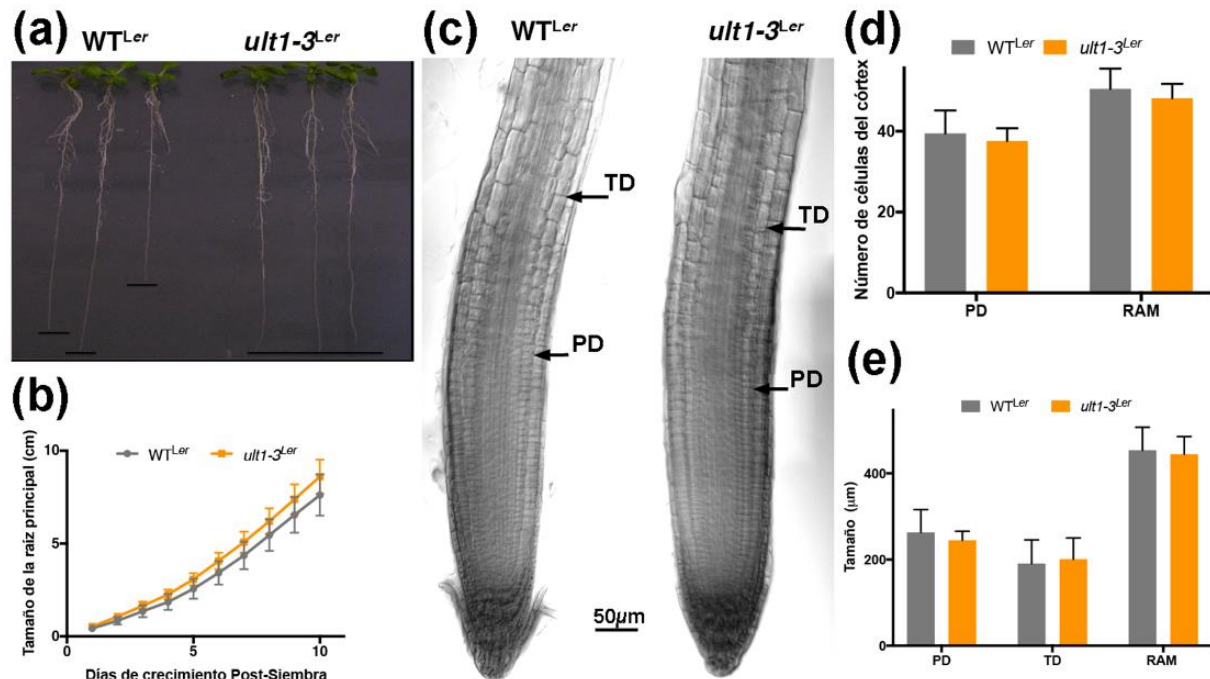


Figura 9. La mutación en *ULT1* no afecta el tamaño de raíz ni el tamaño del RAM en el fondo *Ler*. (a) Imagen representativa de raíces *WT^{Ler}* y *ult1-3^{Ler}* de 12dps. (b) Cinética de crecimiento de la raíz principal de plantas *WT^{Ler}* y *ult1-3^{Ler}* durante 12 días ($n \geq 22$). (c) Imagen representativa tomada con microscopia de campo claro de raíces de plantas *WT^{Ler}* y *ult1-3^{Ler}* de 5dps tratadas con PS-IP. (d) Número de células corticales del RAM de raíces de plantas *WT^{Ler}* y *ult1-3^{Ler}* de 5dps ($n \geq 12$). (e) Longitud de los dos diferentes dominios que componen al RAM de raíces de plantas *WT^{Ler}* y *ult1-3^{Ler}* de 5dps ($n \geq 12$). TD= Dominio de transición; PD= Dominio de proliferación.

- **Fenotipo del SCN en las mutantes *ult1-3***

Al analizar la morfología del SCN en plantas mutantes *ult1-3* observamos que existían cambios fenotípicos importantes (Figura 10). Mientras que en el SCN de las raíces WT y *WT^{Ler}* se observan capas continuas por debajo del QC (Figura 10a, d), en las plantas mutantes se observó una morfología del SCN irregular (Figura 10c, f), así como la presencia de planos de división en las células del QC (Figura 10b, e). Al realizar una cuantificación se observó que el 56.6% de las mutantes *ult1-3* presentaron el fenotipo de SCN irregular, de los cuales un 36.6% presentaron divisiones en el QC. Esto contrasta con lo encontrado en plantas WT, en donde no encontramos raíces con un SCN irregular y sólo el 16% mostró divisiones en el QC (Figura 10h). Cuando complementamos las mutantes con la construcción *pULT1:ULT1:GFP* observamos un rescate casi total del fenotipo de SCN irregular y de divisiones en el QC (Figura 10g, h),

demostrando que es la ausencia de la proteína ULT1 la causante de los cambios en la morfología del SCN.

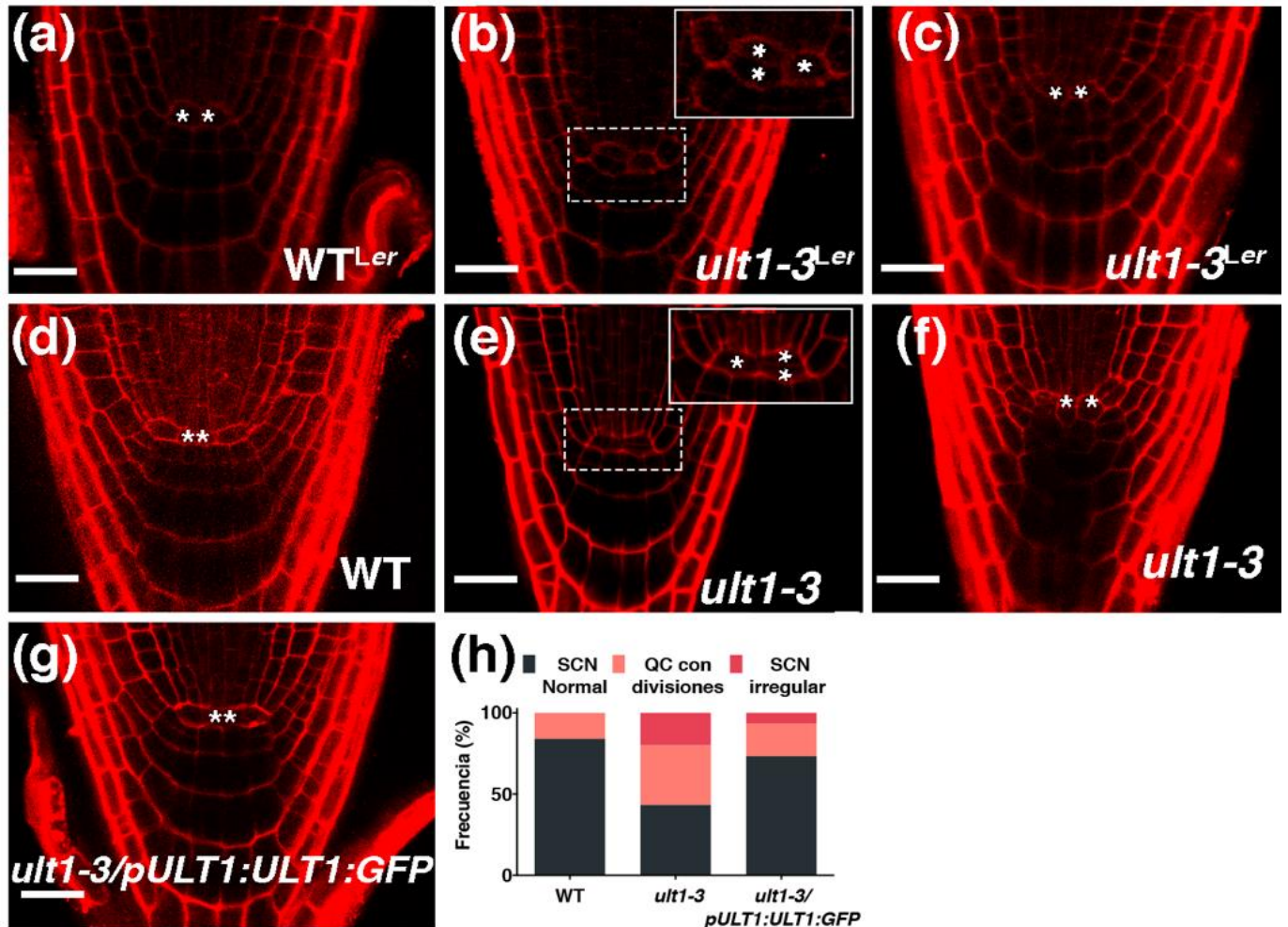


Figura 10. ULTRAPETALA1 es requerida para mantener la organización del nicho de células troncales (SCN). (a-g) Imágenes representativas de microscopia confocal del SCN de raíces de 5 dps de plantas: (a) *WT^{Ler}*, (b) *ult1-3^{Ler}* con divisiones en el QC; (c) *ult1-3^{Ler}* con un SCN con una morfología irregular; (d) *WT*; (e) *ult1-3* con divisiones en el QC; (f) *ult1-3* con un SCN con morfología irregular; (g) Plantas complementadas *ult1-3/pULT1:ULT1:GFP*. (h) Cuantificación de los fenotipos de SCN normales e irregulares, así como de QC con divisiones en raíces *WT* y *ult1-3* ($n \geq 22$). Las imágenes en las cajas son ampliaciones al SCN, y los asteriscos blancos marcan las células del QC. Las raíces fueron teñidas con yoduro de propidio. Las barras blancas representan 20 μ m.

- Fenotipo de *ult1-3* en las células de la columela

Debido a que se encontró un cambio en la arquitectura del SCN, se decidió investigar si este cambio no sólo era morfológico, sino si también estaba relacionado con algún cambio en la identidad celular. Para esto se decidió trabajar con las CIC ya que una de sus características principales es la ausencia de gránulos de almidón, los cuales sólo se encuentran en células de columela diferenciadas (DCC). Mientras que en las raíces WT el 72% de las raíces analizadas presentaron una capa de CIC (sin gránulos de almidón) (Figura 11a), en las mutantes *ult1-3* sólo el 27% presentó una capa de CIC, mientras que el 71.2% de las plantas no mostró CIC (Figura 11b, d). La ausencia de CIC en la mutante se refleja por un aumento en las capas de las DCC (Figura 11e). Cuando la mutante *ult1-3* se complementó con la construcción *pULT1:ULT1:GFP*, fue posible determinar que el fenotipo de acumulación de almidón en las CIC se revierte, observándose una capa de CIC sin gránulos de almidón (Figura 11c). La presencia de gránulos de almidón en las células inmediatamente debajo del QC en las plantas *ult1-3*, sugiere que estas células ya están diferenciadas, lo cual se pudo corroborar mediante el uso de cruza con el marcador *Q1630:GFP*, cuya señal se restringe solamente a las DCC (Sabatini et al. 2003). A diferencia de las raíces WT, en donde la marca del reportero se observa sólo en las capas debajo de las CIC, correspondientes a las DCC (Figura 11f), en las raíces *ult1-3* la marca se intensifica y se presenta ectópicamente en células de la cofia lateral (Figura 11g), y de manera interesante se presenta justo por debajo del QC, como se puede observar en una imagen que se obtuvo con menor intensidad de laser (Figura 11h). Además de este marcador, se realizaron cruza de la mutante *ult1-3* con el marcador *J2314:GFP*, el cual se expresa preferencialmente en las CIC y el QC (Figura 11i). Como se esperaba, en las cruza *ult1-3/J2341:GFP* se observó la ausencia del marcador en el QC y una disminución de la marca en las células iniciales (Figura 11j). Con estos datos se demuestra que la proteína ULT1 es importante para mantener el estado indiferenciado y la identidad de las CIC.

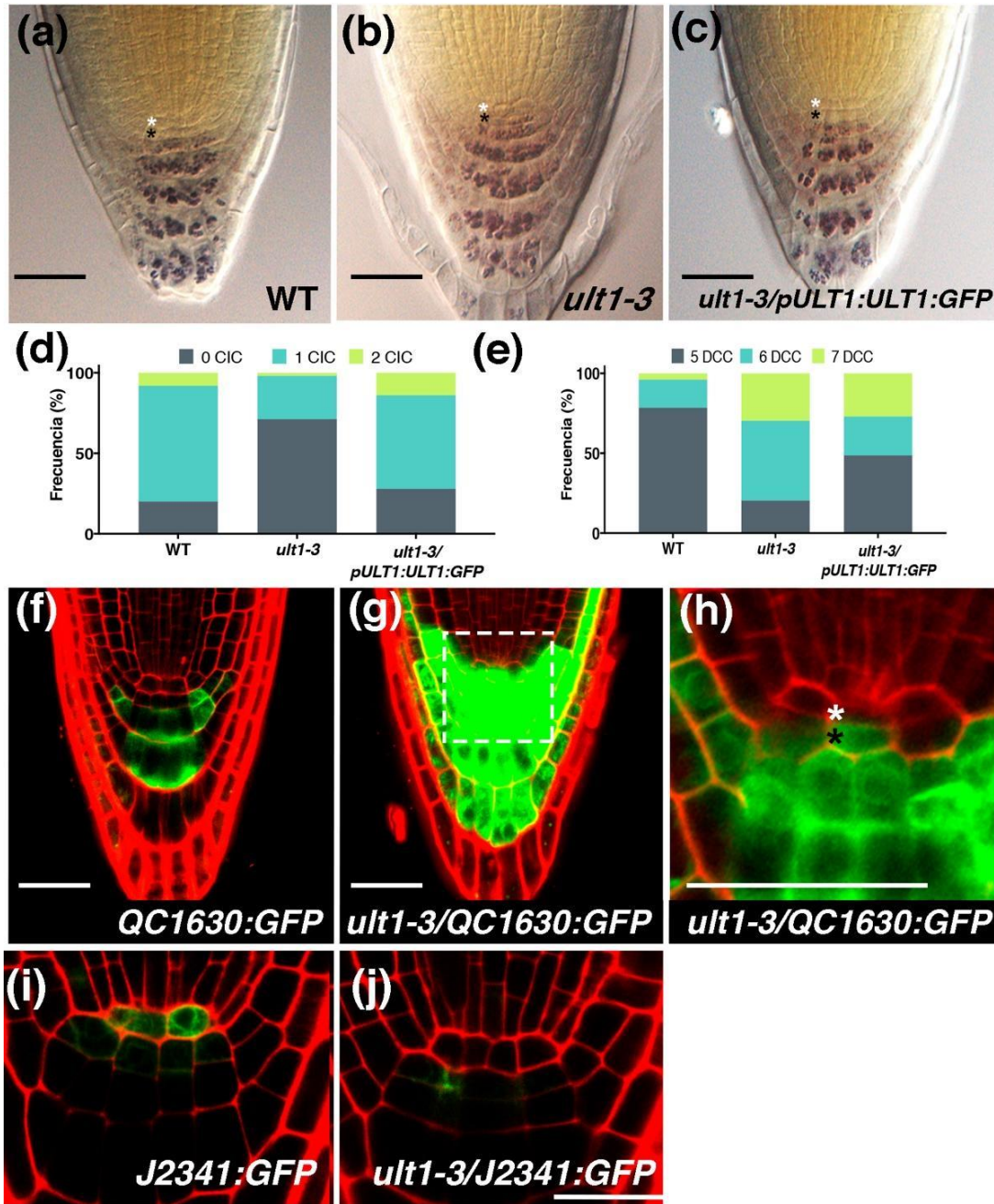


Figura 11. ULT1 es necesario para el mantenimiento del SCN. a-c) Imágenes representativas obtenidas por microscopía óptica de raíces teñidas con lugol. d) Frecuencia de las capas de CIC en raíces WT y *ult1-3* ($n \geq 23$). e) Frecuencia de las capas de DCC en raíces WT y *ult1-3* ($n \geq 23$). f-h) Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal del marcador de enhancer trap *Q1630:GFP* en raíces de 5dps en plantas WT (f) y *ult1-3* (g-h). i-h) Imágenes representativas obtenidas por microscopia confocal del marcador de enhancer trap *J2341:GFP* en plantas WT (i) y *ult1-3* (j). Los asteriscos blancos marcan el QC, mientras que los asteriscos negros marcan las CIC. Las barras blancas representan 20 μ M. CIC=Células iniciales de columela, DCC= Células diferenciadas de columela.

8.4 Función de ULT1 en la raíz y su relación con ATX1

Debido a que se ha reportado que ULT1 interacciona físicamente con ATX1, y a que esta interacción es importante para una adecuada deposición de la marca de H3K4me3 en algunos genes clave para el desarrollo del SAM (Carles & Fletcher 2009), nos preguntamos si en el RAM existía un mecanismo similar; es decir, si la función de ULT1 en el RAM se da a través de ATX1. Para abordar esta pregunta y conocer la relación genética que existe entre estos genes se analizaron los fenotipos de las raíces de las mutantes sencillas *atx1-3* y *ult1-3*, y de la mutante doble *atx1-3/ult1-3*, la cual se obtuvo por cruce de las mutantes sencillas.

Al estudiar la longitud de la raíz principal, se observó que la mutante simple *atx1-3* presenta raíces más cortas y un meristemo con un menor número de células respecto a las raíces WT (Figura 12a, b), lo cual concuerda con el fenotipo previamente reportado (Napsucialy-Mendivil et al. 2014). De igual manera, la doble mutante *atx1-3/ult1-3* presentó los mismos fenotipos que la mutante sencilla de *atx1-3*, mostrando que, a diferencia de ATX1, ULT1 no participa en estos procesos. También se analizó el fenotipo de la parte aérea, en donde se notó que *ult1-3* genera una floración tardía, en tanto que la mutante *atx1-3* luce muy similar a la WT. La mutante *atx1-3/ult1-3* muestra un fenotipo similar a la mutante sencilla de *atx1-3* y a la planta WT, mostrando que este fenotipo de *ult1-3* requieren de la función de ATX1 (Figura S3).

Como se mostró anteriormente, ULT1 se requiere para mantener la identidad de las CIC (Figura 11); ya que *ult1-3* carece de estas células. En contraste, la mutante *atx1-3* no tiene este defecto e incluso una parte de su población presenta dos capas de CIC (Figura 12c, d). Cuando analizamos la doble mutante observamos que las proporciones de CIC son muy similares a la de la mutante sencilla *ult1-3* (Figura 12c, d). Con respecto a las DCC, la mutante *ult1-3* presenta un aumento en la frecuencia de raíces con 6 capas de DCC, mientras que las mutantes *atx1-3* muestran un aumento en la frecuencia de raíces con 4 capas de DCC. En la doble mutante se observa un aumento en la frecuencia de raíces con 6 capas de DCC, pero a diferencia de la mutante sencilla *ult1-3* no presenta raíces con 7 capas de DCC, y en contraste con *atx1-3*, tiene una muy baja frecuencia de raíces con 4 capas de DCC (Figura 12c, e).

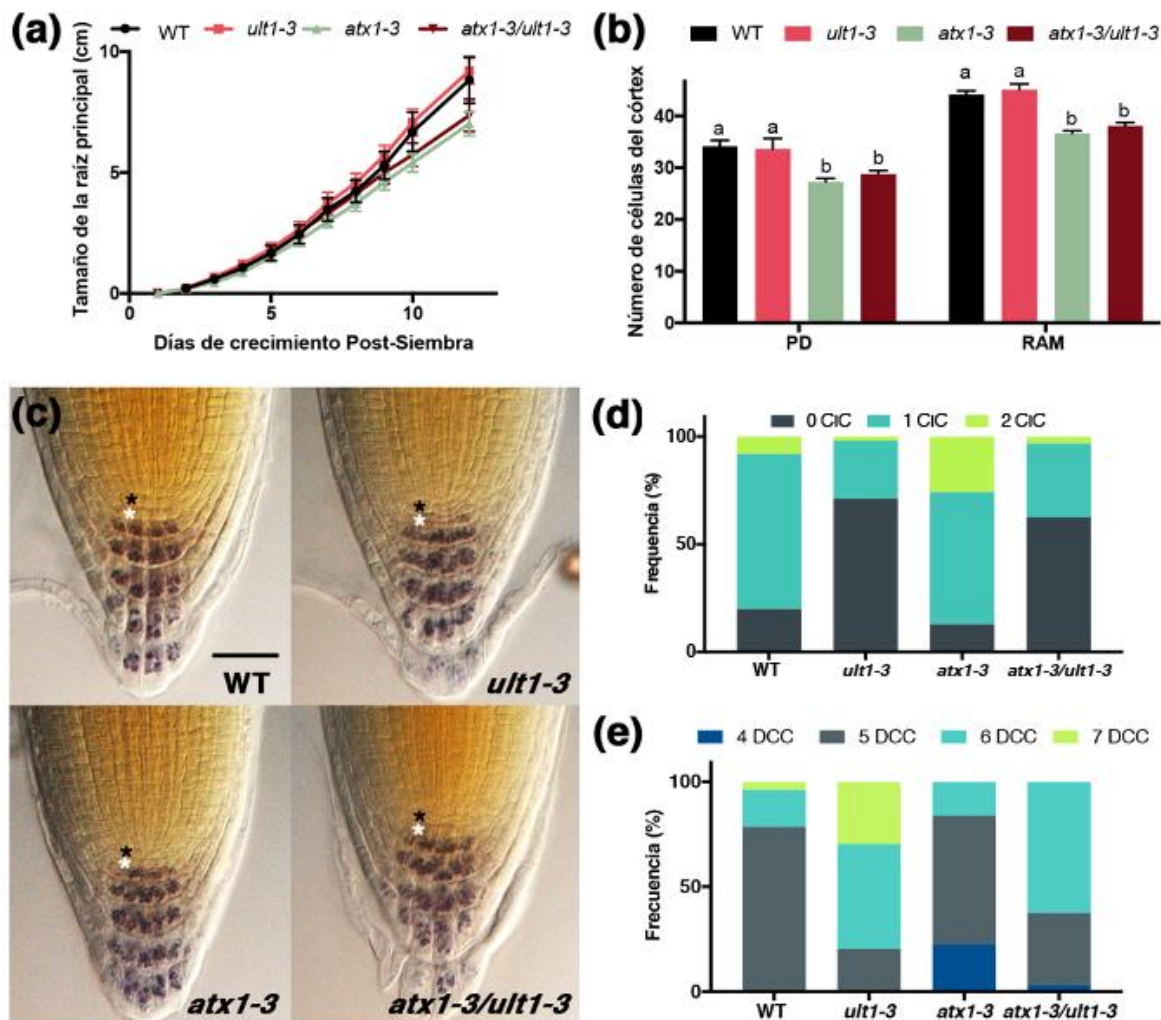


Figura 12. ATX1 y ULT1 actúan independientemente en la raíz. a) Cinética de crecimiento de la raíz primaria en plantas WT, *ult1-3*, *atx1-3* y *atx1-3/ult1-3* durante 12 días (n=12). b) Número de células corticales del RAM en plantas WT, *ult1-3*, *atx1-3* y *atx1-3/ult1-3*. Las letras representan diferencias significativas (p<0.005, ANOVA con prueba de comparación múltiple de Tukey's). c) Imágenes representativas de microscopía óptica teñidas con lugol, los asteriscos negros marcan el QC mientras que los asteriscos blancos marcan las CIC. d) Frecuencia de las capas de CIC en raíces WT, *ult1-3*, *atx1-3*, *atx1-3/ult1-3* (n=28). e) Frecuencia de las capas de DCC en raíces WT, *ult1-3*, *atx1-3*, *atx1-3/ult1-3* (n=28). CIC=Columella initial cells; DCC=Diferenciated columella cells. La barra representa 20 μm.

Por otro lado, se midieron algunos genes relacionados al mantenimiento del SCN en las mutantes sencillas, encontrándose una desregulación del factor transcripcional XAL2 sólo en las mutantes *atx1-3*, pero no en las mutantes *ult1-3* (Figura S4). Estos resultados en conjunto sugieren que tanto ATX1 como ULT1 tienen una función en el RAM, pero la función de cada una de ellas es independiente y tejido específicas. Mientras que la función de ATX1 está relacionada con el meristemo proximal de la raíz controlando el tamaño del RAM y la longitud de la raíz, la función ULT1 parece estar más relacionada

con el meristemo distal, manteniendo el estado indiferenciado de las CIC.

8.5 Función de *ULT1* en la señalización de auxinas

Debido a la importancia de las auxinas en el RAM, especialmente en el mantenimiento del estado indiferenciado del QC (Grieneisen, et al., 2017), se decidió evaluar si una señalización alterada de esta hormona vegetal tenía lugar en la mutante *ult1-3*. Para esto se realizaron cruces de *ult1-3* con el sistema reportero de respuesta a auxinas *DR5:GUS*. Con las plantas *ult1-3/DR5:GUS* obtenidas, primero se realizó una cinética de la reacción de GUS a diferentes tiempos para verificar que las diferencias observadas entre WT y *ult1-3* no dependen del tiempo de incubación (Figura S5). Como se puede observar en la Figura S5, las diferencias de intensidad de la señal de GUS entre plantas WT/*DR5:GUS* y *ult1-3/DR5:GUS* son constantes en los diferentes tiempos de incubación utilizados, indicando que no es un artefacto que dependa de los tiempos de reacción de la tinción de GUS.

De manera general, se sabe que en plantas WT, la distribución de auxinas en el RAM tiene un pico máximo de concentración en el QC, y presentan un gradiente de concentración en las células de la columela (Sabatini et al. 1999), tal y como se observa en la (Figura 13a). De manera interesante, las raíces mutantes *ult1-3* mostraron una disminución en los niveles del reportero de respuesta auxinas *DR5:GUS*, que pierde el pico máximo en el QC (Figura 13b). Para investigar si la disminución en la expresión de *DR5:GUS* en *ult1-3* se debía a un defecto en la respuesta más que a una disminución en la concentración de la hormona, se trataron las raíces con un pulso de auxinas de manera exógena, utilizando a la forma nativa de la auxina IAA (indole-3-acetic acid). Se realizó una cinética con diferentes concentraciones de IAA en tratamientos de 12 hrs (Figura S6). Debido a que se observó un patrón muy similar en todas las concentraciones usadas, se decidió trabajar con la concentración intermedia probada, 200 nM. La disminución en la respuesta a auxinas en la mutante *ult1-3* con respecto a la WT tras el tratamiento con IAA (Figura 13c, d) sugiere que esta disminución en la mutante no es debido a la reducción en la concentración de auxinas, ya que la adición de auxinas no compensa esta disminución. Por lo tanto, la otra posibilidad es que el transporte de influjo de las auxinas estuviera afectado. Para probar esta hipótesis, se realizaron tratamientos

con la auxina sintética NAA (α -Naphthaleneacetic Acid), la cual puede entrar a las células independientemente del transporte de influjo (Delbarre et al., 1996). Primero se probaron diferentes concentraciones de NAA, encontrando que las diferencias en la señal *DR5:GUS* entre raíces WT y *ult1-3* son independientes de la concentración de NAA (Figura S7), por lo que se decidió trabajar con la concentración intermedia (500 nM). Aún con estos tratamientos la disminución en la respuesta a auxinas en la mutante *ult1-3* persiste (Figura 13e, f, g). Estos resultados descartan defectos importantes en el transporte de influjo de las auxinas en la mutante *ult1-3*.

La formación del gradiente de auxinas depende tanto del transporte de influjo como de eflujo (Sabatini et al. 1999), por lo que por qPCR se determinó la acumulación de los transcritos de algunos transportadores de eflujo como *PIN1,2,3,4* y *7*, así como de los transportadores de influjo *AUX1* y *LAX2*, encontrando una disminución significativa en la expresión de *PIN1*, *PIN2*, *PIN4* y *LAX2* (Figura 13h). También se determinaron los niveles de algunos transcritos que responden a auxinas (Hagen & Guilfoyle, 2002; Bargmann et al., 2013), encontrando una disminución en la expresión de *GH3.5* y *PLT2* (Figura 13i). A su vez, se realizaron los mismos ensayos, pero bajo tratamientos con IAA, encontrando que, aunque los niveles de *GH3.5* están disminuidos en la mutante *ult1-3*, estos se recuperan después del tratamiento de IAA (Figura S8). Estos datos y los obtenidos con el sistema del reportero *DR5:GUS* permiten concluir que la mutante de *ult1-3* presenta una menor respuesta a auxinas en raíz, la cual podría deberse en parte a una alteración de transportadores, que se refleja en una disminución en la expresión de genes de respuesta auxinas.

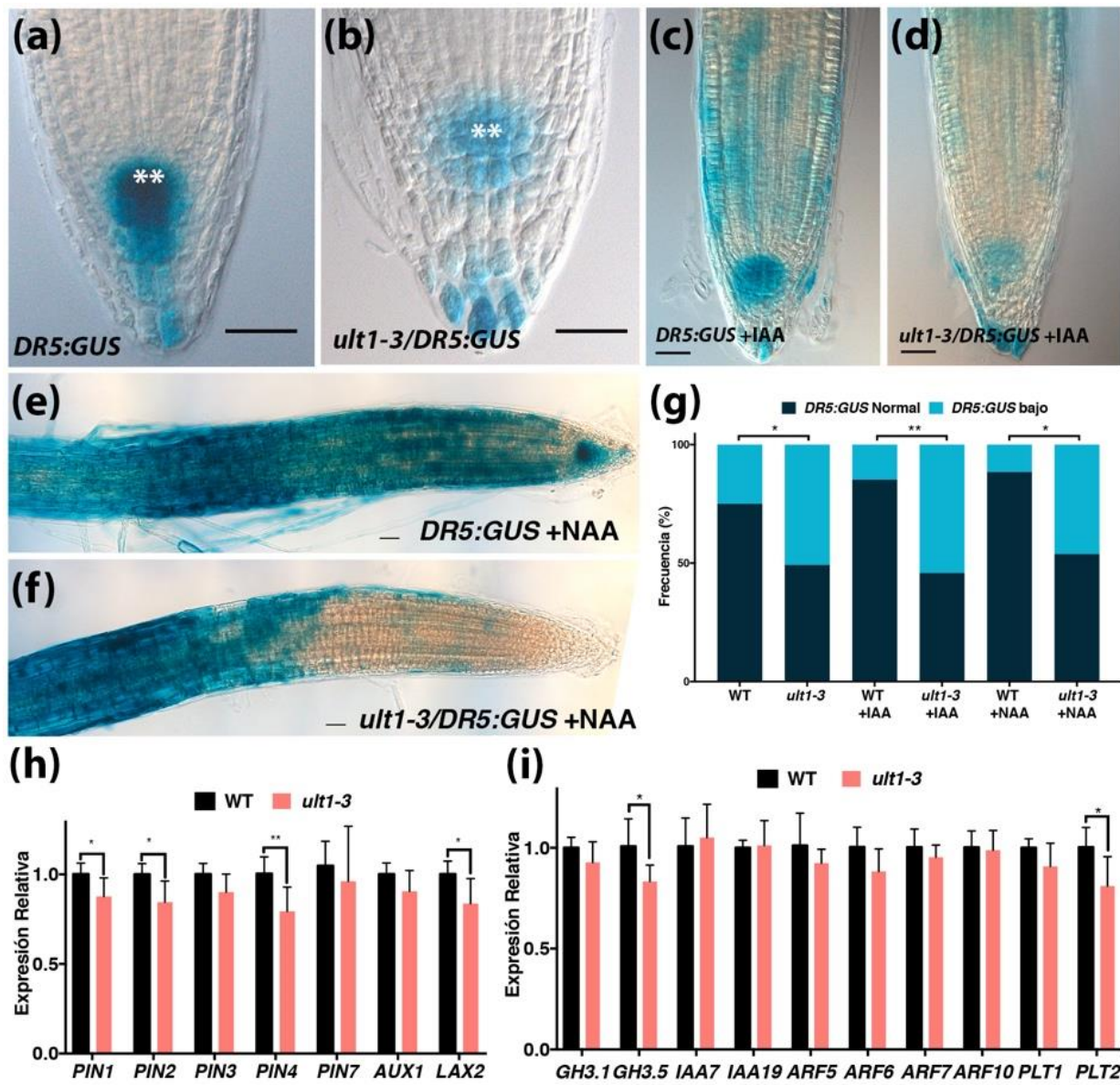


Figura 13. ULT1 regula el gradiente de auxinas en el SCN del RAM. Imágenes de microscopía óptica del reportero *DR5:GUS* en raíces a) WT, b) *ult1-3*. c-d) Imágenes representativas de raíces *DR5:GUS* WT y *ult1-3* tratadas con 200nM de IAA por 12 hrs. e-f) Imágenes representativas de raíces *DR5:GUS* WT y *ult1-3* tratadas con 500nM de NAA por 12hrs. g) Análisis cuantitativos de raíces WT y *ult1-3* con niveles normales y bajos de *DR5:GUS* en condiciones control y con tratamientos con IAA y NAA (n≥24). Análisis de expresión por qPCR de genes relacionados con h) el transporte a auxinas y de i) respuesta a auxinas. *= p<0.05; **=p<0.005 Prueba de Chi-cuadrada de Pearson. Los asteriscos blancos en a) y b) marcan el QC. Las barras horizontales negras representan 20 µM.

8.6 Función de *ULT1* en el mantenimiento del SCN

Para determinar si la morfología desorganizada del SCN observada en las plantas *ult1-3* es debida a un cambio en la identidad del QC, se decidió realizar cruza de las plantas mutantes *ult1-3* con plantas que incluían los sistemas reporteros transcripcionales *pSCR:GFP*, cuyo gen está implicado en dar identidad a las células de QC, teniendo una expresión en estas células y en las células de endodermis (Sabatini et al. 2003) y *pWOX5:GFP*, gen que también está involucrado en la identidad a las células del QC, con una expresión exclusiva en el QC (Sarkar et al. 2007). Utilizando el reportero de *pSCR:GFP* no se encontraron diferencias en su dominio espacial de expresión, ni en la intensidad de fluorescencia relativa entre las raíces WT y las raíces *ult1-3* (Figura 14a, b, e). Para el reportero *pWOX5:GFP* se encontraron diferencias en la intensidad de la señal de GFP entre raíces WT y *ult1-3* (Figura 14c, d, e). A su vez, por ensayos de qPCR, se determinaron los niveles del transcrito de *GFP* en las plantas *pWOX5:GFP* silvestre y mutante, utilizando como control los niveles de GFP en las plantas *pULT1:ULT1:GFP*, para corroborar que la disminución en la intensidad de señal de GFP en las plantas *pWOX5:GFP/ult1-3* está directamente asociada a menores niveles del transcrito de *GFP* (Figura S9). Este resultado fue muy prometedor, pues sugería que la desorganización del SCN en *ult1-3* era debido a una desregulación en la expresión de *WOX5*; sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en los niveles del transcrito del *WOX5* endógeno entre las plantas silvestres y mutantes (Figura 14k). Este resultado resalta las discrepancias que puede existir entre construcciones con reporteros y la expresión endógena del gen. El reportero *pWOX5:GFP* esta basado en una construcción que incluye 4.6kb como promotor, excluyendo la región 3'UTR y al único intrón del gen, lo que podría excluir regiones regulatorias que tiene como consecuencia una regulación diferencial entre el reportero y el gen endógeno.

Por el resultado anterior, también se determinaron los niveles del transcrito de *SCR* y se corroboró que no hay cambios en las plantas *ult1-3*, en consonancia con los datos sobre la intensidad de fluorescencia de su gen reportero con GFP (Figura 14a, b, e). Así mismo, se analizó la expresión de *AGL42* y *TEL1*, cuya expresión se encuentra enriquecida en las células del QC, siendo una expresión casi exclusiva de estas células

(Zhang et al., 2019). En estos casos tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de estos transcritos, sugiriendo fuertemente que en la mutante de *ult1-3* no hay cambios en la identidad del QC.

8.7 Función de ULT1 en la división del QC

Uno de los fenotipos observado en las raíces de *ult1-3* fue el aumento en la frecuencia de planos de división en el QC (Figura 14f, i). Indagando más acerca de la causa de este fenotipo, se realizaron experimentos de incorporación de EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine), un análogo de timidina que se incorpora al DNA en células que están en fase S, dando información directa sobre cuáles células pasaron o pasan por una división celular. Dado que el QC se divide a una tasa muy baja, se decidió dar un pulso de 20 hrs de incubación con EdU, de acuerdo con lo ya reportado por Jia et al. (2015). Para determinar si las células que incorporaban EdU efectivamente eran del QC se realizaron los experimentos utilizando plantas que incluyeran al reportero *pWOX5:GFP*. Con estas condiciones se observó que la marca de Edu estaba en el QC del 29.2% de las raíces WT observadas, mientras que para las raíces *ult1-3*, la marca en el QC se encontró en el 69.6% de las raíces (Figura 14f, g, j). Este resultado, junto con los planos de división observados, sugieren que la mutación de *ult1-3* provoca un aumento en la frecuencia de división del QC. En las mutantes *atx1-3* también se encontró que el 55.6% de las plantas presentaron marca de EdU en las células del QC (Figura 14h, j), indicando que tanto ATX1 como ULT1 limitan la frecuencia de división de estas células. Para saber si existe alguna relación funcional entre ATX1 y ULT1 sobre la división de estas células se realizaron ensayos de EdU en la doble mutante *atx1-3/ult1-3*. En la doble mutante, al igual que en las mutantes sencillas, se encontró un aumento en la frecuencia de raíces de marca de EdU en el QC; sin embargo, al comparar la relación que existe entre las plantas con marca de EdU en el QC con el número de planas sin esta marca en el QC (QC con Edu/ QC sin Edu) (Tabla 2) se encontró que existían diferencias entre los mutantes sencillos y la doble mutante. Mientras que para los mutantes sencillos *atx1-3* y *ult1-3* la relación fue de 2.12 y 2.18, respectivamente; en tanto que la mutante doble *atx1-3/ult1-3* presentó una relación de 1.25. La falta de una clara epistasis en la doble mutante,

sugiere que, aunque ULT1 y ATX1 participan en mantener la baja tasa de división del QC, no es un efecto conjunto y probablemente sea por diferentes vías.

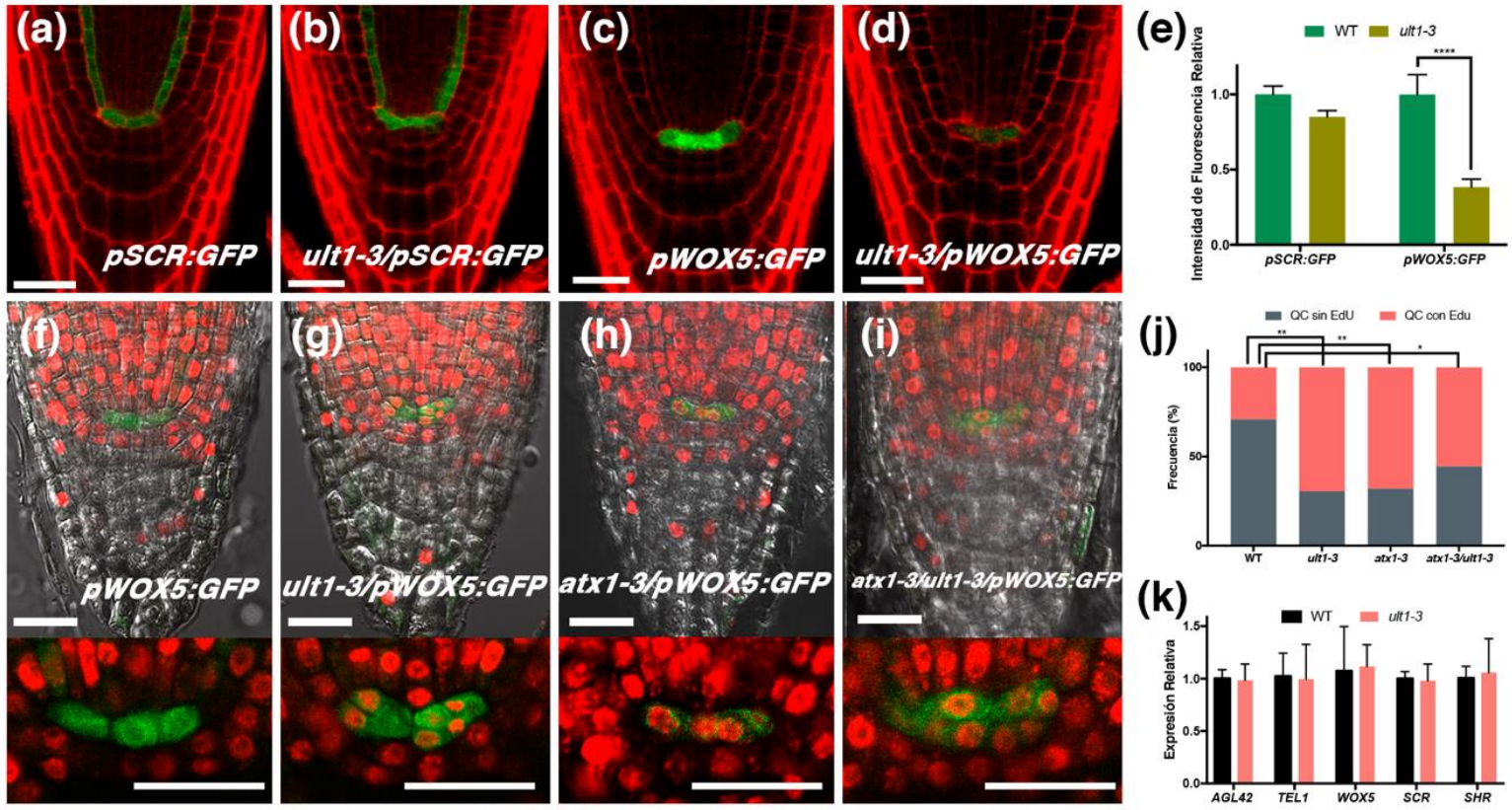


Figura 14. ULT1 es necesario para mantener la baja tasa de división del QC. a-d) Imágenes representativas de microscopía confocal de a) *pSCR:GFP*, b) *ult1-3/pSCR:GFP*, c) *pWOX5:GFP*, d) *ult1-3/pWOX5:GFP*. e) Fluorescencia relativa de los reporteros *pSCR:GFP* y *pWOX5:GFP* en fondos WT y *ult1-3*. ****= $p < 0.0005$ usando prueba de t. f-i) Imágenes representativas de marcatejo con Edu en raíces de f) *pWOX5:GFP*, g) *ult1-3/pWOX5:GFP*, h) *atx1-3/pWOX5:GFP*, i) *atx1-3/ult1-3/pWOX5:GFP*. j) Frecuencia de células del QC positivas para la marca de Edu en plantas WT, *ult1-3*, *atx1-3* y *atx1-3/ult1-3* ($n \geq 23$). *= $p < 0.05$; **= $p < 0.005$ diferencias significativas en prueba de Chi-cuadrada de Pearson. Las barras representan 20 μ M.

