



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ANÁLISIS DEL DESARROLLO DE LA RAÍZ EN LA MUTANTE “*short lateral root*”
(s) DE *Arabidopsis thaliana*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

Biol. Héctor Hugo Torres Martínez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Joseph Dubrovsky

Departamento de Biología Molecular de Plantas (IBT-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Gladys Ileana Cassab López

Departamento de Biología Molecular de Plantas (IBT-UNAM)

Dr. Ángel Arturo Guevara García

Departamento de Biología Molecular de Plantas (IBT-UNAM)

Cuernavaca, Morelos. Enero, 2014



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.

INDICE.

RESÚMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
La raíz y el sistema radical.....	4
<i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo experimental.....	5
El desarrollo de raíces en <i>A. thaliana</i>	6
El papel de la auxina y la regulación genética en el meristemo apical de la raíz.....	9
Iniciación y morfogénesis de primordios de raíces laterales.....	13
Regulación de la maquinaria del ciclo celular durante el establecimiento del sistema radical.....	21
ANTECEDENTES.....	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS.....	25
METODOLOGÍA.....	26
Medio de cultivo <i>in vitro</i> y condiciones de crecimiento.....	26
Determinación de la dinámica de crecimiento de la RP.....	26
Preparaciones de raíces para análisis al microscopio.....	26
Análisis con microscopía de Contraste Diferencial de Interferencia (DIC).....	27
Determinación de la longitud celular promedio de células diferenciadas y de células en el dominio de transición de la RP.....	27
Determinación del tamaño del meristemo apical de la RP.....	27
Estimación de la tasa de producción celular en el meristemo apical de la RP.....	27
Estimación de la duración del ciclo celular en el meristemo apical de la RP.....	27
Estimación del número de ciclos celulares en el meristemo apical de la RP.....	28
Estimación de la densidad de PRL's.....	28
Estimación del Índice de iniciación de RL's.....	28
Análisis de la morfogénesis del PRL.....	28

Análisis del patrón de expresión del marcador de respuesta a auxina <i>pDR5::VENUS-N7</i>	29
Análisis molecular para la identificación del gen <i>SL</i>	29
RESULTADOS.....	30
Fenotipo de la mutante <i>sl</i>	30
Análisis del desarrollo de la raíz primaria.....	30
Análisis del desarrollo de raíces laterales.....	36
Identificación del gen <i>SL</i>	40
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	42
Desarrollo de la raíz primaria en la mutante <i>sl</i>	42
Desarrollo de primordios de raíces laterales en la mutante <i>sl</i>	49
Identificación molecular del gen <i>SL</i>	50
CONCLUSIONES.....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	53
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	66

RESUMEN.

Actualmente se conocen algunas vías de regulación genética que participan durante el desarrollo de la raíz primaria (RP) y de raíces laterales (RL's). Sin embargo, aún no está dilucidado como se regula de manera simultánea el establecimiento del sistema radical. Por tal motivo, en este trabajo se caracterizó el desarrollo de la RP y de primordios de raíces laterales (PRL's) en la mutante "*short lateral root*" (*sl*) de *Arabidopsis thaliana* afectada en el establecimiento del sistema radical. Esta mutante se seleccionó a partir de una población de más de 17,000 plantas M2 resultantes de la mutagénesis con Etil-Metano-Sulfonato (EMS). La mutante *sl* presenta un sistema radical bastante reducido, con una RP muy corta y menor número de RL's, en comparación al tipo silvestre (ecotipo *Landsberg erecta*, Ler). De manera particular, la RP de la mutante *sl* presenta una tasa de crecimiento bastante baja en comparación al tipo silvestre debido a problemas tanto de la elongación como de la proliferación celular. Sin embargo, principalmente, la proliferación celular se encuentra dramáticamente reducida y esta afectación está acompañada por un fuerte incremento en la duración del ciclo celular. Además el análisis del patrón de expresión del gen reportero de respuesta a auxina *pDR5::VENUS-N7* indica que la señalización por auxina no se encuentra afectada en la RP de esta mutante. En conjunto, estos datos indican que el gen *SL* participa durante el desarrollo de la RP a través de la regulación de la correcta progresión del ciclo celular en el meristemo apical y que, además, puede actuar independientemente de la señalización por auxina o que se encuentre río abajo de esta. Por otro lado, el análisis del desarrollo de RL's en esta mutante mostró que la iniciación está exacerbada mientras que, la morfogénesis de los PRL's se encuentra alterada en comparación al tipo silvestre. En contraste a la RP de esta mutante, el análisis del marcador *pDR5::VENUS-N7*, durante la morfogénesis de PRL's, reveló que la respuesta a auxina se encuentra disminuida en etapas tardías. Estos datos sugieren que el menor número de raíces laterales que se aprecian en la mutante *sl* se debe principalmente a afectaciones durante el proceso de morfogénesis de PRL's vinculadas con problemas en la señalización por auxina. En general, todas estas observaciones demuestran que el gen *SL* participa de manera compleja en el correcto desarrollo y establecimiento del sistema radical en *A. thaliana*.

INTRODUCCIÓN.

El desarrollo, en términos generales, puede ser considerado como la suma total de eventos o cambios que ocurren durante la elaboración progresiva del cuerpo de un organismo multicelular a lo largo de su ciclo de vida (Steeves y Sussex, 1989; Westhoff, *et al.*, 1998). Sin embargo, pueden encontrarse diferencias significativas en el desarrollo del plan del cuerpo básico entre organismos eucariontes pertenecientes a distintos reinos, como en el caso de plantas y animales. Durante la embriogénesis animal, el plan fundamental del cuerpo adulto es establecido de manera que todos los órganos y tejidos o la mayoría de ellos, están presentes en el embrión, al menos de una forma rudimentaria, es decir, que durante el desarrollo embrionario una versión casi completa pero en miniatura del adulto está presente, con un cierto número de extremidades y órganos; mientras que el desarrollo post-embrionario de los animales consiste en un mayor crecimiento y mantenimiento del sistema de órganos ya existente. Una diferencia fundamental en el desarrollo entre plantas y animales es que mientras los animales superiores tienen un número característico de órganos, las plantas tienen un número indeterminado de éstos (Steeves y Sussex, 1989; Howell, 1998; Westhoff *et al.*, 1998).

El desarrollo embrionario de las plantas resulta en una versión bastante simple del plan del cuerpo en comparación a una planta adulta, de modo que, en los embriones solamente se generan órganos rudimentarios y se establecen estructuras celulares conocidas como meristemos apicales. Durante el desarrollo post-embrionario, los órganos de las plantas adultas son formados a partir de los meristemos del brote (parte aérea de la planta) y de la raíz, los cuales permanecen activos a lo largo del ciclo de vida de las plantas. Específicamente, el meristemo apical del brote produce el sistema del brote que se expande por la formación continua de tejidos y órganos nuevos como hojas y flores, mientras que en el otro polo, el meristemo apical de la raíz participa en la formación del sistema radical el cual se ramifica por la continua generación de raíces laterales. La actividad de los meristemos apicales resulta en la producción de un cuerpo en continuo crecimiento llamado cuerpo primario de la planta. En algunos casos, dependiendo de la especie, existe un componente más de desarrollo que conduce al incremento de grosor del eje donde se encuentran los meristemos apicales, como consecuencia de la formación y actividad de meristemos adicionales, llamados meristemos laterales o secundarios que se generan post-embrionariamente y que en conjunto con los tejidos producidos por estos mismos, conforman el cuerpo secundario de la planta. Debido a que la formación de

órganos durante el desarrollo post-embriionario puede ocurrir continuamente, las plantas pueden adaptar su plan de cuerpo de acuerdo a los cambios que ocurren en su entorno (Steeves y Sussex, 1989; Howell, 1998; Westhoff *et al.*, 1998).