Genotipo	Tamaño de la raíz a 12dps (cm)	Fenotipos de raíz											
		Capas de CIC (%)			Capas de DCC (%)				Señal de <i>DR5::GUS</i> (%)		QC con (+) y sin (-) marca de Edu		
		0	1	2	4	5	6	7	Normal	baja	(+)	(-)	Relación* (+/-)
WT	8.8 ± 0.9	20	72	8	0	78.4	17.7	3.9	75	25	29.2	70.8	0.41
<i>atx1-3</i>	7 ± 0.4	12.9	61.3	25.8	22.6	61.3	16.1	0	Sin cambios*		68	32	2.12
<i>ult1-3</i>	9.1 ± 0.5	71.2	26.9	1.9	0	20.4	50	29.6	49.2	50.8	69.6	30.4	2.28
<i>atx1-3/ult1-3</i>	7.3 ± 0.6	62.5	34.4	3.1	3.1	34.4	62.5	0	No determinado		55.6	44.4	1.25

Tabla 2. Resumen de los fenotipos observados en *atx1-3*, *ult1-3* y la doble mutante *atx1-3/ult1-3*. *Datos obtenidos de (Napsucialy-Mendivil et al., 2014). +Ratio = (% de células del QC con marca de EdU (+) / % de células del QC sin marca de EdU (-)).

9. DISCUSIÓN

ULT1 es una proteína del complejo TrxG exclusiva de plantas con múltiples funciones previamente descritas en el desarrollo de Arabidopsis (Pires et al. 2014, Xu et al. 2018, Carles and Fletcher 2009). En este trabajo se describe por primera vez su función en el desarrollo de raíz, encontrando que es necesaria para mantener una correcta organización del SCN del RAM y la identidad de las CIC, además de regular la distribución de auxinas en esta zona y la proliferación del QC. Por análisis genéticos también se determinó que estas funciones son independientes de ATX1, contrastando con su función en la parte aérea. La información disponible en la literatura y la generada en este trabajo denotan la versatilidad de ULT1, postulándola como una proteína con capacidad de formar diferentes complejos con componentes de TrxG, PcG y factores de transcripción, y que cuya función es tejido desarrollo dependiente.

9.1 La expresión de ULT1 en raíz

En este trabajo se determinó que *ULT1* se expresa en la raíz de Arabidopsis, lo que concuerda con lo reportado por Carles y colaboradores en el 2004, en donde se

determinó que *ULT1* se expresa en prácticamente todos los tejidos de la planta, incluido los de la raíz. Además, se encontró que *ULT2* también se expresa en la raíz, en contraste con lo reportado a 8dps (Carles et al. 2004). Sin embargo, es posible que esta discrepancia se deba a que la expresión de *ULT2* sea desarrollo dependiente, ya que en otro reporte en donde se usan plántulas de 4 dps, un estado de desarrollo similar al que se utilizó en el presente trabajo (5 dps), también se detectó el transcrito de *ULT2* (Monfared et al. 2013).

En este trabajo también se pudieron detectar transcritos que no correspondían al mRNA anotado para *ULT1* en la base de datos del TAIR (www.arabidopsis.org). Con base a análisis de más de 200 transcriptomas de Arabidopsis se han identificado ~40,000 lncRNA. Dentro de estas especies >30,000 corresponden a NAT, especies de RNA que se codifican en contrasentido al gen anotado, y se estima que cerca del 70% de las regiones codificantes producen especies tipo NAT (Jin et al. 2013). La información experimental en este trabajo muestra que existen transcritos que se generan a partir de la secuencia de *ULT1*, encontrando transcritos que abarcaban desde el primer intrón hasta el último exón. Estos transcritos se encontraron en plantas silvestres, mostrando que no son un efecto dado por la inserción de T-DNA del alelo *ult1-3*. Aún así, también se mostró que la inserción de T-DNA de *ult1-3* provocó un aumento en el transcrito que abarcaba desde el primer intrón hasta el segundo exón, e incluso se vio que provocaba que en las regiones intergénicas tanto río arriba de *ULT1* como río abajo se generaran transcritos que en una planta silvestre no se encontraban. Se ha determinado que las inserciones de T-DNA pueden provocar cambios en la cromatina como cambios en los patrones de metilación del DNA, y modificaciones de proteínas histonas que pueden modificar la transcripción tanto en *cis* como en *trans* (Jupe et al. 2019, Sandhu, Koirala and Neff 2013). Debido a que no se secuenciaron los RNAs identificados en este trabajo, no fue posible determinar si se trataba de una sola molécula o si eran distintos transcritos, pero dado que los oligo usados para caracterizarlos están diseñados en el mismo sentido que el mRNA de *ULT1*, se puede concluir que no se tratan de RNAs tipo NAT. Debido a que fue posible detectar que el mRNA de *ULT1* se abatía completamente en las mutantes *ult1-3*, se decidió no continuar caracterizando estos RNAs, aunque no queda descartada la posibilidad de que puedan de alguna manera influir sobre la función de *ULT1*.

La expresión de *ULT1* en la raíz es nuclear y citoplásmica, en coincidencia con lo observado en células de cebolla transformadas, así como por detección de la proteína con anticuerpos en fracciones nucleares y citoplásmicas de extractos proteicos provenientes de tejido meristemático de la inflorescencia de *Arabidopsis* (Monfared et al. 2013). A pesar de que se ha descrito a *ULT1* como un regulador transcripcional, su presencia en el citoplasma sugiere que podría tener funciones diferentes a las que realiza en el núcleo. En la raíz *ULT1* parece tener un patrón de expresión particular, pues su acumulación se detecta principalmente en la zona de alta proliferación del meristemo, incluyendo el SCN y el QC. En comparación con el SAM, *ULT1* también parece expresarse en el SCN. Sin embargo, en el SAM la expresión de *ULT1* se limita a una ventana de tiempo correspondiente a la diferenciación del meristemo de flor; en donde, *ULT1* se expresa en el meristemo de inflorescencia, pero cuando surge el meristemo de flor, *ULT1* no se expresa en la etapa 1, sino hasta la etapa 3 cuando surge el primordio del sépalo, restringiendo su expresión al centro del meristemo de flor (Carles et al. 2004). Así mismo, se ha demostrado que el mensajero de *ULT1* se expresa en etapas tempranas del desarrollo embrionario, desde la etapa de cuatro células hasta la etapa de la generación de cotiledones; período en la que su expresión es exclusiva del tejido embrionario ya que no está presente en el suspensor, ni en el endospermo (Carles et al. 2004). En embriones ya maduros, la expresión de *ULT1* se restringe a las células apicales del SAM y del RAM (Carles et al. 2004). Puesto que los patrones de distribución espacial del transcrito que encontramos para *ULT1* en la raíz se limitan a una pequeña ventana de tiempo (5 dps), es posible que el patrón que la distribución de este transcrito cambie durante el desarrollo de la raíz. Los datos generados en este trabajo, y los observados en el SAM y durante el desarrollo embrionario (Carles et al., 2004), muestran que la expresión de *ULT1* no es constitutiva ni homogénea en los distintos tejidos. El transcrito de *ULT1* se concentra en tejidos meristemáticos, y sus niveles dependen del estado del desarrollo, pues se detecta en tejidos próximos a diferenciarse, o que se mantienen indiferenciados, como en el SCN del RAM, sugiriendo que su función es necesaria para procesos de proliferación y diferenciación.

9.2 La actividad de ULT1 en la organización e identidad del SCN del RAM

Los resultados obtenidos por microscopía confocal demuestran que ULT1 es importante para mantener una correcta organización del SCN, ya que: 1) los mutantes de pérdida de función presentan un cambio en la organización espacial de las células que conforman al SCN; 2) los cambios en la organización del SCN están asociados a cambios en la identidad de las células que lo conforman; y 3) la construcción *pULT1:ULT1:GFP* rescata el fenotipo de las mutantes. La presencia de gránulos de almidón y la expresión ectópica del marcador *Q1630:GFP* en las CIC muestran un cambio de identidad que se traduce en una diferenciación prematura hacia DCC. Este cambio de identidad se confirma con la disminución de los marcadores para los CIC y QC. La disminución del marcador de CIC y el aumento del marcador de DCC también se observa en las mutantes del factor de transcripción SCR (Sabatini et al. 2003). En plantas sobre-expresoras de WOX5 se observa un aumento en el marcador *J2341:GFP* y una disminución de *Q1630:GFP* (Pi et al. 2015), mostrando la estrecha relación que hay entre ambos marcadores y por ende entre las CIC y las DCC.

A pesar de que se ha demostrado que algunos marcadores de identidad celular no son estáticos en el desarrollo (Timilsina et al. 2019), el patrón de expresión y los cambios que observamos en *ult1-3* en la ventana de tiempo analizada fue constante, demostrando que los cambios son ocasionados por la mutación. Debido a que no se encontró una desregulación en la expresión de *SCR* y *WOX5*, se descarta la posibilidad de que el cambio de identidad de las CIC en *ult1-3* sea el resultado en una alteración en la expresión de estos factores transcripcionales. La desorganización del SCN y la diferenciación de las CIC están reguladas por múltiples factores, como son proteínas del sistema del spliceosoma, factores de transcripción como el grupo de los PLTs, reguladores del ciclo celular como CCS52A2 y RBR, entre otros (Vanstraelen et al. 2009, Cruz-Ramirez et al. 2013, Ji et al. 2015). En el presente trabajo se encontró una disminución en la expresión de PLT2 que, aunque no está comprobado, podría contribuir en parte al fenotipo observado de desorganización y diferenciación de CIC. Se ha caracterizado que las células de la columela en la raíz permiten generar una correcta respuesta gravitrópica (Strohm, Baldwin and Masson 2012); sin embargo, ensayos

preliminares muestran que las mutantes *ult1-3* no presentan cambios en su respuesta gravitrópica (Figura S10), por lo que podemos concluir que ULT1 no contribuye de forma evidente en este proceso.

9.3 La función de ULT1 en la respuesta a auxinas

Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales con funciones muy importantes durante todo el desarrollo de la planta, controlando procesos de proliferación y diferenciación celular (Garay-Arroyo et al. 2012). En el meristemo de la raíz las auxinas exhiben un gradiente de distribución, alcanzando una concentración máxima en las células del QC del SCN (Sabatini et al. 1999). Los resultados mostraron una disminución de la señal del reportero de respuesta a auxinas *DR5:GUS* en el RAM de plantas mutantes *ult1-3* con respecto a la señal observada en las plantas silvestres. Esta disminución indica que probablemente la concentración de auxinas en el QC no alcanza el pico máximo requerido para una respuesta apropiada. Debido a que la respuesta a auxinas depende de la concentración de la hormona, se realizaron tratamientos con IAA, la auxina más bioactiva, y con NAA, una auxina sintética que no requiere de los transportadores de influjo para adentrarse a las células (Delbarre et al. 1996). La disminución en la respuesta a auxinas observada en las mutantes *ult1-3*, tratadas con IAA o con NAA, descarta hasta cierto punto que esta respuesta sea el resultado de una baja concentración de auxinas en el SCN, o de un efecto en su transporte de influjo, ya que si fuera un problema de transporte este se compensaría con el uso de NAA. La disminución en los niveles de los transcritos que codifican para los transportadores de eflujo PIN1, PIN2, PIN4 y el transportador de influjo LAX2 en *ult1-3* sugiere un problema de transporte, el cual es necesario para formar el gradiente de auxinas adecuado. Además, la disminución de los transcritos para PLT2 y GH3.5 y del marcador *DR5:GUS* refleja una desregulación río abajo en la señalización de auxinas (Bargmann et al. 2013).

Los transportadores de eflujo PIN1, y de influjo AUX1, AXR1 y AXR3 son necesarios para mantener el pico máximo de distribución de respuesta auxinas en el QC, y la ausencia de cualquiera de estos transportadores provoca un cambio en la

organización del SCN (Sabatini et al. 1999). Los cambios morfológicos en el SCN producidos por modificaciones en la distribución de auxinas también provocan modificaciones en la proliferación y diferenciación celular. Además, la evidencia experimental demuestra que la relación entre la cantidad de auxinas y el mantenimiento del SCN de la raíz no es lineal. Por ejemplo, tratamientos con el inhibidor del transporte a auxinas NPA (1-N-naphthylphthalamic acid) provoca una redistribución de las auxinas en la punta de la raíz que desencadena una diferenciación ectópica de células con gránulos de almidón, disminución y cambio en el patrón de expresión de marcadores para células del QC, células iniciales del córtex y células de la cofia lateral. En cambio, una aplicación de auxinas provoca cambios en el dominio de expresión de algunos marcadores para QC y para células de columela (Sabatini et al. 1999). A su vez, la ausencia de los transportadores de eflujo PIN3, 4 y 7, al igual que de las enzimas de síntesis de auxina YUCCA y TAA1, propician un aumento en las capas del CIC, mientras que tratamientos con auxinas o con el inhibidor NPA provocan una diferenciación temprana de las células del QC (Ding and Friml 2010).

Es importante recalcar que el sistema reportero *DR5:GUS* está basado en siete elementos de respuesta a auxinas localizados en tándem y fusionados al gen de la enzima glucoronidasa, por lo que su señal no es un reflejo directo de la concentración de auxinas, sino que depende también de los factores de transcripción tipo ARF que se unen a estos elementos, y de las proteínas AUX/IAA que inhiben esta unión al asociarse con las proteínas ARF (Ulmasov et al. 1997, Garay-Arroyo et al. 2012). Aunque no encontramos diferencias en los niveles de los transcritos *ARF* o *IAA* por qPCR, no descartamos que exista una desregulación de otros factores de la misma familia que no se midieron en este estudio; o bien, que la diferencia sea en el patrón de expresión espacial del mensajero o de la proteína y que no se refleja en el método de estudio usado.

Además de su papel en el SCN de la raíz, las auxinas también participan en la proliferación del meristemo, pero al igual que en el SCN, su efecto es dosis dependiente. A dosis de 0.1 nM de IAA, las raíces aumentan su tamaño, debido a un incremento en la proliferación del meristemo, mientras que a dosis más altas (en el orden de μM) las

auxinas provocan una disminución en el crecimiento de la raíz, así como en el número de células del meristemo (Peng et al. 2013, Ji et al. 2015). A pesar de que en este trabajo se observan menores niveles de los transcritos para los transportadores de auxinas *PIN1*, *PIN2*, *PIN4* y *LAX2* en las mutantes *ult1-3*, esto no repercutió en una disminución en el tamaño de la raíz ni en el número de células del meristemo. Está bien documentado que las mutantes en *LAX2* no tienen una disminución en el crecimiento de la raíz (Street et al. 2016), al igual que las mutantes sencillas en *PIN1*, *PIN2* y *PIN4* (Blilou et al. 2005). Además de que se ha determinado que existe redundancia funcional entre los distintos transportares tipo PIN, por lo que experimentalmente es necesario mutar más de uno de ellos para observar un fenotipo en el meristemo y tamaño de la raíz, siendo PIN2 el más importante para estos procesos (Blilou et al. 2005, Vieten et al. 2005). Es probable que debido a que la desregulación de los transportadores en la mutante de *ult1-3* no es tan severa, no se alcance un impacto suficiente para causar un cambio en la proliferación y por consiguiente en el tamaño de la raíz.

Existe un fino control sobre la concentración y distribución de las auxinas en el SCN y un cambio en estos patrones puede tener consecuencias no lineales en la proliferación e identidad de las células que lo componen. La evidencia mostrada en este trabajo sugiere que *ULT1* regula la distribución correcta de la respuesta a auxinas en el QC y, posiblemente, esto ocurra a través de la regulación de ciertos transportadores. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que la disminución observada en las mutantes pueda deberse más bien a una combinación de factores que involucre cambios en el transporte de auxinas, en los factores de transcripción -activadores o represores- implicados en la señalización de estas hormonas, o incluso enzimas relacionadas con la síntesis y la degradación de las auxinas.

Además de las auxinas, existen otras hormonas involucradas en el desarrollo de la raíz. Las citocininas tienen una relación muy estrecha con las auxinas en la raíz; por ejemplo, se conoce que las citocininas promueven diferenciación en la raíz, y su acción está dada más en la zona de transición de la raíz. Mutantes de pérdida de función en factores de transcripción asociados a citocininas y enzimas que las sintetizan presentan un meristemo más grande y raíces con un mayor crecimiento (Dello Iorio et al. 2008). A

su vez las auxinas son capaces de reprimir al factor de respuesta a citocininas ARR1 (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 1) a través del factor de transcripción SCR para reprimir la diferenciación en las células del QC. Mientras que, en la zona de transición, donde la concentración de auxinas es menor, ARR1 no está reprimido y puede activar la transcripción de IAA3/SHY, el cual reprime la expresión de los transportadores PIN, limitando la concentración de auxinas y permitiendo que las citocininas desencadenen los procesos de diferenciación en esa zona (Moubayidin et al. 2013). El transportador de auxinas de influjo AUX1 también se relaciona funcionalmente con las citocininas, ya que es necesario para que estas inhiban la elongación celular en el meristemo, pero no la proliferación celular (Street et al. 2016). En esta red de regulación, también las giberelinas están involucradas, ya que SCR activa a la proteína SNE que junto con esta hormona degrada al activador de ARR1, a la proteína tipo DELLA RGA, para controlar el tamaño del meristemo de la raíz a través de la diferenciación (Moubayidin et al. 2016). Por otro lado, los brasinosteroides también tienen una función en la proliferación y en la elongación celular, y al igual que las auxinas, exhiben un comportamiento no lineal. A concentraciones muy bajas por debajo de 0.04 nM inhiben el crecimiento del meristemo, mientras que, por otro lado, mutantes insensibles a brasinosteroides presentan un crecimiento de la raíz menor por una menor proliferación y elongación celular (González-García et al. 2011). Debido a la falta de fenotipos aparentes en el tamaño de la raíz principal, el número de células del meristemo y el tamaño de las células completamente elongadas en la mutante *ult1-3*, es poco probable que exista una desregulación en alguna de estas vías. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que la disminución en la respuesta auxinas se deba a un efecto indirecto dado por la interacción con otras hormonas.

9.4 La función de ULT1 en el mantenimiento del QC

Como se mencionó en la introducción, una gran cantidad de factores están involucrados en el mantenimiento de la identidad de las células del QC en el SCN de la raíz de Arabidopsis. Dentro de estos factores se encuentran SCR y WOX5, cuyos niveles de transcritos no cambian acorde a los resultados que obtuvimos por qPCR. Sin

embargo, al analizar el reportero del promotor de *WOX5* unido a GFP se observó una disminución en su señal en el QC. Es posible que los cambios en el gen endógeno sean tan pequeños o localizados que por cuestiones técnicas no sea posible detectarlos; pero también otra posibilidad es que lo observado en el reportero no sea una representación de la expresión del gen endógeno, ya que este reportero no necesariamente contiene todos los elementos para su regulación. Los niveles de los transcritos para otros genes expresados en estas células (Zhang et al. 2019), tampoco se modificaron en la mutante en *ULT1*. Las mutantes en *WOX5* presentan una diferenciación temprana de las células iniciales de la columela (Sarkar et al. 2007), fenotipo similar a lo observado en *ult1-3*. Puesto que no se detectaron cambios en los niveles del mensajero de *WOX5*, el fenotipo de *ult1-3* no parece deberse a la desregulación de la vía controlada por este factor transcripcional. Sin embargo, se ha demostrado que la proteína *WOX5* tiene la capacidad de moverse del QC a las CIC, inhibiendo la diferenciación de manera no autónoma; por lo que, a pesar de que no observamos un cambio aparente en su expresión, existe la posibilidad de que el fenotipo sea resultado de un cambio en la movilidad de esta proteína (Pi et al. 2015).

Una de las propiedades de las células del QC es su baja tasa de división, estimándose que es cuatro veces más lenta que la de una célula meristemática (Cruz-Ramirez et al. 2013). Nuestros resultados muestran que a pesar de que no existe una pérdida de la identidad del QC en las mutantes *ult1-3*, sí hay un cambio en su estado proliferativo, ya que las mutantes presentan una mayor frecuencia de incorporación del EdU. Son numerosos los factores que pueden modificar el estado proliferativo del QC, mutantes en la proteína perteneciente al complejo promotor de anafase CCS52A2 tienen un aumento en la proliferación del QC, pero no así una pérdida total de la identidad del QC, visto con los marcadores *QC184* y *WOX5* (Vanstraelen et al. 2009). Las mutantes de los factores transcripcionales *WOX5*, *PLT2*, *PLT3* y *FEZ* también presentan un aumento en la división del QC (Bennett et al. 2014); de hecho, se sabe que *WOX5* puede reprimir a *CYCD3;3* inhibiendo la división celular en estas células (Forzani et al. 2014). En este sentido, no sabemos el mecanismo exacto por el que *ULT1* podría estar controlando la tasa de división del QC; sin embargo, los datos de qPCR sugieren que no es a través de una desregulación de *WOX5*.

Debido a la disminución en la respuesta a auxinas en el SCN en las mutantes *ult1-3*, es probable que la disminución en la quiescencia de las células del QC esté dada por un cambio en la respuesta a esta hormona. En este sentido, mutantes de la proteína DAR2, proteína que conecta la señalización de auxinas y citocininas para controlar el tamaño del RAM, también presentan una disminución en la respuesta a auxinas, así como una diferenciación temprana de las CIC, una pérdida del marcador de CIC *J2341* y un aumento en la incorporación del Edu en las células del QC (Peng et al. 2013). En otro estudio, con la acetiltransferasa ELP2, se encontró un incremento similar en la incorporación del Edu en el QC, una diferenciación temprana de las CIC, una baja expresión de los marcadores de QC, *QC25* y *WOX5* y una disminución en la respuesta a auxinas en el SCN (Jia et al. 2015). Esto se asemeja a lo que encontramos en las mutantes de *ULT1*; no obstante, esto no quiere decir que los genes antes mencionados sean los causantes de los fenotipos que encontramos, sino más bien que diferentes componentes de la red de regulación del SCN pueden desencadenar respuestas similares. Se ha determinado con diferentes mutantes que existe una correlación entre un aumento en las divisiones del centro quiescente y una disminución en las capas de CIC, lo cual podría estar dado como una respuesta compensatoria del QC para reponer las capas de células iniciales diferenciadas prematuramente (Burkart et al., 2019), aunado a esto se ha visto que *PLT* y *WOX5* tienen efectos aditivos en el control de la proliferación del QC, lo cuál habla de vías paralelas en el mantenimiento de su quiescencia.

Además de las auxinas, otras hormonas también están involucradas en el control de la proliferación del SCN. Las citocininas pueden inducir divisiones en el QC, y esta respuesta requiere de la presencia del factor de transcripción de respuesta a citocininas *ARR1*, el cual se une al promotor del transportador de auxinas *LAX2* reduciendo su expresión y disminuyendo el flujo de auxinas al QC (Zhang et al., 2013). Este aumento de las divisiones en el QC por las citocininas es independiente del efecto del etileno, ya que también se ha determinado que el etileno puede promover divisiones en el QC no dependientes de las auxinas (Ortega-Martinez et al., 2007). También se ha determinado que el factor de transcripción *ERF115* es limitante en las divisiones del QC, y este a su vez es inducible por las hormonas brasinosteroides (Heyman et al., 2013).

Toda esta información no pretende explicar cómo es que ULT1 controla la tasa de división del QC, sino más bien busca hacer notar el grado de complejidad que subyace en los procesos de proliferación y diferenciación del SCN de la raíz de *Arabidopsis*, y de como estos están influenciado por diferentes especies de hormonas.

9.5 La relación entre ATX1 y ULT1 y su posible función en el complejo TrxG

La proteína ULT1 se ha caracterizado como un co-activador de la HMT ATX1, ya que la evidencia demuestra que interactúan físicamente, que comparten genes blanco en el SAM, además de que ULT1 es importante para mantener los niveles de H3K4me3 en algunos genes blanco de ATX1 (Carles and Fletcher 2009). Aunado a esto, existe evidencia que indica que ATX1 es importante para el crecimiento de la raíz principal, la proliferación del RAM, así como para la organización del SCN (Napsucialy-Mendivil et al. 2014). Debido a esta relación estrecha se investigó si existía una relación funcional entre ambas proteínas en términos del desarrollo del RAM y el mantenimiento del SCN. Los resultados obtenidos muestran que, como estaba reportado, la mutante sencilla *atx1-3* presentó una raíz principal con una menor longitud y un menor número de células en el RAM. Por su parte *ult1-3* no presentó cambios en el tamaño de la raíz principal, en el número de células del meristemo, ni en el marcador de mitosis *CYCB1;1:GUS*, cuyos niveles disminuyen en las mutantes de *ATX1* (Napsucialy-Mendivil et al. 2014). Los resultados también mostraron que la longitud de la raíz principal, y número de células que conforman al RAM de la doble mutante *atx1-3/ult1-3* son iguales a la de la mutante sencilla *atx1-3*, lo cual, muestra que: 1) ULT1 no participa en el crecimiento de la raíz principal, y que 2) los fenotipos de *atx1-3* no dependen de la función de ULT1. Debido a que se ha propuesto a ULT1 como un coactivador de ATX1, se esperaba que la ausencia de ULT1 exacerbara los fenotipos resultantes en la mutante de sencilla *atx1-3*; sin embargo, con este resultado se puede concluir que no están actuando en conjunto para regular estos procesos. A diferencia de las mutantes *ult1-3*, las mutantes *atx1-3* no presentaron un fenotipo de diferenciación temprana de las CIC y se ha reportado que no tiene cambios en su respuesta auxinas (Napsucialy-Mendivil et al. 2014). Las dobles mutantes, por su parte, presentaron una disminución en la frecuencia de raíces con una

capa de CIC, muy similar a las mutantes sencillas *ult1-3*, apoyando la idea de que ATX1 no está participando en conjunto con ULT1 en el mantenimiento de las CIC. Por lo tanto, de manera contraria a lo reportado en el SAM (Alvarez-Venegas et al. 2003, Carles and Fletcher 2009), ULT1 y ATX1 parecen no actuar en conjunto para modular la proliferación del RAM, la longitud de la raíz principal, ni el mantenimiento del estado indiferenciado de las CIC. Mientras que ULT1 participa en el mantenimiento de las CIC, ATX1 regula la proliferación de las células meristemáticas del RAM y el tamaño de la raíz principal, independientemente de las auxinas. A pesar de que el experimento de incorporación de EdU muestra un aumento en la frecuencia de células del QC con señal en las mutantes de ULT1 y ATX1, la relación observada en la doble mutante sugiere que las mutantes en ambas proteínas convergen (o coinciden) en el mismo fenotipo. Si el aumento en la proliferación del QC que se observó en la doble mutante hubiera ocurrido en alguna de las mutantes sencillas se podría hablar de una epistasis de ambos factores sobre este fenotipo; pero, por el contrario, la doble mutante presenta un aumento menos pronunciado que las mutantes sencillas. La diferenciación temprana de las CIC y la disminución en la respuesta a auxinas en las mutantes de *ult1-3*, contrastan con lo observado en *atx1-3*, por lo que es posible que la función de ATX1 y de ULT1 en el mantenimiento de la quiescencia del QC sea por mecanismos independientes. ULT1 se expresa tanto en el SCN como en el RAM, y mediante una construcción de ATX1 con GFP se determinó que también se expresa en todos los tipos celulares correspondientes, aunque su distribución en la célula no es uniforme y no está localizada principalmente en el núcleo (Alvarez-Venegas et al. 2006). Esto sugiere que la función que estas proteínas pudieran tener en conjunto no depende tanto de su patrón de expresión espacial, sino más bien del contexto del desarrollo y el tejido en donde actúen. Sin embargo, no se ha determinado el patrón de expresión espacial de ATX1 bajo su propio promotor, por lo que lo observado no representa necesariamente su expresión endógena. Tampoco se descarta la posibilidad de que existan más componentes en la red de regulación que medien la capacidad de estas dos proteínas para actuar en conjunto, y que estos componentes estén presentes en el SAM y no en el RAM.

Por otro lado, se ha demostrado que el ortólogo de ULT1 de Arabidopsis en arroz, OsULT1 no sólo puede formar multímeros consigo mismo a través de su motivo B-box,

sino que también OsULT1 es capaz de interaccionar con el dominio SET de OsTRX1, el cual es un ortólogo a ATX1 de Arabidopsis (Roy et al. 2019). Debido a que el dominio SET esta presente en múltiples proteínas del complejo TrxG (Avramova 2009), y que OsULT1 y ULT1 tienen un 90.91% de similitud en su secuencia de aminoácidos, se sugiere que ULT1 podría interaccionar no sólo con ATX1, sino también con otras HMT del complejo. Aunado a esto, datos de ChIP-PCR muestran una disminución de la marca H3K4me3 en algunos genes relacionados con el desarrollo de semilla en la mutante de *ULT1*, incluso mayor que en las mutantes de *ATX1*, sugiriendo que gran parte de la deposición de esta marca epigenética está mediada por ULT1, pero que no depende totalmente de la actividad HMT de ATX1 (Xu et al. 2018). Dentro de las HMT del complejo TrxG se encuentra ATX2, la cual se originó de ATX1 a partir de una duplicación parcial del cromosoma (Baumbusch et al., 2001), y que a pesar de tener una similitud de 75% en su secuencia de aminoácidos, y aunque también se exprese en raíz, presenta poca redundancia funcional con ATX1, ya que su función está más enfocada a la deposición de la marca de H3K3me2 (Saleh et al., 2008, Baumbusch et al., 2001). Tampoco se ha reportado un fenotipo evidente para la mutante de ATX2. El análisis de triples mutantes ha demostrado que las proteínas ATX3, ATX4 y ATX5 tienen una alta redundancia con ATX1 en la parte aérea; sin embargo, estas proteínas no presentan una expresión ni un fenotipo aparente en la raíz (Chen et al. 2017), impidiendo relacionar su función con la de ULT1. Otra HMT caracterizada es SDG2/ATXR3, la HMT que más contribuye a la deposición de H3K4me3 en el genoma de Arabidopsis (Guo et al. 2010). Se ha estimado que regula el 46.4% de los sitios H3K4me3 (Chen et al. 2017), lo cual contrasta con el ~15% regulado por ATX1 (Alvarez-Venegas and Avramova 2005), además de que análisis genéticos muestran que existe poca redundancia por parte de SDG2 con las HMT del complejo TrxG antes mencionadas (Chen et al. 2017). De manera interesante, se ha reportado que SDG2 es importante para el desarrollo de la raíz de Arabidopsis, donde la mutante de pérdida de función presenta diferentes fenotipos; entre los cuales, la desorganización del SCN, la diferenciación temprana de las CIC, y la disminución de la respuesta a auxinas se comparten con lo observado en las mutantes *ult1-3* (Yao et al., 2013). Aunque no se ha demostrado una interacción física entre SDG2 y ULT1, como se ha hecho para el caso de ATX1 (Carles and Fletcher 2009), la similitud de los fenotipos

podría indicar que, en el caso del RAM, ULT1 podría estar actuando a través de SDG2.

9.6 ¿Funciona ULT1 como un interruptor epigenético?

Como se mencionó anteriormente, ULT1 presenta características que permiten clasificarla como una proteína del complejo TrxG. Sin embargo, también se ha demostrado que ULT1 puede interactuar físicamente con la proteína EMF1, caracterizada como un componente del complejo PRC1 que interactúa con el complejo PRC2 (Calonje et al. 2008). En este sentido, se ha observado que en ausencia de EMF1, la marca de H3K27me3 disminuye, y de manera interesante esta disminución se exacerba cuando ULT1 y ATX1 también están ausentes. En base a esto, se propone un modelo en el cual ULT1 interactúa con ATX1 y EMF1 formando un complejo que ayuda a mantener los niveles de H3K27me3 (Xu et al. 2018). Aunque, también cabe mencionar que, se ha demostrado que ULT1 actúa antagónicamente con EMF1, ya que las mutantes de *ULT1* contrarrestan la desregulación de ciertos genes que aumentan en la mutante de *EMF1*, y también contrarrestan el aumento de la H3K4me3 y la disminución de la H3K27me3 observados en ausencia de EMF1 (Pu et al. 2013). Esto indica que ULT1 tiene una función dual actuando también como miembro del complejo TrxG, que en otros contextos podría actuar con PcG afectando las marcas de activación H3K4me3 y las de represión H3K27me3. Resulta interesante que en las mutantes de *ULT1* son más genes que se desregulan a la alza que a la baja (Tyler et al. 2019), contrastando con su función ya descrita como un activador transcripcional. Dentro de los genes que se desregulan de manera positiva está *FLC*, un represor de la floración ampliamente caracterizado, cuya expresión está controlada por los complejos PcG y TrxG (Whittaker and Dean 2017, Tyler et al. 2019, Pu et al. 2013). De manera sorprendente, los niveles del transcrito de *FLC* aumentan poco más de cuatro veces en las raíces de la mutante *ult1-3* (Figura S4), lo que concuerda con lo encontrado en plántulas (Xu et al. 2018). Además, por experimentos de ChIP, se demostró que ULT1 es capaz de unirse al gen *FLC* (Xu et al. 2018), sugiriendo que esta desregulación podría ser por un efecto directo. La desregulación de manera positiva de *FLC* en las mutantes de *ULT1* aumenta aún más en las dobles mutantes *emf1/ult1*, por lo que su acción podría ser a través del complejo

PcG (Pu et al. 2013, Tyler et al. 2019).

En animales se han demostrado la existencia de dominios “bivalentes”, los cuales se caracterizan por tener tanto la marca de activación H3K4me3, como la marca de represión H3K27me3. Se propone que estos dominios bivalentes mantienen a los genes en un estado “de espera” y que su expresión cambia a un modo “apagado” o “prendido” dependiendo del estímulo, permitiendo que este cambio sea rápido y no gradual (Hoffmann, Zimmermann and Spengler 2015). En plantas no se ha podido demostrar la existencia de estos dominios bivalentes, pero debido a que ULT1 i) puede interaccionar con proteínas del complejo TrxG y del complejo PcG, ii) tiene un impacto en la marca de H3K4me3 y H3K27me3, y iii) puede regular genes tanto positiva como negativamente, es posible que funcione como un interruptor epigenético. De esta manera podría actuar como un integrador de señales modulando, a través de sus interacciones con otras proteínas, las marcas epigenéticas y la actividad transcripcional. Debido a que toda la evidencia anterior se ha demostrado de manera independiente, es necesario realizar experimentos que permitan explorar bajo cuáles contextos genéticos y de desarrollo se dan las interacciones de ULT1 con los componentes de PcG y TrxG, y cómo estos tienen un impacto en la expresión de sus genes blanco.

9.7 La actividad de ULT1 en los procesos de proliferación y diferenciación

Debido a su organización celular característica, su fácil manejo y visualización, así como la gran cantidad de marcadores existentes, el SCN del RAM es un excelente modelo para estudiar procesos de proliferación celular, diferenciación y mantenimiento del estado indiferenciado. Los fenotipos observados en este trabajo denotan la importancia de la proteína ULT1 en dichos procesos, convirtiéndola en un factor importante en la biología de las células troncales. Además del papel de ULT1 en la regulación epigenética, y en los otros mecanismos de control en los que pueda estar inmersa, es importante referirse también a su papel a nivel celular. Las células troncales son células indiferenciadas con la capacidad de dar origen a distintos tipos celulares (dependiendo de su potencial) y de auto-regenerarse (Verdeil et al. 2007, Sablowski

2004). En este sentido, cuando una célula troncal se divide puede generar otra célula troncal para su mantenimiento, así como una célula que va a pasar por una zona de proliferación para después diferenciarse (Heidstra and Sabatini 2014). En otro escenario, las células troncales se pueden dividir de manera asimétrica, en donde la división está acoplada con procesos de diferenciación, generando una célula troncal y una célula con propiedades distintas, producto de esta división (Obernier et al., 2018). Sin embargo, se ha observado que en una población celular existen células troncales que se dividen para generar dos células troncales, otras que generan una célula troncal y otra que se va a diferenciar, y otras que se dividen para dar origen a dos células que se van a diferenciar. Aunque el destino celular de esta división está definido por procesos estocásticos (Simons and Clevers 2011, Basak et al. 2018, Snippert et al. 2010), las señales celulares a corto plazo y las limitaciones espaciales también juegan un papel importante (Pillitteri, Guo and Dong 2016).

Volviendo al SCN del RAM, en este ocurren divisiones asimétricas de distintos tipos; por ejemplo, las células iniciales del córtex/endodermis se pueden dividir para dar origen a dos células iniciales y, posteriormente, una de ellas, la más alejada al SCN, puede dividirse de manera asimétrica para dar origen a dos células de diferentes linajes (Petricka, Winter and Benfey 2012). Del lado de las células del QC, que a pesar de que se creía que contribuía a dar origen a todas las células iniciales que lo rodeaban, se ha determinado que, en condiciones normales, las células del QC sólo contribuyen a la generación de las CIC (Cruz-Ramirez et al. 2013).

Con biología de sistemas, utilizando un modelo multiescala de la raíz que, además de incorporar los componentes más importantes, conocidos a la fecha, de la red molecular de regulación del SCN, también incorpora la dinámica espacial que existe entre cada célula que lo conforma. Con esto se han podido recuperar los diferentes tipos celulares que componen al SCN, permitiendo proponer que dependiendo del plano de división del QC este va a dar origen a otra célula del QC o a una CIC (García-Gómez et al. 2020). En este modelo se plantea que la presencia de la proteína SHR funciona como un paso limitante para que el QC siga manteniendo su identidad aún después de que ocurra una división, funcionando así, como una señal que determina qué tipo de división

tendría que ocurrir en el QC, si es asimétrica o no. Los resultados de esta investigación demuestran que ULT1 es necesario para mantener la baja tasa de división del QC, en donde la mutante *ult1-3* no permite el aumento en las células del QC, sino una diferenciación temprana de las CIC. Por un lado, se observó con el marcador de QC *pWOX5:GFP* que existían más células con la marca de Edu en el fondo mutante, mientras que, por otro lado, se observó al marcador de DCC *Q1630:GFP* justo por debajo de las células del QC, sugiriendo que se dividen e inmediatamente adquieren la identidad de DCC. Si consideramos a las CIC como un estado intermediario y ya comprometido hacia las DCC se puede proponer que, en ausencia de ULT1, la división asimétrica del QC da origen a una célula del QC (auto-regenerándose) y a una célula de DCC sin pasar por el estado intermedio de CIC. Se sabe que las CIC reciben señales moleculares del QC, como es la proteína WOX5, para impedir que éstas se diferencien completamente hacia DCC (Pi et al. 2015). La distribución espacial de la expresión de la proteína ULT1 muestra que está en el QC y en todas las células que lo rodean, por lo que es probable que ULT1 actúe en dos vías, por una parte, limitando la proliferación del QC, y por otra funcionando como señal que impide que las células intermediarias CIC pasen a diferenciarse completamente a DCC. Por lo tanto, la ausencia de ULT1 no sólo compromete a las células del QC a sufrir divisiones, sino que hace que esta división se acople a procesos de diferenciación. Es posible que, además de ULT1, existan otras señales moleculares que impidan que las células producto de las divisiones ectópicas del QC sigan manteniendo su identidad, es decir que sean simétricas. Este modelo se ajusta bien a los resultados obtenidos; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que ULT1 actúe solamente como un inhibidor de la división celular y que los efectos en la diferenciación de las CIC sean indirectos.

Otro aspecto importante que no queda claro es por qué las divisiones generadas en la ausencia de ULT1 son dirigidas hacia las CIC y no hacia más células del QC u otro destino celular, por lo que es probable que ULT1 tenga un control más fino dirigiendo a su vez el plano de división. Esta idea surge a partir de que se ha propuesto que al no presentarse migración celular en plantas, el destino celular está altamente influenciado por su disposición espacial, en donde la naturaleza de las células cercanas influye sobre las señales moleculares que reciben (García-Gómez et al. 2020, Pillitteri et al. 2016).

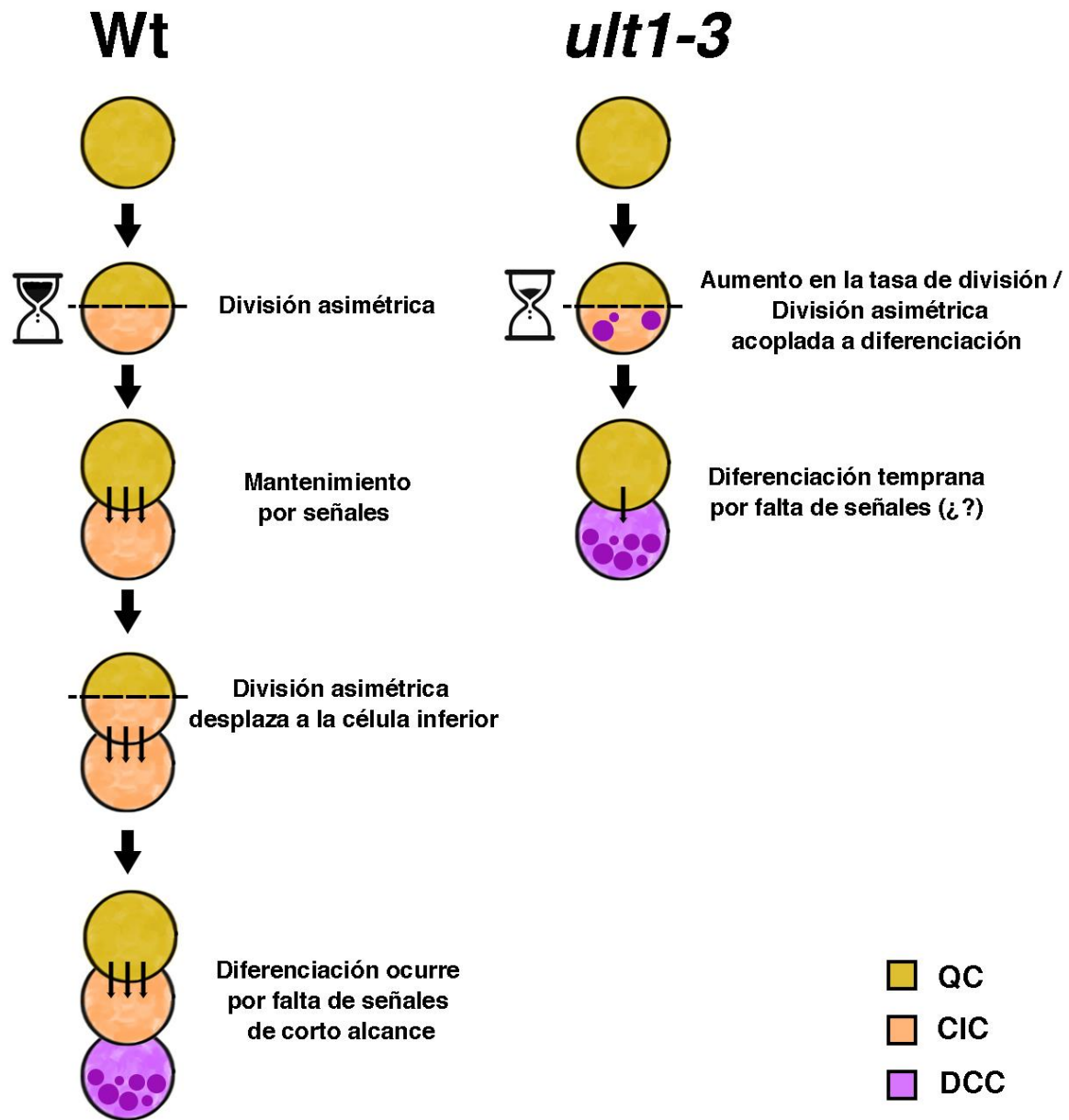


Figura 15. Esquema de divisiones del QC. Modelo que propone cómo ocurren las divisiones asimétricas de las células del QC en un contexto WT y mutante *ult1-3*. Las líneas horizontales punteadas representan el plano de división celular, mientras que las flechas delgadas negras representan señales moleculares de corto alcance. QC=Quiescent center, CIC= Columella initial cell, DCC= Differentiated columella cell.

10. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se investigó la función de la proteína ULT1 en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* que, con base a la evidencia generada de manera experimental, se concluyó lo siguiente:

- La proteína ULT1 se expresa en la raíz, localizándose en la zona meristemática de alta proliferación y en las células que conforman al SCN incluyendo al QC.
- ULT1 no participa en el crecimiento de la raíz principal, ni en la proliferación del meristemo apical de la raíz.
- ULT1 es necesario para mantener la organización celular del SCN.
- ULT1 ayuda a mantener el estado indiferenciado y la identidad de las CIC en el SCN.
- ULT1 participa en mantener la baja tasa de división del QC, pero no en mantener su identidad.
- ULT1 es esencial para el establecimiento del patrón de respuesta a auxinas en el meristemo apical de la raíz.
- La función de ULT1 en el SCN del RAM es independiente de la presencia de ATX1, contrastando con lo ya descrito en el SAM.

11. PERSPECTIVAS

- Realizar experimentos de ChIP para determinar si los cambios observados en la ausencia de ULT1 se deben a su función epigenética a través de cambios en las marcas H3K4me3 y H3K27me3. A su vez, se podría determinar si ULT1 se encuentra unido a los sitios donde ocurren esos cambios.
- Analizar sistemas reporteros para diferentes transportadores de auxinas para determinar si los cambios observados en la respuesta pueden estar ocasionados por modificaciones en el patrón espacial de algún transportador.
- Hacer análisis morfológicos y de expresión en una doble mutante para ULT1 y su parólogo ULT2 para descartar efectos enmascarados por una posible redundancia.

- Experimentos que expresen a ULT1 en un tipo celular específico en un fondo mutante *ult1-3* podría ayudar a determinar si el efecto que tiene ULT1 en el control de la tasa de división del QC y el mantenimiento del estado indiferenciado de las CIC son procesos independientes; es decir, si es un efecto autónomo de la célula o sí existe alguna relación causal.

12. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

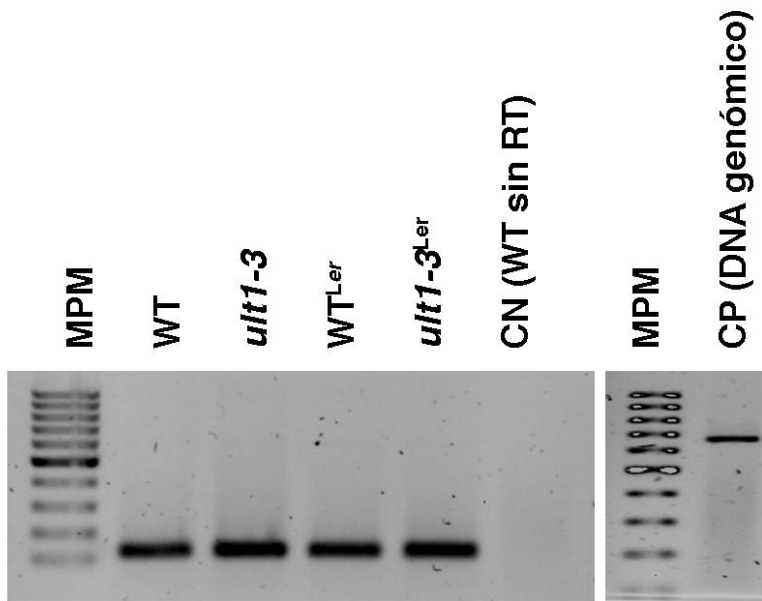


Figura S1. Expresión de *TUB2*. PCR semicuantitativa de la expresión de *TUB2* en mutantes *ult1-3* de fondos Col y Ler. El cDNA se extrajo de raíces de 5 dps; se utilizó como control negativo una reacción de RT sin retrotranscriptasa, y como control positivo DNA genómico de una planta WT, ya que los oligos pueden diferenciar entre mRNA y DNA genómico, amplificando productos de 120 pb y 668 pb, respectivamente. El DNA genómico se obtuvo de plántulas de 5 dps. MPM=Marcador de peso molecular de 100 pb, CN=Control negativo, CP=Control positivo.

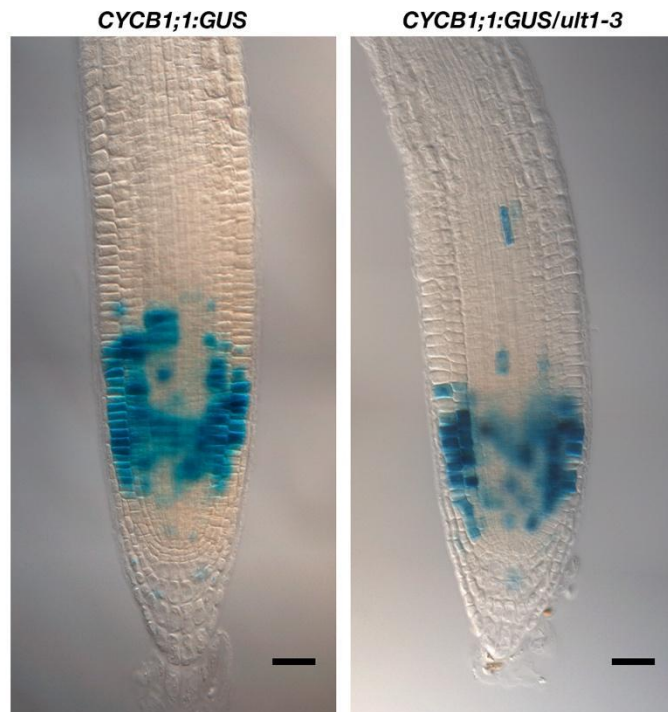


Figura S2. Imágenes representativas de la señal del marcador *CYCB1;1:GUS* de raíces de 5 dps de plantas silvestres y mutantes *ult1-3*. La barra negra representa 20μm.



Figura S3. Imagen representativa del crecimiento de plantas silvestre, mutantes *ult1-3*, *atx1-3* y dobles mutantes. a) plantas de 30 dps y b) plántulas de 12 dps.

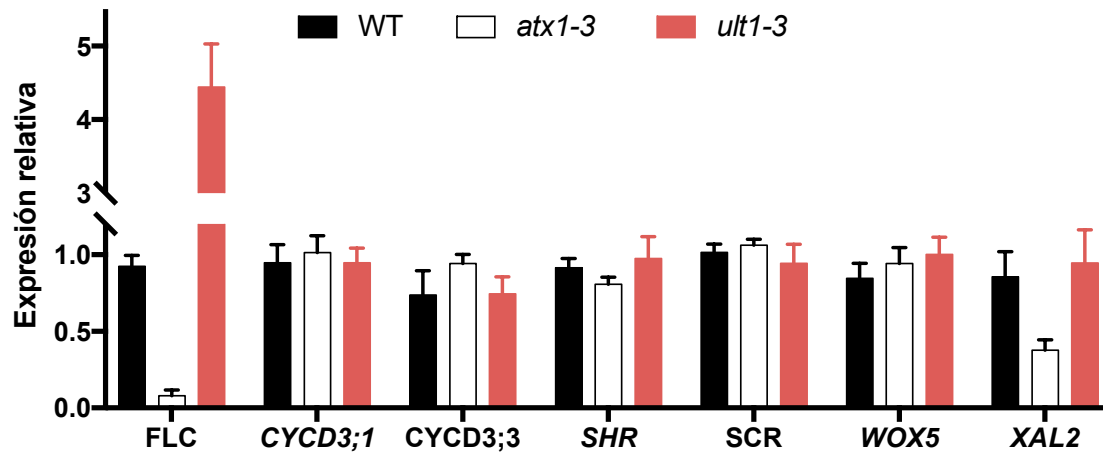


Figura S4. Resultados de qPCR de la expresión de algunos genes en mutantes *atx1-3* y *ult1-3*.

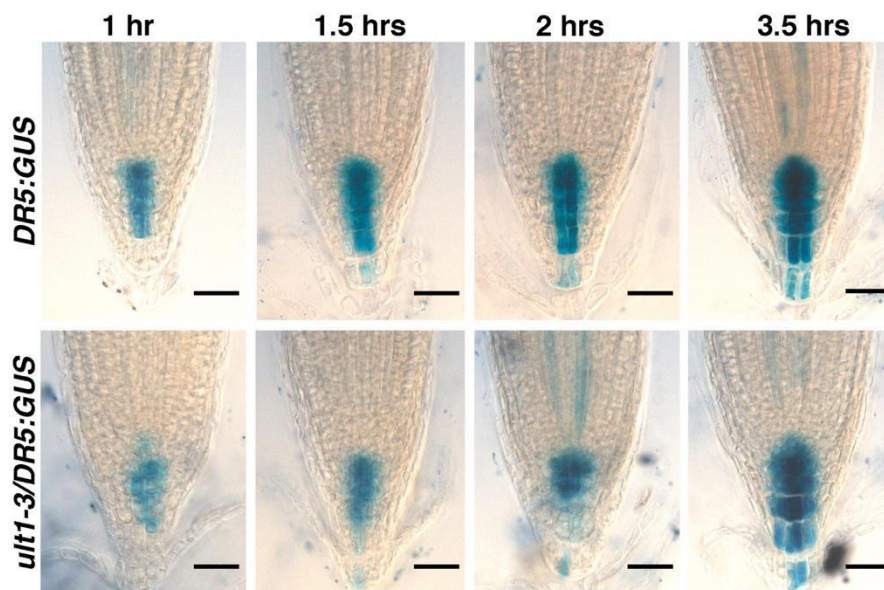


Figura S5. Ensayos de GUS a diferentes tiempos de incubación. Imágenes representativas de raíces de plantas *DR5:GUS* y mutantes *ult1-3/DR5:GUS* de 5dps tomadas con microscopía de luz. La línea horizontal negra en la esquina inferior derecha representa 20µm.

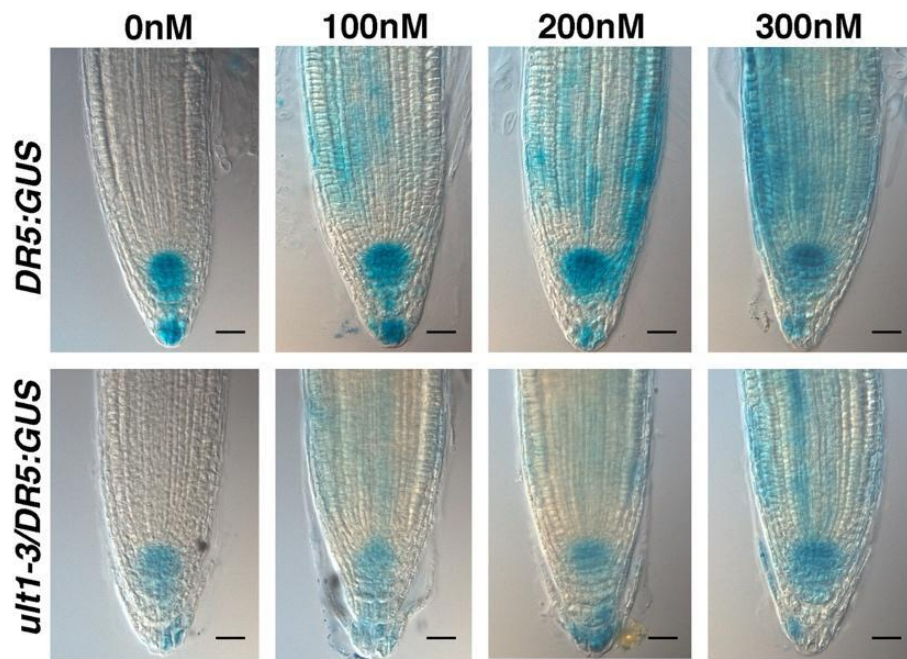


Figura S6. Ensayos de GUS a diferentes concentraciones de IAA. Imágenes representativas de raíces de plantas *DR5:GUS* y mutantes *ult1-3/DR5:GUS* de 5dps tomadas con microscopía de luz. La línea horizontal negra en la esquina inferior derecha representa 20µm.

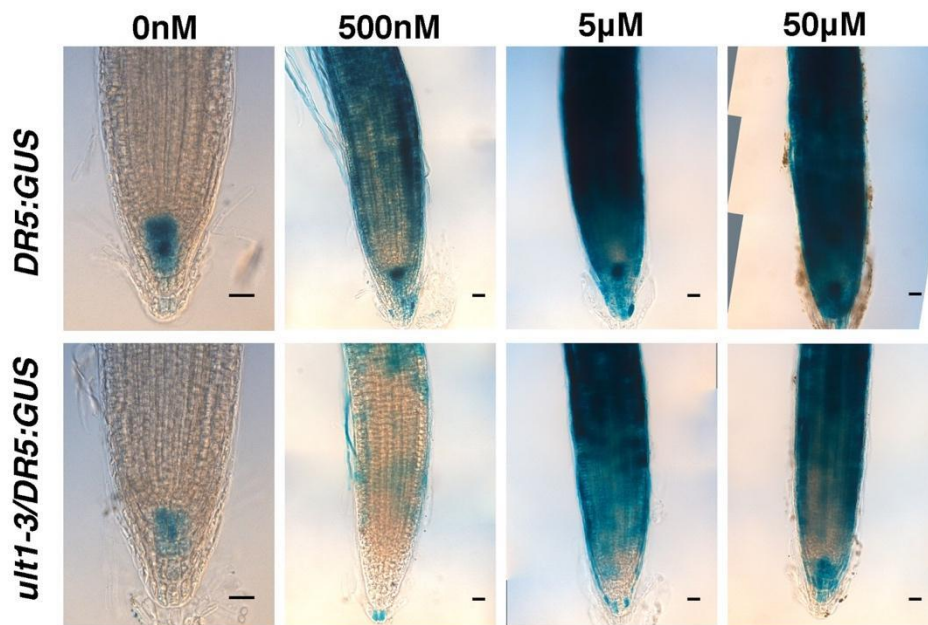


Figura S7. Ensayos de GUS a diferentes concentraciones de NAA. Imágenes representativas de raíces de plantas *DR5:GUS* y mutantes *ult1-3/DR5:GUS* tomadas con microscopía de luz. La línea horizontal negra en la esquina inferior derecha representa 20µm.

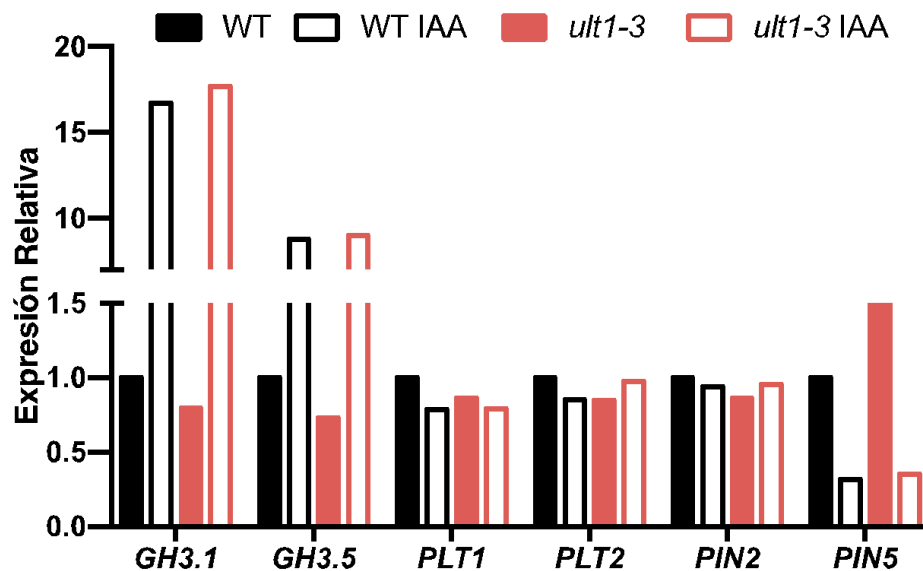


Figura S8. Niveles de los transcritos de algunos genes que responden a auxinas bajo tratamientos de IAA 500 nM, en plantas WT y mutantes *ult1-3*.

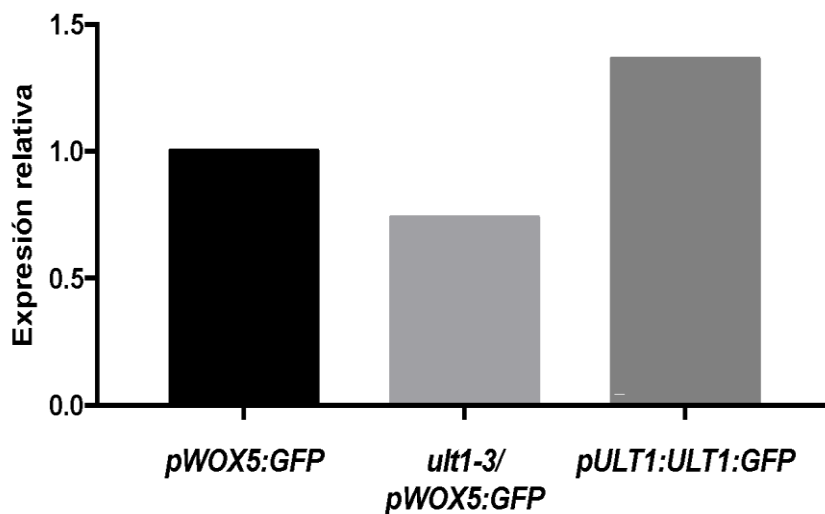


Figura S9. Determinaciones por qPCR que muestran los niveles de expresión de GFP en diferentes fondos usando a RNAH como control de carga.

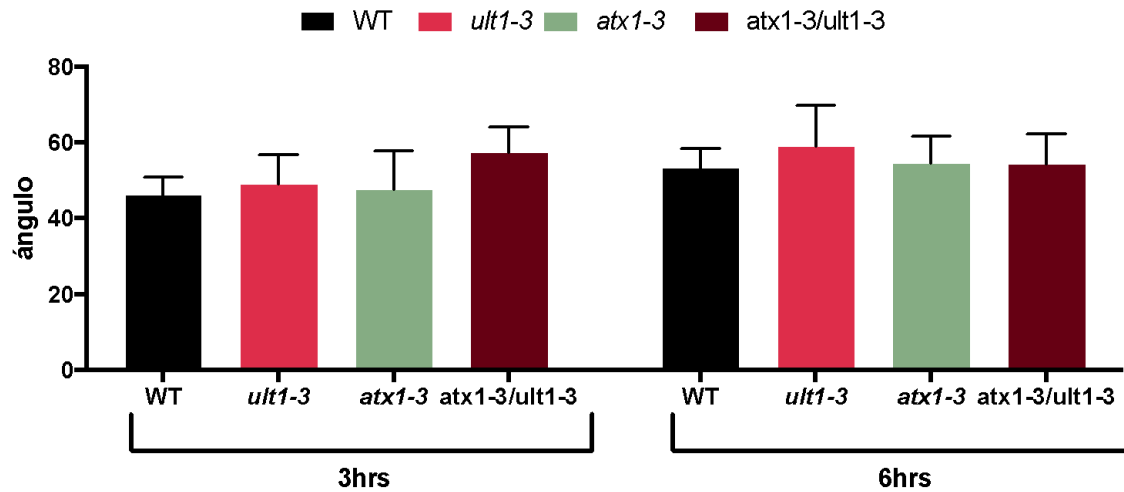


Figura S10. ULT1 no participa en la respuesta gravitrópica en la raíz. Ángulos medidos de la punta de la raíz con respecto al eje de la raíz principal después de 3 y 6 horas de rotar 90° la caja de medio MS. Plantas de 5 dps (n=10).

Ensayo	Gen	Locus	Nombre	Secuencia
qPCR	RNAH	AT1G58050	RNAH_Y_qF	5'-CCATTCTACTTTTTGGCGGCT-3'
			RNAH_Y_qR	5'-TCAATGGTAACTGATCCACTCTGATG-3'
	TIP41	AT4G34270	TIP41_Y_qF	5'-GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCAA-3'
			TIP41_Y_qR	5'-TCAACTGGATACCCTTTTCGCA-3'
	PIN1	AT1G73590	MP-PIN1q-F	5'-TGGTCCCCTCATTTCTTCAAGT-3'
			MP-PIN1q-R	5'-CAACCCAAGACTGAACATAGCCA-3'
	PIN2	AT5G57090.1	PIN2 FOR	5'-CTG CTC TTC CTC AAG GAA TCG-3'
			PIN2 REV	5'-ATA CAC CTA AGC CTG ACC TGG-3'
	PIN3	AT1G70940	MP-PIN3q-F	5'-TTCAGGCCCGCATTACCTCAAGGA-3'
			MP-PIN3q-R	5'-TCGGAAGCGCTATAAGCATTG-3'
	PIN4	AT2G01420	MP-PIN4q-F	5'-GCTAAGGAGATTCCGGATGTTG-3'
			MP-PIN4q-R	5'-CCTCTCCACTATCAAGACCG-3'
	PIN5	AT5G16530	PIN5_DO_qF1	5'-CTGTGAAATGGTGGCACATC-3'
			PIN5_DO_qR1	5'-ACATGGGCCCGTGAACCTCAAT-3'
	PIN7	AT1G23080.1	PIN7_DO_qF1	5'-GTGAAAACAAAGCTGGTCCGATG-3'
			PIN7_DO_qR1	5'-CCGAAGCTTGTGTAGTCCGT-3'
	LAX2	AT2G21050.1	LAX2_DO_qF1	5'-CCATGGACAGTAGAAGGAGTG-3'
			LAX2_DO_qR1	5'-AGCATGTCCACCGAATGTGT-3'
	AUX1	AT2G38120.1	AUX1_DO_qF1	5'-TCGCTCACATGCTCACTTACCGAT-3'
			AUX1_DO_qR1	5'-AAGAACCCAAACCACCACGAAAGC-3'
	GH3.1	AT2G14960	GH3.1_DO_qF1	5'-GATGTTCCAGAGCTAGTGAGGA-3'
			GH3.1_DO_qR1	5'-CAGAGATTCAACGCATTGCTGA-3'
	GH3.5	AT4G27260	GH3.5_DO_qF1	5'-CCTCACAAGCTCTGGGACATC-3'
			GH3.5_DO_qR1	5'-GGAACGAAGTGGCTCATCAC-3'
	IAA19	AT3G15540	IAA19_DO_qF1	5'-CGTGGCATCGGTGTGGCCTT-3'
			IAA19_DO_qR1	5'-GCTGCAGCCCCAAACCCGGTA-3'
	IAA7	AT3G23050.1	IAA7_DO_qF1	5'-CCTCCTGCTAAAGCACAAGTGG-3'
			IAA7_DO_qR1	5'-CTTCTCACTGCTGGCCTCC-3'
	ARF5	AT1G19850.1	ARF5_DO_qF1	5'-CCATGGGAAGAGTTTGTGGG-3'
			ARF5_DO_qR1	5'-AGATCGTTAATGCCTGCGCT-3'
	ARF7	AT5G20730.1	ARF7_DO_qF1	5'-GATGATCCATGGGAAGAATTCG-3'
			ARF7_DO_qR1	5'-ACTGGTACACCGGCAAAGTT-3'
	ARF10	AT2G28350.1	ARF10_DO_qF1	5'-CGTCTCCTTCAGGTAGCTTGGG-3'
			ARF10_DO_qR1	5'-ACCAATTCGACTAACCACGGA-3'
	PLT1	AT3G20840	QRT_PLT1F	5'-CAAACCCCTGGTGGTGTTC-3'
			QRT_PLT1R	5'-CTACCAAAAGGCCCCCTCTA-3'
	PLT2	AT1G51190	QRT_PLT2F	5'-ATCCAGGAGGTGTTTTACAG-3'
			QRT_PLT2R	5'-AGAAGACTCCAGCCGATCCT-3'
	AGL42	AT5G62165.1	AGL42_AGR_qF	5'-GAACGCTACCGCAAGTACAC-3'
			AGL42_AGR_qR	5'-GCAAGTGAATTTGTGAGTCGTG-3'
	SHR	AT4G37650	QRT_SHRF	5'-GCCAACGTAAAGGGTTGTTTT-3'
			QRT_SHRR	5'-TCAATCTCAAAGCCCATCATC-3'
	SCR	AT3G54220	QRT_SCRF	5'-CTTGGACGCCTCGTTCTTAG-3'
			QRT_SCRR	5'-CCACCAATCAGGTAGCCAAT-3'
		AT3G26120.1	TEL1_DO_qF1	5'-CGAGAGTTCAGGGTTTGGAGGAT-3'
			TEL1_DO_qR1	5'-AACTGCTTCCCATCTCGTGG-3'
	WOX5	AT3G11260	WOX5_DO_qF1	5'-CCATCAACTAGAGATGTTTTTG-3'
			WOX5_DO_qR1	5'-CACCTTGGAGTTGGAGTCTTC-3'
	ULT1	AT4G28190	ULT1_exon_DO F	5'-GGGTTTTTCCCCACCGGTGACC-3'
			PA-ULT1pcr R	5'-AGCTGGTGTCAACTTGTCTAGC-3'
	CYCD3;1	AT4G34160.1	RT-FCYCD3;1	5'-CTA GAC TTT CAA GTG GAG GA-3'
			RT-RCYCD3;1	5'-GAG TAA TGA GAT GCA TCT TCC-3'
	CYCD3;3		CYCD3;3F	-
			CYCD3;3R	-
Clonación		AT4G28190	EP-ULT1-F	5'-GCTTAATACTTATACTACCAACATC-3'
			EP-ULT1-R	5'-AGCTTTGACATTGCTGGTGAAG-3'
Genotipificación	T-DNA	-	LBC1	5'-GGA ACA ACA CTC AAC CCT ATC TCG G-3'
	ATX1	AT1G66240	MP-ATX1pcr-F	5'- GGCGGGAGATATGATGATTGAA-3'
			MP-ATX1pcr-R	5'-TCTTCCCATTTAGGGATATGCC-3'
	ULT1	AT4G28190	PA-ULT1pcrF	5'-GTGGGGTCAATGTTGGTGGCGA-3'
			PA-ULT1pcrR	5'-AGCTGGTGTCAACTTGTCTAGC-3'
			ULT1_DO_qF	5'-ACT TCA CCA GCA ATG TCA AAG C-3'
			ULT1_DO_qR	5'-GCA ACG AAC AAA GTC TGA GAC AG-3'
			EP-ULT1-R	5'-AGCTTTGACATTGCTGGTGAAG-3'

		ULT2_DO_qF2	5'-GCGGAACCTTGTCTCCTTCAATG-3'
		ULT1alelo1F_DO	5'-GGTTGCGATGAAGACAAGTTGA-3'
		ULT1alelo1R_DO	5'-TCTATGGCAAACCTTTGGCACC-3'
		ULT1IncF_DO	5'-CTGGTGAAAGGGAAGAGCCA-3'
		ULT1IncR_DO	5'-AAACAAAACCTCGTGGGGGCA-3'
		ULT1IncR2_DO	5'-TCCTCTTTACCTGGTGACGAC-3'
		ULT1_ATG_DO F	5'-ATGGCGAACAATGAGGGAGAGA-3'
		ULT1_ATG_DO R	5'-CTAGCAACAGCATCGCCGTATC-3'

Tabla S1. Lista de oligos utilizados en esta tesis

12. REFERENCIAS

- Abramson, J., M. Giraud, C. Benoist & D. Mathis (2010) Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell*, 140, 123-35.
- Aichinger, E., C. B. Villar, R. Di Mambro, S. Sabatini & C. Köhler (2011) The CHD3 chromatin remodeler PICKLE and polycomb group proteins antagonistically regulate meristem activity in the Arabidopsis root. *Plant Cell*, 23, 1047-60.
- Aida, M., D. Beis, R. Heidstra, V. Willemsen, I. Blilou, C. Galinha, L. Nussaume, Y. S. Noh, R. Amasino & B. Scheres (2004) The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell*, 119, 109-20.
- Alonso, J. M., A. N. Stepanova, T. J. Leisse, C. J. Kim, H. Chen, P. Shinn, D. K. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas, R. Cheuk, C. Gadriab, C. Heller, A. Jeske, E. Koesema, C. C. Meyers, H. Parker, L. Prednis, Y. Ansari, N. Choy, H. Deen, M. Geralt, N. Hazari, E. Hom, M. Karnes, C. Mulholland, R. Ndubaku, I. Schmidt, P. Guzman, L. Aguilar-Henonin, M. Schmid, D. Weigel, D. E. Carter, T. Marchand, E. Risseuw, D. Brogden, A. Zeko, W. L. Crosby, C. C. Berry & J. R. Ecker (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science*, 301, 653-7.
- Alvarez-Venegas, R. (2010) Regulation by polycomb and trithorax group proteins in Arabidopsis. *Arabidopsis Book*, 8, e0128.
- Alvarez-Venegas, R. & Z. Avramova (2005) Methylation patterns of histone H3 Lys 4, Lys 9 and Lys 27 in transcriptionally active and inactive Arabidopsis genes and in atx1 mutants. *Nucleic Acids Res*, 33, 5199-207.
- Alvarez-Venegas, R., S. Pien, M. Sadler, X. Witmer, U. Grossniklaus & Z. Avramova (2003) ATX-1, an Arabidopsis homolog of trithorax, activates flower homeotic genes. *Curr Biol*, 13, 627-37.
- Alvarez-Venegas, R., M. Sadler, A. Hlavacka, F. Baluska, Y. Xia, G. Lu, A. Firsov, G. Sarath, H. Moriyama, J. G. Dubrovsky & Z. Avramova (2006) The Arabidopsis homolog of trithorax, ATX1, binds phosphatidylinositol 5-phosphate, and the two regulate a common set of target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 6049-54.
- Aquea, F., A. J. Johnston, P. Cañon, U. Grossniklaus & P. Arce-Johnson (2010) TRAUCO, a Trithorax-group gene homologue, is required for early embryogenesis in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot*, 61, 1215-24.
- Ariel, F., T. Jegu, D. Latrasse, N. Romero-Barrios, A. Christ, M. Benhamed & M. Crespi (2014) Noncoding transcription by alternative RNA polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. *Mol Cell*, 55, 383-96.
- Avramova, Z. (2009) Evolution and pleiotropy of TRITHORAX function in Arabidopsis. *Int J Dev Biol*, 53, 371-81.
- Bannister, A. J. & T. Kouzarides (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, 21, 381-95.
- Bargmann, B. O., S. Vanneste, G. Krouk, T. Nawy, I. Efroni, E. Shani, G. Choe, J. Friml, D. C. Bergmann, M. Estelle & K. D. Birnbaum (2013) A map of cell type-specific auxin responses. *Mol Syst Biol*, 9, 688.
- Barker, H. E., G. K. Smyth, J. Wettenhall, T. A. Ward, M. L. Bath, G. J. Lindeman & J. E. Visvader (2008) Deaf-1 regulates epithelial cell proliferation and side-branching in the mammary gland. *BMC Dev Biol*, 8, 94.
- Basak, O., T. G. Krieger, M. J. Muraro, K. Wiebrands, D. E. Stange, J. Frias-Aldeguer, N. C. Rivron, M. van de Wetering, J. H. van Es, A. van Oudenaarden, B. D. Simons & H. Clevers (2018) Troy+ brain stem cells cycle through quiescence and regulate their number by sensing niche occupancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E610-E619.
- Baubec, T., A. Finke, O. Mittelsten Scheid & A. Pecinka (2014) Meristem-specific expression of epigenetic regulators safeguards transposon silencing in Arabidopsis. *EMBO Rep*, 15, 446-52.
- Baumbusch, L. O., T. Thorstensen, V. Krauss, A. Fischer, K. Naumann, R. Assalkhou, I. Schulz, G. Reuter & R. B. Aalen (2001) The Arabidopsis thaliana genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Res*, 29, 4319-33.
- Bennett, T., A. van den Toorn, V. Willemsen & B. Scheres (2014) Precise control of plant stem cell activity through parallel regulatory inputs. *Development*, 141, 4055-64.

- Berger, S. L., T. Kouzarides, R. Shiekhattar & A. Shilatifard (2009) An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*, 23, 781-3.
- Berr, A., L. Xu, J. Gao, V. Cognat, A. Steinmetz, A. Dong & W. H. Shen (2009) SET DOMAIN GROUP25 encodes a histone methyltransferase and is involved in FLOWERING LOCUS C activation and repression of flowering. *Plant Physiol*, 151, 1476-85.
- Blilou, I., J. Xu, M. Wildwater, V. Willemsen, I. Paponov, J. Friml, R. Heidstra, M. Aida, K. Palme & B. Scheres (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature*, 433, 39-44.
- Bollati, V. & A. Baccarelli (2010) Environmental epigenetics. *Heredity (Edinb)*, 105, 105-12.
- Bottomley, M. J., M. W. Collard, J. I. Huggenvik, Z. Liu, T. J. Gibson & M. Sattler (2001) The SAND domain structure defines a novel DNA-binding fold in transcriptional regulation. *Nat Struct Biol*, 8, 626-33.
- Calonje, M., R. Sanchez, L. Chen & Z. R. Sung (2008) EMBRYONIC FLOWER1 participates in polycomb group-mediated AG gene silencing in Arabidopsis. *Plant Cell*, 20, 277-91.
- Carles, C. C., D. Choffnes-Inada, K. Reville, K. Lertpiriyapong & J. C. Fletcher (2005) ULTRAPETALA1 encodes a SAND domain putative transcriptional regulator that controls shoot and floral meristem activity in Arabidopsis. *Development*, 132, 897-911.
- Carles, C. C. & J. C. Fletcher (2009) The SAND domain protein ULTRAPETALA1 acts as a trithorax group factor to regulate cell fate in plants. *Genes Dev*, 23, 2723-8.
- Carles, C. C., K. Lertpiriyapong, K. Reville & J. C. Fletcher (2004) The ULTRAPETALA1 gene functions early in Arabidopsis development to restrict shoot apical meristem activity and acts through WUSCHEL to regulate floral meristem determinacy. *Genetics*, 167, 1893-903.
- Chen, L. Q., J. H. Luo, Z. H. Cui, M. Xue, L. Wang, X. Y. Zhang, W. P. Pawlowski & Y. He (2017). *Plant Physiol*, 174, 1795-1806.
- Cruz-Ramirez, A., S. Diaz-Trivino, G. Wachsman, Y. Du, M. Arteaga-Vazquez, H. Zhang, R. Benjamins, I. Blilou, A. B. Neef, V. Chandler & B. Scheres (2013) A SCARECROW-RETINOBLASTOMA protein network controls protective quiescence in the Arabidopsis root stem cell organizer. *PLoS Biol*, 11, e1001724.
- de la Paz Sanchez, M., P. Aceves-García, E. Petrone, S. Steckenborn, R. Vega-León, E. R. Álvarez-Buylla, A. Garay-Arroyo & B. García-Ponce (2015) The impact of Polycomb group (PcG) and Trithorax group (TrxG) epigenetic factors in plant plasticity. *New Phytol*, 208, 684-94.
- Delbarre, A., P. Muller, V. Imhoff & J. Guern (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta*, 198, 532-541.
- Dello Ioio, R., K. Nakamura, L. Moubayidin, S. Perilli, M. Taniguchi, M. T. Morita, T. Aoyama, P. Costantino & S. Sabatini (2008) A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 322, 1380-4.
- Di Mambro, R., M. De Ruvo, E. Pacifici, E. Salvi, R. Sozzani, P. N. Benfey, W. Busch, O. Novak, K. Ljung, L. Di Paola, A. F. M. Marée, P. Costantino, V. A. Grieneisen & S. Sabatini (2017) Auxin minimum triggers the developmental switch from cell division to cell differentiation in the. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E7641-E7649.
- Ding, Y., Z. Avramova & M. Fromm (2011) Two distinct roles of ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX1 (ATX1) at promoters and within transcribed regions of ATX1-regulated genes. *Plant Cell*, 23, 350-63.
- Ding, Y., I. Ndamukong, Z. Xu, H. Lapko, M. Fromm & Z. Avramova (2012) ATX1-generated H3K4me3 is required for efficient elongation of transcription, not initiation, at ATX1-regulated genes. *PLoS Genet*, 8, e1003111.
- Ding, Z. & J. Friml (2010) Auxin regulates distal stem cell differentiation in Arabidopsis roots. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 12046-51.
- Drisch, R. C. & Y. Stahl (2015) Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Front Plant Sci*, 6, 505.
- Erhard, K. F., J. L. Stonaker, S. E. Parkinson, J. P. Lim, C. J. Hale & J. B. Hollick (2009) RNA polymerase IV functions in paramutation in Zea mays. *Science*, 323, 1201-5.
- Farrona, S., L. Hurtado, J. L. Bowman & J. C. Reyes (2004) The Arabidopsis thaliana SNF2 homolog AtBRM controls shoot development and flowering. *Development*, 131, 4965-75.

- Farrona, S., L. Hurtado, R. March-Díaz, R. J. Schmitz, F. J. Florencio, F. Turck, R. M. Amasino & J. C. Reyes (2011) Brahma is required for proper expression of the floral repressor FLC in Arabidopsis. *PLoS One*, 6, e17997.
- Fletcher, J. C. (2001) The ULTRAPETALA gene controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Development*, 128, 1323-33.
- (2017) State of the Art: trxG Factor Regulation of Post-embryonic Plant Development. *Front Plant Sci*, 8, 1925.
- Forzani, C., E. Aichinger, E. Sornay, V. Willemsen, T. Laux, W. Dewitte & J. A. Murray (2014) WOX5 suppresses CYCLIN D activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Curr Biol*, 24, 1939-44.
- Gaillochet, C. & J. U. Lohmann (2015) The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. *Development*, 142, 2237-49.
- Galinha, C., H. Hofhuis, M. Luijten, V. Willemsen, I. Blilou, R. Heidstra & B. Scheres (2007) PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature*, 449, 1053-7.
- Garay-Arroyo, A., M. De La Paz Sánchez, B. García-Ponce, E. Azpeitia & E. R. Alvarez-Buylla (2012) Hormone symphony during root growth and development. *Dev Dyn*, 241, 1867-85.
- Garay-Arroyo, A., E. Ortiz-Moreno, M. de la Paz Sánchez, A. S. Murphy, B. García-Ponce, N. Marsch-Martínez, S. de Folter, A. Corvera-Poiré, F. Jaimes-Miranda, M. A. Pacheco-Escobedo, J. G. Dubrovsky, S. Pelaz & E. R. Álvarez-Buylla (2013) The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during Arabidopsis root development by regulating PIN expression. *EMBO J*, 32, 2884-95.
- García-Cruz, K. V., B. García-Ponce, A. Garay-Arroyo, M. P. Sanchez, Y. Ugartechea-Chirino, B. Desvoyes, M. A. Pacheco-Escobedo, R. Tapia-López, I. Ransom-Rodríguez, C. Gutierrez & E. R. Alvarez-Buylla (2016) The MADS-box XAANTAL1 increases proliferation at the Arabidopsis root stem-cell niche and participates in transition to differentiation by regulating cell-cycle components. *Ann Bot*, 118, 787-796.
- García-Gómez, M. L., D. Ornelas-Ayala, A. Garay-Arroyo, B. García-Ponce, M. P. Sánchez & E. R. Álvarez-Buylla (2020) A system-level mechanistic explanation for asymmetric stem cell fates: Arabidopsis thaliana root niche as a study system. *Sci Rep*, 10, 3525.
- Glaser, S., S. Lubitz, K. L. Loveland, K. Ohbo, L. Robb, F. Schwenk, J. Seibler, D. Roellig, A. Kranz, K. Anastasiadis & A. F. Stewart (2009) The histone 3 lysine 4 methyltransferase, Mll2, is only required briefly in development and spermatogenesis. *Epigenetics Chromatin*, 2, 5.
- Godfrey, K. M., P. M. Costello & K. A. Lillycrop (2015) The developmental environment, epigenetic biomarkers and long-term health. *J Dev Orig Health Dis*, 6, 399-406.
- Goldberg, A. D., C. D. Allis & E. Bernstein (2007) Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, 128, 635-8.
- González-García, M. P., J. Vilarrasa-Blasi, M. Zhiponova, F. Divol, S. Mora-García, E. Russinova & A. I. Caño-Delgado (2011) Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development*, 138, 849-59.
- Grini, P. E., T. Thorstensen, V. Alm, G. Vizcay-Barrena, S. S. Windju, T. S. Jørstad, Z. A. Wilson & R. B. Aalen (2009) The ASH1 HOMOLOG 2 (ASHH2) histone H3 methyltransferase is required for ovule and anther development in Arabidopsis. *PLoS One*, 4, e7817.
- Guo, L., Y. Yu, J. A. Law & X. Zhang (2010) SET DOMAIN GROUP2 is the major histone H3 lysine [corrected] 4 trimethyltransferase in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 18557-62.
- Hamann, T., E. Benkova, I. Bäurle, M. Kientz & G. Jürgens (2002) The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev*, 16, 1610-5.
- Heidstra, R. & S. Sabatini (2014) Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 301-12.
- Hellman, A. & A. Chess (2007) Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science*, 315, 1141-3.
- Heyman, J., T. Cools, F. Vandenbussche, K. S. Heyndrickx, J. Van Leene, I. Vercauteren, S. Vanderauwera, K. Vandepeole, G. De Jaeger, D. Van Der Straeten & L. De Veylder (2013) ERF115 controls root quiescent center cell division and stem cell replenishment. *Science*, 342, 860-3.