Hasta hoy en día todavía permanecen por ser dilucidados muchos de los mecanismos genéticos, celulares y moleculares que regulan el desarrollo post-embriionario de las plantas y en particular del sistema radical. Con base en esto y con la finalidad de contribuir al conocimiento de la biología del desarrollo de la raíz, este trabajo se enfocó en el análisis de una mutante de *Arabidopsis thaliana* que se encuentra afectada en el desarrollo del sistema radical.

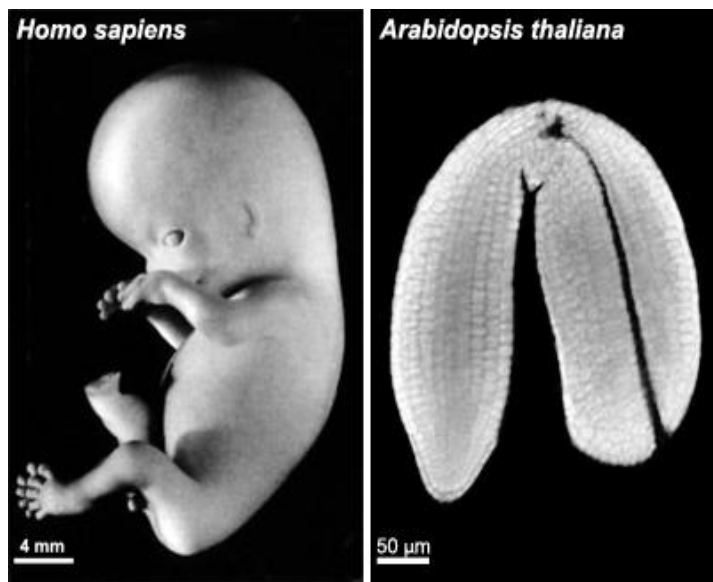


Fig. 1 Embriones de *Homo sapiens* (de 8 semanas post-fecundación) y de *Arabidopsis thaliana* (en una etapa tardía de desarrollo). Imagen de feto humano, modificada de Hill (2013) y del embrión de *A. thaliana*, modificada de Gilmor, S. *et al* (2005).

La raíz y el sistema radical.

La raíz es un órgano de suma importancia para la planta debido a las funciones que cumple. Entre estas funciones se encuentran el anclaje al suelo, la absorción de agua y nutrientes, así como el transporte de estos últimos a la parte aérea en donde, con ayuda de la fotosíntesis, se producen compuestos orgánicos, entre otros, necesarios para el desarrollo normal de la planta. La capacidad de una planta para obtener agua y nutrientes suficientes depende del desarrollo de un sistema radical extenso (Taiz y Zeiger, 2002). Se han reportado plantas que llegan a desarrollar un sistema radical con miles de metros de longitud total, teniendo un área superficial de varios cientos de metros cuadrados; incluso se ha determinado que este sistema radical extenso representa la mayor porción de la planta en comparación con la parte aérea (Dittmer, 1937).

Existen diferencias en la forma y arquitectura del sistema radical entre especies. Sin embargo, de manera general, en las plantas dicotiledóneas se desarrollan sistemas radicales conformados por una raíz primaria, como eje principal, desarrollada a partir de la radícula, y por raíces laterales que emergen de esa raíz primaria. Algunas especies también desarrollan raíces adventicias, que emergen a partir de cualquier otro órgano diferente a la raíz. Específicamente el desarrollo de este sistema radical depende de la actividad del meristemo apical de la raíz primaria y de la producción de nuevos meristemos apicales de raíces laterales o adventicias. Además, en el punto más distal de las raíces, se forma una estructura llamada cofia, que funciona principalmente para proteger al meristemo y produce una sustancia llamada mucílago, que permite la lubricación del suelo para la fácil penetración de la raíz a través de éste (Taiz y Zeiger, 2002).

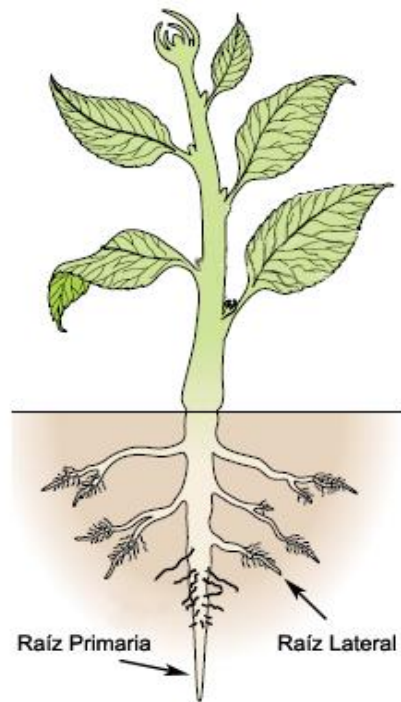


Fig. 2 Esquema del sistema radical de una planta dicotiledónea. Imagen modificada de Taiz y Zeiger, (2002).

***Arabidopsis thaliana* como modelo experimental.**

A. thaliana es una planta dicotiledónea (Angiosperma), perteneciente a la familia Brassicaceae. Se distribuye ampliamente en el hemisferio norte a través de Europa, Asia y Norte América. El ciclo de vida completo de las plantas de esta especie tiene una duración de 6 semanas aproximadamente, abarcando los procesos de germinación de la semilla, formación de una roseta, desarrollo de la inflorescencia y maduración de las primeras semillas. Como rasgos generales de esta especie, encontramos que las flores son de 2 mm de largo y tienen la capacidad de auto-polinizarse en cuanto el capullo se abre; éstas están compuestas de un verticilo externo con 4 sépalos verdes y un verticilo interno que contiene 4 pétalos blancos, 6 estambres y un gineceo central. Las semillas son de 0.5 mm de longitud en estado maduro y son producidas en frutos llamados silicuas. Estas plantas desarrollan rosetas con un diámetro de entre 2 y 10 cm y sus hojas

están cubiertas con pequeños pelos unicelulares conocidos como tricomas. El escapo cuenta con hojas caulinares, con un número reducido de tricomas y con yemas axilares que se desarrollan como inflorescencia secundaria. Las plantas adultas alcanzan una altura de entre 15 y 20 cm (Revisado en Meink, *et al.* 1998; Koornneef y Scheres, 2001).