- Hoffmann, A., C. A. Zimmermann & D. Spengler (2015) Molecular epigenetic switches in neurodevelopment in health and disease. *Front Behav Neurosci*, 9, 120.
- Ingham, P. W. (1985) Genetic control of the spatial pattern of selector gene expression in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 50, 201-8.
- Ivanov, V. B. & J. G. Dubrovsky (2013) Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends Plant Sci*, 18, 237-43.
- Ji, H., S. Wang, K. Li, D. Szakonyi, C. Koncz & X. Li (2015) PRL1 modulates root stem cell niche activity and meristem size through WOX5 and PLTs in *Arabidopsis*. *Plant J*, 81, 399-412.
- Jia, Y., H. Tian, H. Li, Q. Yu, L. Wang, J. Friml & Z. Ding (2015) The *Arabidopsis thaliana* elongator complex subunit 2 epigenetically affects root development. *J Exp Bot*, 66, 4631-42.
- Jiang, D., X. Gu & Y. He (2009) Establishment of the winter-annual growth habit via FRIGIDA-mediated histone methylation at FLOWERING LOCUS C in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21, 1733-46.
- Jiang, D., N. C. Kong, X. Gu, Z. Li & Y. He (2011) *Arabidopsis* COMPASS-like complexes mediate histone H3 lysine-4 trimethylation to control floral transition and plant development. *PLoS Genet*, 7, e1001330.
- Jin, J., J. Liu, H. Wang, L. Wong & N. H. Chua (2013) PLncDB: plant long non-coding RNA database. *Bioinformatics*, 29, 1068-71.
- Jude, C. D., L. Climer, D. Xu, E. Artinger, J. K. Fisher & P. Ernst (2007) Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Cell Stem Cell*, 1, 324-37.
- Jupe, F., A. C. Rivkin, T. P. Michael, M. Zander, S. T. Motley, J. P. Sandoval, R. K. Slotkin, H. Chen, R. Castanon, J. R. Nery & J. R. Ecker (2019) The complex architecture and epigenomic impact of plant T-DNA insertions. *PLoS Genet*, 15, e1007819.
- Kamiya, M., S. Y. Higashio, A. Isomoto, J. M. Kim, M. Seki, S. Miyashima & K. Nakajima (2016) Control of root cap maturation and cell detachment by BEARSKIN transcription factors in *Arabidopsis*. *Development*, 143, 4063-4072.
- Kawakatsu, T., T. Stuart, M. Valdes, N. Breakfield, R. J. Schmitz, J. R. Nery, M. A. Urich, X. Han, R. Lister, P. N. Benfey & J. R. Ecker (2016) Unique cell-type-specific patterns of DNA methylation in the root meristem. *Nat Plants*, 2, 16058.
- Kennison, J. A. & J. W. Tamkun (1988) Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 8136-40.
- Kim, D. H. & S. Sung (2017) Vernalization-Triggered Intragenic Chromatin Loop Formation by Long Noncoding RNAs. *Dev Cell*, 40, 302-312.e4.
- Kirk, M. M., K. Stark, S. M. Miller, W. Muller, B. E. Taillon, H. Gruber, R. Schmitt & D. L. Kirk (1999) *regA*, a *Volvox* gene that plays a central role in germ-soma differentiation, encodes a novel regulatory protein. *Development*, 126, 639-47.
- Kong, X., S. Lu, H. Tian & Z. Ding (2015) WOX5 is Shining in the Root Stem Cell Niche. *Trends Plant Sci*, 20, 601-603.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128, 693-705.
- Kwon, C. S., C. Chen & D. Wagner (2005) WUSCHEL is a primary target for transcriptional regulation by SPLAYED in dynamic control of stem cell fate in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 19, 992-1003.
- Lang, Z., Y. Wang, K. Tang, D. Tang, T. Datsenko, J. Cheng, Y. Zhang, A. K. Handa & J. K. Zhu (2017) Critical roles of DNA demethylation in the activation of ripening-induced genes and inhibition of ripening-repressed genes in tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E4511-E4519.
- Lewis, E. B. (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 276, 565-70.
- Liang, S. C., B. Hartwig, P. Perera, S. Mora-García, E. de Leau, H. Thornton, F. de Lima Alves, F. L. de Alves, J. Rappsilber, J. Rappsilber, S. Yang, G. V. James, K. Schneeberger, E. J. Finnegan, F. Turck & J. Goodrich (2015) Kicking against the PRCs - A Domesticated Transposase Antagonises Silencing Mediated by Polycomb Group Proteins and Is an Accessory Component of Polycomb Repressive Complex 2. *PLoS Genet*, 11, e1005660.
- Liu, B., A. Berr, C. Chang, C. Liu, W. H. Shen & Y. Ruan (2016) Interplay of the histone methyltransferases SDG8 and SDG26 in the regulation of transcription and plant flowering and development. *Biochim Biophys Acta*, 1859, 581-90.
- Loda, A. & E. Heard (2019) Xist RNA in action: Past, present, and future. *PLoS Genet*, 15, e1008333.

- López Sánchez, A., J. H. Stassen, L. Furci, L. M. Smith & J. Ton (2016) The role of DNA (de)methylation in immune responsiveness of Arabidopsis. *Plant J*, 88, 361-374.
- Matzke, M. A. & R. A. Mosher (2014) RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet*, 15, 394-408.
- Milne, T. A., Y. Dou, M. E. Martin, H. W. Brock, R. G. Roeder & J. L. Hess (2005) MLL associates specifically with a subset of transcriptionally active target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 14765-70.
- Monfared, M. M., C. C. Carles, P. Rossignol, H. R. Pires & J. C. Fletcher (2013) The ULT1 and ULT2 trxG genes play overlapping roles in Arabidopsis development and gene regulation. *Mol Plant*, 6, 1564-79.
- Monfared, M. M. & J. C. Fletcher (2014) The ULT trxG factors play a role in Arabidopsis fertilization. *Plant Signal Behav*, 9, e977723.
- Moore, L. D., T. Le & G. Fan (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38, 23-38.
- Moreau, F., E. Thevenon, R. Blanvillain, I. Lopez-Vidriero, J. M. Franco-Zorrilla, R. Dumas, F. Parcy, P. Morel, C. Trehin & C. C. Carles (2016) The Myb-domain protein ULTRAPETALA1 INTERACTING FACTOR 1 controls floral meristem activities in Arabidopsis. *Development*, 143, 1108-19.
- Moubayidin, L., R. Di Mambro, R. Sozzani, E. Pacifici, E. Salvi, I. Terpstra, D. Bao, A. van Dijken, R. Dello Ioio, S. Perilli, K. Ljung, P. N. Benfey, R. Heidstra, P. Costantino & S. Sabatini (2013) Spatial coordination between stem cell activity and cell differentiation in the root meristem. *Dev Cell*, 26, 405-15.
- Moubayidin, L., E. Salvi, L. Giustini, I. Terpstra, R. Heidstra, P. Costantino & S. Sabatini (2016) A SCARECROW-based regulatory circuit controls Arabidopsis thaliana meristem size from the root endodermis. *Planta*, 243, 1159-68.
- Napsucialy-Mendivil, S., R. Alvarez-Venegas, S. Shishkova & J. G. Dubrovsky (2014) Arabidopsis homolog of trithorax1 (ATX1) is required for cell production, patterning, and morphogenesis in root development. *J Exp Bot*, 65, 6373-84.
- Nedelcu, A. M. (2019) Independent evolution of complex development in animals and plants: deep homology and lateral gene transfer. *Dev Genes Evol*, 229, 25-34.
- Ng, H. H., F. Robert, R. A. Young & K. Struhl (2003) Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell*, 11, 709-19.
- Obernier, K., A. Cebrian-Silla, M. Thomson, J. I. Parraguez, R. Anderson, C. Guinto, J. Rodas Rodriguez, J. M. Garcia-Verdugo & A. Alvarez-Buylla (2018) Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell*, 22, 221-234.e8.
- Org, T., F. Chignola, C. Hetenyi, M. Gaetani, A. Rebane, I. Liiv, U. Maran, L. Mollica, M. J. Bottomley, G. Musco & P. Peterson (2008) The autoimmune regulator PHD finger binds to non-methylated histone H3K4 to activate gene expression. *EMBO Rep*, 9, 370-6.
- Ortega-Martinez, O., M. Pernas, R. J. Carol & L. Dolan (2007) Ethylene modulates stem cell division in the Arabidopsis thaliana root. *Science*, 317, 507-10.
- Pacheco-Escobedo, M. A., V. B. Ivanov, I. Ransom-Rodríguez, G. Arriaga-Mejía, H. Ávila, I. A. Baklanov, A. Pimentel, G. Corkidi, P. Doerner, J. G. Dubrovsky, E. R. Álvarez-Buylla & A. Garay-Arroyo (2016) Longitudinal zonation pattern in Arabidopsis root tip defined by a multiple structural change algorithm. *Ann Bot*.
- Peng, Y., W. Ma, L. Chen, L. Yang, S. Li, H. Zhao, Y. Zhao, W. Jin, N. Li, M. W. Bevan, X. Li, Y. Tong & Y. Li (2013) Control of root meristem size by DA1-RELATED PROTEIN2 in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 161, 1542-56.
- Petricka, J. J., C. M. Winter & P. N. Benfey (2012) Control of Arabidopsis root development. *Annu Rev Plant Biol*, 63, 563-90.
- Pi, L., E. Aichinger, E. van der Graaff, C. I. Llavata-Peris, D. Weijers, L. Hennig, E. Groot & T. Laux (2015) Organizer-Derived WOX5 Signal Maintains Root Columella Stem Cells through Chromatin-Mediated Repression of CDF4 Expression. *Dev Cell*, 33, 576-88.
- Pien, S., D. Fleury, J. S. Mylne, P. Crevillen, D. Inzé, Z. Avramova, C. Dean & U. Grossniklaus (2008) ARABIDOPSIS TRITHORAX1 dynamically regulates FLOWERING LOCUS C activation via histone 3 lysine 4 trimethylation. *Plant Cell*, 20, 580-8.
- Pillitteri, L. J., X. Guo & J. Dong (2016) Asymmetric cell division in plants: mechanisms of symmetry breaking and cell fate determination. *Cell Mol Life Sci*, 73, 4213-4229.

- Pires, H. R., M. M. Monfared, E. A. Shemyakina & J. C. Fletcher (2014) ULTRAPETALA *trxG* genes interact with KANADI transcription factor genes to regulate Arabidopsis gynoecium patterning. *Plant Cell*, 26, 4345-61.
- Pires, H. R., E. A. Shemyakina & J. C. Fletcher (2015) The ULTRAPETALA1 *trxG* factor contributes to patterning the Arabidopsis adaxial-abaxial leaf polarity axis. *Plant Signal Behav*, 10, e1034422.
- Poynter, S. T. & C. Kadoch (2016) Polycomb and trithorax opposition in development and disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 5, 659-688.
- Pu, L., M. S. Liu, S. Y. Kim, L. F. Chen, J. C. Fletcher & Z. R. Sung (2013) EMBRYONIC FLOWER1 and ULTRAPETALA1 Act Antagonistically on Arabidopsis Development and Stress Response. *Plant Physiol*, 162, 812-30.
- Pu, L. & Z. R. Sung (2015) PcG and *trxG* in plants - friends or foes. *Trends Genet*, 31, 252-62.
- Rao, R. C. & Y. Dou (2015) Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases. *Nat Rev Cancer*, 15, 334-46.
- Rao, X., X. Huang, Z. Zhou & X. Lin (2013) An improvement of the 2^{-ΔΔCT} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*, 3, 71-85.
- Rinn, J. L. & H. Y. Chang (2012) Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem*, 81, 145-66.
- Roy, D., J. Chakrabarty, R. Mallik & S. Chaudhuri (2019) Rice Trithorax factor ULTRAPETALA 1 (OsULT1) specifically binds to "GAGAG" sequence motif present in Polycomb response elements. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*.
- Sabatini, S., D. Beis, H. Wolkenfelt, J. Murfett, T. Guilfoyle, J. Malamy, P. Benfey, O. Leyser, N. Bechtold, P. Weisbeek & B. Scheres (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell*, 99, 463-72.
- Sabatini, S., R. Heidstra, M. Wildwater & B. Scheres (2003) SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes Dev*, 17, 354-8.
- Sablowski, R. (2004) Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? *Trends Cell Biol*, 14, 605-11.
- Saleh, A., R. Alvarez-Venegas, M. Yilmaz, O. Le, G. Hou, M. Sadler, A. Al-Abdallat, Y. Xia, G. Lu, I. Ladunga & Z. Avramova (2008) The highly similar Arabidopsis homologs of trithorax ATX1 and ATX2 encode proteins with divergent biochemical functions. *Plant Cell*, 20, 568-79.
- Sandhu, K. S., P. S. Koirala & M. M. Neff (2013) The *ben1-1* brassinosteroid-catabolism mutation is unstable due to epigenetic modifications of the intronic T-DNA insertion. *G3 (Bethesda)*, 3, 1587-95.
- Sarkar, A. K., M. Luijten, S. Miyashima, M. Lenhard, T. Hashimoto, K. Nakajima, B. Scheres, R. Heidstra & T. Laux (2007) Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature*, 446, 811-4.
- Schubert, D., L. Primavesi, A. Bishopp, G. Roberts, J. Doonan, T. Jenuwein & J. Goodrich (2006) Silencing by plant Polycomb-group genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27. *EMBO J*, 25, 4638-49.
- Schuettengruber, B., H. M. Bourbon, L. Di Croce & G. Cavalli (2017) Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell*, 171, 34-57.
- Schuettengruber, B., A. M. Martinez, N. Iovino & G. Cavalli (2011) Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 799-814.
- Shilatifard, A. (2008) Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 341-8.
- (2012) The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis. *Annu Rev Biochem*, 81, 65-95.
- Simons, B. D. & H. Clevers (2011) Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell*, 145, 851-62.
- Snippert, H. J., L. G. van der Flier, T. Sato, J. H. van Es, M. van den Born, C. Kroon-Veenboer, N. Barker, A. M. Klein, J. van Rheenen, B. D. Simons & H. Clevers (2010) Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell*, 143, 134-44.
- Springer, N. M., C. A. Napoli, D. A. Selinger, R. Pandey, K. C. Cone, V. L. Chandler, H. F. Kaeppler & S. M. Kaeppler (2003) Comparative analysis of SET domain proteins in maize and Arabidopsis reveals multiple duplications preceding the divergence of monocots and dicots. *Plant Physiol*, 132, 907-25.

- Stoller, J. Z., L. Huang, C. C. Tan, F. Huang, D. D. Zhou, J. Yang, B. D. Gelb & J. A. Epstein (2010) Ash2l interacts with Tbx1 and is required during early embryogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 235, 569-76.
- Street, I. H., D. E. Mathews, M. V. Yamburkenko, A. Sorooshzadeh, R. T. John, R. Swarup, M. J. Bennett, J. J. Kieber & G. E. Schaller (2016) Cytokinin acts through the auxin influx carrier AUX1 to regulate cell elongation in the root. *Development*, 143, 3982-3993.
- Strohm, A. K., K. L. Baldwin & P. H. Masson (2012) Molecular mechanisms of root gravity sensing and signal transduction. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 1, 276-85.
- Tamburri, S., E. Lavarone, D. Fernández-Pérez, E. Conway, M. Zanotti, D. Manganaro & D. Pasini (2020) Histone H2AK119 Mono-Ubiquitination Is Essential for Polycomb-Mediated Transcriptional Repression. *Mol Cell*, 77, 840-856.e5.
- Teale, W. D., I. A. Paponov & K. Palme (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 847-59.
- ten Hove, C. A., K. J. Lu & D. Weijers (2015) Building a plant: cell fate specification in the early Arabidopsis embryo. *Development*, 142, 420-30.
- Tian, H., K. Wabnik, T. Niu, H. Li, Q. Yu, S. Pollmann, S. Vanneste, W. Govaerts, J. Rolcik, M. Geisler, J. Friml & Z. Ding (2014) WOX5-IAA17 feedback circuit-mediated cellular auxin response is crucial for the patterning of root stem cell niches in Arabidopsis. *Mol Plant*, 7, 277-89.
- Timilsina, R., J. H. Kim, H. G. Nam & H. R. Woo (2019) Temporal changes in cell division rate and genotoxic stress tolerance in quiescent center cells of Arabidopsis primary root apical meristem. *Sci Rep*, 9, 3599.
- Torok, M. & L. D. Etkin (2001) Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins. *Differentiation*, 67, 63-71.
- Tyler, L., M. J. Miller & J. C. Fletcher (2019) The Trithorax Group Factor ULTRAPETALA1 Regulates Developmental as Well as Biotic and Abiotic Stress Response Genes in Arabidopsis. *G3 (Bethesda)*, 9, 4029-4043.
- van den Berg, C., V. Willemsen, G. Hendriks, P. Weisbeek & B. Scheres (1997) Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature*, 390, 287-9.
- Vanstraelen, M., M. Balaban, O. Da Ines, A. Cultrone, T. Lammens, V. Boudolf, S. C. Brown, L. De Veylder, P. Mergaert & E. Kondorosi (2009) APC/C-CCS52A complexes control meristem maintenance in the Arabidopsis root. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 11806-11.
- Veraksa, A., J. Kennison & W. McGinnis (2002) DEAF-1 function is essential for the early embryonic development of Drosophila. *Genesis*, 33, 67-76.
- Verdeil, J. L., L. Alemanno, N. Niemenak & T. J. Tranbarger (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci*, 12, 245-52.
- Vermeulen, M., K. W. Mulder, S. Denissov, W. W. Pijnappel, F. M. van Schaik, R. A. Varier, M. P. Baltissen, H. G. Stunnenberg, M. Mann & H. T. Timmers (2007) Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell*, 131, 58-69.
- Vieten, A., S. Vanneste, J. Wisniewska, E. Benková, R. Benjamins, T. Beeckman, C. Luschnig & J. Friml (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development*, 132, 4521-31.
- Vissers, L. E., C. M. van Ravenswaaij, R. Admiraal, J. A. Hurst, B. B. de Vries, I. M. Janssen, W. A. van der Vliet, E. H. Huys, P. J. de Jong, B. C. Hamel, E. F. Schoenmakers, H. G. Brunner, J. A. Veltman & A. G. van Kessel (2004) Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet*, 36, 955-7.
- Waddington, C. H. (2012) The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol*, 41, 10-3.
- Wang, H. V. & J. A. Chekanova (2017) Long Noncoding RNAs in Plants. *Adv Exp Med Biol*, 1008, 133-154.
- Wei, L., L. Gu, X. Song, X. Cui, Z. Lu, M. Zhou, L. Wang, F. Hu, J. Zhai, B. C. Meyers & X. Cao (2014) Dicer-like 3 produces transposable element-associated 24-nt siRNAs that control agricultural traits in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 3877-82.
- Whittaker, C. & C. Dean (2017) The FLC Locus: A Platform for Discoveries in Epigenetics and Adaptation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 33, 555-575.

- Willemsen, V., M. Bauch, T. Bennett, A. Campilho, H. Wolkenfelt, J. Xu, J. Haseloff & B. Scheres (2008) The NAC domain transcription factors FEZ and SOMBRERO control the orientation of cell division plane in Arabidopsis root stem cells. *Dev Cell*, 15, 913-22.
- Xu, F., T. Kuo, Y. Rosli, M. S. Liu, L. Wu, L. O. Chen, J. C. Fletcher, Z. R. Sung & L. Pu (2018) Trithorax Group Proteins Act Together with a Polycomb Group Protein to Maintain Chromatin Integrity for Epigenetic Silencing during Seed Germination in Arabidopsis. *Mol Plant*, 11, 659-677.
- Yang, H., M. Howard & C. Dean (2014) Antagonistic roles for H3K36me3 and H3K27me3 in the cold-induced epigenetic switch at Arabidopsis FLC. *Curr Biol*, 24, 1793-7.
- (2016) Physical coupling of activation and derepression activities to maintain an active transcriptional state at FLC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 9369-74.
- Yang, S., C. Li, L. Zhao, S. Gao, J. Lu, M. Zhao, C. Y. Chen, X. Liu, M. Luo, Y. Cui, C. Yang & K. Wu (2015) The Arabidopsis SWI2/SNF2 Chromatin Remodeling ATPase BRAHMA Targets Directly to PINs and Is Required for Root Stem Cell Niche Maintenance. *Plant Cell*, 27, 1670-80.
- Yao, X., H. Feng, Y. Yu, A. Dong & W. H. Shen (2013) SDG2-mediated H3K4 methylation is required for proper Arabidopsis root growth and development. *PLoS One*, 8, e56537.
- Yu, B. D., R. D. Hanson, J. L. Hess, S. E. Horning & S. J. Korsmeyer (1998) MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10632-6.
- Zhang, H., Z. Lang & J. K. Zhu (2018) Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19, 489-506.
- Zhang, L. & H. Ma (2012) Complex evolutionary history and diverse domain organization of SET proteins suggest divergent regulatory interactions. *New Phytol*, 195, 248-63.
- Zhang, T., S. Cooper & N. Brockdorff (2015) The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO Rep*, 16, 1467-81.
- Zhang, T. Q., Z. G. Xu, G. D. Shang & J. W. Wang (2019) A Single-Cell RNA Sequencing Profiles the Developmental Landscape of Arabidopsis Root. *Mol Plant*, 12, 648-660.
- Zhang, W., R. Swarup, M. Bennett, G. E. Schaller & J. J. Kieber (2013) Cytokinin induces cell division in the quiescent center of the Arabidopsis root apical meristem. *Curr Biol*, 23, 1979-89.

ULTRAPETALA1 maintains Arabidopsis root stem cell niche independently of ARABIDOPSIS TRITHORAX1

Diego Ornelas-Ayala¹ , Rosario Vega-León¹ , Emilio Petrone-Mendoza¹ , Adriana Garay-Arroyo^{1,2} , Berenice García-Ponce¹ , Elena R. Álvarez-Buylla^{1,2} , and María de la Paz Sánchez^{1,2} 

¹Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ser. Circuito Ext. Junto al J. Botánico, Ciudad Universitaria, UNAM, México City Cdmx 04510, México; ²Centro de Ciencias de la Complejidad (C3), Universidad Nacional Autónoma de México, México City Cdmx 04510, México

Summary

Author for correspondence:
María de la Paz Sánchez
Tel: +52 55 56 22 82 22 ext. 46869
Email: mpsanchez@ecologia.unam.mx

Received: 9 May 2019
Accepted: 14 September 2019

New Phytologist (2020) 225, 1261–1272
doi: 10.1111/nph.16213

Key words: Arabidopsis, ATX1, root apical meristem, root stem cell niche, ULTRAPETALA1.

- During plant development, morphogenetic processes rely on the activity of meristems. Meristem homeostasis depends on a complex regulatory network constituted by different factors and hormone signaling that regulate gene expression to coordinate the correct balance between cell proliferation and differentiation.
- ULTRAPETALA1, a transcriptional regulatory protein described as an Arabidopsis Trithorax group factor, has been characterized as a regulator of the shoot and floral meristems activity. Here, we highlight the role of ULTRAPETALA1 in root stem cell niche maintenance.
- We found that ULTRAPETALA1 is required to regulate both the quiescent center cell division rate and auxin signaling at the root tip. Furthermore, ULTRAPETALA1 regulates columella stem cell differentiation.
- These roles are independent of the ARABIDOPSIS TRITHORAX1, suggesting a different mechanism by which ULTRAPETALA1 can act in the root apical meristem of Arabidopsis. This work introduces a new component of the regulatory network needed for the root stem cell niche maintenance.

Introduction

The development of multicellular organisms depends on the activity of stem cell niches (SCNs), constituted by specialized cells that maintain surrounding stem cells undifferentiated (Sablowski, 2004; Scheres, 2007; Dinnery & Benfey, 2008; Sablowski, 2011). Stem cells have self-renewal capacity and can differentiate into specialized cell types to form the different organs in animals and post-embryonic organs in plants (Lau, 2003). Plants have two principal SCNs, situated in the shoot apical meristem (SAM) and the root apical meristem (RAM), which develop into aboveground organs and the underground root system, respectively (Galliochet & Lohmann, 2015).

In *Arabidopsis thaliana* (hereafter *Arabidopsis*), both SCNs show different cell organization; however, they also have similar structures that are responsible for most of the post-embryonic development (Scheres, 2007). The root SCN is formed by a small group of slowly dividing organizing cells called the quiescent center (QC). The QC constitutes an organizing center, surrounded by stem cells (or initial cells) of cortex/endodermis, columella, lateral root cap/epidermis, and vascular tissues (Galliochet & Lohmann, 2015). The QC cells play essential roles in stem cell maintenance (van den Berg et al., 1997). Stem cells, in turn, are

pluripotent cells that divide asymmetrically to produce all root tissues (Galliochet & Lohmann, 2015). The regulatory network that has been described to regulate and maintain the root SCN involves the transcriptional factors SCARECROW (SCR), WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5), SHORT ROOT (SHR), and PLETHORA 1 and 2 (PLT1/2). This network, in combination with auxin signaling, maintains the QC identity (Wysoka-Diller et al., 2000; Sabatini et al., 2003; Aida et al., 2004; Sarker et al., 2007). WOX5 and SCR also regulate the QC division rate, determining how rapidly surrounding stem cells are replenished (Sarker et al., 2007; Cruz-Ramirez et al., 2013; Zhang et al., 2015). Moreover, WOX5 is required for the maintenance of at least a subset of the surrounding stem cells, whereas QC identity is also required to regulate the differentiation of columella stem cells (CSCs; Sarker et al., 2007).

Auxin signaling is tightly wired to a set of regulatory networks that play essential roles in the maintenance of SCN identities (Sabatini et al., 1999). In the RAM, auxin is distributed in a gradient-like fashion with a maximum concentration at the QC, product of polar transport, biosynthesis, metabolism and the response machinery (Ljung et al., 2005; Woodward & Bartel, 2005; Stepanova et al., 2008; Tao et al., 2008; Petersen et al., 2009; Grunwald & Friml, 2010; Vernoux et al., 2011). In the

QC, auxin biosynthesis depends on a WOX5 IAA17 feedback circuit, where WOX5 regulates the expression of key auxin biosynthesis genes and the auxin response repressor IAA17 restricts the WOX5 expression domain (Tian *et al.*, 2014).

Recently, there has been increasing evidence of the role of epigenetic factors in the SCN regulation. Specifically, some proteins of the Trithorax group (TrxG) have been reported to play important roles in the SCN (Chen *et al.*, 2018). The TrxG is an epigenetic complex that regulates transcriptional activation through the action of their associated histone methyltransferases, involved in the trimethylation of lysines 4 and 36 of histone H3 (H3K4me3 and H3K36me3; Sanchez *et al.*, 2015). The H3K4me3 mark is catalyzed by SET domain proteins, such as SET DOMAIN GROUP2 (SDG2) and ARABIDOPSIS TRITHORAX1 (ATX1), that play different roles in RAM homeostasis (Yao *et al.*, 2013; Napsucialy-Mendivil *et al.*, 2014). In addition, the ATX1 function is necessary to acquire the correct primary root length and maintain RAM proliferation and SCN organization (Napsucialy-Mendivil *et al.*, 2014). In the SAM, it has been proposed that ATX1 acts together with ULTRAPETALA1 (ULT1) to perform its function (Carles & Fletcher, 2009).

ULT1 is a SAND domain protein, described as a coactivator of ATX1 due to its physical interaction with ATX1 and to its ability to control transcriptional activation of ATX1 common targets, such as *AGAMOUS*, by stimulating H3K4me3 deposition, even though ULT1 lacks enzymatic activity (Carles & Fletcher, 2009). The ULT1 interaction with ATX1 and its antagonistic function over CURLY LEAF (CLF), a histone methyltransferase of the repressor complex of the Polycomb group, have led to description of ULT1 as part of the TrxG complex (Carles & Fletcher, 2009; Xu *et al.*, 2018). *ULT1* is expressed in the shoot and floral meristems, and its loss of function delays the floral meristem determinacy, producing supernumerary flowers and floral organs (Carles *et al.*, 2004; Carles *et al.*, 2005). Moreover, ULT1 regulates other MAIS-box and class I *KNOX* genes involved in the maintenance of the aerial meristem (Monfared *et al.*, 2013). ULT1 is also able to interact with KANADIN, a transcription factor, to establish apical–basal polarity by promoting basal cell fate in the gynoecium (Pires *et al.*, 2014).

ULT1 is also expressed in roots (Carles *et al.*, 2005), but its function in this organ remains unknown. Given that ATX1 acts both in shoot and root meristems (Alvarez-Venegas *et al.*, 2003; Napsucialy-Mendivil *et al.*, 2014) and that, in the former, ATX1 shares targets with ULT1 (Alvarez-Venegas *et al.*, 2003; Carles & Fletcher, 2009), we sought to determine if and how ULT1 acts in the RAM. Our results indicate that ULT1 plays important roles in the root SCN organization, ULT1 inhibits CSC differentiation; it is also required to regulate QC quiescence and proper auxin signaling in the root SCN. Interestingly, ULT1 functions in root SCN are independent of ATX1, revealing that ULT1 has different functional relationships with ATX1 depending on the meristem or the tissue type. Our findings introduce to ULT1 as a novel component required for the root SCN maintenance.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

Arabidopsis ecotypes Columbia-0 (Col-0) and Landsberg *erecta* (*ler*) were used as wild-type plants. The transfer DNA (T-DNA) insertion mutants of *ult1-3* (SALK_074642C) and *atx1-3* (SALK_105214) were obtained from the SALK T-DNA collection, and the *ult1-3^{tr}* mutant was donated by Dr Fletcher (Carles *et al.*, 2005). Reporter markers *DR5::GUS* (Ulanasov *et al.*, 1997), *pSCR::GFP* (Sabatini *et al.*, 2003), and *pWOX5::GFP* (Blilou *et al.*, 2005) were in a Col-0 background, whereas the *Q1630::GFP* (Sabatini *et al.*, 2003) enhancer trap line was in a C24 background. As a control of the enhancer trap line, we used a hybrid cross between Col-0 and C24 backgrounds.

For growth conditions, seeds were stratified for 2 d at 4°C and grown vertically on Murashige and Skoog (MS) medium (0.2× MS salts, 0.05% MES, 1% sucrose, 1% agar, at pH 5.6) at 22°C under long day conditions (16 h : 8 h, light : dark). Auxin treatments were done 5 d after sowing (das); seedlings were incubated for 12 h on MS medium with 200 nM IAA or 500 nM α -naphthaleneacetic acid (NAA).

Obtaining pULT1:ULT1:GFP plants

The *ULT1* gene was obtained by PCR amplification from genomic DNA of Col-0 plants, using primers (5-GCCTTAAATACCTTATACTACCAACATC-3', 5-AGCTTTGACATTGCTGGTGAAG-3') to amplify 3006 bp (a fragment extending 1711 bp upstream the transcription start site until 1295 bp of the gene coding region, without the stop codon). The amplification product was cloned into pCR7.3/GW/TOPO[®] Gateway[®] binary vector system (Invitrogen[®]) and then transferred to the pGWB4 vector to obtain the *pULT1:ULT1:GFP* plasmid. *Arabidopsis* WT and *ult1-3* plants were transformed by the floral-dip method (Clough & Bent, 1998) with an *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 carrying the *pULT1:ULT1:GFP* plasmid. Transformed plants were selected by hygromycin B and kanamycin to obtain homozygous resistant plants.

Morphological analysis

For RAM morphological analysis, roots at 5 das were fixed in a 50% ethanol and 10% acetic acid solution, and pseudo-Schiff staining was performed as described (Truernit *et al.*, 2008). The root meristem cell number was estimated by measuring the meristematic cortical cells according to the multiple structural change algorithm (Pacheco-Escobedo *et al.*, 2016). For the columella analysis, roots were stained with Lugol and mounted in clearing solution (80% chloral hydrate and 20% glycerol). For *DR5::GUS* staining, the roots were incubated 1.5 h at 37°C in GUS solution (2 mM ferricyanide, 2 mM ferrocyanide, 0.1% Tween 20, and 25 μ g μ L⁻¹ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide acid in 1× phosphate-buffered saline (PBS)), and cleared with 100% ethanol. Samples were mounted on 65% glycerol, 2% dimethyl sulfoxide in 1× PBS buffer and visualized using light microscopy with

Notnarski optics under an Olympus BX60 microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

For confocal microscopy, roots were stained with propidium iodide (PI, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and visualized using a Nikon Eclipse Ti-E confocal microscope (Nikon, Tokyo, Japan) with a CFI Plan Apochromat Lambda 20 $\times$ NA 0.75 WD 1.00 mm objective, and a CFI Super Fluor 40 $\times$ Oil NA 1.3 WD 0.22 mm objective at 488 nm for PI and 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) and at 561 nm for green fluorescent protein (GFP).

All image quantifications and relative fluorescence estimations were performed using Fiji software (Schindelin *et al.*, 2012). For GFP relative fluorescence, the integrated density of the green channel was measured in QC cells.

EdU assays

For EdU assays, seedlings at 4 d after germination (dag) were incubated on MS medium containing 10 μM EdU (Click-iT EdU kit with Alexa Fluor 647 by Invitrogen[®]) in the dark with gentle agitation at 22°C for 20 h. Afterwards, the seedlings were fixed under vacuum conditions with 3.7% paraformaldehyde in 1 $\times$ PBS for 15 min. Roots were then washed three times with 1 $\times$ PBS and 3% BSA solution and mounted on Thermo Scientific[™] (Waltham, MA, USA) Superfrost Plus[®] slides. After rehydration with 1 $\times$ microtubules stabilizing buffer, roots were permeabilized with a 1 $\times$ PBS, 3% BSA, and 0.5% Triton solution for 20 min in gentle shaking and washed twice with a 1 $\times$ PBS, 3% BSA solution. Finally, EdU fluorescent staining were revealed under dark conditions using the Click-iT reaction mixture, prepared according to manufacturer's instructions. Slides were mounted in Mowiol solution and visualized using a Nikon Eclipse Ti-E confocal microscope.

Quantitative reverse transcription PCR

RNA was isolated 5 dag from full roots for assays on auxin-related genes and from root tips for assays on QC genes of 5 dag, using Quick-RNA[™] Miniprep (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Complementary DNA was generated using the SuperScript[™] II Reverse Transcriptase (Invitrogen[®]) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCRs were performed using Maxima[™] SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2 $\times$ (Thermo Scientific) on a StepOne[™] real-time PCR system (Waltham, MA, USA). The C_T and the efficiency of primers values were calculated using the Miui algorithm (Zhao & Fernald, 2005). The relative expression was calculated with the $E^{-\Delta\Delta C_T}$ method (where E is the efficiency of each primer pair; Rao *et al.*, 2013), with three biological replicates, with technical duplicates, and using the *RNAT* (AJ11658050) and *UPL1* (AJ14634270) as reference genes. Statistical significance was evaluated with a Student's t -test using the Bonferroni Dunn multiple comparison method. All the primers used for these analyses are shown in Supporting Information Table S1.

Results

ULT1 is expressed in the root proximal meristem and in the root stem cell niche

Besides being expressed in the SAM, *ULT1* is also expressed in other tissues, including the roots (Carles *et al.*, 2005), although its role in root tissues remains unknown. Thus, we first analyzed the expression pattern of *ULT1* in *Arabidopsis* primary roots. To this end, we generated transgenic plants carrying the *pULT1:ULT1:GFP* gene (see Materials and Methods section). We found that the expression of *ULT1* seems to be mainly nuclear, preferentially seen in the epidermis, cortex, endodermis, and vascular tissues of the RAM proliferation domain (Fig. 1a–c). In the SCN, *ULT1* is expressed in the QC cells and in all stem cells (or initial cells), including CSCs but not in differentiated columella cells (DCCs; Fig. 1b). The *ULT1* expression is not restricted to the RAM, since it is also expressed in the endodermis of differentiated cells (Fig. 1d).

ULT1 is required for stem cell niche morphology and columella stem cell maintenance

The observed expression pattern led us to evaluate the role of *ULT1* in the root. Therefore, we analyzed the root phenotype of both *ult1-3^{col}* (a mutant allele in the Columbia accession; hereafter *ult1-3*) and *ult1-3^{ler}* mutant plants (the same allele in *Ler* accession). These two mutants have the same T-DNA insertion in the first exon of the *ULT1* gene; *ult1-3^{ler}* was obtained by introgression of the *ult1-3^{col}* allele into *Ler* (Carles *et al.*, 2005). Both *ult1-3* plants are loss-of-function mutants that show undetectable levels of *ULT1* gene expression (Fig. 2a). Root morphology analyses indicated that both *ult1-3* mutant plants had no defects in their primary root length, RAM size, RAM cortical cell length, or the length of cortical differentiated cells (Figs S1, S2). Nevertheless, unlike *WT^{ler}* plants, the SCN of *ult1-3^{ler}* mutants showed an irregular morphology that included an apparent disorganization of the cells located below the QC, at the position of CSCs, and of the lateral root cap/epidermis stem cells; and in some cases they also showed indications of QC cell divisions, based on PI staining (Fig. 2b–d). Likewise, 56.6% of the *ult1-3* plants displayed defects in SCN; from these, 36.6% of them displayed QC cell divisions and 20% showed an irregular morphology (Fig. 2f,g,i). By contrast, *WT* plants did not show any change in their SCN morphology, and only 16% of them showed QC divisions (Fig. 2c,i). The expression of *ULT1* (using a *pULT1:ULT1:GFP* construct) in the *ult1-3* mutant background (*ult1-3/pULT1:ULT1:GFP*) complemented both QC cell division and the irregular SCN morphology phenotype, since 73.33% of these plants had a *WT*-like phenotype and only 20% and 6.66% displayed QC cell divisions and an irregular SCN morphology, respectively (Fig. 2h,i), demonstrating that the *ULT1*-GFP fusion protein was functional. These results show that *ULT1* is involved in the regulation of QC cell division and the maintenance of the SCN morphology.

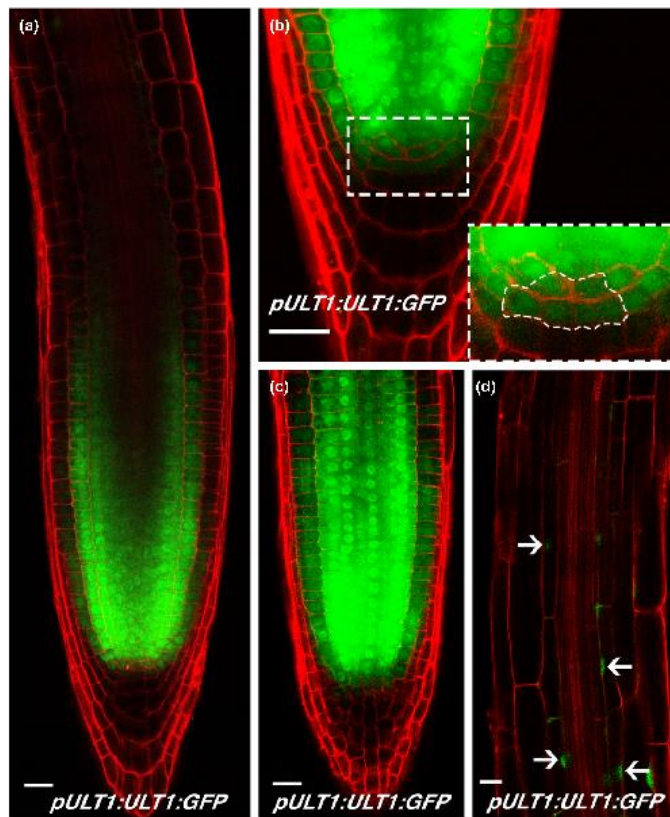


Fig. 1 Expression pattern of the *Arabidopsis* *ULTRAPETALA1* (*ULT1*) gene in the root. Confocal images of different regions of *pULT1:ULT1:GFP* roots at 5 d after sowing: (a) root apical meristem; (b) stem cell niche (magnified in the box); (c) an epidermis plane; (d) root differentiation zone. Arrows indicate expression in endodermis cells. Bars, 20 μ m.

To address whether the altered SCN morphology in *ult1-3* plants could be due to changes in cell fate identity of stem cells, we analyzed the CSC fate. Unlike DCCs, CSCs do not have starch granules that can be visualized by Lugol staining (Hong *et al.*, 2015). Staining of *ult1-3* roots with Lugol revealed that only 27% of these plants maintained a tier of CSCs, marked by the absence of Lugol staining, whereas 71.2% showed Lugol staining in cells immediately below the QC cells (Fig. 3b,d), where CSCs should be. As expected, most WT plants (72%) showed one layer of unstained cells in this position (Fig. 3a,d). Again, this *ult1-3* phenotype was reverted in *ult1-3;pULT1:ULT1:GFP* complemented plants, which contain a perfect layer of CSCs (Fig. 3c,d), indicating a critical role of *ULT1* in CSC maintenance.

To confirm whether those Lugol-stained cells, underneath the QC of *ult1-3* roots, had a DCC identity, we used a *Q1630:GFP* enhancer trap marker of differentiated columella cells (Sabatini *et al.*, 2003). Strikingly, the GFP signal was stronger in *ult1-3* than in WT roots; not only did DCCs have a GFP signal, but some lateral root cap cells were also labeled (Fig. 3f,g). This signal was not

observed in WT roots, even when using high GFP laser power (Fig. S3), indicating a modification in the expression pattern of the *Q1630* marker in *ult1-3* plants. Moreover, in *ult1-3* roots, when the images were taken at a lower photomultiplier tube high voltage, we were able to observe that, when QC cells divide, daughter cells immediately acquired a DCC identity without generating a CSC identity first, as revealed by the *Q1630:GFP* signal (Fig. 3h). This result strongly suggests that the *ULT1* loss of function promotes premature differentiation of CSCs.

The premature differentiation of CSCs in *ult1-3* mutants impacted the number of DCC layers. Whereas most WT plants (78.4%) showed five layers of DCCs (Fig. 3a,c), only 20.4% of the *ult1-3* plants exhibited five layers and 79.6% had six or seven layers (Fig. 3b,c). This phenotype was partially complemented in *ult1-3;pULT1:ULT1:GFP* plants, showing only 49% of the roots with five DCC layers (Fig. 3c,c).

All these data indicate that *ULT1* is required to maintain CSCs, restricting CSC differentiation. Consequently, *ULT1* is also required to maintain the correct number of DCC layers in the root.

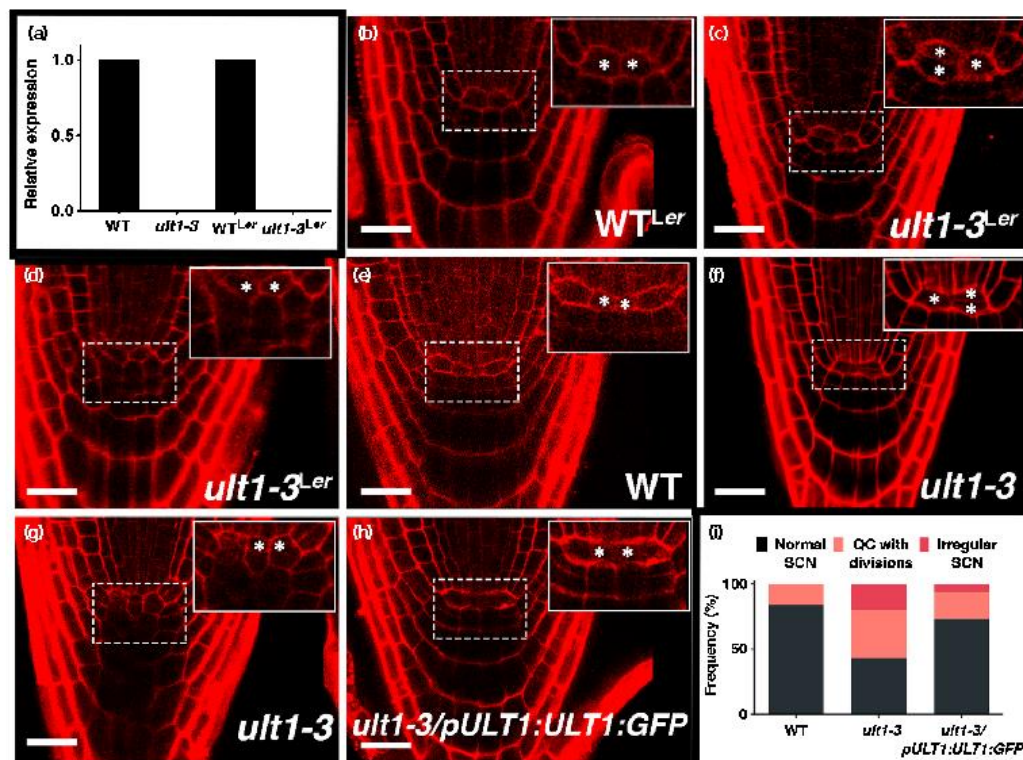


Fig. 2 ULTRAPETALA1 (*ULT1*) is required to maintain the Arabidopsis stem cell niche (SCN) organization. (a) Quantitative reverse transcription PCR of the *ULT1* gene in wild-type (WT) and *ult1-3* mutants from Col and Ler backgrounds. (b–h) Representative confocal images of the SCN of roots at 5 d after sowing: (b) WT^{Ler} root; (c) *ult1-3*^{Ler} root with divisions in the quiescent center (QC; see the asterisks in the box); (d) *ult1-3*^{Ler} root with an irregular SCN morphology; (e) WT root of Col-0 background; (f) *ult1-3* root showing cell division in the QC (see the asterisks in the box); (g) *ult1-3* root with irregular SCN morphology; (h) SCN phenotype of *ult1-3/pULT1:ULT1:GFP* plants. (i) Phenotypic quantification of normal and irregular SCN morphologies, and of QC cells showing divisions in WT and *ult1-3* roots ($n \geq 22$). The images in the boxes are an amplification of SCN, and the white asterisks mark the QC cells. Roots were stained with propidium iodide. Bars, 20 μ m.

Role of *ULT1* in columella stem cell maintenance is independent of *ATX1*

It has been reported that *ULT1* and *ATX1* can physically interact and that, in the SAM, *ULT1* participates in the H3K4me3 deposition catalyzed by *ATX1* (Carles & Fletcher, 2003; Xu et al., 2018). Therefore, we analyzed the genetic relationship between *ULT1* and *ATX1* in the RAM. To do this, we generated an *abx1-3ult1-3* double mutant and analyzed the root phenotype. It has been reported that the primary root of the *abx1-1* mutant plants is shorter than that of WT plants, due to *ATX1* modulating both cell proliferation and the transition from cell proliferation in the RAM to cell elongation (Napsuday-Mendivil et al., 2014). Like in the *abx1-1* mutant, the primary roots of *abx1-3* plants were shorter than in the WT roots; however, root length in *ult1-3* was unaffected (Figs 4a, S1). Interestingly, the *abx1-3ult1-3* double mutant behaved as the *abx1-3* single mutant, showing shorter

roots than WT plants (Fig. 4a; Table S2). Likewise, the RAM cortical cell number and the cell length in the *abx1-3ult1-3* double mutant were similar to those in the *abx1-3* single mutant (Fig. 4b). Therefore, this phenotype is due to the absence of the *ATX1* function, suggesting that *ULT1* does not seem to be cooperate with *ATX1* in regulating RAM cell proliferation or the primary root length.

The analysis of the CSC phenotype in these mutants was, however, different. Unlike with the *ult1-3* plants, we found that most WT and *abx1-3* plants (72% and 61.3%, respectively) showed one layer of CSCs and in some cases even two layers (Fig. 4c; Table S2). However, the phenotype of the *abx1-3ult1-3* double-mutant plants was similar to that of *ult1-3* mutants, showing more plants (62.5% and 71.2%, respectively) without any layer of CSCs (Fig. 4c; Table S2).

Additionally, the phenotype of DCC layers was interesting: unlike the *ult1-3* mutant, which showed more plants with six

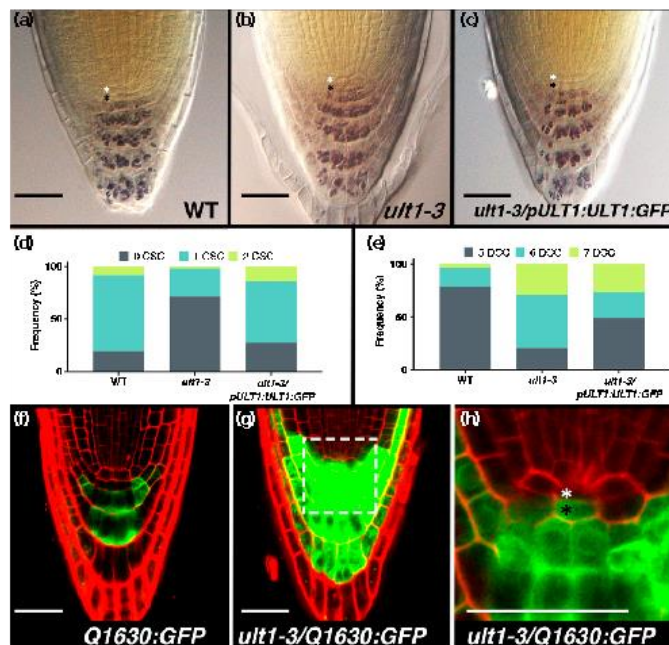


Fig. 3 ULTRAPETALA1 (ULT1) is necessary for Arabidopsis columella stem cell maintenance. (a–c) Representative images of roots 5 d after sowing (das) stained with Lugol: (a) wild-type (WT); (b) *ult1-3*; (c) *ult1-3/pULT1:ULT1:GFP* plants. (d) Frequency of columella stem cells (CSCs) layers in WT, *ult1-3*, and *ult1-3/pULT1:ULT1:GFP* roots ($n \geq 23$). (e) Frequency of differentiated columella cells (DCCs) layers in WT, *ult1-3*, and *ult1-3/pULT1:ULT1:GFP* roots ($n \geq 23$). (f–h) Representative confocal images of Q1630:GFP enhancer trap marker at 5 das. (f) WT roots; (g, h) *ult1-3* mutants; (h) magnified image of boxed area in (g). Note that images (f) and (g) were taken at green fluorescent protein (GFP) laser power of 20.1 mW, photomultiplier (PMT) offset of -45, and PMT high voltage (HV) of 77; image (h) was taken at the same laser power and PMT offset but at a lower PMT HV of 50. White asterisks mark the quiescent center; black asterisks mark the CSCs. Bars, 20 μ m.

(50%) and seven (29.62%) DCC layers, the *atx1-3* plants had lower numbers of DCC layers than even WT plants did. Although 61.3% of *atx1-3* plants displayed five DCC layers as WT plants, an important population of 22.6% showed only four layers of DCCs (Fig. 4c,e; Table S2). In the case of the *atx1-3ult1-3* double mutant, most of the roots showed five (34.4%) and six (62.5%) DCC layers, like the *ult1-3* single mutants (Fig. 4c,e; Table S2). However, in contrast to *ult1-3*, this double mutant displayed a small population of roots with four DCC layers and, most importantly, it did not show any roots with seven DCC layers. Therefore, the *atx1-3ult1-3* double mutant seems to have an intermediate phenotype between those of the single mutants.

The contrasting behavior among single and double mutants, both in the whole RAM and in the SCN, suggests that ULT1 and ATX1 act independently in different processes during root development: whereas ATX1 seems to be more important to regulate the proximal RAM meristem, ULT1 seems to act in the distal RAM meristem, specifically in the regulation of CSC differentiation. Although both ATX1 and ULT1 are necessary for the correct formation of DCC layers, they act in different ways. ATX1 seems to be promoting the formation of DCC layers, whereas ULT1 seems to be restricting it.

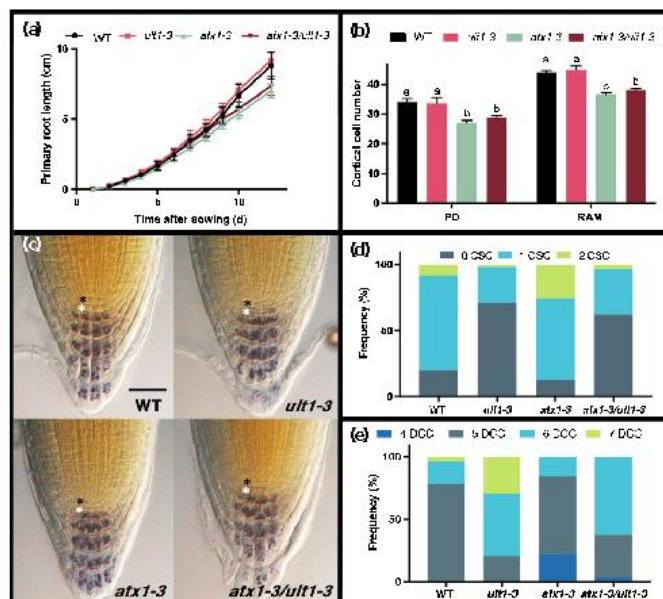
ULT1 deficiency reduces auxin signaling within the stem cell niche

It is well known that auxin signaling is important to maintain both the SCN and the QC quiescence (Sabatini et al., 1999; Tian

et al., 2014). To investigate whether *ult1-3* mutants had any defects in the auxin response in the SCN, we generated plants expressing the DR5:GUS reporter (a system widely used to study auxin responses; Ulmasov et al., 1997) in an *ult1-3* background. As has been reported, in WT root tips, a high DR5:GUS staining was observed in QC cells, together with a decreasing gradient in the central columella cells (Fig. 5a,g). Strikingly, DR5:GUS staining in *ult1-3* plants decreased in both the QC and columella cells (Fig. 5b,g). The low levels of the auxin signal reporter seen in the *ult1-3* mutants were not due to a low auxin concentration within the roots, because when these plants were incubated with IAA, we again found lower levels of auxin signaling in *ult1-3* mutants than with WT plants (Fig. 5c,d,g). Therefore, auxins supplementation was unable to restore the auxin response of *ult1-3* plants to WT levels.

To evaluate whether *ult1-3* plants had defects in auxin transport, we incubated WT and *ult1-3* plants with 500 nM NAA, a synthetic auxin able to move passively into cells independently of the influx carriers (Dobbie et al., 1996). Our results showed an increase in the DR5:GUS reporter signal on WT roots treated with NAA, but this increase was not observed in the RAM of *ult1-3* mutants (Fig. 5e–g). Although NAA assays discard defects in influx transport in *ult1-3* plants, we observed a slight decrease in *LAX2* gene expression (Fig. 5h), one of the two influx transporter genes mainly expressed at the root tip (Carrier et al., 2008; Peret et al., 2012); thus, we cannot rule out problems in auxin influx transport. However, the slight decrease in gene expression of efflux transporters PIN1, PIN2, and PIN4 observed

Fig. 4 ARABIDOPSIS TRITHORAX1 (ATX1) and ULTRAPETALA1 (ULT1) act independently in the Arabidopsis stem cell niche. (a) Root growth curves of wild-type (WT), *ult1-3*, *atx1-3*, and *atx1-3/ult1-3* plants during 12 d after sowing (das) ($n \geq 12$). (b) Cortex cell number of the root apical meristem (RAM) and the RAM proliferation domain of WT, *ult1-3*, *atx1-3*, and *atx1-3/ult1-3* plants ($n \geq 12$); letters represent significant differences using a two-way ANOVA with a Tukey's multiple comparison test ($P < 0.005$). (c) Representative optical microscopy images of roots at 5 das stained with Lugol. The black asterisks mark the quiescent center (QC); the white asterisks mark the columella stem cells (CSCs). Bar, 20 μ m. (d) Frequency of CSC layers in WT, *ult1-3*, *atx1-3*, and *atx1-3/ult1-3* roots ($n \geq 28$). (e) Frequency of differentiated columella cells (DCCs) layers in WT, *ult1-3*, *atx1-3*, and *atx1-3/ult1-3* roots ($n \geq 28$). PD, proliferation domain.



in the *ult1-3* mutant (Fig. 5h) suggests that there are more defects in auxin efflux than in influx transport. Moreover, when we analyzed the expression of some auxin response genes of the auxin-responsive GRETCHEN HAGEN3 (GH3), INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA), and auxin response factor (ARF) families (Hagen & Guilfoyle, 2002; Bargmann et al., 2013) in the *ult1-3* mutant, we observed a slight decrease in the expression of GH3.5 (a gene inducible by auxins; Bargmann et al., 2013) and of PLT2 (a gene whose expression correlates with auxin accumulation and depends on auxin response factors; Aida et al., 2004), whereas the rest of the eight genes tested did not change (Fig. 5). Although the expression changes observed in auxin-related genes in the *ult1-3* mutant were slight, all of them had a trend to decrease, which correlated with the low levels of expression of the DR5::GUS marker, supporting the idea that a ULT1 deficiency reduces auxin signaling within the SCN.

ULT1 is necessary for the maintenance of QC quiescence

The homeostasis of the root SCN depends on the QC cells and their signaling (Aidinger et al., 2012). To address whether defects in SCN morphology observed in *ult1-3* mutants were due to defects in QC cell identity, we generated *ult1-3* plants expressing either pWOX5::GFP or pSCR::GFP, two specific markers of QC identity (Sakai et al., 2007; Cruz-Ramírez et al., 2013). In the QC cells of *ult1-3*:pSCR::GFP plants we did not observe any changes in GFP signal with respect to WT roots (Fig. 6a,b,e). However, a low signal of the pWOX5::GFP marker was observed in *ult1-3* plants (Fig. 6c–e). Nonetheless, the measurement of the

messenger RNA (mRNA) levels of WOX5 in root tips by quantitative reverse transcription PCR did not reveal any changes in its expression between WT and *ult1-3* plants (Fig. 6k). This indicates that, in *ult1-3* plants, the expression of the pWOX5::GFP marker is altered for some unknown reason, unrelated to the expression of the endogenous WOX5 gene. This suggests that QC identity is not affected in *ult1-3* plants, which is also supported by the pSCR::GFP marker and the expression of SCR and SHR genes; this is further supported by the expression of AGAMOUS LIKE 42 (AGL42) and TERMINAL EAR1-LIKE 1 (TEL1) genes (Fig. 6k), two QC markers identified by cell isolation and single cells experiments as genes with high expression in the QC cells but with minimal expression elsewhere (Navy et al., 2005; Efroni et al., 2015; Zhang et al., 2019). Therefore, the defects seen in the SCN morphology could be associated with changes in some characteristics of the QC cells rather than with their identity.

In fact, one of the major characteristics of the QC cells is their low cell division rate (Cruz-Ramírez et al., 2013). The increase in QC cell divisions observed in *ult1-3* mutant roots (Fig. 2f) suggests that ULT1 is necessary to restrict the cell division rate in the QC cells. To address this hypothesis, seedlings at 4 das were incubated in the presence of EdU, a nucleoside analogue of thymidine that is incorporated into the cellular DNA during replication, to tag cells throughout the S phase, and thus into dividing cells. After 20 h of incubation we observed that only 29.2% of WT roots were labeled with EdU in their QC cells, identified by the pWOX5::GFP marker (Fig. 6f,j). By contrast, 69.6% of the *ult1-3* plants were labeled with EdU stain in their

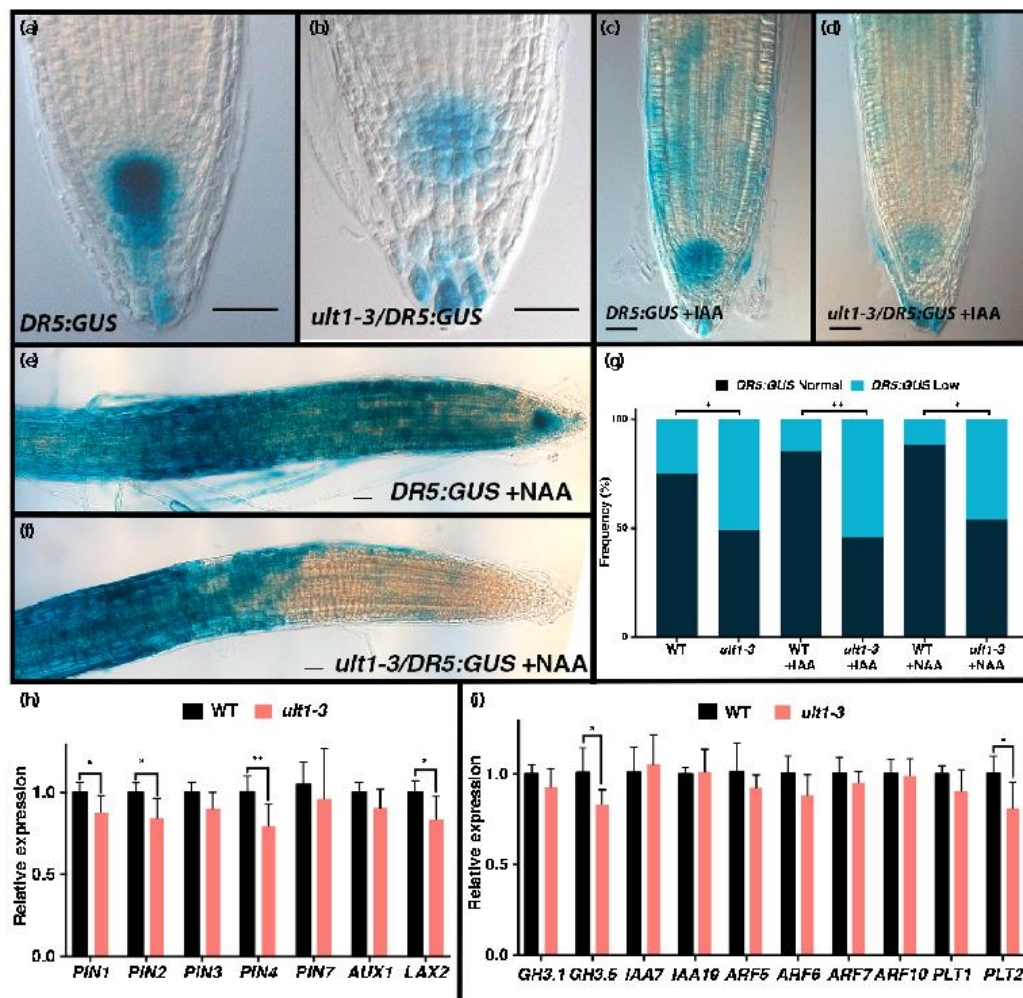


Fig. 5 ULTRAPETALA1 (*ULT1*) regulates auxin signaling in the stem cell niche of the Arabidopsis root apical meristem. (a–f) Representative optical microscopy images of *DR5:GUS* roots. Untreated: (a) wild-type (WT) and (b) *ult1-3*. Treated with 200 nM IAA for 12 h: (c) WT and (d) *ult1-3*. Treated with 500 nM α -naphthaleneacetic acid (NAA) for 12 h: (e) WT and (f) *ult1-3* mutants. (g) Quantitative analysis of WT and *ult1-3* roots with normal and low levels of *DR5:GUS* staining without and with IAA and NAA treatments. As *DR5:GUS* staining was not homogeneous in each population analyzed, even in WT plants, we classified and measured the frequency of appearance of roots with a *DR5:GUS* signal called 'Normal' when this signal was maximum (staining observed in the most WT roots), as in images (a), (c), and (e), and called 'Low' when staining was minimal, as in images (b), (d), and (f). ($n \geq 24$) *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$ according to a Pearson's chi-squared test. Bars: 20 μ m. (h) Expression of efflux (*PIN1*, *PIN2*, *PIN3*, *PIN4* and *PIN7*) and influx auxins (*AUX1* and *LAX2*) transporter genes. (i) Auxin response genes (*GH3.1*, *GH3.5*, *IAA7*, *IAA19*, *ARF5*, *ARF6*, *ARF7* and *ARF10*) and related genes (*PLT1* and *PLT2*) in WT and *ult1-3* roots. Data are shown as mean $\pm$ SD of three independent biological replicates with two technical replicates. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$, according to a Student's *t*-test.

QC cells (Fig. 6g), indicating a loss of QC quiescence in these mutants. Interestingly, a similar phenotype was observed in roots of the *abx1-3* mutants, where 68% of the plants presented EdU

staining in their QC cells (Fig. 6h). The *abx1-3ult1-3* double mutant was slightly different from single mutants: in this case, 55.6% of the QC cells showed EdU staining (Fig. 6i). This

differentia was more evident when we analyzed the ratio between QC cells with and without EdU stain (Table S2), which in *abx1-3* and *ult1-3* was 2.12 and 2.28, respectively, whereas in the double mutant *abx1-3ult1-3* it was 1.25. These different behaviors observed among double and single mutants suggest that, although both *ATX1* and *ULT1* are required to maintain QC quiescence, they have different ways to regulate this quiescence.

Discussion

The role of *ULT1* in the shoot and floral meristems has been reported (Cates et al., 2005; Monfared et al., 2013). Our work provides new information about the *ULT1* role in the root SCN. We have shown that *ULT1* is required for the root SCN activity but not for RAM cell proliferation and root growth. In the root SCN, *ULT1* participates in the maintenance of the QC quiescence, modulates auxin signaling, and is necessary for CSC maintenance. In contrast to the SAM, the function of *ULT1* in the root SCN seems to act independently of *ATX1*, revealing a new mechanism of function for *ULT1*.

The absence of the *ULT1* function results in several changes in SCN morphology but not in the RAM cell proliferation, neither in RAM size nor in primary root length. Given that *ULT1* is

expressed in the proximal root meristem, including the RAM proliferation domain that contains highly proliferative cells, we cannot exclude another role of *ULT1* in plant roots different to the roles highlighted here. In the root SCN, the irregular morphology observed in *ult1-3* mutants includes the absence of CSCs with an increase in DCC layers, a phenotype that was complemented by a *pULT1:ULT1:GFP* transgene, confirming that *ULT1* is required for CSC maintenance. The CSCs arise from QC periclinal division, in which rootward daughter cells replenish existing CSCs and, in turn, CSCs differentiate to form DCC layers (Ortega-Martinez et al., 2007; Cruz-Ramirez et al., 2013). Therefore, the *ult1-3* phenotype denotes an accelerated CSC differentiation, as it was confirmed by the *Q1630:GFP* marker, which indicated that, immediately after a QC cell division, daughter cells acquire the identity of columella differentiated cells. The strong signal of the *Q1630:GFP* marker in DCCs suggests that, in addition to the promotion of CSC differentiation, the absence of *ULT1* causes an ectopic expression of this columella identity marker on lateral root cap cells. Therefore, *ULT1* may inhibit CSC differentiation, although we do not exclude its participation in the maintenance of CSC identity.

Several factors modulate CSC differentiation (Stahl et al., 2009; Pi et al., 2015); but as is evident from experiments of laser ablation

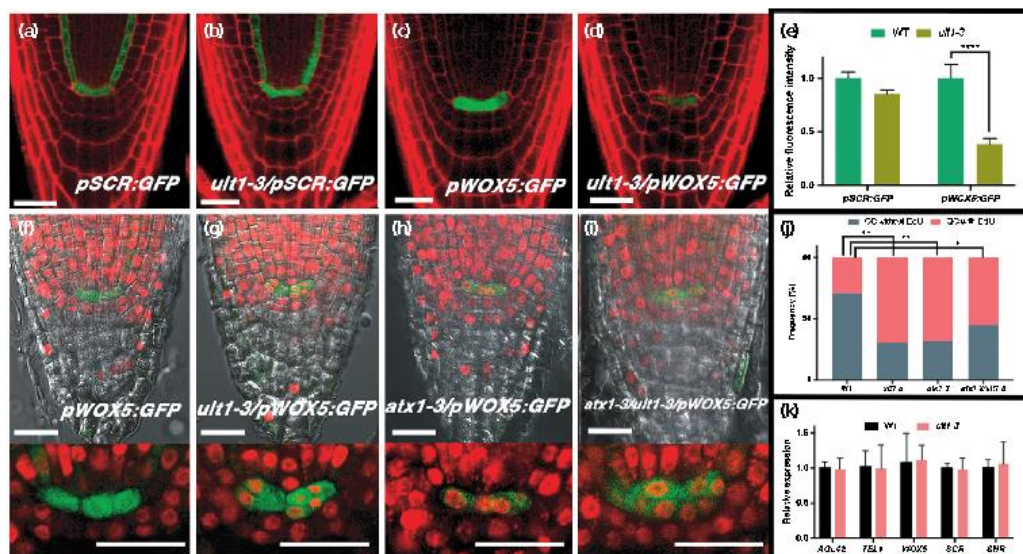


Fig. 6 ULTRAPETALA1 (*ULT1*) is necessary to maintain quiescent center (QC) cell division rate in Arabidopsis. (a–d) Representative confocal images of (a) *pSCR:GFP*, (b) *ult1-3/pSCR:GFP*, (c) *pWOX5:GFP*, and (d) *ult1-3/pWOX5:GFP*. (e) Relative green fluorescent protein (GFP) fluorescence intensity in QC cells of *pSCR:GFP* and *pWOX5:GFP* markers, where *ult1-3* values were scaled with respect to wild-type (WT) values. ****, $P < 0.0005$, using an unpaired Student's *t*-test. (f–i) Representative images of 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) labeling assays in roots of (f) *pWOX5:GFP*, (g) *ult1-3/pWOX5:GFP*, (h) *atx1-3/pWOX5:GFP*, and (i) *atx1-3ult1-3/pWOX5:GFP*. (j) Frequency of appearance of QC cells with positive EdU stain in WT, *ult1-3*, *atx1-3*, and *atx1-3ult1-3* backgrounds ($n \geq 23$). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$, significance in Pearson chi-squared test. (k) Relative expression of QC marker genes in *ult1-3* mutants compared with WT plants. Analyses of gene expression of *AGL42*, *TEL1*, *WOX5*, *SCR*, and *SHR* by quantitative reverse transcription PCR of RNA isolated from root tips at 5 d after sowing. Data are shown as mean $\pm$ SD of three independent biological replicates with two technical replicates. No statistical significance was found by Student's *t*-test. Bars, 20 μ m.

(van den Berg *et al.*, 1997) and with *WOX5* mutants (Sarkar *et al.*, 2007). QC identity and its signals are crucial to maintain the undifferentiated state of CSCs (van den Berg *et al.*, 1997; Sarkar *et al.*, 2007). Like *ult1-3*, *wox5-1* mutants have an accelerated CSC differentiation (Sarkar *et al.*, 2007). This similarity leads us to think that there was a relationship between ULT1 and WOX5, in which *WOX5* gene expression was regulated by ULT1. However, the *WOX5* mRNA levels in *ult1-3* plants did not change compared with the WT, indicating that *WOX5* is not involved in premature CSC differentiation in *ult1-3* mutants, although it cannot be excluded that both WOX5 and ULT1 act together regulating common genes involved in the CSC differentiation pathway in such a way that absence of one of them provokes premature CSC differentiation. In addition, given that *AGL42*, *TELL1* and *WOX5* expression and *pSCR:GFP* marker expression did not change in *ult1-3* plants, it is suggested that QC identity is not altered in *ult1-3* plants and that the CSC differentiation may be explained by partial changes in some QC characteristics more than for loss of identity. In this regard, the QC high division rate observed in *ult1-3* mutants supports this hypothesis.

The auxin gradient also regulates QC quiescence and CSC differentiation. High levels of auxin in QC cells are required to maintain cell quiescence, whereas low levels can increase their division rate and induce loss of identity (Peng *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2015). Whereas for CSC differentiation some reports indicate that a decrease of auxin biosynthesis or transport delays differentiation (Ding & Friml, 2010), others indicate that CSC differentiation is associated with reduced auxin signaling (Thomann *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2014). Although we observed a reduced auxin signaling in *ult1-3* plants, which was supported by the *DR5:GUS* signal and by the down-regulation of *LAX2*, *PIN1*, *PIN2*, *PIN4*, *GIL3.5* and *PLT2* in *ult1-3* roots, we actually do not know if the loss of quiescence and accelerated CSC differentiation of *ult1-3* is a consequence of the disruption of auxin signaling or if ULT1 impinges on the cycle machinery to alter cell division or on some pathway that regulates CSC differentiation. In addition, we also do not know if these auxin-related genes are direct targets of ULT1. So far, the ULT1 targets described have been mainly transcriptional factors (Charles & Fletcher, 2009; Xu *et al.*, 2018); however, it has been reported that other auxin-related genes are also downregulated in ULT1 mutants (Pu *et al.*, 2013), which correlates with our results and with the typical behavior of ULT1 targets reported. Thus, identifying auxin-related genes that are targets of ULT1 will provide information to understand the mechanism of ULT1 associated with auxin signaling.

In the SAM, ULT1 acts together with ATX1, modulating gene expression of some MADS-box genes (Charles & Fletcher, 2009; Monfared *et al.*, 2013; Pires *et al.*, 2014). The interaction of ULT1 with ATX1, and its antagonistic function over CLF, has led to describing ULT1 as a component of the TrxG complex (Charles & Fletcher, 2009), an association that is conserved in *Oryza sativa* (Roy *et al.*, 2019). Strikingly, in the RAM, ULT1 acts independently of ATX1, since it has been reported that ATX1 controls root growth by regulating cell cycle duration, cell production, and cell proliferation in the RAM (Napsucially-

Mendivil *et al.*, 2014). Whereas ATX1 loss-of-function mutants have short roots with short RAMs (Napsucially-Mendivil *et al.*, 2014), ULT1 loss-of-function mutant does not have these phenotypes. In the root SCN, both ULT1 and ATX1 loss-of-function mutants have morphological defects. However, whereas ULT1 modulates CSC differentiation and mutant plant roots have lower levels of auxin signaling, ATX1 is not related to CSC differentiation or to auxin signaling (this study; Napsucially-Mendivil *et al.*, 2014). Furthermore, both ULT1 and ATX1 are required to regulate QC quiescence. However, the intermediate phenotype observed in *axr1-3/ult1-3* double mutants, with fewer QC EdU-labeled cells than single mutants but with more QC EdU-labeled cells than WT plants, suggests that ATX1 and ULT1 have different ways to modulate QC quiescence.

It has been reported that ULT1 has more targets than ATX1 (Xu *et al.*, 2018); thus, if ULT1 is a TrxG factor, then in the RAM it may act together with another TrxG protein. In this regard, ATXR3/SDG2 is another TrxG methyltransferase (considered as the main methyltransferase responsible for H3K4me3 deposition in *Arabidopsis*; Guo *et al.*, 2010) that may act with ULT1. Although, the *ult1-3* phenotype in root and RAM growth shows some differences with respect to that of *sdg2-3* mutants (Yao *et al.*, 2013), both mutants have reduced auxin signaling and a premature CSC differentiation, suggesting that ULT1 could be related to the SDG2 functions rather than to ATX1, supporting the idea that ULT1 could be participating in different TrxG complexes with different histone methyltransferases during plant development (Shilarifard, 2012).

Finally, our results propose ULT1 as a novel component of the regulatory network of the root SCN, which has different functions in the SAM and RAM. In the SAM, ULT1 promotes meristem determination, which seems to be dependent on ATX1. However, in the RAM, ULT1 is required to maintain the low proliferation rate of the QC and the CSCs' identity. This last function is independent of ATX1, revealing a versatile ULT1 role in the differentiation processes of the meristems.

Acknowledgements

We thank Jennifer C. Fletcher for providing the *ult1-3^{tr}* mutant seeds, Crisanto Gutiérrez for comments, Miguel Tapia for confocal technical assistance, Carlos Cortés for his help in generation of *ult1-3/Q1630* plants, Diana Romo for support on logistical work and Diana B. Sánchez Rodríguez for technical support. Diego Ornelas-Ayala is a PhD student from the Posgrado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, and recipient of a fellowship from CONACYT (588728), Mexico. This work was supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT (IN204217 and IN208517) and CONACYT (240180, 2015-01-687).

Author contributions

DO-A, RV-L and EP-M performed the experiments; BG-P, ERA-B and AG-A participated in data interpretation and

discussion; MdIPS designed and supervised the experiments; DO-A and MdIPS wrote the manuscript and all authors revised it.

ORCID

Hena R. Álvarez-Buylla  <https://orcid.org/0000-0002-7938-6473>

Adriana Caray-Arroyo  <https://orcid.org/0000-0003-1575-6284>

Berenice García-Ponce  <https://orcid.org/0000-0002-7312-0754>

Diego Ornelas-Ayala  <https://orcid.org/0000-0003-0813-3273>

Familio Petrone-Mendoza  <https://orcid.org/0000-0003-2130-3927>

María de la Paz Sánchez  <https://orcid.org/0000-0003-4153-5119>

Rosario Vega-León  <https://orcid.org/0000-0003-7104-8111>

References

- Aichinger E, Kornet N, Friedrich T, Laux T. 2012. Plant stem cell niches. *Annual Review of Plant Biology* 63: 615–636.
- Aida M, Heis D, Heidstra R, Willemssen V, Bilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R, Scheres B. 2004. The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119: 109–120.
- Alvarez-Venegas R, Pion S, Sadler M, Wimmer X, Grossniklaus U, Avramova Z. 2003. *ATX-1*, an *Arabidopsis* homolog of *crithopsis*, activates flower homeotic genes. *Current Biology* 13: 627–637.
- Bargmann BO, Vanneste S, Krouk G, Naway T, Efroni I, Shani E, Choe G, Friml J, Bergmann DC, Iselle M *et al.* 2013. A map of cell type-specific auxin responses. *Molecular Systems Biology* 9: e088.
- Bilou I, Xu J, Wildwater M, Willemssen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433: 39–44.
- Charles CC, Choffnes-Luata D, Reville K, Lempirapong K, Fletcher JC. 2005. *ULTRAPETALA1* encodes a SAND domain putative transcriptional regulator that controls shoot and floral meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 132: 897–911.
- Charles CC, Fletcher JC. 2009. The SAND domain protein, *ULTRAPETALA1*, acts as a meristem group factor to regulate cell fate in plants. *Genes & Development* 23: 2723–2738.
- Charles CC, Lempirapong K, Reville K, Fletcher JC. 2004. The *ULTRAPETALA1* gene functions early in *Arabidopsis* development to restrict shoot apical meristem activity and acts through *WUSCHEL* to regulate floral meristem determinacy. *Genes & Development* 18: 1893–1903.
- Carrier DJ, Baker NT, Swarup R, Callaghan R, Napier RM, Bennett MJ, Kerr ID. 2008. The binding of auxin to the *Arabidopsis* auxin influx transporter *AUX1*. *Plant Physiology* 148: 529–535.
- Chen DH, Huang Y, Jiang C, Si JP. 2018. Chromatin-based regulation of plant root development. *Frontiers in Plant Science* 9: e1509.
- Clough SJ, Bent AR. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16: 735–743.
- Cruz-Ramírez A, Díaz-Trivino S, Wachsman G, Du Y, Arceaga-Vazquez M, Zhang H, Benjamín R, Bilou I, Neel AB, Chandler V *et al.* 2013. A SCARECROW-RETINOBLASTOMA protein network controls protective quiescence in the *Arabidopsis* root stem cell organizer. *PLoS Biology* 11: e1001773.
- Delbarre A, Müller P, Imhoff V, Guern J. 1996. Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 198: 552–561.
- Ding Z, Friml J. 2010. Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 107: 2046–2051.
- Dimony JR, Benfey PN. 2008. Plant stem cell niches: standing the test of time. *Cell* 132: 553–557.
- Efroni I, Ip PL, Naway T, Mello A, Birnbaum KD. 2015. Quantification of cell identity from single-cell gene expression profiles. *Genome Biology* 16: e9.
- Gaillorget C, Lohmann JU. 2015. The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. *Development* 142: 2237–2249.
- Gronwald W, Friml J. 2010. The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *EMBO Journal* 29: 2300–2314.
- Guo L, Yu Y, Law JA, Zhang X. 2010. SH1 DOMAIN GROUT2 is the major histone H3 lysine 4 trimethyltransferase in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 107: 18551–18552.
- Hagen G, Guilfoyle T. 2002. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology* 49: 373–385.
- Hong JH, Chu H, Zhang C, Ghosh D, Gong X, Xu J. 2015. A quantitative analysis of stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* columella root cap. *Frontiers in Plant Science* 6: e206.
- Jia Y, Tian H, Li H, Yu Q, Wang L, Friml J, Ding Z. 2015. The *Arabidopsis thaliana* elongates complex shoot 2: phylogenetically affords root development. *Journal of Experimental Botany* 66: 4631–4642.
- Laux T. 2003. The stem cell concept in plants: a matter of debate. *Cell* 113: 281–283.
- Ljung K, Hull AK, Colenzy J, Yamada M, Lexell M, Normanly J, Sandberg G. 2005. Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 17: 1099–1104.
- Monfared MM, Charles CC, Rossignol P, Pires HR, Fletcher JC. 2013. The *ULTRA1* and *ULTRA2* genes play overlapping roles in *Arabidopsis* development and gene regulation. *Molecular Plant* 6: 1564–1579.
- Napushaluy-Mendivil S, Alvarez-Venegas R, Shishkova S, Dubrovsky JG. 2011. *ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITICORAX1 (ATX1)* is required for cell production, patterning, and morphogenesis in root development. *Journal of Experimental Botany* 62: 6373–6384.
- Naway T, Lee JY, Collaas J, Wang JY, Thongrod SC, Malamy JE, Birnbaum K, Benfey PN. 2005. Transcriptional profile of the *Arabidopsis* root quiescent center. *Plant Cell* 17: 1908–1925.
- Ortega-Martinez O, Pecnas M, Carol RJ, Dolan L. 2007. Trichome modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science* 317: 507–510.
- Pacheco-Escobedo MA, Ivanov VB, Ransom-Rodriguez I, Arriaga-Mejía G, Avila H, Balabanov IA, Pimentel A, Corlidi G, Doerner P, Dubrovsky JG *et al.* 2016. Longitudinal zonation pattern in *Arabidopsis* root tip defined by a multiple structural change algorithm. *Annals of Botany* 118: 763–776.
- Peng Y, Ma W, Chen L, Yang L, Li S, Zhao H, Zhao Y, Jin W, Li N, Bevan MW *et al.* 2013. Control of root meristem size by DAI1/RAI1/ERF1/PROTEIN2 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 161: 1542–1556.
- Peret B, Swarup R, Ferguson A, Seth M, Yang Y, Dhondt S, James N, Casimiro L, Perry P, Syed A *et al.* 2012. *AUX1/AA* genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 24: 2874–2885.
- Peterson SV, Johansson AI, Kowalczyk M, Makeyevchuk A, Wang JY, Moritz T, Crepe M, Benfey PN, Sandberg G, Ljung K. 2009. An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *Plant Cell* 21: 1659–1668.
- Pi L, Aichinger E, van der Graaff E, Llavata-Peris CI, Weijers D, Hennig L, Gross F, Laux T. 2015. Organiser-derived WOX5 signal maintains root columella stem cells through chromatin-mediated repression of *GDF4* expression. *Developmental Cell* 33: 576–588.
- Pires HR, Monfared MM, Shemyakina EA, Fletcher JC. 2014. *ULTRAPETALA1* and *ULTRA2* genes interact with *KANADI* transcription factor genes to regulate *Arabidopsis* root meristem patterning. *Plant Cell* 26: 4345–4361.
- Pu L, Liu MS, Kim SY, Chen LF, Fletcher JC, Sung ZR. 2013. *EMBRYONIC FLOWER1* and *ULTRAPETALA1* act antagonistically on *Arabidopsis* development and stress response. *Plant Physiology* 162: 812–830.
- Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. 2013. An improvement of the 2^{-C_T} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Bioinformatics, Bioinformatics, and Bioinformatics* 3: 71–85.

- Roy D, Chakrabarty J, Mallik R, Chaudhuri S. 2019. Rice trichoxa factor ULTRAP5/1AA11 (OSUL11) specifically binds to "GAGAG" sequence motif present in Polycomb response elements. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Gene Regulatory Mechanisms* 1862: 582–597.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfeld H, Murfet J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeck P *et al.* 1999. An auxin-dependent distal outgrowth pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99: 163–172.
- Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B. 2003. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes & Development* 17: 354–358.
- Sablowski R. 2004. Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct. *Trends in Cell Biology* 14: 605–611.
- Sablowski R. 2011. Plant stem cell niches: from signalling to execution. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 4–9.
- Sánchez MP, Aceves García P, Petrone F, Steckenborn S, Vega León R, Alvarez Builla LR, Gamay-Arroyo A, García-Ponce B. 2015. The impact of Polycomb group (PcG) and Trithoxa group (TtG) epigenetic factors in plant plasticity. *New Phytologist* 208: 687–694.
- Sarkar AK, Luitjen M, Miyashima S, Lenhard M, Hashimoto T, Nakajima K, Scheres B, Heidstra R, Lauz T. 2007. Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446: 811–814.
- Scheres B. 2007. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 345–354.
- Schindelin J, Arganda-Camaras J, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietusch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B *et al.* 2012. Fiji: an open-source platform for biological image analysis. *Nature Methods* 9: 676–682.
- Shillatford A. 2012. The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis. *Annual Review of Biochemistry* 81: 45–95.
- Stahl Y, Wink RII, Ingram GC, Simon R. 2009. A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Current Biology* 19: 907–914.
- Stepanova AN, Roberson-Toy J, Yua J, Benavente LM, Xie DY, Dolan K, Schlereth A, Jurgens G, Alonso JM. 2008. *YGA1*-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133: 177–191.
- Tao Y, Ferrer JL, Jung K, Pojer T, Hong F, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Evans LJ *et al.* 2008. Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan decarboxylase pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133: 164–176.
- Thomann A, Lechner E, Hansen M, Dumbiauskas E, Parmentier Y, Kieber J, Scheres B, Genschik P. 2009. *Arabidopsis GL1.1/PG3* genes regulate primary root growth and patterning by ethylene-dependent and independent mechanisms. *Plant Genetics* 5: e000378.
- Tian H, Niu T, Yu Q, Quan T, Ding Z. 2013. Auxin gradient is crucial for the maintenance of root distal stem cell identity in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* 8: e36429.
- Tian H, Wahnik K, Niu T, Li H, Yu Q, Pollmann S, Vanneste S, Govaerts W, Rolcik J, Geisler M *et al.* 2014. WOX5-1AA17 feedback circle-mediated cellular auxin response is critical for the patterning of root stem cell niches in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 7: 271–289.
- Tremat L, Bauby H, Dubreucq B, Grandjean O, Runions J, Barchelemy J, Palanqui JC. 2008. High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of phloem development and structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 1494–1503.
- Ulanasov T, Murfet J, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9: 1363–1371.
- van den Berg C, Willemssen V, Hendriks G, Weisbeck P, Scheres B. 1997. Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390: 287–289.
- Vernoux T, Brunoud G, Farcot E, Morin V, Van den Daele H, Legrand J, Oliva M, Das P, Larrien A, Wells D *et al.* 2011. The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Molecular Systems Biology* 7: e508.
- Woodward AW, Bartel B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95: 707–735.
- Wysocza-Diller JW, Helacina Y, Polaki H, Malamy JE, Benfey PN. 2000. Molecular analysis of *SCARECROW* function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* 127: 595–603.
- Xu B, Kuo T, Rishi Y, Liu MS, Wu L, Chen LO, Fletcher JC, Sung ZR, Pu L. 2018. Trichoxa group proteins act together with a polycomb group protein to maintain chromatin integrity for epigenetic silencing during seed germination in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 11: 659–677.
- Yao X, Feng H, Yu Y, Dong A, Shen WH. 2013. SID2-mediated H3K4 methylation is required for proper *Arabidopsis* root growth and development. *PLoS One* 8: e56537.
- Zhang TQ, Xu ZG, Shang GD, Wang JW. 2019. A single-cell RNA sequencing profiles the developmental landscape of *Arabidopsis* root. *Molecular Plant* 12: 648–660.
- Zhang Y, Jiao Y, Liu Z, Zhu YX. 2015. ROW1 maintains quiescent centre identity by confining WOX5 expression to specific cells. *Nature Communications* 6: e6003.
- Zhao S, Peraldo RD. 2005. Comprehensive algorithm for quantitative real time polymerase chain reaction. *Journal of Computational Biology* 12: 1047–1064.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Fig. S1 *ULT1* loss-of-function mutant, does not affect primary root length and RAM size.