En la biología de las plantas se ha utilizado a *A. thaliana* como modelo experimental debido a que presenta características que la hacen manipulable en condiciones de laboratorio. Como ya se mencionó anteriormente, tienen un ciclo de vida relativamente corto, un tamaño pequeño y una eficiente reproducción por autopolinización que resulta en una prolífica producción de semillas. Además, fue la primer planta modelo con su genoma completamente secuenciado, el cual tiene un tamaño de 130 megabases organizado en 5 cromosomas, lo que ha permitido hacer estudios de genética clásica y molecular así como el uso de ingeniería genética con ayuda de *Agrobacterium tumefaciens* (Revisado en Meink *et al.*, 1998; Curtis y Grossniklaus, 2007; Koornneef y Scheres, 2001; Koornneef y Meinke, 2010).

El desarrollo de raíces en *A. thaliana*.

Las raíces de *A. thaliana* son un modelo adecuado para el estudio de la biología del desarrollo de raíces en plantas, debido a que su estructura presenta ciertas características ventajosas sobre otras especies de plantas: presentan un linaje celular constante, tejidos relativamente transparentes y un tamaño pequeño que la hace manipulable para el análisis experimental en condiciones de laboratorio (Revisado en Scheres y Wolkenfelt, 1998; Van Norman y Benfey, 2009).

Características celulares del desarrollo de raíces.

Como resultado de la actividad meristemática post-germinación de la raíz primaria (RP) y post-emergencia de raíces laterales (RL's), a partir de la raíz parental, se establece un patrón específico de los diferentes tejidos que componen la raíz, así como las tres distintas zonas de desarrollo que se pueden encontrar en ella en un plano longitudinal (Fig. 3). En la posición más distal de la raíz se encuentra la zona meristemática o meristemo, en donde las células mantienen una actividad proliferativa que genera células hijas pequeñas con citoplasma denso y crecimiento lento. Además, esta misma zona puede subdividirse en dos dominios ocupados por dos poblaciones celulares con comportamiento diferente; en la posición distal se encuentra el dominio de proliferación

celular, con una población de células que se caracterizan por un crecimiento lento y una alta actividad proliferativa, mientras que en la posición proximal está el dominio de transición, cuya población de células mantiene un crecimiento lento con baja probabilidad de dividirse. En la zona subsiguiente al meristemo, en posición proximal con respecto a éste, se encuentra la zona de elongación, en donde las células que son desplazadas del meristemo apical (con dirección hacia la base de la raíz), comienzan un proceso de expansión longitudinal, incrementándose de 20 a 30 veces de la inicial. Por último, en una posición proximal con respecto a la zona de elongación, se encuentra la zona de diferenciación (o maduración), en donde las células ya están completamente elongadas y diferenciadas. Un rasgo morfológico de esta última zona es la presencia de pelos radicales desarrollados a partir de células epidérmicas (Dolan *et al.*, 1993; Ivanov y Dubrovsky, 2012) (Fig. 3a). Por otro lado, de manera transversal, en el meristemo apical de la raíz, se puede apreciar un patrón radial establecido por mono-capas concéntricas de los diferentes tejidos de la raíz. Del exterior al interior se pueden observar la epidermis, el córtex, la endodermis (estas últimas dos capas en conjunto se llaman tejido fundamental) y el cilindro central; este último, está rodeado por un tejido llamado periciclo (Dolan *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 2002) (fig. 3).

En el meristemo apical de la raíz (MAR) se encuentra un grupo de células que en conjunto forman el nicho de células troncales o iniciales, que dan origen a cada uno de los diferentes tejidos que conforman la raíz. Estas células a su vez, rodean un grupo de células conocidas como células del centro quiescente (CQ) que se caracterizan por presentar una tasa muy baja de división celular y que principalmente participan en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células iniciales y por tanto mantiene activo al MAR (Dolan *et al.*, 1993; Van den Berg *et al.*, 1997; Scheres *et al.* 2002) (fig. 3 b y c).