Fig. S2 *ULT1* loss of function mutant, *Ler* background, does not affect primary root length and RAM size.

Fig. S3 Confocal images of *Q1630:GFP* enhancer trap marker in roots.

Table S1 List of primers used to clone *ULT1* and for qPCR's assays.

Table S2 Summary of phenotypes observed in *arx1-3*, *ulr1-3* and *arx1-3/ulr1-3* mutants.

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



The Epigenetic Faces of ULTRAPETALA1

Diego Ornelas-Ayala¹, Adriana Garay-Arroyo^{1,2}, Berenice García-Ponce¹,
Elena R. Álvarez-Buylla^{1,2} and María de la Paz Sánchez^{1*}

¹ Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, 3er Circuito Ext. Junto a J. Botánico, Ciudad Universitaria, UNAM, Mexico City, Mexico,
² Centro de Ciencias de la Complejidad (C3), Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Gang Wu,
Zhejiang Agriculture and Forestry
University, China

Reviewed by:

Chris Helliwell,
Commonwealth Scientific
and Industrial Research Organisation
(CSIRO), Australia
Li Pu,
Chinese Academy of Agricultural
Sciences, China

*Correspondence:

María de la Paz Sánchez
mpsanchez@ecologia.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Development and EvoDevo,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 03 December 2020

Accepted: 21 January 2021

Published: 25 February 2021

Citation:

Ornelas-Ayala D, Garay-Arroyo A,
García-Ponce B, R Álvarez-Buylla E
and Sánchez MP (2021) The
Epigenetic Faces of ULTRAPETALA1.
Front. Plant Sci. 12:637244.
doi: 10.3389/fpls.2021.637244

ULTRAPETALA1 (ULT1) is a versatile plant-exclusive protein, initially described as a trithorax group (TrxG) factor that regulates transcriptional activation and counteracts polycomb group (PcG) repressor function. As part of TrxG, ULT1 interacts with ARABIDOPSIS TRITHORAX1 (ATX1) to regulate H3K4me3 activation mark deposition. However, our recent studies indicate that ULT1 can also act independently of ATX1. Moreover, the ULT1 ability to interact with transcription factors (TFs) and PcG proteins indicates that it is a versatile protein with other roles. Therefore, in this work we revised recent information about the function of Arabidopsis ULT1 to understand the roles of ULT1 in plant development. Furthermore, we discuss the molecular mechanisms of ULT1, highlighting its epigenetic role, in which ULT1 seems to have characteristics of an epigenetic molecular switch that regulates repression and activation processes via TrxG and PcG complexes.

Keywords: ULTRAPETALA1, TrxG, PcG, ATX1, Molecular epigenetic switch, Arabidopsis

INTRODUCTION

In multicellular organisms, epigenetic regulation plays crucial roles for the correct deployment of developmental programs and for the establishment of cell fates. Epigenetic mechanisms include post-translational histone modifications (PHM) that modulate chromatin structure to regulate gene expression. The trithorax group (TrxG) is an epigenetic protein complex able to regulate transcriptional activation through trimethylation of lysine 4 and 36 of histone H3 (H3K4me3 and H3K36me3) as well as other associated PHMs (Schuettengruber et al., 2011). TrxG proteins are those that belong to complexes counteracting of polycomb group (PcG) repressive activity at the same set of target genes (Grimaud et al., 2006); however, other proteins that act together with TrxG on PcG or non-PcG target genes are also considered TrxG (Schuettengruber et al., 2007).

In plants, TrxG participates in different developmental processes from embryogenesis to floral development, regulating gene expression of several transcription factors (TFs) involved in stem cell maintenance, cell fate identity, and cell proliferation and differentiation (Sanchez et al., 2015; Fletcher, 2017). The plant TrxG complex has been identified by homology to known TrxG proteins in animals or by genetic characterization based on their ability to counteract PcG mutant phenotypes (Fletcher, 2017). In this regard, SET histone methyltransferases (HMTs) of MLL and SET families, COMPASS-like proteins such as WDR5, ASH2L and RBBP5, and ATP-dependent chromatin-remodeling factors such as BRM, CHD and BPTF, have been described in plants

(Avramova, 2009; Schuettengruber et al., 2011; Sanchez et al., 2015) (**Figure 1**). In *Arabidopsis thaliana* (hereafter *Arabidopsis*), the main HMTs of TrxG that catalyze the H3K4me3 mark are the ARABIDOPSIS TRITHORAX1 (ATX1) and the ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED 3/SETDOMAIN GROUP 2 (ATXR3/SDG2) (Alvarez-Venegas et al., 2003; Berr et al., 2010; Guo et al., 2010; Chen et al., 2017), although until now, only ATX1 has been found to form a complex within the core of *Arabidopsis* COMPASS-like complex described (Jiang et al., 2011). Interestingly, it has been reported that the plant TrxG group includes a unique protein named ULTRAPETALAI (ULT1) (**Figure 1**), whose structure differs from all TrxG components reported in animals and yeast. ULT1 has been defined as a TrxG factor by counteract PcG silencing and by its physical interaction with ATX1 (Carles and Fletcher, 2009; Pu et al., 2013). However, our recent study indicates that ULT1 can act independently of ATX1, in a tissue-specific fashion (Ornelas-Ayala et al., 2020). Moreover, the interactions of ULT1 with PcG proteins (Xu et al., 2018) suggest other roles of ULT1 as well. Therefore, here we review recent information on the structure of the ULT1 protein, its interactions with other proteins, and its gene targets, as well as the phenotypic analysis of loss-of-function mutants to understand the roles of ULT1 in plant development. Furthermore, we discuss the molecular mechanisms in which ULT1 is involved, as well as its possible function as an epigenetic molecular switch that regulates repression and activation processes via TrxG and PcG complexes.

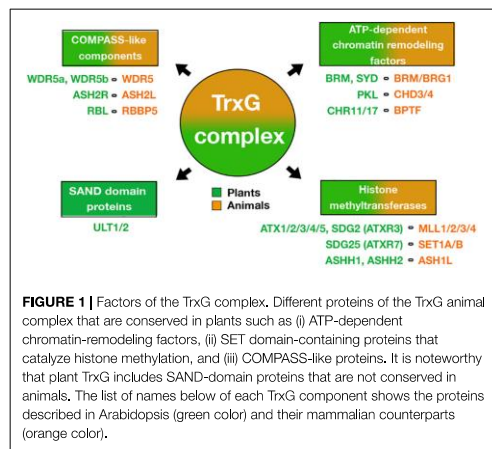
WHAT THE ULT1 STRUCTURE REVEALS ABOUT ITS FUNCTION

In *Arabidopsis*, ULT1 has been described as a SAND (named after Sp100, AIRE, NucP41/75, DEAF-1) domain protein that

also contains a B-box motif (**Figure 2A**), a motif that seems to be important for protein-protein interaction (Torok and Etkin, 2001; Carles et al., 2005; Khanna et al., 2009). In the case of OsULT1 from *Oryza sativa*, it has been shown that is important for its multimerization (Roy et al., 2019). Meanwhile, the SAND domain has a DNA-binding function (Bottomley et al., 2001), and it is conserved in plants and animals in vast combinations with other protein domains on the Viridiplantae and metazoan lineages. The Chlorophyta lineage contains a single-SAND domain protein RegA, whereas in the Embryophyte lineage only ULT and ATX3 (ARABIDOPSIS TRITHORAX3) proteins and its paralogs contain a SAND domain (Kirk et al., 1999; Nedelcu, 2019). In ULT proteins, the SAND domain is unique, whereas in ATX3, it appears in combination with the SET-like and PHD domains (Nedelcu, 2019). The SAND domain in combination with other protein domains has also been related to chromatin interactions and transcriptional regulation. For instance, AIRE (Autoimmune Regulator) is capable of interacting with chromatin through its PHD domain. AIRE binds specifically unmethylated H3K4 residues and it is proposed that this binding is important for its function as a transcriptional activator (Org et al., 2008). Moreover, the AIRE protein can associate with DNA transcriptional control elements and factors involved in pre-mRNA processing (Abramson et al., 2010) and also can be acetylated by the CBP (CREB Binding Protein) and the p300 histone acetyltransferases to enhance its transactivation activity (Saare et al., 2012). Therefore, the SAND domain is a DNA-binding module characteristic of chromatin-dependent transcriptional regulation. In fact, by *in vitro* assays, it has been shown that the SAND domain of human DEAF-1 (Deformed Epidermal Autoregulatory Factor-1) homolog recognizes the 5'-TTTCG-3' sequence (Bottomley et al., 2001). This sequence differs from what has been reported in plants, where the SAND domain of recombinant OsULT1, has affinity for the 5'-GAGAG-3' sequence (Roy et al., 2019).

Most of the SAND domain proteins of the different lineages are involved in developmental processes such as cell proliferation, cell differentiation, tissue homeostasis and organ formation (Nedelcu, 2019). For instance, in the multicellular green alga *Volvox carter*, RegA is involved in somatic cell differentiation (Kirk et al., 1999), while the DEAF-1 protein is necessary for embryonic development in *Drosophila melanogaster* (Veraksa et al., 2002), and its ortholog in mammals is involved in breast epithelial cell differentiation (Barker et al., 2008). In addition, AIRE is an important transcriptional activator to regulate autoimmune processes in the thymus (Abramson et al., 2010).

In plants, ULT1 functions have been described only for *Arabidopsis* and rice (see below); however, several ULT1 sequences have been reported in other species. In this kingdom, ULT1 seems to be a protein exclusive to Angiosperms, since Gymnosperm, Lycophytes or Mosses lack sequences homologous to ULT1. In angiosperms ULT1 is highly conserved in different species of Eudicots, Monocotyledons, and even in Amborellales, considered one of the most basal angiosperms (Chase et al., 2016), the latter being closer to Eudicots than



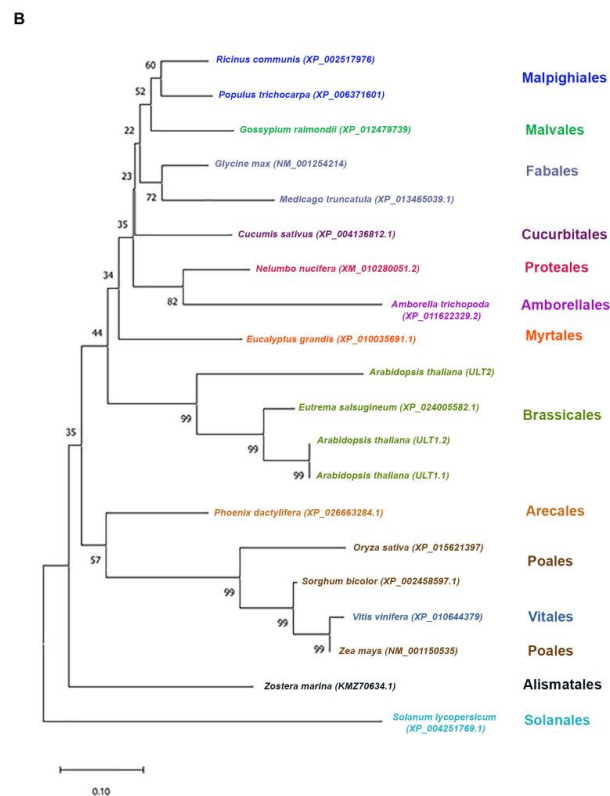
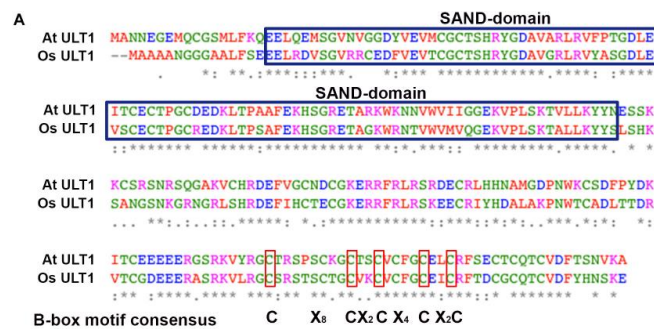


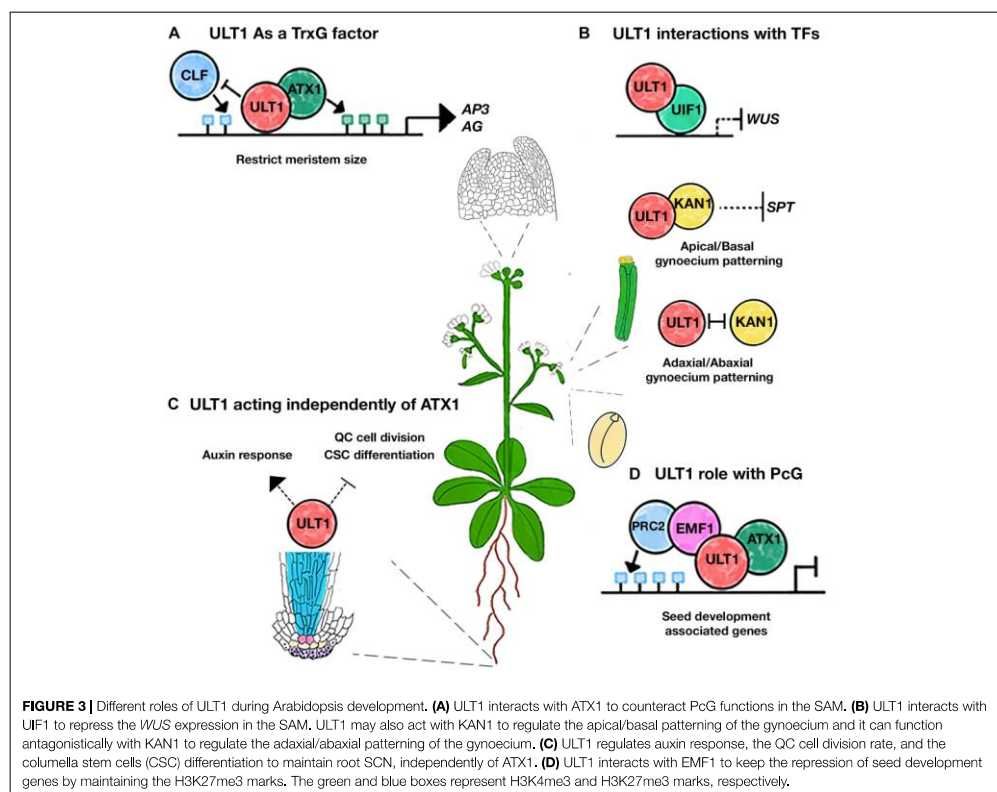
FIGURE 2 | ULTRAPETALA1 is conserved in different angiosperm species. **(A)** The SAND-domain and B-box motif of ULT1 from *Arabidopsis thaliana* and its alignment with ULT1 from *Oryza sativa*. The asterisks show identical residues; colons (:) and periods (.) show residues with strongly and weakly similar properties, respectively. The blue boxes show the SAND-domain and the red boxes represent the B-box consensus motif. **(B)** Phylogenetic analysis generated using the neighbor-joining method based on the ULT1 protein sequence of selected plant species. Numbers at nodes represent bootstrap percentages based on 10,000 samplings. The scale bars represent 0.1 substitutions per site.

to Monocotyledons (Figure 2B). The topology of neighboring phylogenetic analysis shows a clear clade distribution according to plant orders, with the exception of *Vitis vinifera* that is closer to Poales (Figure 2B). Evolutionary conservation is also observed for Arabidopsis ULT2, a paralog of ULT1, which conserved a similar protein structure that includes the SAND domain (Carles et al., 2005). The high identity of ULT1 proteins in these species predicts similar functions among them.

THE ROLE OF ULT1 AS PART OF TrxG EPIGENETIC COMPLEX

The first reports on ULT1 function were made by analyzing the *ULT1* loss and gain-of-function mutant plants (Fletcher, 2001; Carles et al., 2004, 2005; Carles and Fletcher, 2009). Indeed, loss of function of ULT1 delays differentiation and increases shoot and floral meristem size, producing extra-floral organs such as sepals

and petals, hence the name ULTRAPETALA (Fletcher, 2001; Carles et al., 2004). In the shoot apical meristem (SAM), ULT1 positively regulates the expression of *APETALA3* (*AP3*) and *AGAMOUS* (*AG*) (Figure 3A), two genes of the ABC flower organ identity model (Carles and Fletcher, 2009). However, ULT1 was also described as a negative regulator of *WUSCHEL* (*WUS*) expression (Figure 3B), a TF that maintains stem cells in the meristems and must be repressed in order to establish floral determinacy (Carles et al., 2004). Therefore, these reports describe ULT1 as a putative transcriptional regulator, involved in shoot meristem maintenance and floral meristem differentiation and determinacy. Nevertheless, the opposite regulation between ULT1 and *CURLY LEAF* (*CLF*), an HMT of the Arabidopsis PcG repressive complex, observed in some vegetative and reproductive organs (Carles and Fletcher, 2009), as well as the antagonistic function of ULT1 with *EMBRYONIC FLOWER1* (*EMF1*), another PcG component (Pu et al., 2013), together with the ability of ULT1 to physically interact with the *ATX1*, have led to propose ULT1 as a TrxG factor with coactivator



properties of some genes related to the SAM development (Carles and Fletcher, 2009).

Furthermore, despite the lack of HMT activity of ULT1, it has been suggested that *ult1* mutant plants have lower levels of H3K4me3 marks on *AG* and *AP3* genes, which are associated with an increase of H3K27me3 PcG mark on these ULT1 targets (Carles and Fletcher, 2009; Pu et al., 2013), evidencing the ability of ULT1 to regulate these epigenetic marks. Interestingly, the 5'-GAGAG-3' Arabidopsis PRE motifs recognized by CLF and its functional homolog SWINGER (SWN), as well as by other core components of PcG (Deng et al., 2013; Xiao et al., 2017; Shu et al., 2019), can also be recognized by the OsULT1 SAND-domain (Roy et al., 2019). Given that the ULT1 SAND-domains from rice and Arabidopsis share 90.91% of similarity (Figure 2A), it could be predicted that Arabidopsis ULT1 can bind through its SAND domain to the same sites as PcG proteins and thereby interfere with H3K27me3 marks.

All of these reports indicate that ULT1 is a unique SAND-domain protein that is part of a TrxG complex; neither in animals nor in yeast is there evidence of SAND-domain proteins in the TrxG complexes described so far.

DIFFERENT TISSUES, DIFFERENT ULT1 MECHANISMS

Although ULT1 is able to bind to ATX1, its interactions with other TrxG components are unclear. Unlike the other members of the TrxG, ULT1 has a very discrete expression pattern, being mainly expressed in young organ primordia and shoot and root meristems (Carles et al., 2005; Ornelas-Ayala et al., 2020). This suggests that ULT1 has a tissue-specific regulation rather than a general expression pattern as do the other TrxG members.

Genome-wide analyses have revealed that ULT1-regulated genes are involved in different developmental processes (Tyler et al., 2019). Besides its function in SAM development (Fletcher, 2001), ULT1 participates in different stress processes (Pu et al., 2013; Tyler et al., 2019). In addition, we recently found that ULT1 is necessary for root stem cell niche (SCN) maintenance (Figure 3C), including the cell division rate of the Quiescent Center (QC) and the undifferentiated state of the columella stem cells (Ornelas-Ayala et al., 2020). Interestingly and in contrast to its role in the SAM, our genetic analyses of *atx1* and *ult1* single and double mutants revealed that in the root apical meristem (RAM) ULT1 acts independently of ATX1 (Ornelas-Ayala et al., 2020). The *ult1* mutants showed a diminished response to auxins, demonstrated by a down regulation of some efflux *PIN* transporter genes and the *DR5-GUS* reporter, as well as a premature columella stem cell differentiation (Ornelas-Ayala et al., 2020). Contrary to this, *atx1* mutants do not seem to have defects in auxin response, whereas the columella stem cell differentiation seems to be delayed; besides, in contrast to *atx1* mutants, *ult1* plants did not show any changes in the root and RAM length (Napsucialy-Mendivil et al., 2014; Ornelas-Ayala et al., 2020).

Although the studies of the relationship between ULT1 and ATX1 in the SAM were carried out by single mutant analysis

and biochemical methods, and in the RAM were carried out by genetic analysis of double mutants, with these studies, it is possible to establish that ULT1 can act by different mechanisms in the SAM and in the RAM, one of which requires ATX1 to regulate some aspects of floral development while in the other, ULT1 maintains SCN homeostasis in ATX1-independent manner.

In this regard, 18.7% (2859) of Arabidopsis genes are deregulated in *atx1* loss-of-function mutants, whereas 5.6% (856) are deregulated in *ult1* mutants, and among them only a little subset is shared (1.1%; 170 genes) in both *atx1* and *ult1* mutants (Xu et al., 2018); although this does not mean that it is a direct regulation by ATX1 or ULT1, it reflects the behavior of genes that do not always act together. In fact, by ChIP-seq analysis, it has also been determined that out of the 2,276 Arabidopsis TFs annotated (Perez-Rodriguez et al., 2010; Jin et al., 2017), ATX1 is bound to 43 (1.88%) of these, whereas ULT1 to 67 (2.9%) and only in 18 (0.8%) of these are bound both ATX1 and ULT1 (Xu et al., 2018), evidencing that ATX1 and ULT1 have independent targets.

The ATX1-independent function of ULT1 raises the question whether ULT1 acts together with other HMTs of the TrxG complex or by a TrxG-independent mechanism or both in different developmental processes. The analysis of ULT1 protein interactions in different developmental contexts could provide evidence compatible with both mechanisms as shown below.

ULT1 ACTS TOGETHER WITH SOME TRANSCRIPTION FACTORS

The presence of the B-box motif in ULT1 suggests multiple interactions with other proteins. Indeed, ULT1 interacts with some TFs (Figure 3B). One of these is the GARP family transcription factor KANADI1 (KAN1), described as a transcriptional repressor, involved in the patterning of the abaxial polarity of leaves and the gynoecium (Eshed et al., 2001; Pires et al., 2014; Xie et al., 2015). ULT1 interacts physically with KAN1 and genetic analysis indicates that they participate together in the apical-basal polarity of the gynoecium, restricting the *SPATULA* (*SPA*) expression, which promotes carpel marginal tissue apical style and stigma tissue formation (Figure 3B). But also, ULT1 and KAN1 may act antagonistically to regulate the adaxial-abaxial axis of the gynoecium (Pires et al., 2014; Figure 3B). ULT2 also physically interacts with KAN1, performing redundant roles on the apical-basal gynoecium patterning (Monfared et al., 2013; Pires et al., 2014).

Furthermore, the physical interaction of ULT1 with the MYB domain-containing TF ULTRAPETALA INTERACTING FACTOR 1 (UIF1) has been reported. UIF1 binds to *WUS* and *AG* regulatory sequences in the floral meristem (Moreau et al., 2016). Given that UIF1 acts as a transcriptional repressor, it has been suggested that it represses *WUS* expression when interacting with ULT1, to establish floral meristem determinacy (Moreau et al., 2016; Figure 3B).

These reports have led to suggestions that ULT1 can act as a link between chromatin-remodeling factors and some TFs (Pires et al., 2014). However, other evidence will be needed to indicate whether the combined function of ULT1 with

these TFs depends on the other components of TrxG or is TrxG-independent.

CAN ULT1 ACT IN DIFFERENT TrxG COMPLEXES?

The lower levels of H3K4me3 marks detected in some genes in the *ult1* mutants compared with those observed in *atx1* mutants (Xu et al., 2018) support the idea that ULT1 can act together with TrxG complex but independently of ATX1, suggesting the existence of different TrxG complexes, through which ULT1 can perform its function. In this regard, multiple SET or MLL HMT homologues from yeasts and animals that can form different COMPASS-like complexes and predict the existence of different TrxG complexes in plants (Schuettengruber et al., 2011). The Arabidopsis compass-like complex reported so far contains ATX1 as the H3K4me3 HMT (Jiang et al., 2009, 2011); however, there are other HMTs of H3K4, such as ATX1/SDG27, ATX2/SDG30, ATXR3/SDG2 and ATXR7/SDG25, that could form different COMPASS complexes (Sanchez et al., 2015). Indeed, it has been demonstrated that the SAND domain of OsULT1 is responsible for interacting with the SET-domain of OsTRX1, an ATX1 ortholog (Roy et al., 2019). The high similarity of Arabidopsis and rice SAND-domains of ULT1 (Figure 2A) suggests that ULT1 can also interact with different proteins with a SET-domain.

Of particular interest is ATXR3/SDG2, reported as the main HMT of the Arabidopsis (Guo et al., 2010). ATXR3/SDG2 does not have a significant sequence homology with other SDGs outside of the SET domain. However, the gene encoding this protein is broadly expressed and is crucial for multiple Arabidopsis developmental processes, regulating 46.4% of all H3K4me3 sites in the Arabidopsis genome (Berr et al., 2010; Guo et al., 2010; Chen et al., 2017). In root tissues, the *sdg2* loss-of-function mutant shares some phenotypes with *ult1* mutants, such as disorganization of the SCN, early differentiation of the columella stem cells, and diminished auxin response (Yao et al., 2013; Ornelas-Ayala et al., 2020). Although it is still unknown whether ULT1 interacts with SDG2, the similarities in their phenotypes raises the possibility that ULT1 could act with SDG2 in some developmental contexts.

DOES ULT1 FUNCTION AS A MOLECULAR EPIGENETIC SWITCH?

Besides the interactions with TFs and TrxG factors, ULT1 also interacts with EMF1 (Xu et al., 2018). EMF1 is the plant-specific protein proposed as a component of Polycomb repressive complex 1 (PRC1), acting as a bridge to the Polycomb repressive complex 2 (PRC2) (Calonje et al., 2008; Wang et al., 2014). Although the relevance of such interaction is unknown, the H3K27me3 abundancy on some EMF1-target genes associated with seed development decreases more in the *emf1/ult1/atx1* triple mutant than in *emf1*, *atx1*, or *ult1* single mutant (Xu et al., 2018). In this framework, it has been proposed that ULT1

interacts with ATX1 to form a complex with PRC2 through EMF1 to maintain the H3K27me3 marks and a chromatin repressive state (Xu et al., 2018). This model suggests that ULT1 not only acts to antagonize the PcG activity; instead, it could act together with PRC2, maintaining the repression states of some targets, through the maintenance of the H3K27me3 mark (Figure 3D). For instance, it has been seen that the *ult1* mutants have more upregulated genes than down-regulated genes (Xu et al., 2018; Tyler et al., 2019). Interestingly, the MADS-box *FLOWERING LOCUS C (FLC)* gene, which is activated by TrxG and repressed by PcG (Whittaker and Dean, 2017), is upregulated (~4.35 fold) in *ult1* mutant plants (Pu et al., 2013; Xu et al., 2018; Tyler et al., 2019), contrary to what is expected for TrxG mutants. Besides, ULT1 binding to the *FLC* locus supports a direct regulation (Xu et al., 2018). Moreover, the *FLC* upregulation is higher in *ult1/emf1* double mutants than in the *emf1* single mutant (Pu et al., 2013). Hence, loss of *ULT1* function enhances *emf1* upregulation on *FLC*. In contrast, a different behavior was observed on genes that are positively regulated by ULT1, e.g., *AG*, whose upregulation in *emf1* loss-of-function mutants is abated in the double mutant *ult1/emf1* plants (Pu et al., 2013). Although additional experiments are needed, these observations support the involvement of ULT1 in transcriptional repression. Moreover, the repressive function of ULT1 could be compatible with *WUS* repression via *UIF1* (Moreau et al., 2016), where PcG could also be participating, as it has been reported (Xu and Shen, 2008).

Given these observations, we suggest two modes of ULT1 action: one through TrxG to regulate transcriptional activation via H3K4me3 deposition, which can be ATX1 dependent or independent, and another, through PcG via EMF1 to repress transcription.

The apparent dual function of ULT1 has led us to wonder whether ULT1 can act as a molecular epigenetic switch, regulating transcriptional repression and activation via PcG and TrxG, respectively. The presence of molecular epigenetic switches allows a dynamic regulation, capable of changing gene expression quickly and efficiently to face different environmental and developmental states. The existence of bivalent chromatin domains provides persuasive evidence of molecular epigenetic switches that regulate gene expression (Hoffmann et al., 2015). The bivalent domains produced by TrxG and PcG serve to keep developmental genes on standby, primed for subsequent expression and to protect against unscheduled expression, reducing transcriptional noise in favor of robust developmental decisions (Hoffmann et al., 2015). Although in plant biological studies, bivalent marks in the same locus have been little addressed and still remain elusive, finding proteins involved in both activation and repression processes shows the relevance of bivalent marks to regulating gene expression quickly and efficiently. In this regard, ULT1 fulfills the main features to act as a molecular epigenetic switch: (i) interaction with both TrxG and PcG proteins, (ii) the ability to increase or decrease gene expression, and (iii) the ability to regulate the deposition of H3K4me3 and H3K27me3 marks. However, establishing whether these characteristics converge into specific genes in time and/or space is still necessary, in such a way that ULT1 can be a link to

load the TrxG or PcG complexes and consequently regulate gene expression accordingly.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Current knowledge reveals ULT1 to be a versatile protein able to interact with TFs, TrxG, and PcG proteins to regulate gene expression of several developmental processes: (1) ULT1 activates genes related to floral development through its interaction with ATX1, (2) in association with UIF1, ULT1 represses WUS expression to regulate shoot and floral meristem homeostasis, (3) ULT1 is also involved in the regulation of gynoecium patterning, in which it interacts with KAN1 to repress *SPT*, (4) ULT1 together with EMF1 maintains repressive marks of some genes related to seed development, and (5) ULT1, independently of ATX1, is involved in the root SCN maintenance (Figure 3). The ability of ULT1 to regulate both gene expression and repression by modulation of H3K4me3 and H3K27me3 bivalent marks makes this protein a suitable candidate to regulate bivalent genes that can be in a poised state, waiting for future instructions from the cell. The role of ULT1, independent of ATX1 in roots tissues, suggests a function with other TrxG factors, evidencing the possible existence of different TrxG complexes that could be formed in a tissue-specific fashion in which ULT1 could be involved.

The complexity of ULT1 interactions, the phenotypes reported for *ult1* mutants, and their genome-wide effects make it difficult to define modes of action of ULT1. However, these reports illustrate four possible ways of action for ULT1: (i) together with TrxG factors, (ii) with PcG factors, (iii) outside of both TrxG/PcG complex, and (iv) in association with TFs. Furthermore, a possible mechanism cannot be ruled out through which ULT1 and TrxG or PcG converge in association with TFs.

REFERENCES

- Abramson, J., Giraud, M., Benoist, C., and Mathis, D. (2010). Air's partners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell* 140, 123–135. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.030
- Alvarez-Venegas, R., Pien, S., Sadler, M., Witmer, X., Grossniklaus, U., and Avramova, Z. (2003). ATX-1, an *Arabidopsis* homolog of trithorax, activates flower homeotic genes. *Curr. Biol.* 13, 627–637. doi: 10.1016/s0960-9822(03)00243-4
- Avramova, Z. (2009). Evolution and pleiotropy of TRITHORAX function in *Arabidopsis*. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 371–381. doi: 10.1387/ijdb.082664za
- Barker, H. E., Smyth, G. K., Wettenhall, J., Ward, T. A., Bath, M. L., Lindeman, G. J., et al. (2008). Deaf-1 regulates epithelial cell proliferation and side-branching in the mammary gland. *BMC Dev. Biol.* 8:94. doi: 10.1186/1471-213X-8-94
- Berr, A., McCallum, E. J., Menard, R., Meyer, D., Fuchs, J., Dong, A., et al. (2010). *Arabidopsis* SET DOMAIN GROUP2 is required for H3K4 trimethylation and is crucial for both sporophyte and gametophyte development. *Plant Cell* 22, 3232–3248. doi: 10.1105/tpc.110.079962
- Bottomley, M. J., Collard, M. W., Huggenvik, J. I., Liu, Z., Gibson, T. J., and Sattler, M. (2001). The SAND domain structure defines a novel DNA-binding fold in transcriptional regulation. *Nat. Struct. Biol.* 8, 626–633. doi: 10.1038/89675
- Calonje, M., Sanchez, R., Chen, L., and Sung, Z. R. (2008). EMBRYONIC FLOWER1 participates in polycomb group-mediated AG gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 277–291. doi: 10.1105/tpc.106.049957

It would be important to study specific ULT1 targets in different developmental and/or tissue-specific stages to analyze the ULT1 involvement on its activation or repression, which could shed light on the role of ULT1 in association with TrxG and PcG complexes, as a molecular epigenetic switch. Therefore, the future challenge is to define whether ULT1 acts by different mechanisms or in a single mechanism that involves all reported interactions. In this regard, additional research is needed to define whether these mechanisms can coexist or are tissue-, cell type-, or loci-specific.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DO-A and MPS conceived and wrote the review. AG-A, ERA-B, and BG-P wrote the review. All authors have read and approved this version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT IN203220, IN206220, IN200920, and IN211721. CONACyT 102987 and 102959.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Diana B. Sánchez Rodríguez for her logistical support. Diego Ornelas-Ayala is a Ph.D. student from the Posgrado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, and recipient of a fellowship from CONACyT (588728), Mexico.

- Carles, C. C., Choffnes-Inada, D., Reville, K., Lertpiriyapong, K., and Fletcher, J. C. (2005). ULTRAPETALA1 encodes a SAND domain putative transcriptional regulator that controls shoot and floral meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 132, 897–911. doi: 10.1242/dev.01642
- Carles, C. C., and Fletcher, J. C. (2009). The SAND domain protein ULTRAPETALA1 acts as a trithorax group factor to regulate cell fate in plants. *Genes Dev.* 23, 2723–2728. doi: 10.1101/gad.1812609
- Carles, C. C., Lertpiriyapong, K., Reville, K., and Fletcher, J. C. (2004). The ULTRAPETALA1 gene functions early in *Arabidopsis* development to restrict shoot apical meristem activity and acts through WUSCHEL to regulate floral meristem determinacy. *Genetics* 167, 1893–1903. doi: 10.1534/genetics.104.028787
- Chase, M., Christenhusz, M., Fay, M., Byng, J., Judd, W., Soltis, D., et al. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* 181:20.
- Chen, L. Q., Luo, J. H., Cui, Z. H., Xue, M., Wang, L., Zhang, X. Y., et al. (2017). ATX3, ATX4, and ATX5 encode putative H3K4 methyltransferases and are critical for plant development. *Plant Physiol.* 174, 1795–1806. doi: 10.1104/pp.16.01944
- Deng, W., Buzas, D. M., Ying, H., Robertson, M., Taylor, J., Peacock, W. J., et al. (2013). *Arabidopsis* polycomb repressive complex 2 binding sites contain putative GAGA factor binding motifs within coding regions of genes. *BMC Genomics* 14:593. doi: 10.1186/1471-2164-14-593

- Eshed, Y., Baum, S. F., Perea, J. V., and Bowman, J. L. (2001). Establishment of polarity in lateral organs of plants. *Curr. Biol.* 11, 1251–1260. doi: 10.1016/s0960-9822(01)00392-x
- Fletcher, J. C. (2001). The ULTRAPETALA gene controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Development* 128, 1323–1333.
- Fletcher, J. C. (2017). State of the Art: trxG factor regulation of post-embryonic plant development. *Front. Plant Sci.* 8:1925. doi: 10.3389/fpls.2017.01925
- Grimaud, C., Negre, N., and Cavalli, G. (2006). From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. *Chromosome Res.* 14, 363–375. doi: 10.1007/s10577-006-1069-y
- Guo, L., Yu, Y., Law, J. A., and Zhang, X. (2010). SET DOMAIN GROUP2 is the major histone H3 lysine [corrected] 4 trimethyltransferase in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 18557–18562. doi: 10.1073/pnas.1010478107
- Hoffmann, A., Zimmermann, C. A., and Spengler, D. (2015). Molecular epigenetic switches in neurodevelopment in health and disease. *Front. Behav. Neurosci.* 9:120. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00120
- Jiang, D., Gu, X., and He, Y. (2009). Establishment of the winter-annual growth habit via FRIGIDA-mediated histone methylation at FLOWERING LOCUS C in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 1733–1746. doi: 10.1105/tpc.109.067967
- Jiang, D., Kong, N. C., Gu, X., Li, Z., and He, Y. (2011). *Arabidopsis* COMPASS-like complexes mediate histone H3 lysine-4 trimethylation to control floral transition and plant development. *PLoS Genet.* 7:e1001330. doi: 10.1371/journal.pgen.1001330
- Jin, J., Tian, F., Yang, D. C., Meng, Y. Q., Kong, L., Luo, J., et al. (2017). PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Res.* 45, D1040–D1045. doi: 10.1093/nar/gkw982
- Khanna, R., Kronmiller, B., Maszle, D. R., Coupland, G., Holm, M., Mizuno, T., et al. (2009). The *Arabidopsis* B-box zinc finger family. *Plant Cell* 21, 3416–3420. doi: 10.1105/tpc.109.069088
- Kirk, M. M., Stark, K., Miller, S. M., Muller, W., Tailon, B. E., Gruber, H., et al. (1999). *regA*, a *Volvox* gene that plays a central role in germ-soma differentiation, encodes a novel regulatory protein. *Development* 126, 639–647.
- Monfared, M. M., Carles, C. C., Rossignol, P., Pires, H. R., and Fletcher, J. C. (2013). The ULT1 and ULT2 trxG genes play overlapping roles in *Arabidopsis* development and gene regulation. *Mol. Plant* 6, 1564–1579. doi: 10.1093/mp/sss041
- Moreau, F., Thevenon, E., Blanvillain, R., Lopez-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J. M., Dumas, R., et al. (2016). The Myb-domain protein ULTRAPETALA1 INTERACTING FACTOR 1 controls floral meristem activities in *Arabidopsis*. *Development* 143, 1108–1119. doi: 10.1242/dev.127365
- Napsucialy-Mendivil, S., Alvarez-Venegas, R., Shishkova, S., and Dubrovsky, J. G. (2014). *Arabidopsis* homolog of trithorax1 (ATX1) is required for cell production, patterning, and morphogenesis in root development. *J. Exp. Bot.* 65, 6373–6384. doi: 10.1093/jxb/eru355
- Nedelcu, A. M. (2019). Independent evolution of complex development in animals and plants: deep homology and lateral gene transfer. *Dev. Genes Evol.* 229, 25–34. doi: 10.1007/s00427-019-00626-8
- Org, T., Chignola, F., Hetenyi, C., Gaetani, M., Rebane, A., Liiv, I., et al. (2008). The autoimmune regulator PHD finger binds to non-methylated histone H3K4 to activate gene expression. *EMBO Rep.* 9, 370–376. doi: 10.1038/sj.embor.2008.11
- Ornelas-Ayala, D., Vega-Leon, R., Petrone-Mendoza, E., Garay-Arroyo, A., Garcia-Ponce, B., Alvarez-Buylla, E. R., et al. (2020). ULTRAPETALA1 maintains *Arabidopsis* root stem cell niche independently of ARABIDOPSIS TRITHORAX1. *New Phytol.* 225, 1261–1272. doi: 10.1111/nph.16213
- Perez-Rodriguez, P., Riano-Pachon, D. M., Correa, L. G., Rensing, S. A., Kersten, B., and Mueller-Roeber, B. (2010). PlantTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Res.* 38, D822–D827. doi: 10.1093/nar/gkp805
- Pires, H. R., Monfared, M. M., Shemyakina, E. A., and Fletcher, J. C. (2014). ULTRAPETALA trxG genes interact with KANADI transcription factor genes to regulate *Arabidopsis* gynoecium patterning. *Plant Cell* 26, 4345–4361. doi: 10.1105/tpc.114.131250
- Pu, L., Liu, M. S., Kim, S. Y., Chen, L. F., Fletcher, J. C., and Sung, Z. R. (2013). EMBRYONIC FLOWER1 and ULTRAPETALA1 act antagonistically on *Arabidopsis* development and stress response. *Plant Physiol.* 162, 812–830. doi: 10.1104/pp.112.213223
- Roy, D., Chakrabarty, J., Mallik, R., and Chaudhuri, S. (2019). Rice Trithorax factor ULTRAPETALA 1 (OsULT1) specifically binds to “GAGAG” sequence motif present in Polycomb response elements. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 1862, 582–597. doi: 10.1016/j.bbagr.2019.02.001
- Saare, M., Rebane, A., Rajashekar, B., Vilo, J., and Peterson, P. (2012). Autoimmune regulator is acetylated by transcription coactivator CBP/p300. *Exp. Cell Res.* 318, 1767–1778. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.04.013
- Sanchez, M. P., Aceves-Garcia, P., Petrone, E., Steckenborn, S., Vega-Leon, R., Alvarez-Buylla, E. R., et al. (2015). The impact of Polycomb group (PcG) and Trithorax group (TrxG) epigenetic factors in plant plasticity. *New Phytol.* 208, 684–694. doi: 10.1111/nph.13486
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., and Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* 128, 735–745. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.009
- Schuettengruber, B., Martinez, A. M., Iovino, N., and Cavalli, G. (2011). Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 799–814. doi: 10.1038/nrm3230
- Shu, J., Chen, C., Thapa, R. K., Bian, S., Nguyen, V., Yu, K., et al. (2019). Genome-wide occupancy of histone H3K27 methyltransferases CURLY LEAF and SWINGER in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Direct* 3:e00100. doi: 10.1002/pld3.100
- Torok, M., and Etkin, L. D. (2001). Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins. *Differentiation* 67, 63–71. doi: 10.1046/j.1432-0436.2001.067003063.x
- Tyler, L., Miller, M. J., and Fletcher, J. C. (2019). The Trithorax group factor ULTRAPETALA1 regulates developmental as well as biotic and abiotic stress response genes in *Arabidopsis*. *G3* 9, 4029–4043. doi: 10.1534/g3.119.400559
- Veraksa, A., Kennison, J., and McGinnis, W. (2002). DEAF-1 function is essential for the early embryonic development of *Drosophila*. *Genesis* 33, 67–76. doi: 10.1002/gene.10090
- Wang, Y., Gu, X., Yuan, W., Schmitz, R. J., and He, Y. (2014). Photoperiodic control of the floral transition through a distinct polycomb repressive complex. *Dev. Cell* 28, 727–736. doi: 10.1016/j.devcel.2014.01.029
- Whittaker, C., and Dean, C. (2017). The FLC locus: a platform for discoveries in epigenetics and adaptation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33, 555–575. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100616-060546
- Xiao, J., Jin, R., Yu, X., Shen, M., Wagner, J. D., Pai, A., et al. (2017). Cis and trans determinants of epigenetic silencing by Polycomb repressive complex 2 in *Arabidopsis*. *Nat. Genet.* 49, 1546–1552. doi: 10.1038/ng.3937
- Xie, Y., Straub, D., Eguen, T., Brandt, R., Stahl, M., Martinez-Garcia, J. F., et al. (2015). Meta-analysis of *Arabidopsis* KANADI1 direct target genes identifies a basic growth-promoting module acting upstream of hormonal signaling pathways. *Plant Physiol.* 169, 1240–1253. doi: 10.1104/pp.15.00764
- Xu, F., Kuo, T., Rosli, Y., Liu, M. S., Wu, L., Chen, L. O., et al. (2018). Trithorax group proteins act together with a polycomb group protein to maintain chromatin integrity for epigenetic silencing during seed germination in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 11, 659–677. doi: 10.1016/j.molp.2018.01.010
- Xu, L., and Shen, W. H. (2008). Polycomb silencing of KNOX genes confines shoot stem cell niches in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 18, 1966–1971. doi: 10.1016/j.cub.2008.11.019
- Yao, X., Feng, H., Yu, Y., Dong, A., and Shen, W. H. (2013). SDG2-mediated H3K4 methylation is required for proper *Arabidopsis* root growth and development. *PLoS One* 8:e56537. doi: 10.1371/journal.pone.0056537

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Ornelas-Ayala, Garay-Arroyo, Garcia-Ponce, R Álvarez-Buylla and Sanchez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

OPEN

A system-level mechanistic explanation for asymmetric stem cell fates: *Arabidopsis thaliana* root niche as a study system

Mónica L. García-Gómez^{1,2,3}, Diego Ornelas-Ayala¹, Adriana Garay-Arroyo^{1,2}, Berenice García-Ponce¹, María de la Paz Sánchez¹ & Elena R. Álvarez-Buylla^{1,2*}

Asymmetric divisions maintain long-term stem cell populations while producing new cells that proliferate and then differentiate. Recent reports in animal systems show that divisions of stem cells can be uncoupled from their progeny differentiation, and the outcome of a division could be influenced by microenvironmental signals. But the underlying system-level mechanisms, and whether this dynamics also occur in plant stem cell niches (SCN), remain elusive. This article presents a cell fate regulatory network model that contributes to understanding such mechanism and identify critical cues for cell fate transitions in the root SCN. Novel computational and experimental results show that the transcriptional regulator SHR is critical for the most frequent asymmetric division previously described for quiescent centre stem cells. A multi-scale model of the root tip that simulated each cell's intracellular regulatory network, and the dynamics of SHR intercellular transport as a cell-cell coupling mechanism, was developed. It revealed that quiescent centre cell divisions produce two identical cells, that may acquire different fates depending on the feedback between SHR's availability and the state of the regulatory network. Novel experimental data presented here validates our model, which in turn, constitutes the first proposed systemic mechanism for uncoupled SCN cell division and differentiation.

Stem cells (SCs) are undifferentiated cells that continuously produce the cells necessary to maintain post-embryonic tissues in multicellular organisms^{1,2}. Upon cell division, SCs can produce both daughter cells to renew themselves and cells that leave the niche and actively proliferate until differentiating^{1,2}. Both the transition from stemness to cell proliferation and the perpetuation of the cells necessary and sufficient for organ maintenance, depend on SCs' ability to divide asymmetrically³. Asymmetry cannot always be understood at the individual cell level (Fig. 1a), as SCs divisions are not always coupled with cell differentiation or with asymmetric characteristics of the daughter cells (Fig. 1b)^{4–10}. The population asymmetry model suggests that, in a SC population, certain cell divisions may yield two SCs, others may yield two cells that will differentiate, and yet others may yield one of each (Fig. 1b). The fate of the SC progeny in each case could be defined stochastically^{4,5,8}, although restrictions imposed by molecular signals (i.e., short-range niche signals) and space limitations at the niche may also be involved^{7,11,12}.

Dynamical models of gene regulatory networks have been used to study cell differentiation and pattern formation in plant and animal development^{13–17}. These computational models describe cell types or fates as attractors and have shown that cell-fate decisions emerge from the feedback between intracellular regulatory networks and extracellular signals^{13,18}. In these models, the extracellular signals may vary according to the position of a cell within a spatial domain. It is possible that these complex mechanisms could also participate in defining the fate of SCs' progeny^{5,17–25}, where some of the spatial signals could be emanating from the organizer or other niche cells^{1,2,26–35}. Dynamical models of gene regulatory networks define an attractor landscape: a multidimensional and non-linear potential that restricts the possible transitions among the network attractors (cell types)^{16,36–38}. For spatial signals to influence the differentiation dynamics of SCs, they must impinge on the underlying gene regulatory networks. For example, by affecting the activity of an individual regulator of the intracellular networks, causing

¹Departamento de Ecología Funcional, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México, México. ²Centro de Ciencias de la Complejidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México, México. ³Present address: School of Life Sciences, University of Warwick, Coventry, United Kingdom. *email: elenabuylla@protonmail.com

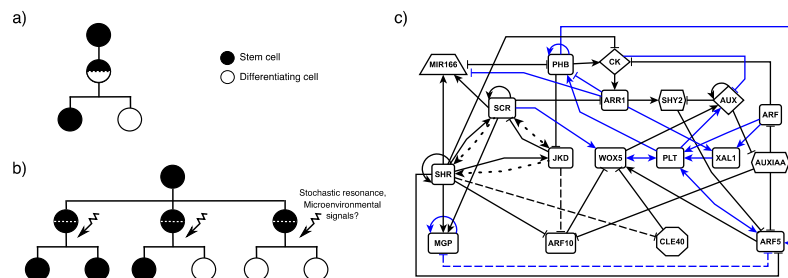


Figure 1. Models of SC asymmetric division: (a) SC divisions are invariably asymmetric, or (b) SC divisions are uncoupled from cell differentiation, such that a division produces two identical cells that can later acquire different fates. In this latter scenario, asymmetry can exist at the population level (reviewed in Simons and Clevers, [2011]). (c) Regulatory network model of the root SCN⁵³. We updated the network and show the newly incorporated interactions (blue).

a reshaping of the attractor landscape. This reshaping could then facilitate the transition between two particular attractors (cell types or fates)^{39–41}. In the context of a SCN, these external signals may provide niche-dependent information and could explain the stereotypical differentiation patterns observed during SC divisions. Symmetric and asymmetric SC divisions could each be the result of the same multistable regulatory mechanism under different spatial conditions within the niche. In this article we hypothesize that a mechanism like this is behind the asymmetric divisions at the root stem cell niche (SCN) of *Arabidopsis thaliana* (“Arabidopsis” herein). We used a complex-systems approach to identify the signals that could be critical for the asymmetric SC divisions in the root SCN, and then studied the cell-fate decisions during SC divisions as a dynamic process resulting from the feedback between the intracellular regulatory network underlying cell fate and an extracellular signal that reshapes the attractor landscape, and hence, cell fate.

The root SCN consists of the quiescent centre (QC) cells and the surrounding initials (Fig. 2a). The QC is the organizer centre of the niche from which short-range signals are produced; these signals maintain the initial cells in an undifferentiated state^{27,34}. The initial cells divide asymmetrically, and, depending on their location relative to the QC cells, each type generates progeny committed to assuming the identity of a specific tissue⁴². The QC cells rarely divide in optimal growth conditions at 5 dpg (days post-germination)⁴³, making it experimentally challenging to analyse what types of initial cells it is capable of producing^{44–46}. Some studies have addressed the mechanisms that regulate the timing of the division of the QC cells^{46,47}, but the mechanisms underlying the cell-fate decisions during asymmetric divisions remain unknown. Clonal analyses have shown that the QC cells divide asymmetrically, with one daughter cell renewing the QC while the other becoming either a columella or a cortex/endodermis (CEI) initial cell^{46,48}. Indirect evidence suggests that pro-vascular initials can also be produced in rare occasions⁴⁹, but, by far, the most common fate is to produce columella initials⁴⁶. Nonetheless, it is not yet clear what is the underlying mechanism for this biased cellular pattern nor under which conditions the QC could produce the other types of initial cells.

Anticlinal QC cell divisions add cells to the existing cell layer surrounding the pro-vascular tissues, while periclinal divisions create new cell layers⁵⁰. QC cell divisions are mostly periclinal (examples can be found in^{45,46,51,52}). Temporal expression dynamics of cell identity markers suggest that every periclinal cell division yields two QC cells that, after several days, acquire different fates⁴⁶. It is reasonable to think that the spatial context in which the QC progeny is found after a periclinal division could be providing molecular cues that guide their posterior fate: to remain as a QC cell or to differentiate into one of the initial cells. To identify such signals we used an updated version of a published mathematical model of the gene regulatory network underlying cell fate decisions at the root SCN (Fig. 1c)⁵³. Using this model, we performed a decay-rate variation analysis⁴⁹ to theoretically predict the regulators that might be causing cell-fate transitions within the root SCN. Interestingly, our computational analysis predicted that variations in the activity of SHORTROOT (SHR) within the daughter cells of a QC cell division could explain the biased production of columella initials.

SHR—a GRAS transcriptional regulator—is a key regulator of both endodermal^{54,55} and QC cell fate specification³². The pro-vascular tissues are the only place in the root meristem where this regulator’s expression has been observed⁵⁵, and from which SHR’s protein moves through the symplast to the adjacent layer⁵⁶. Importantly, SHR is not expressed in the QC cells, but instead these cells receive it from the pro-vascular neighbouring tissues. To explore if the constrained SHR’s expression domain, SHR’s regulated mobility, and its feedback with the regulatory network could altogether explain the observed cell fate transitions after QC divisions, we developed a multi-scale model of the root tip. This model allowed us to follow the activity of the intracellular regulatory network in each simulated cell, and to couple cell networks via SHR movement. Interestingly, we found that, depending on the division axis of the QC (and how it constrains SHR availability), both symmetric and asymmetric divisions can take place in the simulation platform. We further used this multi-scale model and an experimental counterpart to study the fate of the QC cells and its progeny upon changes in the range of activity of SHR. Altogether, our model and its experimental validation show that the biased commitment to columella initials observed during

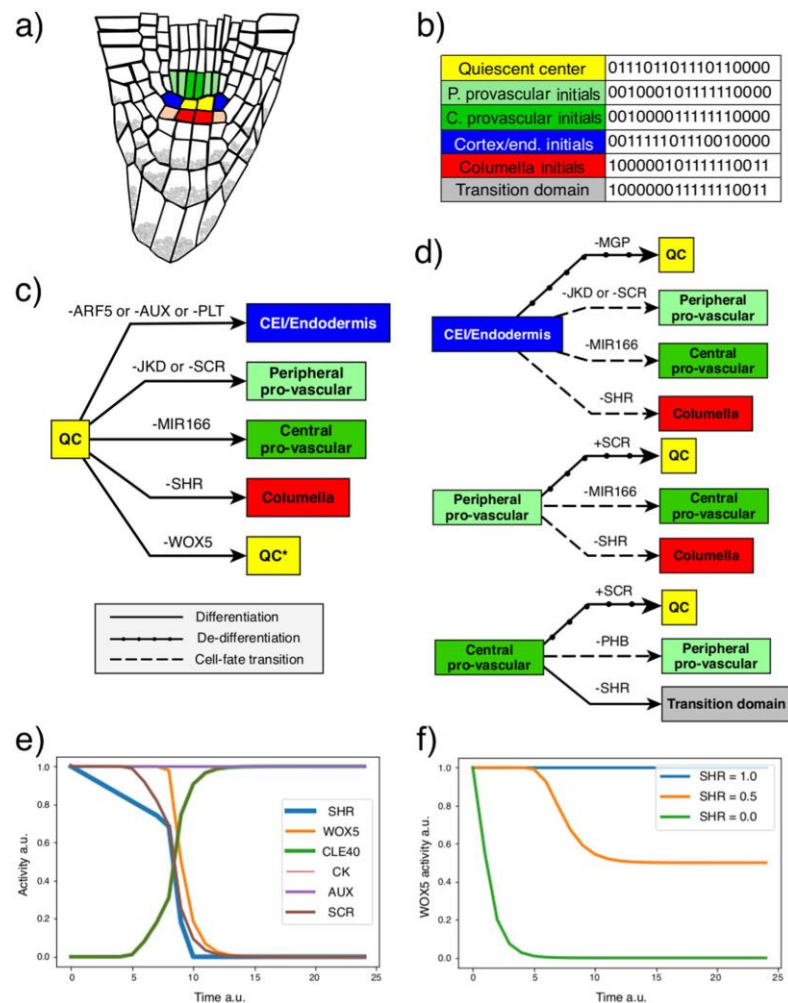


Figure 2. Attractor transitions caused by quantitative variations in the decay rate of the regulators of the network. **(a)** The root SCN consists of the QC cells (yellow) that are surrounded by the cortex/endodermis initials (blue), the pro-vascular initials (green, sub-differentiated into peripheral [P.] and central [C.]), the columella initials (red), and the lateral root cap/epidermis initials (orange). **(b)** We assumed constitutive auxin (AUX) activity. The attractors recovered by the regulatory network model with this condition correspond to the activity profiles of these root SCN cells, and a transition domain attractor that represent cells that exit the meristem and begin to differentiate. The activity of the regulators in the attractors are in the following order: CLE40, WOX5, SHR, SCR, MGP, JKD, MIR166, PHB, XAL1, PLT, ARF, ARF10, ARF5, AUX, AUX1A, SHY2, CK, and ARR1. **(c)** Transitions from the QC to the initial cells' attractors. The coloured boxes represent the attractors of the model, while the connecting arrows show the direction of attractor transitions. The regulators on each arrow indicate that its downregulation (−) causes the respective transition. **(d)** Transitions between the rest of the initial cells' attractors: the transition from the pro-vascular attractors to the QC attractor is caused, in this case, by the upregulation (+) of a regulator. **(e)** Temporal activity of cell-fate regulators in the transition from the QC to the columella initials attractor: SCR and WOX5 were used as markers of the QC cells, and CLE40 and CK as markers of columella initials cells. **(f)** WOX5 activity in the context of different activity levels of SHR. Time and activity are in arbitrary units (a.u.).

asymmetric divisions of the QC cells is the result of the dynamic feedback between the intracellular regulatory network, SHR intercellular movement, SHR intracellular levels, and the cell division plane. The results we present strongly support that the dynamics of SC division at the root SCN follow the population asymmetry model in which a regulatory feedback between signals of the microenvironment and the intracellular regulatory network drive cell fate decisions.

Results

Reshaping the attractor landscape of the root SCN regulatory network: SHR is key for the cell fate transition from QC to columella initials.

We first introduce the experimentally grounded regulatory network model (Fig. 1c)⁵³ that we will study. We previously developed a Boolean model of the regulatory network in the root meristem that integrates well characterized regulatory interactions between transcriptional regulators, and the auxin and cytokinin signaling pathways in the root meristem (the interactions can be found in⁵³). Based on an exhaustive literature review, we defined logical functions (one per regulator) that formalize experimental information about the regulation of each element of the network; the logical rules consider regulation at the transcriptional, post-transcriptional and protein activity levels. The logical functions are applied to all possible states of the system (2^n , where 2 is the two possible states of activity [active or inactive], and n is the number of modelled nodes) to find the state of the system in the next time step. By updating the state of the nodes with the logical rules iteratively, the system eventually converges at activity configurations that do not change anymore, known as attractors. The attractors satisfy the constraints imposed by the logical rules and the system will remain in those states, unless perturbed. The activity configuration of each attractor can be associated with that of different cell types of the experimental system under study, based on documented experimental activity patterns. For example, the Boolean model of the root meristem recovered attractors corresponding to different cell types along the meristem, including those at the root SCN⁵³. It is possible to transform the Boolean model to a system of ordinary differential equations to model the activity of the nodes as continuous variables. The continuous model recovers the same attractors as the Boolean network, and this is not dependant on the specific parameters used⁵³. The advantage of using a continuous version of the Boolean model is that it is possible to quantitatively vary the parameters and analyse the effect of those changes on the state of the system; namely, to analyse if those perturbations cause attractor transitions. The latter represent a transition from one cell type to another one.

We updated the regulatory network model we previously reported⁵³ with new experimental information (Supplementary Table S1); for instance, we included the role of XAL1 and PLT transcription factors (Fig. 1c). The updated regulatory network recovered attractors equivalent to those reported previously⁵³. In the present study we aimed to study the cell transitions at the root SCN, where auxin levels are high^{57,58}. Hence, we defined the node representing this hormone as constitutively active ($AUX = 1$). The regulatory network model with this condition recovered attractors representing the following cell types of the root SCN: QC, CEI/Endodermis, peripheral pro-vascular initials, central pro-vascular initials, and columella initials (Fig. 2b).

Then, we used the continuous version of the model and performed a decay rate variation analysis⁴⁹, in order to identify if individual regulators of the network could be mediating attractor transitions (Supplementary Tables C). To perform this analysis, we gradually increased the decay rate of each regulator and analysed the new attractor attained when initiating the system from any other particular attractor. If the activity of the nodes in the new attractor did not correspond to that of the original attractor, that meant that the decay rate alteration caused a transition from one attractor to another. Importantly, we varied the decay rates as a methodological strategy to identify candidates, but functionally their role is not limited to the regulation of their decay rate; instead the candidates could constitute positional information, or could be the targets of developmental, physical, chemical, or environmental cues regulating their expression or protein activity to influence the output of a SC division towards each one of the cell types within the niche. We performed this analysis and found several regulators which, when altered, were sufficient to cause a transition between the attractors of the regulatory network (Fig. 2).

First we will discuss the candidates that could be underlying the asymmetric divisions of the QC cells. We found that decreasing SHR activity caused a transition from the QC to the columella initial attractor; decreasing JACKDAW (JKD) or SCARECROW (SCR) causes a QC cell attractor transition to the peripheral pro-vascular initials attractor; decreasing microRNA165/6 (MIR166) causes a transition to the central pro-vascular initials attractor; and decreasing AUXIN RESPONSE FACTOR 5 (ARF5), PLETHORA (PLT), or AUX cause a transition to the CEI/Endodermis attractor (Fig. 2c). Notably, SHR is the only candidate regulator found through this analysis which alterations may yield a transition from the QC to the columella initials attractor (Fig. 2c), that is the most commonly observed cell transition from the QC cells⁴⁶. The model allowed us to monitor how the activity of other regulators of the network change as SHR levels decrease (Fig. 2e). This simulates how the network responds during this transition and shows that the candidate regulators predicted, in this case SHR, do not work in isolation, but instead in the context of a network of many interacting elements. We also considered how the QC attractor responded to arbitrary levels of SHR activity. We found that high levels of SHR maintained the QC attractor, intermediate levels of SHR produced a mixed QC-columella initials cell state, and low SHR activity yielded a columella initial cell state (Fig. 2f). Finally, we assessed if the reverse transition was possible; if increasing SHR activity could cause a transition from the columella initials to the QC attractor. We found that SHR activity was insufficient to cause the reverse attractor transition (Supplementary Fig. 3), indicating a directionality in the attractor transitions predicted by our decay-rate variation analysis when modifying SHR levels.

We also found candidate regulators that may be important for explaining the differentiation of QC cells into CEI⁴⁸. The transition from the QC to the CEI/Endodermis attractor is caused by network regulators related to auxin responses (Fig. 2c). This result agrees with the known role of auxin levels in defining the position of the QC in the cells of the layer adjacent to the pro-vasculature⁵⁷, which would otherwise acquire an endodermis fate. Our decay-rate variation analysis correctly predicted this known role of auxin as an important signal for the transition

of the QC cells to the endodermal initial cells. The downregulation of the predicted candidate regulators, namely *PLT*, *ARF5* and *AUX*, may be underlying the reported production of CEI during QC anticlinal cell divisions⁴⁸.

Through our analysis, we also identified regulators that cause transitions among the rest of the attractors (Fig. 2d). In some cases these transitions imply de-differentiation and cell fate transition events in the root meristem. For instance, we found that the CEI/Endodermis attractor transitions to the QC attractor when *MAGPIE* (*MGP*) activity decreases, implying the de-differentiation of these initial cells back to the multipotent QC cell state. We also found candidate regulators that can individually mediate the transition from the CEI/Endodermis attractor towards the peripheral and central pro-vascular initials attractors (Fig. 2d), but we did not find candidate regulators for the reverse transition. Clonal analysis had detected this cell fate transition event, and its directionality, as cell layer invasion events in the root meristem⁴⁹. In these events, clones starting in the endodermal or cortex cells divide periclinally, invading the inner tissues of the pro-vasculature. Based on our results, we argue that a downregulation of *MIR166*, *JKD*, or *SCR* activity could explain these experimentally observed cell fate transitions (Fig. 2d).

Some cell-fate transitions described experimentally were not recovered by the decay-rate variation analysis we performed. For example, the pro-vascular cells of the root meristem can regenerate the QC upon the excision of the root apex or upon the ablation of the original QC cells^{59–61}. This transition was not recovered by our analysis. It is possible that this cell fate transition is not mediated solely by the change in the activity of a single component of the regulatory network. Alternatively, this transition might be mediated by a more complex alteration derived from the ablation/excision experiments. Nonetheless, to identify some of the critical regulators that could be participating in this attractor transition, we explored the effect of simulating the ectopic activation of regulators that are typically inactive in the peripheral and central pro-vascular attractors (Supplementary Fig. 1). We found that *SCR* activity—normally not found in the pro-vascular cells of the meristem—is sufficient to cause the transition of the pro-vascular attractors to the QC attractor (Fig. 2d). This result predicts that the ectopic activity of *SCR* in the pro-vascular cells could be critical for QC regeneration; it would allow *SHR* to positively regulate its targets in these cells during the extraordinary conditions posed by regeneration.

Overall, our model identified critical regulators of the regulatory network as candidates that may induce cell state transitions in the root SCN. Some of these transitions have been previously observed but no candidate regulators had been suggested to explain them. The predictions of this analysis could inform future experiments to mechanistically explain these cell-fate transitions events, where no underlying mechanism has been proposed. Regarding the QC asymmetric cell division, we predicted regulators that can cause the transition from the QC attractor to each of the initial cells attractors, posing them as potential regulators of QC asymmetric divisions. Particularly, decreasing *SHR* activity triggers the experimentally described transition from the QC to the columella initials cell fate⁴⁶, suggesting that variations in *SHR* levels within the progeny of the QC could explain that—in contrast to other cell types—columella initials are preferentially produced by QC cell divisions.

Development of a multi-scale model of *SHR* intercellular transport and the dynamic regulatory network in the root stem cell niche.

To understand the mechanism involved in creating variations in *SHR* levels in the progeny of a QC cell, and possibly in the production of columella initials, we next considered the constraints of *SHR*'s expression pattern and protein mobility in the root SCN. *SHR* is expressed in the pro-vascular cells of the root meristem, and its protein is transported to the QC cells, the CEI, and endodermal cells⁵⁵. In this cell layer adjacent to the pro-vasculature, *SHR* forms protein complexes with *JKD* and *SCR* that localize to the cell nucleus, preventing *SHR*'s further intercellular movement^{62,63}. These protein complexes also promote the expression of *SCR*, *JKD*, and other genes^{54,62,64–66}, establishing a positive feedback loop. To study the coordinated role of *SHR* intercellular movement and the activity of the intracellular regulatory network in the dynamics of cell fate attainment in QC divisions, we developed a multi-scale model of the root SCN (Fig. 3). This multi-scale model simulates different cell types in the root SCN, how they exchange *SHR* through its regulated transport, and how they respond to changes in the intracellular levels of *SHR*. Importantly, each cell in the simulated cellularized domain has a regulatory network model that is coupled with the network of its neighbours through *SHR* transport, yielding a domain with a network of intracellular networks (Fig. 3a). The links that connect the regulatory network in each cell with the spatio-temporal information of *SHR* are explained below.

We used a static cellular configuration to model the cells of different cell types in the root SCN. The regulatory network model (Fig. 3a) of each cell was initialized into one of the following attractors: QC, CEI/Endodermis, central pro-vascular tissues, and columella initials (Fig. 3b). The state of the network in each cell was updated periodically throughout the simulation. We also included a continuous variable in each cell, SHR_m (the subscript *m* indicates that it models *SHR* movement), that can be exchanged between neighbouring cells periodically (Fig. 3a). These two cell properties, the intracellular regulatory network and the mobile variable SHR_m , are linked such that the state of the network constrains the site of production of SHR_m while the intracellular levels of SHR_m feedbacks on the activity of *SHR* in the network (Fig. 3a). This means that SHR_m will be produced only in the pro-vascular cells, and that the activity level of SHR_m in a cell defines if it regulates its targets of the regulatory network or not. Finally, the intercellular transport of SHR_m was modelled considering the restrictive role of *JKD* and *SCR*, such that if they are active in the network of a cell, its transport will be much lower than if these regulators are inactive. Hence, we put forward a multi-scale model as schematized in Fig. 3a.

The multi-scale model initially recovered the activity of SHR_m exclusively in the pro-vascular cells as these are the only cells that can produce it (Fig. 3c). Then, SHR_m was also found in the adjacent layer to the pro-vascular tissues, composed of the QC, the CEI and the endodermal cells. This activity pattern of SHR_m did not change through the simulation (Fig. 3c) and corresponds to what has been described experimentally. There are three main parameters in the multi-scale model: SHR_m transport, SHR_m synthesis rate, and SHR_m activity threshold. We found that the distribution pattern of SHR_m we described above is robust to changes in these model parameters (Methods), and does not depend on a specific set. Indeed, many different parameter sets can reach this

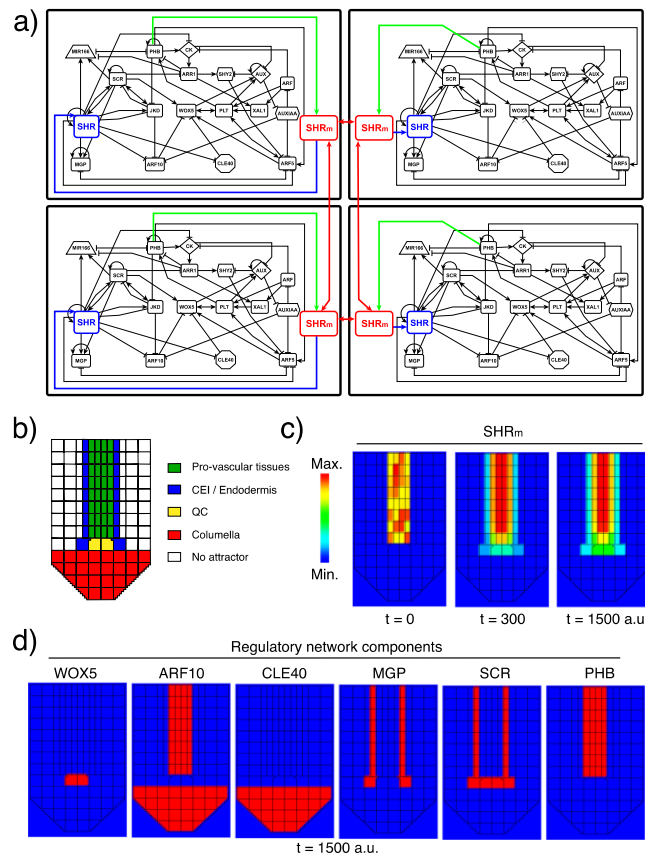


Figure 3. Multi-scale model of SHR intercellular transport in the root SCN. (a) Scheme of four cells of the multi-scale model, showing the links connecting the dynamics of their intracellular regulatory network through SHR_m intercellular movement. (b) Cellular configuration used as initial condition in the multi-scale model. The colours correspond to the attractor initialized in each cell. (c) Dynamics of SHR_m field formation: SHR_m is initially only present in the pro-vascular cells where its produced, while at $t = 1500$ a.u. it is also present in the layer adjacent to the pro-vascular cells, but no further. (d) Activity of six regulators of the regulatory network in the multicellular template. Time (t) is in arbitrary units (a.u.).

distribution (Supplementary Fig. 2). For the following simulations, we chose a parameter set that better describes the SHR's observed behaviour in the root meristem and that complies with transport ratios described previously⁶⁷. Importantly, the network's attractors in the cells remain as initialized throughout this simulation (Fig. 3d); this result was dependent on the modelled dynamics of SHR_m intercellular movement (Supplementary Fig. 2). Thus, the multi-scale model—that considers the coordinated role of the dynamics of SHR_m movement and the regulatory network—accurately depicts the activity pattern of SHR as observed in the Arabidopsis root SCN.

Then, we put forward a multi-scale model of the constraints of the interaction of polarizing signals from the niche microenvironment (SHR) and the underlying regulatory network.

SHR intercellular transport and the dynamics of the gene regulatory network guide the transition from QC to columella initials cell fate in the root SCN. We used the multi-scale modelling platform presented in the previous section to simulate the division of a QC cell (Fig. 4). We assumed that upon a QC cell division, both daughter cells inherit the state of the intracellular regulatory network in the QC attractor (supported by time-lapse experiments⁴⁶ and by the detection of equal levels of SHR_m in cell divisions of the adjacent CEI cells³⁵). Then, we followed the fate of the QC's progeny using the activity of the network's regulators

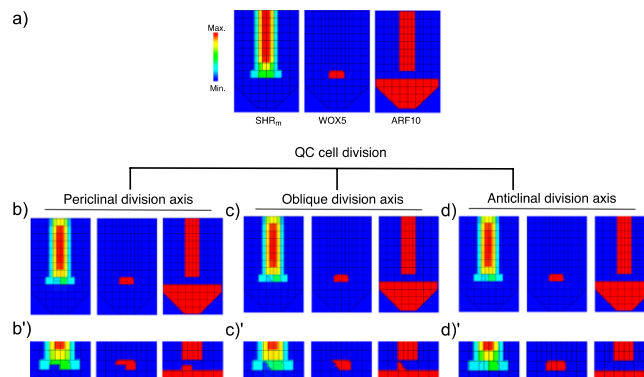


Figure 4. Simulation of a QC cell division in the multi-scale model. The activity pattern of SHR_m and the network regulators WOXS and ARF10 are shown (a) before the division, (b,c, and d) immediately after the division takes place, (b',c', and d') and some time after the division took place. (b) A periclinal division axis produces a shootward and a rootward daughter cell that gradually develop differences in SHR_m concentration and the states of their regulatory network: one cell remains at the QC attractor while the other shifts to the columella initial attractor. (c) The same pattern is observed for oblique divisions, where the division axis deviates from that of a periclinal or anticlinal pattern. (d) An anticlinal division axis produces two daughter cells that remain with high levels of SHR_m and in the QC attractor.

WOXS and ARF10 as markers of QC cell and the columella initial cell states, respectively. The division axis of the QC cells was chosen at random in 100 simulations, and the results were classified as periclinal (25), anticlinal (31) and oblique (44) division axes.

We noticed that the simulations of a periclinal and an oblique division axis produced one rootward and one shootward daughter cell, that at the moment of the division, were identical (Fig. 4b,c). However, as the simulations ran, these cells developed differences in their intracellular levels of SHR_m, and the rootward daughter cell transitioned to the columella initial attractor (Fig. 4b'). The dynamics recovered in the simulation of a QC periclinal division correlate with those reported experimentally⁴⁶. In these experiments, the daughter cells initially maintain the activity of a QC marker (Fig. 4b) and eventually develop differences in its activity. The model shows that this asymmetric differentiation happens because of the differential proximity of the daughter cells to the pro-vascular tissues. On the one hand, the shootward daughter cell, being in the immediate vicinity of the pro-vascular tissues, directly acquires and sequesters SHR_m, maintaining its intracellular regulatory network in the QC attractor. On the other hand, the rootward daughter cell is one cell away from the pro-vascular tissues, and therefore, does not receive such large amounts of SHR_m. In this latter case, the SHR_m levels inherited after the division gradually decay until the intracellular dynamic regulatory network of the rootward daughter cell transitions towards the columella initial cell-fate attractor. Importantly, the simulations suggest that the asymmetric QC divisions may not result from the divisions themselves, but rather from the interaction between the intracellular regulatory network and the cellular levels of SHR_m.

In contrast to the above situations, the simulation of an anticlinal QC division axis produced two daughter cells that remained in the QC attractor (Fig. 4c). This symmetric division occurred because the daughter cells are equidistantly located from the pro-vascular tissues and thus received SHR_m from the primary source of the root SCN. The high levels of SHR_m in the daughter cells allowed them to remain in the QC attractor in all simulations of an anticlinal division axis.

Overall, the results of these simulations provide a system-level mechanistic explanation to why, in a periclinal QC cell division (the most common pattern in Arabidopsis root apices), one of the daughter cells differentiates into columella initials (the most common cell type⁴⁶). Our multi-scale model simulations suggest that the same underlying systemic mechanism can yield both symmetric and asymmetric divisions, depending on the division axis of the QC cells, suggesting that QC cell divisions follow the population asymmetry model.

Increasing the intercellular range of SHR activity causes a shift from asymmetric to symmetric QC periclinal divisions: Computational and experimental evidence. Our computational simulations led us to propose that SHR availability is a limiting factor in the decision to generate symmetric or asymmetric divisions in the QC (Fig. 4). We then hypothesized that increasing SHR's activity range would have an impact on the fate of the daughter cells produced by QC periclinal divisions. There are several ways to increase SHR's activity range, for example, if SHR protein has a higher mobility range⁶⁸ or by expressing *SHR* in cells that typically do not express it⁶⁵. We explored both possibilities using computational simulations and present the results here together with experimental data to support our theoretical proposals.

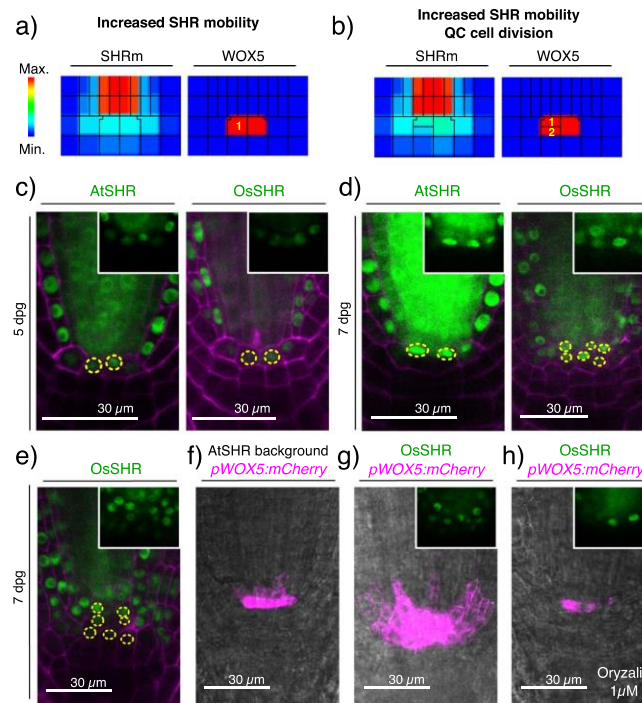


Figure 5. Analysis of SHR increased mobility range and its effect on the fate of the progeny of QC cell divisions. (a) The simulation of an increase in SHR_m transport rate causes an increased SHR_m activity domain, yet a single layer of QC cells is found below the pro-vascular cells (WOX5 as marker of the QC attractor). (b) The simulation of a periclinal division of a QC cell in this context results in the symmetric production of two cells with WOX5 activity. (c) Single layer of GFP nuclear activity in the QC position of 5 dpf AtSHR and OsSHR seedlings. (d) 7 dpf seedlings of AtSHR have a single layer of GFP nuclear activity, while most OsSHR seedlings have two or more (e). Analysis of $WOX5:mCherry$ (magenta) in 7 dpf WT and OsSHR seedlings: the expression of WOX5 is delimited to the QC cells in 7 dpf WT seedlings (f), while its expression is expanded to several cell layers in 7 dpf OsSHR seedlings (g). (h) 7 dpf OsSHR seedlings treated with oryzalin (1 μ M) for 6 hours have a single layer of nuclear GFP and WOX5 signal in the cells at the QC position. Overlay of GFP nuclear activity and propidium iodide counterstain (magenta) in (c), (d) and (e). All insets show the GFP signal from the respective SHR translational reporter.

The first way to increase the activity range of SHR is through increased protein mobility. We implemented this computationally by increasing the parameters related to SHR_m intercellular transport. In comparison to the WT simulation (Fig. 4a), the simulation of increased SHR_m transport resulted in higher SHR_m levels in several cell layers adjacent to the stele, which, in the context of the SCN, are the QC and columella initials cells (Fig. 5a). We noticed that despite the relatively higher levels of SHR_m past the stele, the *in silico* roots retained a single QC layer (one WOX5 + layer). This can be explained by the constraints of the regulatory network as SHR activity is not sufficient to cause an attractor transition from the columella initials towards the QC attractor (Supplementary Fig. 3c). This simulation then predicts that even if SHR levels are high in the columella initials, these will not become QC cells and there will be a single layer of QC cells. Then we simulated a QC periclinal division and found that, in this case, both daughter cells remain in the QC attractor (Fig. 5b). Therefore, a symmetric division took place. This simulation predicts that, in the context of increased SHR protein mobility, a QC periclinal division will yield two QC cells (Fig. 5b).

To assess these predictions experimentally, we used the $pSHR:OsSHR2:GFP$ (OsSHR) translational reporter that expresses a rice orthologue of SHR under the endogenous Arabidopsis promoter⁶⁸. It was previously shown that the OsSHR protein has more mobility than Arabidopsis' AtSHR-GFP⁶⁸, such that GFP signal was detected in up to 6 layers past the stele. This unique feature of OsSHR2 provided us with the opportunity to experimentally study the fate of the daughter cells produced by QC cell divisions in a condition of increased SHR transport. First, for comparison with our simulations, we aimed to establish a condition of infrequent and frequent QC cell

divisions in *OsSHR*, and *pSHR:AtSHR:GFP* (AtSHR) as a control. A recent report found that QC cell divisions are more frequent in older plants⁴⁵. Thus, we compared the frequency of QC periclinal cell division events in 5 and 7 dpw seedlings, and indeed we found that QC divisions were significantly more frequent in older seedlings in both lines (Supplementary Fig. 3). Having established conditions of infrequent and frequent QC cell divisions, we compared the number of QC cells in both lines. For this, we used the nuclear localization of GFP in the cells at the QC position as a marker. At 5 dpw, there was no significant difference in the number of cell layers with nuclear GFP between *OsSHR* and AtSHR as both lines exhibit a single layer (Fig. 5c). This is consistent with the computational simulations that show that even if SHR mobility increases, a single layer of QC cells will be found in the absence of cell divisions (Fig. 5a). In contrast, at 7 dpw the pattern between both lines was significantly different ($P = 0.02$; Supplementary Fig. 3); the *OsSHR* line had a higher frequency of multiple layers with nuclear GFP activity than the AtSHR line (Fig. 5d). Furthermore, some of the 7 dpw *OsSHR* seedlings had up to three layers of cells with nuclear GFP signal cells in the QC position (Fig. 5e), suggesting multiple rounds of QC periclinal divisions. This phenotype was never observed in AtSHR seedlings. The difference in the number of nuclear GFP layers in the QC position in both lines is consistent with the predictions from the simulations (Figs. 4b and 5b): in WT conditions, QC cell divisions will be asymmetric because not sufficient levels of SHR reach one of the daughter cells, whereas in the condition of increased SHR transport both daughter cells receive enough SHR to remain as QC cells.

To verify the identity of the additional nuclear GFP cell layers found in 7dgp OsSHR, we analysed the activity of *pWOX5:mCherry* in this line. *WOX5* is a gene that is expressed exclusively in the QC cells, and it is also a regulatory target of SHR³². Whereas *WOX5* expression is normally demarcated to a single layer of QC cells beneath the pro-vascular cells, even at 7dgp (Fig. 5f), we found multiple cell files with *WOX5* activity in OsSHR (Fig. 5g). This indicates that the additional cell layers have QC identity, and are likely the result of QC symmetric divisions. This result also shows that SHR is acting as a transcriptional regulator in the additional QC cell layers, as *WOX5* expression requires the activity of SHR³². Next, we aimed to show that the increased number of *WOX5* positive cells in OsSHR 7dgp seedlings is a consequence of the increased availability of SHR. To do this, we treated 7dgp OsSHR *pWOX5:mCherry* seedlings with the microtubule depolymerizing drug, oryzalin (1 μ M for 6 hours as in⁴⁹). Oryzalin has been shown to decrease SHR transport in the root meristem⁴⁹. Strikingly, we found that the number of cell layers with GFP and *WOX5* signal was dramatically reduced in 7dgp OsSHR *pWOX5:mCherry* seedlings treated with oryzalin (Fig. 5h; $n = 12$ oryzalin and $n = 24$ DMSO treated seedlings, *Pearson's Chi-square test with Yates' continuity correction, P -value = 0.008665). These results clearly indicate that the multiple cell layers with QC identity observed in OsSHR are indeed a consequence of the increased intercellular transport of SHR; and thus, when reduced, the supernumerary layers disappear. Altogether, this experimental evidence supports that an increased range of SHR activity, via augmented protein mobility, can cause a shift from asymmetric to symmetric QC divisions, expanding the pool of undifferentiated stem cells (Fig. 1b). This had already predicted this by the multi-scale model simulations (Fig. 5), and the experiments we present here confirm it.