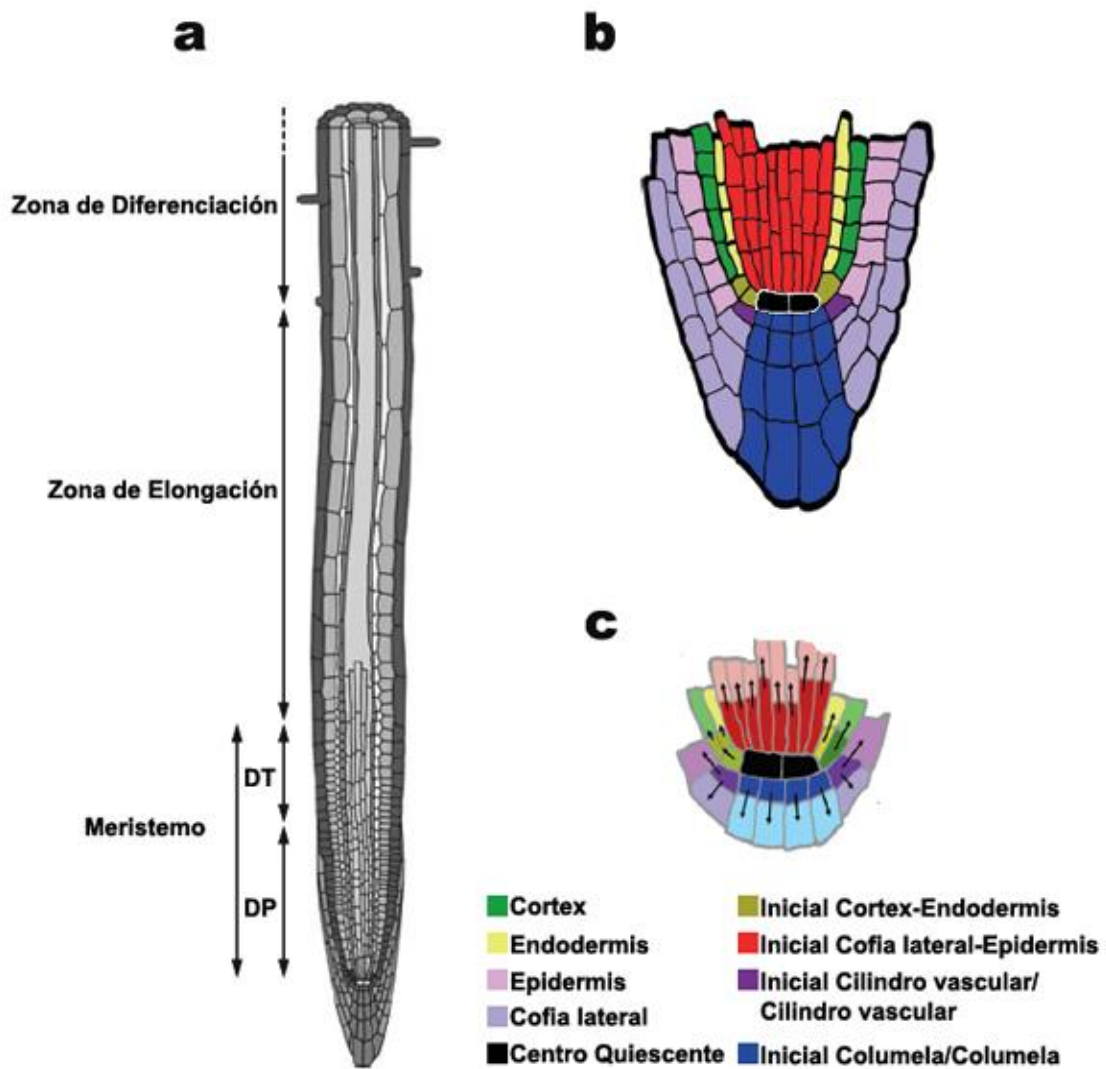


Fig. 3 Esquema de una raíz a nivel celular. **(a)** Zonas de desarrollo post-embriónico de la raíz, **(b)** meristemo apical de la raíz, **(c)** nicho de células troncales. Imágenes modificadas de Benfey, *et al* (2010) en **(a)**, y de Benett y Scheres (2010) en **(b)** y **(c)**. DP dominio de proliferación y DT dominio de transición.

El papel de la auxina y la regulación genética en el meristemo apical de la raíz.

Actualmente se sabe que el desarrollo, en general, de las plantas es regulado por la acción e interacción de diversas moléculas conocidas como hormonas o fitohormonas que participan en distintos procesos específicos del desarrollo de órganos incluyendo a la raíz. Dentro de estas hormonas, la auxina, específicamente Ácido indolacético (AIA), ha sido la más explorada en todos los niveles: síntesis, transporte y señalización. Debido a lo anterior, a esta hormona se le atribuye un papel fundamental en el desarrollo de plantas. El mecanismo de percepción y acción de la auxina se lleva cabo mediante complejas cascadas de señalización debido a la diversidad de proteínas que participan en cada paso de la vía. Cuando la concentración de auxina incrementa en el núcleo, ésta es percibida por el complejo receptor SCF^{TIR1} (complejo E3 ubiquitin-ligasa), el cual está conformado por 4 proteínas diferentes: RING BOX PROTEIN 1 (RBX1), S PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 1 (SKP1), CULLIN 1 (CUL1) y la proteína F-box TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1/AFB), de la cual existen 5 genes homólogos. La auxina específicamente se une a TIR1 y esto promueve el reconocimiento y la unión de todo el complejo SCF^{TIR1} con las proteínas represoras AUXIN/INDOL ACETIC ACID (Aux/IAA). Esta unión permite que el complejo SCF^{TIR1} marque y dirija a degradación a las proteínas Aux/IAA por medio del proteosoma 26S. Las proteínas Aux/IAA pertenecen a una familia de 29 miembros que en bajas concentraciones de auxina nuclear, reprimen constitutivamente a factores de transcripción de la familia AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF). Por lo tanto, la degradación de las proteínas Aux/IAA libera a los ARF y permite su función. Los factores de transcripción ARF forman parte de una familia de 23 miembros que una vez que se encuentran libres, se unen a “elementos en *cis* de respuesta a auxina” (TGTCTC), que se encuentran en los promotores de sus genes blanco y de esta manera regulan su expresión (Fig. 4) (Revisado en Teale *et al.*, 2006; Tanaka, *et al.* 2006; Benjamins y Scheres, 2008; Benková y Hejátko, 2009; Chapman y Estelle, 2009; Vanneste y Friml, 2009; Jung y McCouch, 2013; Ljung, 2013; Saini, *et al.* 2013; Sauer, *et al.* 2013; Sparks, *et al.* 2013). Se ha reportado que existe un gradiente de concentración de auxina en el ápice de la raíz, abarcando la región distal del MAR, con una máxima concentración de auxina en el CQ (Sabatini *et al.*, 1999; Petersson *et al.*, 2009); la generación y mantenimiento de este gradiente de concentración de auxina es necesario para la formación del patrón de la raíz, principalmente para la correcta especificación del destino celular, orientación del plano de división celular y crecimiento celular (Sabatini *et al.*, 1999).

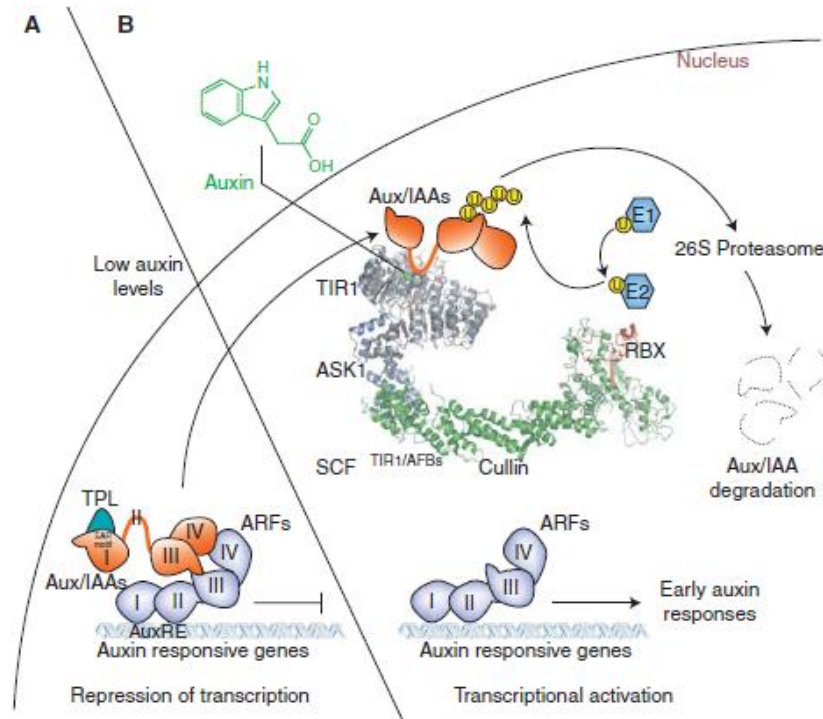


Fig. 4 Modelo de señalización por auxina. (A) Condiciones de niveles bajos de auxina nuclear y (B) condiciones con niveles altos de auxina nuclear. Imagen Calderon-Villalobos *et al.* (2002).

En relación a la señalización inducida por auxina y su papel en el MAR, se han identificado genes que son expresados en una manera dependiente de auxina. Los genes *PLETHORA (PLT)* codifican para una familia de factores de transcripción conocida como APETALA2/ETHYLENE RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEIN (AP2/EREBP). Las proteínas PLT son esenciales para la especificación del centro quiescente y el mantenimiento de la actividad de las células iniciales en el MAR. Existen diferentes proteínas PLT que actúan de manera redundante en los procesos antes mencionados, ya que en la doble mutante *plt1plt2* la actividad meristemática se agota y las células del MAR se diferencian debido a que no se mantiene la identidad de células del CQ (Aida *et al*, 2004). Como ya se mencionó anteriormente, los genes *PLT* se transcriben en respuesta a la acumulación de auxina y en estrecha dependencia de los factores de transcripción ARF; el patrón de expresión de los *PLT* se encuentra asociada con la respuesta máxima de auxina (Aida *et al*, 2004). Además, la distribución de las proteínas PLT muestra un patrón que correlaciona con la distribución de un gradiente de auxina, a lo largo del MAR, en donde su actividad es de manera dosis-dependiente. Niveles altos de actividad son requeridos para la determinación y mantenimiento de las células troncales, un nivel más bajo es requerido para el mantenimiento de la proliferación celular y, un nivel aún más

reducido, en posición proximal, promueve la salida del ciclo mitótico y diferenciación celular (Galinha *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha identificado la vía *SHORT ROOT-SCARECROW (SHR-SCR)*, que actúa de forma paralela a los genes *PLT* en la especificación del CQ y en el mantenimiento de las células troncales. Particularmente *SHR*, además de participar en el mantenimiento del nicho de células troncales, participa en la formación del patrón radial de la raíz, por medio de la especificación de la identidad de la endodermis, así como en la regulación de la división de las células precursoras de las iniciales de la estele y en la especificación de identidad celular tanto de las iniciales como de su progenie (Benfey *et al.*, 1993; Helariutta *et al.*, 2000; Levesque *et al.*, 2006). En la mutante *shr*, el nicho de células troncales no se mantiene y las células en el MAR se diferencian, lo que promueve que el crecimiento de la RP se detenga; el tejido fundamental solamente cuenta con una capa de tejido con identidad de cortex y hay un menor número de células iniciales en la estele con identidad celular perturbada, reduciendo tanto el número de filas celulares visibles como su grosor en una sección óptica media (Benfey *et al.*, 1993; Helariutta *et al.*, 2000). EL gen *SHR* codifica para un factor de transcripción que al igual que el producto de *SCR*, pertenece a la familia de factores de transcripción GRAS (Helariutta, *et al.* 2000). El producto proteínico de *SHR*, se transcribe y traduce en la estele, en donde éste actúa, pero también se mueve fuera de la estele a una sola capa de células adyacente, la endodermis, en donde entra al núcleo y promueve la transcripción de *SCR*. La activación de *SCR* es necesaria para que ocurran divisiones celulares asimétricas en las células iniciales de cortex/endodermis, que dará lugar a los dos tipos de tejidos (Nakajima *et al.*, 2001; Heidstra, 2004; Sena *et al.*, 2004), Además, se sabe que *SCR* es importante para limitar el movimiento de *SHR* a la endodermis (Heidstra, 2004; Sena *et al.*, 2004). Por un lado, la expresión de *SCR* en células del CQ, promueve la adquisición de identidad de este tipo celular y permite el mantenimiento de las células iniciales vecinas; de esta manera estableciendo el nicho de células troncales (Sabatini, *et al.* 2003). Por otro lado, *SCR* se expresa en células iniciales de cortex/endodermis y en el linaje de células de la endodermis, participando así, en la organización radial y generando linajes celulares separados de cortex y endodermis. La mutante *scr* no especifica el CQ y falla para mantener a las células iniciales, posteriormente la raíz detiene su crecimiento y las células en el MAR se diferencian; además esta mutante tiene una sola capa celular de tejido fundamental con atributos de cortex y endodermis. (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Sabatini *et al.*, 2003).

Con el fin de obtener una comprensión más amplia sobre el mecanismo de acción de la vía *SHR-SCR*, se han buscado los genes “blanco” de estos factores de transcripción. En este sentido, se ha reportado que SHR y SCR forman complejos proteínicos mediante dominios que permiten la interacción proteína-proteína y esto genera una interdependencia en la regulación de sus genes “blanco”. Dentro de los genes “blanco” directos de este complejo se encuentran los de factores de transcripción de tipo dedos de zinc C2H2, como *JACKDAW (JKD)*, *MAGPIE (MGP)* y *NUTCRACKER (NUC)*, además de otro que pertenece a la familia GRAS, llamado *SCR-LIKE3 (SCL3)*, así como el de una enzima metabólica que participa en la síntesis del alcaloide tropano TROPINONE REDUCTASE (*TRI*) y el de un receptor cinasa RECEPTOR-LIKE KINASE (RLK) (Levesque *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2007; Welch *et al.*, 2007). Estos descubrimientos sugieren que la vía de *SHR-SCR* no sólo amplifica su señal a través de la regulación de expresión de otros factores de transcripción, sino que también actúa directamente en la regulación de la expresión de enzimas que participan en vías metabólicas específicas y otras que participan en vías de señalización; de esta manera, regulando los procesos de desarrollo involucrados en el mantenimiento del nicho de células troncales y la formación del patrón radial de la raíz.

De manera más profunda, se ha estudiado el papel de los genes *JKD* y *MGP*. Por un lado, *JKD* es requerido para la especificación del centro quiescente y mantiene la actividad del nicho de células troncales. El transcrito de *JKD* se acumula en el CQ, en las células troncales del tejido fundamental y en menor grado, en las células del cortex y endodermis maduros. Mientras que el transcrito de *MGP* se acumula principalmente en células iniciales del tejido fundamental pero no en el CQ. Dentro de las funciones que se le atribuyen a *JKD* relacionadas con las de la vía *SHR-SCR*, es que promueve y mantiene la expresión de *SCR* y por tanto, la localización nuclear de SHR, de esta forma evitando divisiones celulares asimétricas supernumerarias y regulando la especificación del tipo celular endodermal. Además, se ha observado que *JKD* y *MGP* interactúan físicamente con SHR y SCR, sugiriendo que los cuatro pueden formar parte de un complejo nuclear y así amplificar la señal de la vía *SHR-SCR* (Welch *et al.*, 2007).

Otro módulo de regulación o vía de señalización que se ha descrito desempeñando un papel en el mantenimiento del nicho de células troncales, específicamente en el de células iniciales de la columela, es el módulo *CLE40-ACR4-WOX5*. El gen *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5)*, perteneciente a la familia de proteínas WOX, se

expresa en el CQ y es requerido para el mantenimiento de las células iniciales de la columela en una manera independiente de las células en donde éste se expresa, además, redundantemente con otros factores, contribuye al mantenimiento de las células troncales proximales (el resto de las células iniciales). En la mutante nula *wox5*, tanto las células en la posición del CQ como las células iniciales de la columela, tienen una forma y tamaño anormal en comparación a las del tipo silvestre. Adicionalmente, las células iniciales de la columela acumulan gránulos de almidón, característicos de células de la columela diferenciadas. Por otro lado, también se ha reportado que la expresión de *WOX5* depende de la actividad de la vía de *SHR-SCR* (Sarkar, *et al.* 2007). La señalización de *WOX5* promueve la adquisición de identidad y mantenimiento de células iniciales de la columela. Esta señal disminuye en dirección hacia la cofia debido a la expresión de *CLE40*, un miembro de la familia de proteínas CLE, que confina el dominio de expresión de *WOX5* al CQ por medio del receptor cinasa transmembranal *ARABIDOPSIS CRINCLY 4 (ACR4)*, miembro de la familia *CRINCLY 4*, que percibe su señal. De esta manera *CLE40* promueve la diferenciación y la especificación en las células hijas de las células iniciales de la columela, en una manera dependiente de dosis. En la mutante *cle40*, las raíces son más cortas y la diferenciación de las células iniciales hijas de la columela está retrasada, de manera que se puede observar un mayor número de capas celulares en un estado indiferenciado en la cofia (Stahl, *et al.* 2009).