Next, we explored the effect of ectopically expressing SHR in the QC cells, as an alternative strategy to increase the range of activity of SHR. This was previously explored with the *pSCR::SHR* line that expresses *SHR* in the QC, CEI and endodermal cells⁵⁵ (normally SHR is only expressed in the stele). The authors found activity of a QC marker in several cell layers between the stele and the root cap in the *pSCR::SHR* line⁵⁵. To understand the mechanistic basis underlying this phenotype with multiple QC layers, we used the multi-scale computational model to simulate the *pSCR::SHR* line. To do this we included the ectopic production of SHR_m in the cells with the regulatory network in an attractor showing SCR activity (QC, CEI and endodermis). This simulation reached a distribution pattern with relatively high SHR_m levels in the two cell layers beneath the pro-vascular tissues, corresponding to the QC and the columella initial cells, while WOX5 was found active only in the cells in direct contact with the pro-vascular cells (Supplementary Fig. 3). Next, we simulated a periclinal division of a QC cell, finding that—contrary to what happens in WT—both daughter cells remained in the QC attractor. According to our simulations, this shift from asymmetric (WT) to symmetric cell fates (*pSCR::SHR*) happened because in the latter case the daughter cells produce SHR_m themselves and do not depend on the pro-vascular tissues as a source of SHR_m (Supplementary Fig. 3). Therefore, the daughter cells maintain high intracellular SHR_m levels and their networks remain indefinitely in the QC attractor. Linking this result with the reported phenotype of the *pSCR::SHR* line, we hypothesize that multiple cycles of QC periclinal divisions are behind the multiple QC layer phenotype reported by Nakajima and collaborators⁵⁵. Thus, our computational simulations also provide a plausible systemic mechanistic explanation for the QC phenotype observed in the *pSCR::SHR* line.

These computational and experimental findings support our proposal that the feedback between the intracellular regulatory networks and the modulation of SHR's intercellular transport, underlies cell fate decisions during the periclinal division of the QC cells in the root SCN.

Non-equivalent QC cell state transitions in two experiments that affect the activity of QC-identity regulators. Next we aimed to assess the effects of reducing the range of activity of SHR. Recently it was shown that inhibiting SHR sympatric movement in the QC cells (with the *pWOX5:iscalsm3m* line) results in decreased SHR signal, and a reduction in the expression of *SCR* and *WOX5* in these cells³⁰. Intriguingly, these authors reported that the QC cells accumulated starch granules after the treatment, indicating that these cells differentiated into columella³⁰. This phenotype is difficult to interpret, as not even *wox5* mutants have such drastic phenotypic alterations in QC cell identity³². We propose that the contrasting phenotypes of these two genetic perturbations (*pWOX5:iscalsm3m* and *wox5*) are due to different alterations of the attractor landscape. To test this hypothesis and understand the system-level mechanistic basis underlying the phenotypes of these two genetic perturbations, we simulated both in our multi-scale model.

The simulation of the *pWOX5:icalsem3m* line was implemented by not allowing SHR_m movement between the pro-vascular and the QC cells. We found that the levels of SHR_m gradually decreased in the QC cells, and eventually, these were so low that they were unable to activate SHR targets in their intracellular regulatory networks (Fig. 6a).

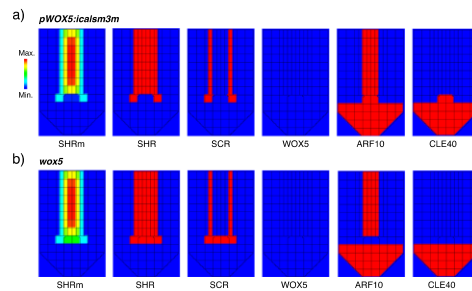


Figure 6. Simulation of two lines with contrasting QC cell identity defects. (a) Simulation of the *pWOX5:icalsm3m* inducible line. The inhibition of symplastic transport in the QC limits SHR_m movement and excludes it from these cells. The loss of SHR_m triggers a transition of the intracellular regulatory network from the QC to the columella attractor. (b) Simulation of the *wox5* mutant. In this mutant, the distribution of SHR_m is unaffected and the QC cells' network is in a QC-like attractor in which the activity of various QC-related genes is maintained (see SHR and SCR).

This lack of activities caused the QC cells to become columella. The result of this simulation suggests that in the *pWOX5:icalsm3m* line the QC cells become columella cells because of how it limits SHR transport and how that feeds into the dynamics of the intracellular regulatory network. It also suggests that the minimal regulatory network model we used⁵³ incorporates the key regulators to explain this intriguing phenotype. On the contrary, when we simulated the *wox5* mutant, we found that SHR_m 's distribution was unaffected (Fig. 6b). The difference found between the WT and the *wox5* mutant was the state of the intracellular regulatory network of the QC cells, that in the latter attains a QC-like attractor that has activity of SHR and SCR, but not of WOX5 (Fig. 2c). In agreement with this result, in the *wox5* mutant, the QC cell identity is compromised but not completely lost, as several QC identity markers are still expressed in the QC position²⁴. Although both the *pWOX5:icalsm3m* and the *wox5* simulations do not have activity of the QC-specific marker WOX5, these perturbations are not equivalent, particularly in the activity pattern of SHR (Fig. 6). Therefore, the simulation of these two genetic perturbations provides an explanation to their reported contrasting phenotypes (Fig. 5), revealing important differences in SHR spatio-temporal dynamics that explain the differences in the state of the QC cells. Such apparently paradoxical results may be explained by considering how spatial information (SHR) reshapes the attractor landscape of the root SCN regulatory network model towards different attractors.

These examples clearly illustrate the enormous explanatory potential inherent in systemic dynamical models of regulatory networks, that consider the concerted activity of different regulatory elements at different scales. Also, it further supports the critical role of SHR in the transition from the QC to columella cell state predicted by our computational analysis, but it does so in the context of complex regulatory networks coupled through SHR movement.

Discussion

Multipotent SCs self-renew and generate different cell lineages upon division. However, the mechanisms underlying the cell-fate decisions during SC divisions and the resulting SCN cellular patterns are not entirely understood. The root SCN is a useful model system to uncover the systemic regulatory mechanisms underlying cell fate. In the root SCN, the QC cells divide asymmetrically, with a preference towards yielding columella initials cells⁴⁶, but this biased cell-fate attainment pattern has not yet been explained. In the present study, we propose that this bias pattern can be explained by considering the constraints in the regulatory networks underlying cell fate decisions and signals from the root SCN microenvironment. To test this hypothesis, we used a dynamic gene regulatory network model that recovers attractors corresponding to the genetic activity configuration patterns of the cells of the root apical meristem, including those of the root SCN⁵³. To explore the attractor landscape that emerges from the network's interactions, we simulated perturbations of individual regulators to uncover the ones that can cause deterministic transitions among the system's attractors^{14,37,40}. Experimentally, this sort of analysis would require us to modulate the activity of each regulator in particular cell types of the root SCN and to monitor the cell-fate changes after each alteration, all of which is very time-consuming and challenging to achieve with the available tools. Alternatively, our computational analysis produced immediate hypotheses that can pose specific predictions and then inform future experiments, as the ones we present in this study. Although, many of the predictions of this analysis remain to be validated, the results we present here provide an overall system-level mechanistic framework to delimit the possible role of different network components in cell-fate transitions in the root SCN, and it thus constitute a valuable resource for the community.

The candidate regulators we identified through the decay-rate analysis (Fig. 2) can be interpreted as key regulators of differentiation, de-differentiation, and cell fate transition events at the root SCN and meristem. Importantly, the decay-rate analysis identifies the key regulators that could be targets of developmental, physical, chemical, and environmental cues to regulate the generation of certain initial cells in the root SCN. Regarding the transitions from the QC attractor to other fates, this analysis predicted regulators that can be important for

the production of each of the initial cell-types by these reserve of multipotent SCs in the root SCN (Fig. 2c). Remarkably, we found that SHR is the only regulator whose downregulation can cause the transition from the QC to the attractor corresponding to the columella initial cells. The fact that this is the only regulator we found is noteworthy given that QC cells receive SHR, a mobile protein, from pro-vascular neighbouring cells, and other regulators of the network tightly control SHR's movement. Therefore, SHR mobility could be informing QC cell-fate decisions within the niche.

To explore the role of SHR intercellular mobility in the asymmetric division of the QC cells, we developed a multi-scale model of the root SCN in which each simulated cell has an intracellular regulatory network linked to its neighbours' network through the movement of SHR. This model is a tool in which we assessed the concerted role of SHR's movement and the activity of the network in each cell, and with which we showed that the symmetry/asymmetry of QC cell divisions depends on the daughter cells' locations relative to the source of SHR in the meristem (pro-vascular tissues). If there is a differential proximity, there will be a gradual decrease in SHR levels in the cell that is not in contact with the SHR source (rootward cell) and its intracellular regulatory network will stabilize in the columella initials attractor. Our decay-rate variation analysis already predicted this critical role of SHR in the transition from the QC to the columella initials attractor, and the multi-scale model complemented and further supported this prediction by considering the spatiotemporal dynamics of SHR intercellular transport in the root SCN. Importantly, our results support that, in the root SCN, QC divisions are uncoupled from cell differentiation. In this case, two identical cells are produced and the asymmetry in the fate of the progeny emerges from the joint dynamics of the intracellular regulatory network, the intercellular movement of SHR, and the stereotypical division axis.

To further support the role of SHR as a key regulator of cell-fate decisions in QC asymmetric divisions, we combined computational and experimental approaches to test how SHR activity range may alter cell-fate dynamics. We analysed cell-fate patterns in a transgenic line with increased SHR protein mobility⁶⁸ and in a line with ectopic *SHR* expression⁶⁵. In both cases, there was an increased number of cell layers with QC cell characteristics⁶⁸ (Fig. 5 and Supplementary Fig. 3). Our computational simulations led us to propose that these phenotypes emerge due to QC periclinal cell divisions, in which both daughter cells remain as QC cells because of the increased availability of SHR (Fig. 5 and Supplementary Fig. 3). Indeed, we found that the multiple QC phenotype in the 7dpg OsSHR seedlings was reversed when we treated the plants with oryzalin (Fig. 5h), an inhibitor of SHR transport. We also explored the effect of decreasing the activity range of SHR. In this case, we found that QC cells differentiate into columella initials in the computational simulation (Fig. 6), which agrees with experimental observations⁷⁰. Thus, both experiments and simulations that perturb SHR's range of activity confirm the critical role of SHR in cell fate transitions from QC to columella initials.

Interestingly, the simulation of intermediate SHR levels in the regulatory network recovers an attractor with co-activity of QC and columella initials regulators (Fig. 2f). It has been reported that during the regeneration of the root meristem, the cells that eventually give rise to a new QC go through a phase where they have mixed QC-columella cell identity⁶¹. Remarkably, there is a correlation between the detection of this mixed QC-columella cell identity and the time it takes to restore SHR's nuclear pattern in the QC position⁶¹. This correlation suggests that SHR could be the signal underlying this mixed cell fate, and that the feedback between SHR levels and the regulatory network reported here might be relevant not only for QC cell divisions but also in the context of root regeneration.

In line with experimental observations, the multi-scale model did not recover the production of initial cell types other than the columella initials⁶⁶. Nevertheless, we predicted which candidate regulators' downregulation could yield such transitions (Fig. 2c). The simulation of an anticlinal division axis of a QC cell produced two cells that remain QC cells (Fig. 4b), but a recent report showed that, in fact, an anticlinal QC division yields a QC and a CEI cell⁴⁸. The decay-rate analysis we performed predicted that a decrease in the activity of *AUX*, *PLT*, or *ARF5* could cause the transition from the QC to the CEI (Fig. 2c). It is possible that the growth of the daughter cells produced by the QC anticlinal division would cause the mechanical displacement of one of the cells out of the QC position, giving rise to auxin variations that could cause a transition of one of them to the CEI/Endodermis attractor. In order to recover such patterns, future improvements of the multi-scale model should incorporate the mechanics of cellular growth, detailed cell geometry, and the dynamics of polar auxin transport. Future model extensions should also address the role of cell geometry, mechanical forces^{71,72}, auxin cellular concentrations⁷³, and global cellular connectivity⁷⁴ in the mechanisms that define the division axis of the QC cells or organizer cells in other SCN.

SCs are important for two critical processes in post-embryonic development: regeneration and differentiation. Through cell division, SCs regenerate themselves and also produce progeny that will differentiate and replenish functional tissues. SCs' invariantly asymmetric divisions are usually assumed to be the basis for these cells' long-term survival and the correct replacement of functional tissues. Nonetheless, recent lineage-tracing analyses have shown that asymmetry can also be achieved at the population level if SC divisions are uncoupled from cell differentiation^{4–10}. So far, this population asymmetry model has only been described in animal SCNs. Here, through a combined computational and experimental approach, we provide evidence of QC cells following a population-level asymmetry model in the root SCN. In this scenario, a QC division produces two identical QC cells and afterward, key regulators (SHR) signal the progeny's regulatory networks, in some cases yielding the cell-fate transition of one of the daughter cells. Indeed, symmetric and asymmetric QC cell divisions were recovered by our simulations (Figs. 4 and 5) by altering the range of activity of SHR and its availability to the QC daughter cells. Therefore, we propose that symmetric and asymmetric divisions can emerge from the same regulatory mechanisms at play in different spatial domains. This proposal implies that SCs do not follow a pre-established lineage program, but rather that their cell-fate decisions emerge from the interplay between their pre-existing cell state and the conditions of the microenvironment. The apparent regularity of the observed patterns depends upon

a robust mechanism, in which constraints in the direction of the division axis are also involved. We recognize that other regulators may play a role as well, and do not claim that the mechanism described here is complete.

Stereotypical patterns of cell-fate attainment have been observed in many SCNs and show a strong correlation between the SC division axis, the position of the progeny after a division, and their fate^{46,75–78}. Interestingly, these patterns suffer alterations upon deviations of the division axis in several systems^{77,79}, suggesting that the division axis influences how daughter cells will be affected by critical positional signals. The theoretical platform we present here provides the first system-level mechanism to study the contribution of the division axis and feedback between intra- and intercellular dynamics during fate decisions at a SCN. Our approach may be useful to decipher the complex mechanisms guiding SC cell fate dynamics in other SCNs. Indeed, systemic mechanisms similar to the one we presented here may be involved in both cell-fate attainment and morphogenetic patterning in other plant and animal SCNs. Thus, both the systemic mechanism and the modelling framework proposed in this study may become useful to further understand the mechanisms involved in plant and animal SCN cell patterning and replacement dynamics.

Methods

Regulatory network model. To study the mechanisms underlying cell fate transitions we used an extended and updated version of a Boolean network model that we previously proposed⁵³. This Boolean network integrates the role of key transcription factors, hormones, peptides, and other regulators of cell fate in the root meristem. Through an extensive literature review, the regulatory interactions between all the elements were identified and abstracted as a network of interacting elements. The activity of each element of the network is modeled as a Boolean variable, such that it can be active (1) or inactive (0). Logical rules, one per each element of the network, are proposed; these formalize the experimental evidence (with the logical operators AND, OR, and NOT) and takes as input the state of its regulators. The logical rules take the general form:

$$x_i(t+1) = F_i(x_1(t), \dots, x_k(t)) \quad (1)$$

where $x_i(t+1)$ is the state of node x_i at time $t+1$ and $x_1(t), \dots, x_k(t)$ are the states of its regulators a previous timestep. By applying the logical rules iteratively we can update the state of the network from all possible initial conditions ($2^{\wedge}$ number of nodes), until eventually the system reaches activity configurations that do not change anymore and are thus self-sustained. These are known as attractors and emerge due to the constraints considered in the model (namely, the logical rules that are based on experimental evidence). The attractors at which the system converges can be interpreted as the different cell types or fates of the biological system under study. In the case of the root SCN, the attractors recovered correspond to different cells of the niche including the QC, CEL, central and peripheral pro-vascular initials, and columella initials.

The Boolean network can be further extended to a continuous model in which the state of the nodes is no longer limited to 0 and 1, but can have any value between these range⁸⁰. In the continuous version of the model, the activity of each regulator is described by an ordinary differential equation (ODE) with the form:

$$\frac{dx_i}{dt} = \frac{-e^{0.5h} + e^{-hw_i}}{(1 - e^{0.5h})(1 + e^{-h(w_i - 0.5)})} - \gamma x_i \quad (2)$$

The first term in (2) describes the production of x_i with a sigmoidal function, and the second term describes its linear decay. The parameter h determines the strength of the interactions and controls if the activation curve of a node resembles a step function, a logistic function, or a straight line; γ is the decay rate. By default, the h and γ parameters are the same for all the elements of the network. Nevertheless, we show in Supplementary information D that the results reported in this paper do not depend on the particular value of h used. The w_i is the continuous form of the logical function of node i using fuzzy logic as in⁸⁰. Briefly, the logical operators OR, AND and NOT are substituted by a maximum function, minimum function, or a subtraction, respectively, as shown in the following examples:

Logical function	w function
$x_i(t) \text{ OR } x_j(t) \rightarrow$	$\text{MAX}(x_i(t), x_j(t))$
$x_i(t) \text{ AND } x_j(t) \rightarrow$	$\text{MIN}(x_i(t), x_j(t))$
$\text{NOT } x_i(t) \rightarrow$	$1 - x_i(t)$

The resulting w_i is then integrated into (2). For a more detailed description on Boolean models to model gene regulatory networks we recommend³⁶, and for more details on the root apical meristem regulatory network we recommend⁵³; the latter includes all the details of how the Boolean network model we used here was integrated from experimental data.

Decay-rate variation analysis of the continuous regulatory network model of the root SCN. To find the regulators (nodes) whose alterations are sufficient to cause transitions in the model's attractors, we performed a decay-rate variation analysis³⁹. For this analysis we used the continuous version of the dynamic regulatory network model underlying cell-fate decisions in the root SCN⁵³. First, we used as initial condition the activity configuration of one of the six attractors of the model. Then, we gradually increased the decay rate, γ^* , of one of the active regulators in that attractor, solved the system until the derivatives became smaller than a threshold⁸¹ (meaning it reached a steady state), and added the value of all the regulators' activity (i.e. $\sum_{i=1}^N x_i$). This sum was plotted for each decay rate analysed for each initial attractor (Supplementary Tables C), and allowed us to visually assess if the increase in γ^* caused a sudden change in the network's behaviour. This suggest that an attractor

transition occurred (even when the initial and final attractor yield the same sum, a noticeable jump is seen) and shows the particular value of γ at which this transition may have happened.

We then analysed the activity configuration at which the system did not change anymore (final state). To associate a particular cell state to a final state, we compared the activity of each node to that of the attractors recovered by the intact model (Supplementary Tables S3). In some cases the final state was identical to one of the attractors and the association was straightforward. In other cases, the activity of one or more nodes did not match the original attractors; in such cases, as long as the cell-fate regulators had the correct activity patterns, we associated the final state to that attractor. These latter cases are clearly indicated in Supplementary Tables C and D (with bold lettering and asterisks). The decay-rate analysis was performed in the R programming environment with a code that systematically changes the decay rate of every active node for every attractor of the system, and retrieves the output plots (Supplementary Tables C).

Multi-scale model of the SHR transport and intracellular regulatory network in the root SCN.

We used the software CompuCell3D⁸² to propose a multi-scale model of the root SCN. CompuCell3D is a lattice-based computational framework that models individual cells as a collection of positions in a grid. In our simulations, the position of each cell is fixed. Cells act as cellular automata that can communicate with its neighbors according to a series of interaction rules. As an initial condition, we used a cellular configuration resembling the cell distribution in the Arabidopsis root SCN (Fig. 3b); here volumes are merely illustrative. Each of the cells has two important features: A Boolean model and an SHR_m variable. The Boolean model was initialized in the attractor corresponding to the cell type observed in the position of the QC, the Endodermis, the pro-vascular and columella cells. The network we used does not describe the activity configuration of the epidermis or the cortex cells of the root meristem⁵³ and therefore, the network dynamics were not modelled in these cells. The SHR_m continuous variable models SHR transport between neighbouring cells. The Boolean model and the SHR_m are connected according to the following rules:

$$\text{SHR}_m = \begin{cases} \text{if } \text{PHB}_{\text{GHRN}} = 1 & \text{synthesis}_{\text{SHR}_m} - \delta_{\text{SHR}_m} \text{SHR}_m \\ \text{else} & - \delta_{\text{SHR}_m} \text{SHR}_m \end{cases} \quad (3)$$

$$\text{SHR}_{\text{GHRN}} = \begin{cases} \text{if } \text{SHR}_m > \text{threshold} & \text{SHR}_{\text{GHRN}} = 1 \\ \text{else} & \text{SHR}_{\text{GHRN}} = 0 \end{cases} \quad (4)$$

$$D_{\text{SHR}_m} = \begin{cases} \text{if } \text{SCR}_{\text{GHRN}} = \text{JKD}_{\text{GHRN}} = 1 & D_{\text{SHR}_{m,1}} = d * (0.5) \\ \text{else} & D_{\text{SHR}_{m,0}} = d \end{cases} \quad (5)$$

The first rule (3) confines SHR_m production to the pro-vascular cells⁵⁴. The simulation evaluates, in each cell, if PHB is active in the regulatory network; if true, there will be SHR_m production and linear decay and if not, SHR_m will only decay linearly. The second rule (4) establishes an activity threshold that must be surpassed by the cellular level of SHR_m to activate SHR in the intracellular regulatory network, so that the transport dynamics feedback into the regulatory network. The third rule (5) models that the intercellular transport rate of SHR_m will depend on the state of the intracellular regulatory network, such that if SCR and JKD are active, the rate will be lower than if they are inactive. Recently, high-resolution microscopy imaging estimated that the diffusion of SHR from the endodermal cells is ~52% of the diffusion from the pro-vascular to the endodermal cells⁶⁷. This ratio was incorporated in rule (4). Importantly, the multi-scale model explicitly models the role of JKD and SCR in the regulation of SHR movement. Therefore, we did not consider this regulation in the regulatory network (compare network topologies in Figs. 1b and 3a).

A discretized Laplacian was used to model the intercellular movement of SHR_m . This operator takes into account that the amount of SHR_m a cell receives from neighbouring cells (N) depends on their cell-type (4) ($D_{\text{SHR}_{m,0}}$ or $D_{\text{SHR}_{m,1}}$) and that the amount of SHR_m sent to the neighbouring cells depends on its own cell type (D_{own}):

$$\text{SHR}_{m_{ij}}(t+1) = \text{SHR}_{m_{ij}}(t) + D_{\text{SHR}_{m,1}} \sum_n^{N^+} \text{SHR}_{m_n}(t) + D_{\text{SHR}_{m,0}} \sum_n^{N^{**}} \text{SHR}_{m_n}(t) - 4 D_{\text{own}} \text{SHR}_{m_{ij}}(t) \quad (6)$$

In (6), the symbol N^+ is used to indicate the neighbours that have SCR and JKD activity in their intracellular regulatory network while N^{**} is used to indicate the neighbours that do not. D_{own} is the intercellular transport rate depending on the cell type of the cell being updated (can be either $D_{\text{SHR}_{m,0}}$ or $D_{\text{SHR}_{m,1}}$). The intercellular transport rates are defined by rule (4).

A limitation of the modelling framework we used for this multi-scale analysis is that it does not consider the shape of the cells nor the cell growth that occurs after the QC cell division; both can potentially alter the number of neighbors of the daughter cells and their levels of SHR. To test the effect of different cell alignments in the differentiation dynamics upon QC divisions we used three cellular configurations in which the daughter cells have different sizes and neighbours after the division (Supplementary Fig. 4). We found that the same differentiation patterns reported in the main text were recovered by these different initial cell configurations, showing that the patterning dynamics described are robust to changes in the number of cell neighbours and the alignment of the daughter cells. This is because the source of SHR is the main constraint underlying the differentiation dynamics described in this study.

Parameter analysis of SHR_m transport in the multi-scale model. We performed a parameter analysis to test the robustness of the SHR_m distribution pattern to the quantitative parameters of the multi-scale model (SHR_m transport rates, SHR_m synthesis and SHR_m activity threshold). First, we varied the SHR_m transport rates, and then we varied the SHR_m synthesis and SHR_m activity threshold. In both cases, we analyzed 3,000 parameter sets and analysed the number of SHR_m + cell layers in the QC position (the cells below the pro-vascular cells with SHR_m levels higher than the SHR_m threshold).

In the first case, the SHR_m intercellular transport rates were varied within the range: 0.0001–0.01 a.u. (Supplementary Fig. 2). We chose a rate for the cells with SCR/JKD activity (QC, CEI, and Endodermis cells) and a different rate for the cells with no activity of these regulators (which we will refer as stele cells hereafter). We found zero SHR_m + cell layers when the transport from the stele cells was too low, a single SHR_m + cell layer when the transport from the QC/CEI/Endodermis cells was lower than the transport from the stele (as described for Arabidopsis roots⁶⁷), and two SHR_m + cell layers when both transport rates were high. Interestingly, we also found the one SHR_m + cell layer pattern in a parameter subdomain where the transport rate from the QC/CEI/Endodermis cells was higher than the transport from the stele cells, but only for very low values of this second rate. This pattern is observed because, even though the rate from the QC/CEI/Endodermis cells is high and could potentially transport SHR_m to the following tissue layers, these cells do not receive high amounts of SHR_m in the first place (Supplementary Fig. 2). Recently, high-resolution microscopy was used to estimate the diffusion rate of SHR from the stele and the endodermis⁶⁷. This study⁶⁷ found the transport from the endodermis to be 52% lower than the transport from the stele. To explore if this ratio between both rates could be related to the single SHR_m + cell layer distribution observed in Arabidopsis, we identified the simulations that have such proportion ($52\% \pm 2$, yellow asterisks in Supplementary Fig. 2). As can be observed in Supplementary Fig. 2, the simulations with transport rates that satisfy this ratio could have either a single or two SHR_m + cell layers in the QC position. Thus, the ratio between both transport rates does not guarantee the existence of a single SHR_m + cell layer pattern in the simulation platform. Instead, the pattern of SHR_m + cells emerges from the coupled SHR_m transport dynamics in cooperation with the rest of the parameters and dynamics considered in the multi-scale model.

Next, we varied both the rate of SHR_m synthesis (values within the range 50–5,000 a.u.) and the SHR_m activity threshold (1,000–100,000 a.u.) and evaluated the number of SHR_m + cell layers. In this case, we found a more linear pattern where the number of SHR_m + cell layers increased as the SHR_m synthesis rate increased, and the number of layers decreased as the SHR_m threshold increased (Supplementary Fig. 2).

Plant growth conditions and microscopy. The transgenic lines used in this study, *pSHR:AtSHR::GFP* (AtSHR throughout the text)⁵⁵, *pSHR:OsSHR2::GFP* (OsSHR)⁶⁸ and *WOX5::mCherry*, are in Arabidopsis Col-0 genetic background and were kindly shared by Joseph Dubrovsky, Kimberly Gallagher, and Ken Birnbaum, respectively. Seeds were sterilized in a 1 ml of 20% sodium hypochlorite and 0.02% Tween 20, stratified for two days in a 4°C dark room, and plated on a growth medium with 0.2X Murashige and Skoog (MS) salts, 1% Sucrose, 1% agar, and MES (pH 5.6). Seedlings were grown vertically at 22 °C in climate chambers in long day conditions (16 hours of light followed by eight hours of dark) for five and seven days. For confocal microscopy, roots were mounted in propidium iodide (PI, 50 µg/ml in MS 0.2X) and visualized using a Nikon Eclipse Ti-E confocal microscope. The images presented in this article correctly represent the original data.

Oryzalin treatment. Following the conditions reported previously⁶⁹, we transferred 7dpg seedlings to plates containing MS 0.2% agar with oryzalin at 1 µM in DMSO (dimethylsulfoxide) and observed in the confocal microscope 6 hours later. Controls were transferred to plates with the same amount of DMSO.

Received: 20 August 2019; Accepted: 23 December 2019;

Published online: 26 February 2020

References

- Morrison, S. J. & Spradling, A. C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* **132**, 598–611 (2008).
- Aichinger, E., Kornet, N., Friedrich, T. & Laux, T. Plant stem cell niches. *Annual review of plant biology* **63**, 615–636 (2012).
- Morrison, S. J. & Kimble, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**, 1068 (2006).
- Simons, B. D. & Clevers, H. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell* **145**, 851–862 (2011).
- Snippert, H. J. *et al.* Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* **143**, 134–144 (2010).
- Rompalas, P. *et al.* Spatiotemporal coordination of stem cell commitment during epidermal homeostasis. *Science* **352**, 1471–1474 (2016).
- Reilein, A. *et al.* Alternative direct stem cell derivatives defined by stem cell location and graded Wnt signalling. *Nature cell biology* **19**, 433 (2017).
- Basak, O. *et al.* Troy+ brain stem cells cycle through quiescence and regulate their number by sensing niche occupancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, E610–E619 (2018).
- Obernier, K. *et al.* Adult neurogenesis is sustained by symmetric self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* **22**, 221–234 (2018).
- Post, Y. & Clevers, H. Defining Adult Stem Cell Function at Its Simplest: The Ability to Replace Lost Cells through Mitosis. *Cell Stem Cell* **25**, 174–183 (2019).
- Pillitteri, L. J., Guo, X. & Dong, J. Asymmetric cell division in plants: mechanisms of symmetry breaking and cell fate determination. *Cellular and molecular life sciences* **73**, 4213–4229 (2016).
- Shao, W. & Dong, J. Polarity in plant asymmetric cell division: Division orientation and cell fate differentiation. *Developmental biology* **419**, 121–131 (2016).
- Benítez, M., Espinosa-Soto, C., Padilla-Longoria, P. & Alvarez-Buylla, E. R. Interlinked nonlinear subnetworks underlie the formation of robust cellular patterns in Arabidopsis epidermis: a dynamic spatial model. *BMC Systems Biology* **2**, 98 (2008).
- Alvarez-Buylla, E. R., Azpeitia, E., Barrio, R., Benítez, M. & Padilla-Longoria, P. From ABC genes to regulatory networks, epigenetic landscapes and flower morphogenesis: making biological sense of theoretical approaches. *In Seminars in cell & developmental biology* **21**, 108–117 (2010).

15. Fauré, A., Vreede, B. M., Sucena, É. & Chaouiya, C. A discrete model of *Drosophila* eggshell patterning reveals cell-autonomous and juxtafacial effects. *PLoS computational biology* **10**, e1003527, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003527> (2014).
16. Álvarez-Buylla, E. R., Dávila-Velázquez, J. & Martínez-García, J. C. Systems biology approaches to development beyond bioinformatics: nonlinear mechanistic models using plant systems. *BioScience* **66**, 371–383 (2016).
17. Lin, Y. T., Hufton, P. G., Lee, E. J. & Potoyan, D. A. A stochastic and dynamical view of pluripotency in mouse embryonic stem cells. *PLoS computational biology* **14**, e1006000, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006000> (2018).
18. Azpettia, E., Benítez, M., Vega, L., Villarreal, C. & Álvarez-Buylla, E. R. Single-cell and coupled GRN models of cell patterning in the *Arabidopsis thaliana* root stem cell niche. *BMC systems biology* **4**, 134, <https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-134> (2010).
19. Meineke, F. A., Potten, C. S. & Loeffler, M. Cell migration and organization in the intestinal crypt using a lattice-free model. *Cell proliferation* **34**, 253–266 (2001).
20. Roeder, I. & Glauche, I. Towards an understanding of lineage specification in hematopoietic stem cells: a mathematical model for the interaction of transcription factors GATA-1 and PU. 1. *Journal of theoretical biology* **241**, 852–865 (2006).
21. Gordon, S. P., Chickarmane, V. S., Ohno, C. & Meyerowitz, E. M. Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 16529–16534 (2009).
22. Kirouac, D. C. *et al.* Cell–cell interaction networks regulate blood stem and progenitor cell fate. *Molecular systems biology* **5**, 293, <https://doi.org/10.1038/msb.2009.49> (2009).
23. Van Leeuwen, I. M. *et al.* An integrative computational model for intestinal tissue renewal. *Cell proliferation* **42**, 617–636 (2009).
24. Greaves, R. B., Dietmann, S., Smith, A., Stepney, S. & Halley, J. D. A conceptual and computational framework for modelling and understanding the non-equilibrium gene regulatory networks of mouse embryonic stem cells. *PLoS computational biology* **13**, e1005713, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005713> (2017).
25. Brackston, R. D., Lakatos, E. & Stumpf, M. P. Transition state characteristics during cell differentiation. *PLoS computational biology* **14**, e1006405, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006405> (2018).
26. van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P. & Scheres, B. Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature* **378**, 62 (1995).
27. van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P. & Scheres, B. Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* **390**, 287 (1997).
28. Mayer, K. F. *et al.* Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**, 805–815 (1998).
29. Ohlstein, B., Kai, T., Decotto, E. & Spradling, A. The stem cell niche: theme and variations. *Current opinion in cell biology* **16**, 693–699 (2004).
30. Williams, L. & Fletcher, J. C. Stem cell regulation in the *Arabidopsis* shoot apical meristem. *Current opinion in plant biology* **8**, 582–586 (2005).
31. Scadden, D. T. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* **441**, 1075 (2006).
32. Sarkar, A. K. *et al.* Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**, 811 (2007).
33. Scheres, B. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 345 (2007).
34. Pi, L. *et al.* Organizer-derived WOX5 signal maintains root columella stem cells through chromatin-mediated repression of CDF4 expression. *Developmental cell* **33**, 576–588 (2015).
35. Pardo-Saganta, A. *et al.* Parent stem cells can serve as niches for their daughter cells. *Nature* **523**, 597 (2015).
36. Álvarez-Buylla, E. R. *et al.* Gene regulatory network models for plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 83–91 (2007).
37. Álvarez-Buylla, E. R. *et al.* Floral morphogenesis: stochastic explorations of a gene network epigenetic landscape. *PLOS One* **3**, e3626, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003626> (2008).
38. Villarreal, C., Padilla-Longoria, P. & Álvarez-Buylla, E. R. General theory of genotype to phenotype mapping: derivation of epigenetic landscapes from N-node complex gene regulatory networks. *Physical review letters* **109**, 118102, <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.109.118102> (2012).
39. Dávila-Velázquez, J., Villarreal, C. & Álvarez-Buylla, E. R. Reshaping the epigenetic landscape during early flower development: induction of attractor transitions by relative differences in gene decay rates. *BMC systems biology* **9**, 20, <https://doi.org/10.1186/s12918-015-0166-y> (2015a).
40. Dávila-Velázquez, J., Martínez-García, J. C. & Álvarez-Buylla, E. R. Modeling the epigenetic attractors landscape: toward a post-genomic mechanistic understanding of development. *Frontiers in genetics* **6**, 160, <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00160> (2015b).
41. Moris, N., Pina, C. & Arias, A. M. Transition states and cell fate decisions in epigenetic landscapes. *Nature Reviews Genetics* **17**, 693 (2016).
42. Dolan, L. *et al.* Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**, 71–84 (1993).
43. Timilsina, R., Kim, J. H., Nam, H. G. & Woo, H. R. Temporal changes in cell division rate and genotoxic stress tolerance in quiescent center cells of *Arabidopsis* primary root apical meristem. *Scientific reports* **9**, 3599, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40383-2> (2019).
44. Clowes, F. A. L. Nucleic acids in root apical meristems of *Zea*. *New Phytologist* **55**, 29–34 (1956).
45. Wachsmann, G., Heidstra, R. & Scheres, B. Distinct cell-autonomous functions of RETINOBLASTOMA-RELATED in *Arabidopsis* stem cells revealed by the Brother of Rainbow clonal analysis system. *The Plant Cell* **23**, 2581–2591 (2011).
46. Cruz-Ramírez, A. *et al.* A SCARECROW-RETINOBLASTOMA protein network controls protective quiescence in the *Arabidopsis* root stem cell organizer. *PLoS biology* **11**, e1001724, <https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-98> (2013).
47. Zhou, W. *et al.* A jasmonate signaling network activates root stem cells and promotes regeneration. *Cell* **177**, 942–956 (2019).
48. Rahni, R. & Birnbaum, K. D. Week-long imaging of cell divisions in the *Arabidopsis* root meristem. *Plant Methods* **15**, 30 (2019).
49. Kidner, C., Sundaresan, V., Roberts, K. & Dolan, L. Clonal analysis of the *Arabidopsis* root confirms that position, not lineage, determines cell fate. *Planta* **211**, 191–199 (2000).
50. Heidstra, R. & Sabatini, S. Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 301 (2014).
51. Chen, Q. *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor MYC2 directly represses PLETHORA expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **23**, 3335–3352 (2011).
52. Yu, Q. *et al.* Cell-fate specification in *Arabidopsis* roots requires coordinative action of lineage instruction and positional reprogramming. *Plant physiology* **175**, 816–827 (2017).
53. García-Gómez, M. L., Azpettia, E. & Álvarez-Buylla, E. R. A dynamic genetic-hormonal regulatory network model explains multiple cellular behaviors of the root apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS computational biology* **13**, e1005488, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005488> (2017).
54. Helariutta, Y. *et al.* The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* **101**, 555–567 (2000).
55. Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T. & Benfey, P. N. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* **413**, 307 (2001).
56. Váten, A. *et al.* Callose biosynthesis regulates symplastic trafficking during root development. *Developmental cell* **21**, 1144–1155 (2011).
57. Sabatini, S. *et al.* An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **99**, 463–472 (1999).
58. Petersson, S. V. *et al.* An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *The Plant Cell* **21**, 1659–1668 (2009).
59. Xu, J. *et al.* A molecular framework for plant regeneration. *Science* **311**, 385–388 (2006).
60. Sena, G., Wang, X., Liu, H. Y., Hothuis, H. & Birnbaum, K. D. Organ regeneration does not require a functional stem cell niche in plants. *Nature* **457**, 1150 (2009).
61. Efroni, I. *et al.* Root regeneration triggers an embryo-like sequence guided by hormonal interactions. *Cell* **165**, 1721–1733 (2016).

62. Cui, H. *et al.* An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science* **316**, 421–425 (2007).
63. Long, Y. *et al.* Arabidopsis BIRD zinc finger proteins jointly stabilize tissue boundaries by confining the cell fate regulator SHORT-ROOT and contributing to fate specification. *The Plant Cell* **27**, 1185–1199 (2015).
64. Levesque, M. P. *et al.* Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in Arabidopsis. *PLoS biology* **4**, e143, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040143> (2006).
65. Welch, D. *et al.* Arabidopsis JACKDAW and MAGPIE zinc finger proteins delimit asymmetric cell division and stabilize tissue boundaries by restricting SHORT-ROOT action. *Genes & Development* **21**, 2196–2204 (2007).
66. Hirano, Y. *et al.* Structure of the SHR-SCR heterodimer bound to the BIRD/IDD transcriptional factor JKD. *Nature plants* **3**, 17010 (2017).
67. Clark, N. M. *et al.* Tracking transcription factor mobility and interaction in Arabidopsis roots with fluorescence correlation spectroscopy. *Elife* **5**, e14770, <https://doi.org/10.7554/eLife.14770.001> (2016).
68. Wu, S. *et al.* A plausible mechanism, based upon Short-Root movement, for regulating the number of cortex cell layers in roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 16184–16189 (2014).
69. Wu, S. & Gallagher, K. L. Intact microtubules are required for the intercellular movement of the SHORT-ROOT transcription factor. *The Plant Journal* **74**, 148–159 (2013).
70. Liu, Y. *et al.* Symplastic communication spatially directs local auxin biosynthesis to maintain root stem cell niche in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 4005–4010 (2017).
71. Louveaux, M., Julien, J. D., Mirabet, V., Boudaoud, A. & Hamant, O. Cell division plane orientation based on tensile stress in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, E4294–E4303 (2016).
72. Chakraborty, B. *et al.* A plausible microtubule-based mechanism for cell division orientation in plant embryogenesis. *Current Biology* **28**, 3031–3043 (2018).
73. Yoshida, S. *et al.* Genetic control of plant development by overriding a geometric division rule. *Developmental cell* **29**, 75–87 (2014).
74. Jackson, M. D. *et al.* Global Topological Order Emerges through Local Mechanical Control of Cell Divisions in the Arabidopsis Shoot Apical Meristem. *Cell systems* **8**, 53–65 (2019).
75. Deng, W. & Lin, H. Spectrosomes and Fusomes Anchor Mitotic Spindles during Asymmetric Germ Cell Divisions and Facilitate the Formation of a Polarized Microtubule Array for Oocyte Specification in *Drosophila*. *Developmental biology* **189**, 79–94 (1997).
76. Scheres, B. & Benfey, P. N. Asymmetric cell division in plants. *Annual review of plant biology* **50**, 505–537 (1999).
77. Yamashita, Y. M., Jones, D. L. & Fuller, M. T. Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* **301**, 1547–1550 (2003).
78. Knoblich, J. A. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* **132**, 583–597 (2008).
79. Quyn, A. J. *et al.* Spindle orientation bias in gut epithelial stem cell compartments is lost in precancerous tissue. *Cell stem cell* **6**, 175–181 (2010).
80. Sanchez-Corrales, Y. E., Alvarez-Buylla, E. R. & Mendoza, L. The Arabidopsis thaliana flower organ specification gene regulatory network determines a robust differentiation process. *Journal of theoretical biology* **264**, 971–983 (2010).
81. Hindmarsh, A. C. ODEPACK, a systematized collection of ODE solvers. *Scientific computing*, 55–64 (1983).
82. Swat, M. H., *et al.* Multicell simulations of development and disease using the CompuCell3D simulation environment. *In Systems Biology* - Humana Press, 361–428 (2009).

Acknowledgements

We thank Diana Romo for her help with various logistical tasks, and Diana Belén Sánchez Rodríguez for technical support. This research was funded by CONACyT grant 240180, and UNAM-DGAPA-PAPIIT grants IN208517 and IN204217. We thank Dr. Ken Birnbaum and Dr. Kimberly Gallagher for sharing seeds for the experimental validation.

Author contributions

M.L.G.-G. and E.R.A.-B. conceptualized the study. M.L.G.-G. developed and analysed the computational models with E.R.A.-B's input. M.L.G.-G., A.G.-A., D.O.-A., B.G.-P. and M.de la P.S. designed the experiments. A.G.-A., D.O.-A. and B.G.-P. performed the experiments. E.R.A.-B. coordinated the research project. M.L.G.-G. and E.R.A.-B. wrote the manuscript, and all authors revised it and approve the final contents.

Competing interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60251-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to E.R.Á.-B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020