Iniciación y morfogénesis de Primordios de Raíces Laterales.

Las raíces laterales (RL's) se desarrollan a partir de algunas células del periciclo adyacentes a las células del protoxilema en la zona de diferenciación de la raíz parental (Laskowski *et al.*, 1995; Malamy y Benfey, 1997; Dubrovsky *et al.*, 2000). Las células del periciclo continúan proliferando después de haber salido del MAR. Esta característica les permite mantenerse como células competentes para que puedan experimentar divisiones celulares formativas o divisiones celulares asimétricas, generando células hijas con diferentes destinos celulares y específicamente, en el desarrollo de raíces laterales, permite la iniciación y desarrollo de primordios de raíces laterales (PRL's) (Dubrovsky *et al.*, 2000; revisado en De Smet y Beeckman, 2011).

El proceso de iniciación del desarrollo de PRL's comienza cuando las células del periciclo adyacentes al protoxilema adquieren identidad de células fundadoras (Dubrovsky *et al.*, 2000). Estas células fundadoras son descritas como aquellas que adquieren un destino de

desarrollo diferente que el de su madre y por tanto, desempeñan un papel importante durante las primeras etapas del desarrollo de PRL's (Dubrovsky *et al.*, 2001).

Existen dos tipos de iniciación del PRL. Un tipo de iniciación es la longitudinal bi-celular, que consiste en divisiones anticlinales asimétricas de dos células vecinas en la misma fila del periciclo; mientras que el segundo tipo, longitudinal uni-celular, ocurre cuando solamente una sola célula del periciclo en plano longitudinal llega a ser célula fundadora y su progeñie da lugar a la formación del PRL. Además, también se sabe que en un plano transversal, el número mínimo de células fundadoras que comienzan el proceso de iniciación de desarrollo del PRL son tres, en filas celulares vecinas (Dubrovsky *et al.*, 2001). El proceso de iniciación se restringe a una ventana de desarrollo, manteniendo un patrón acropétalo (en dirección al ápice), que opera durante un tiempo relativamente corto en una zona distal de la RP (Dubrovsky, *et al.* 2006).

Una vez que la iniciación ha ocurrido, el desarrollo del PRL se lleva a cabo a través de siete etapas, con un patrón reproducible de divisiones celulares anticlinales y periclinales altamente ordenadas, características de cada una de las etapas precediendo la emergencia (Fig. 5). En las últimas etapas, la organización del PRL asemeja el ápice de la RP, de modo que la identidad de muchas células y/o tejidos pueden ser asignadas (Fig. 5). Por último, la emergencia del PRL y el crecimiento inicial de la RL ocurre principalmente por la elongación de las células basales, más que por la actividad meristemática. Después, el número de células en la punta de la RL comienza a incrementarse dramáticamente indicando que el meristemo apical de la RL empieza a ser activo a partir de esta etapa (Malamy y Benfey, 1997).

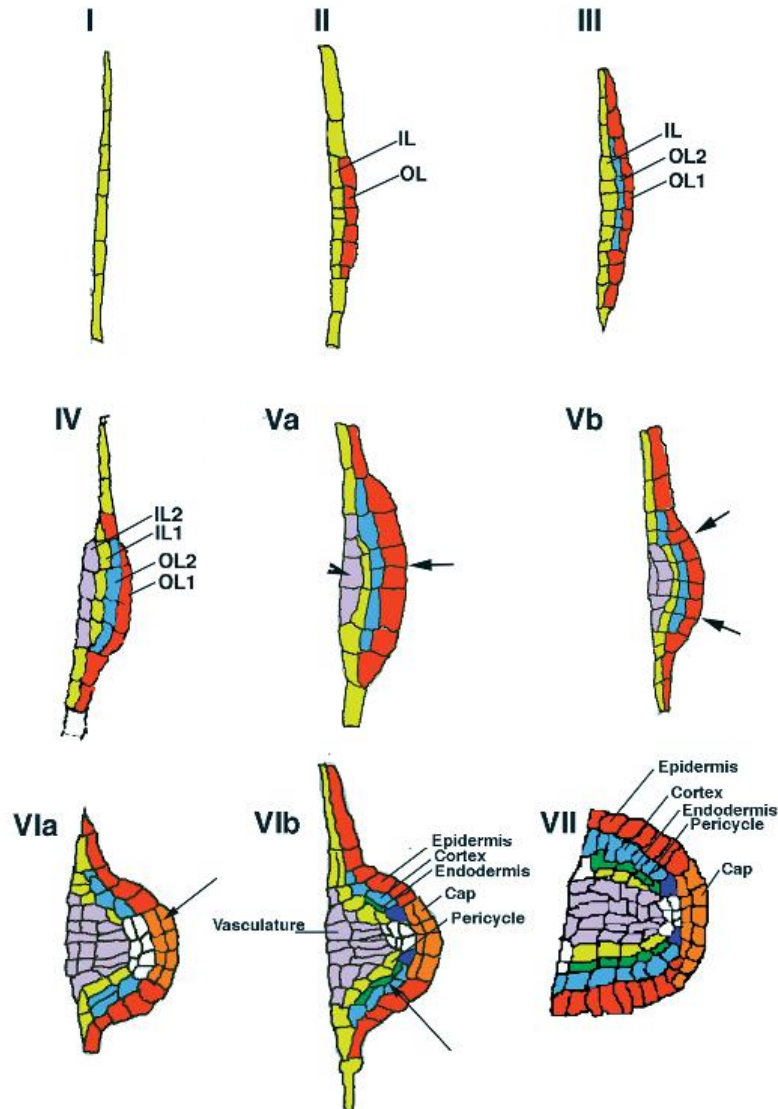


Fig. 5 Representación esquemática de las 7 etapas (I-VII) de desarrollo del primordio de la raíz lateral. "Vb" y "VIb" son etapas intermedias. El código de colores indica los diferentes tejidos que van a componer a la raíz lateral como se muestra en la etapa VII. Las flechas indican nuevos patrones de división celular. IL (capas interna), OL (Capa externa)

En términos de regulación molecular, se ha reportado que la acumulación local de la hormona auxina en células del periciclo de la raíz es necesaria y suficiente para especificar a estas células del periciclo como células fundadoras (Dubrovsky *et al.*, 2008). Además, se ha observado que existe un patrón de picos oscilatorios de la máxima respuesta a auxina entre el dominio de transición del MAR y el comienzo de la zona de elongación que actúa como "priming" o preparación de células del periciclo para el proceso de iniciación, debido a que este patrón oscilatorio correlaciona con la formación sucesiva de RL's (De Smet, *et al.* 2007). Por otro lado, Moreno-Risueno *et al.*, (2010)

reportaron que además del patrón oscilatorio de la máxima respuesta a auxina, existen conjuntos de genes que se expresan diferencialmente en fase y anti-fase con igual patrón oscilatorio en esta misma zona. Un primer conjunto de 2084 genes, oscilan en fase con la máxima respuesta a auxina y un segundo conjunto de 1409 genes, se expresan en anti-fase. Estos conjuntos de genes se expresan de manera independiente de auxina y presentan características de un reloj biológico necesario para la iniciación de RL's. Estos resultados en conjunto sugieren que las vías de señalización dependientes de auxina son importantes para la regulación del desarrollo de RL's y que también existen otros genes importantes que participan en este proceso, cuya expresión no está regulada por esta hormona.

Actualmente se han reportado algunos genes y módulos de señalización involucrados durante la iniciación y desarrollo de raíces laterales. El gen *ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION 4 (ALF4)*, es un gen específico de plantas que codifica para una proteína nuclear. Este gen principalmente, permite el mantenimiento de las células del periciclo en un estado competente para mitosis, necesario durante la iniciación de raíces laterales en una manera independiente de auxina, debido a que tratamientos con auxina no cambia la expresión de las fusiones traduccionales del gen *ALF4* con los marcadores β -glucoronidasa (GUS) y la proteína verde fluorescente (GFP) (DiDonato *et al.*, 2004). La mutación de *ALF4* bloquea el desarrollo temprano de raíces laterales. En la mutante *alf4*, las células del periciclo fallan en experimentar divisiones celulares, necesarias para la iniciación de PRL's, debido a que se bloquea o retrasa la progresión del ciclo celular en estas células (Celenza *et al.*, 1995; DiDonato *et al.*, 2004).

Como ya se mencionó, también se han identificado módulos de señalización en respuesta a auxina que participan en diferentes etapas de este mismo proceso organogénico. Existe un primer módulo de señalización por auxina que ocurre en una zona que abarca el dominio de transición del MAR y el comienzo de la zona de elongación de la raíz, conocido como la zona del meristemo basal, que correlaciona con la máxima respuesta a auxina localizada en esta misma zona reportada anteriormente. Este primer módulo involucra al represor IAA28 que en bajas concentraciones de auxina reprime la actividad de los factores de transcripción de respuesta a auxina ARF5, 6, 7, 8 y 19. La liberación y activación de estos factores en respuesta a auxina promueve la transcripción del gen *GATA23*. *GATA23* codifica para un factor de transcripción del tipo GATA y es reportado como el primer componente molecular en el proceso de especificación de células

fundadoras, en la zona del meristemo basal precediendo la iniciación del PRL (De Rybel *et al.*, 2010). Los factores de transcripción GATA son proteínas con dominios de unión a DNA de la clase IV de dedos de zinc (Reyes *et al.*, 2004). La expresión de *GATA23* es específica de la raíz y se limita a células del periciclo adyacentes al protoxilema. Esta expresión está confinada tanto a etapas tempranas del desarrollo del PRL, en etapas I y II principalmente, como también a algunas células del periciclo adyacentes al protoxilema, en una zona de diferenciación cercana a la zona del meristemo basal. Además, un análisis minucioso de la expresión de *GATA23*, mostró que ésta es importante para la migración sincronizada de núcleos a la pared celular en común entre las dos células contiguas del periciclo, en plano longitudinal, adyacentes al protoxilema, justo antes de la primera división celular asimétrica de la iniciación del PRL. Estos resultados sugieren que *GATA23* se expresa en estas células para regular la adquisición de identidad de células fundadoras *a priori* al proceso de iniciación. Por otro lado, mediante el análisis de una línea de RNA interferente para *GATA23*, se observó un decremento en el número de PRL's, principalmente en las etapas I y II, mientras que una línea sobre-expresora mostró un aumento en el número de PRL's en estas mismas etapas, apoyando la idea de la función esencial de *GATA23* en la especificación de células fundadoras (De Rybel *et al.*, 2010).

Un segundo módulo de señalización en respuesta a auxina actúa en una zona de diferenciación, aún más alejada al meristemo basal con respecto al módulo regulado por IAA28. Este segundo módulo es regulado por *SOLITARY-ROOT/IAA14 (SLR/IAA14)*, y es requerido tanto para la iniciación como para el desarrollo de etapas tempranas del PRL. La mutante de ganancia de función *slr* carece completamente de raíces laterales y el fenotipo no puede ser rescatado por auxina. Específicamente, esta mutación reprime parcialmente las divisiones anticlinales de la etapa I y completamente las divisiones periclinales de la etapa II en células del periciclo, durante la iniciación de raíces laterales (Fukaki *et al.*, 2002). Se ha reportado que *SLR/IAA14* participa en la señalización de auxina reprimiendo directamente las funciones de los factores de transcripción *ARF7* y *ARF19* (Fukaki *et al.*, 2005). *ARF7* y *ARF19* son activados en presencia de auxina y son requeridos para los procesos involucrados en primeras divisiones de las células fundadoras. Estos factores actúan redundantemente promoviendo la transcripción de sus genes "blanco" en este mismo módulo de señalización de auxina. Las mutantes sencillas (mono-génicas) *arf7* y *arf19* no presentan un fenotipo obvio, indicando la redundancia funcional entre las proteínas ARF. Sin embargo, la doble mutante *arf7arf19* tiene un

fenotipo bastante fuerte relacionado con el desarrollo de RL's. Esta doble mutante carece de RL's y además es poco sensible a auxina, ya que en presencia de auxina exógena llega a formar algunas RL's aunque menos que el tipo silvestre (Wt). Específicamente, en la doble mutante, la división celular del periciclo inducida por auxina está fuertemente inhibida. Río abajo de este módulo de señalización, ARF7 y ARF19 regulan la expresión de algunos miembros de la familia de factores de transcripción *LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN/ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE (LBD/ASL)*, que participan en el desarrollo de PRL's. Esta familia de 42 miembros es específica de plantas y sus miembros participan en la regulación del desarrollo de órganos laterales. Las proteínas LBD contienen un dominio LOB conservado, compuesto de un motivo C (cisteína) requerido para la unión a DNA, un residuo de glicina conservado y una secuencia "leucin-zipper-like" requerida para las interacciones proteína-proteína (revisado en Majer y Hochholdinger, 2011). ARF7 y ARF19 se unen directamente a elementos de respuesta a auxina en la región promotora de *LBD16/ASL18* y *LBD29/ASL16*, regulando su expresión inducida por auxina. *LBD16/ASL18* y *LBD29/ASL16* son expresados principalmente en la estele y en el PRL, en donde su dominio de expresión se traslapa con el de los genes *ARF7* y *ARF19*. La sobre-expresión de *LBD16/ASL18* y *LBD29/ASL16* induce la formación de RL's en la doble mutante *arf7arf19*. La mutante por inserción de T-DNA *lbd16* tiene un fenotipo similar al Wt, este fenotipo puede ser atribuido a la redundancia funcional entre los miembros de la familia *LBD/ASL* (Okushima *et al.*, 2005; Okushima *et al.*, 2007; Wilmoth *et al.*, 2005). Específicamente, *LBD16/ASL18* es expresado en células fundadoras, durante la migración nuclear de las células fundadoras y las subsecuentes divisiones celulares asimétricas, además funciona redundantemente con otras proteínas LBD inducibles por auxina durante la iniciación de PRL's. LBD16 y otras proteínas LBD's relacionadas actúan después de la especificación de las células fundadoras y su actividad es importante para la migración de los núcleos a la pared celular en común entre dos células fundadoras, además, promueven la asimetría de las primeras divisiones de las células fundadoras para la iniciación de PRL's. La expresión de *LBD16/ASL18* en células del periciclo del polo del xilema es suficiente para promover las divisiones celulares para la iniciación de RL's, en la doble mutante *arf7arf19*. Otros miembros de la familia *LBD/ASL* que se expresan en PRL's en respuesta a auxina son *LBD17/ASL15*, *LBD18/ASL20* y *LBD33/ASL24*. La triple mutante *lbd16lbd18lbd33* tiene un número aún más reducido de RL's en comparación de las mutantes sencillas, sugiriendo un papel redundante, al menos entre estos tres miembros. El análisis más profundo de esta triple

mutante indica que LBD16, 18 y 33 no sólo son necesarios para la iniciación sino también para el desarrollo y emergencia del PRL (Goh *et al.*, 2012). Por otro lado, la expresión de *LBD29/ASL16* tiene un efecto dosis-dependiente en la formación de PRL's. El nivel de expresión de este gen está correlacionado con la capacidad de las células del periciclo adyacentes al xilema para experimentar división celular. La mutante de pérdida de función *lbd29* forma menos RL's, mientras que la sobre-expresora de *LBD29/ASL16* forma más RL's, en comparación con el Wt. Los niveles de expresión de genes relacionados con el ciclo celular (*CYCD3*, *CYCD2*, *CYCD4*, *CDKA* Y *CYCB1*), se incrementaron por la sobre-expresión de *LBD29/ASL16* y disminuyeron en la mutante *lbd29*, en comparación con el Wt (Feng *et al.*, 2012). Como ya se mencionó, *LBD18/ASL20* se expresa fuertemente en PRL's y su sobre-expresión promueve la formación de PRL's, incluso, rescata la formación de RL's en la doble mutante *arf7arf19*, demostrando que LBD18 regula positivamente la inducción de RL's río abajo del módulo SLR/IAA14-ARF7-ARF19 (Lee *et al.* 2009). La proteína LBD18 se une específicamente al promotor del factor de transcripción que regula la iniciación del ciclo celular *E2Fa*, regulando positivamente su expresión y participando en la activación del ciclo celular durante la iniciación de RL's. La expresión de *E2Fa* en respuesta a auxina, es anulada por completo en la mutante *slr* en donde la iniciación de PRL's está bloqueada. Mutantes de inserción de T-DNA para *E2Fa* muestran una disminución en el número de PRL's principalmente en etapas tempranas I, II y III. Además, LBD33 interactúa con LBD18 y esta dimerización es necesaria para la activación de la transcripción de *E2Fa*. (Berckmans *et al.*, 2011). LBD18 también regula la expresión, por medio de la unión a un elemento específico en su promotor, de *EXPANSIN14 (EXP14)*. Este gen codifica para un factor de pérdida/remodelación de pared celular, promoviendo la emergencia de PRL's. LBD18 promueve la expresión de *EXP14* en el PRL y en tejidos que se traslapan con éste (endodermis, cotex y epidermis). En la mutante de pérdida de función *lbd18* se reduce la expresión de *EXP14*. La sobre-expresión de *EXP14* estimula la emergencia de PRL's pero no induce la iniciación de estos mismos, mientras que la mutante de pérdida de función *exp14*, presenta una menor formación de RL's inducidas por auxina (Lee *et al.*, 2013). Otro gen que se ha aislado y caracterizado participando en respuesta al módulo de señalización SLR/IAA14-ARF7-ARF19 es *PUCHI* (Kang *et al.*, 2013). Este gen codifica para un factor de transcripción de la familia AP2/EREBP que es requerido para establecer el patrón coordinado de divisiones celulares durante las diferentes etapas del desarrollo del PRL, pero no para el establecimiento y/o mantenimiento del meristemo apical de la RL. En la mutante de

pérdida de función *puchi*, el crecimiento y la morfología de la raíz primaria es normal; sin embargo, tiene RL's mucho más cortas en comparación al Wt, la región proximal de cada RL presenta un mayor grosor debido a la formación de capas de tejidos extras por incremento en número y tamaño de células en esta región a lo largo del eje apical-basal de la raíz parental. Este fenotipo de hiperplasia en la RL es consistente con aberraciones morfológicas encontradas en etapas tempranas del PRL por la ocurrencia de divisiones celulares extras. El análisis de los primordios reveló que en la mutante *puchi* se pueden observar diferencias a partir de las etapas II y III, con respecto al Wt. En estas etapas, la mutante forma más células en el eje radial debido a la ocurrencia divisiones anticlinales extras, aumentando el grosor en esta área en etapas posteriores del desarrollo del PRL (Hirota *et al.*, 2007). Un análisis genético reveló que *PUCHI* actúa sinérgicamente con *LBD16/ASL18* y *LBD18/ASL20* y que su expresión es regulada por *ARF7* y *ARF19* durante el desarrollo del PRL. La expresión de *PUCHI* en respuesta a auxina no se ve afectada en las mutantes sencillas *lbd16* y *lbd18* ni en la doble mutante *lbd16lbd18*; el mismo resultado se puede observar en la expresión de *LBD16/ASL18* y *LBD18/ASL20* en la mutante *puchi*. Sin embargo, la expresión de *PUCHI* en respuesta a auxina fue significativamente disminuida en las mutantes sencillas de *arf7* y *arf19* y completamente inhibida en la doble mutante *arf7arf19*. Además, el análisis de RL's en la doble y la triple mutante de pérdida de función de *PUCHI*, *LBD16/ASL18* y *LBD18/ASL20* mostró un fenotipo aditivo en la disminución del número de RL's y en la afección en la morfogénesis del PRL (Kang *et al.*, 2013).

Existe un tercer módulo que actúa de forma sucesiva y complementaria al módulo regulado por *SLR/IAA14-ARF7-ARF19*, regulando las etapas tempranas del desarrollo del PRL. Este módulo de señalización por auxina está controlado por el represor *BONDELOS/IAA12* y el factor de respuesta a auxina *MONOPTEROS/ARF5*, sin embargo aún no se han reportado genes que su expresión sea regulada por este módulo de señalización (De Smet *et al.*, 2009).

Por otro lado, también se ha descrito al gen *ARABIDOPSIS CRINKLY4 (ACR4)* regulado en respuesta a auxina y que codifica para un receptor tipo cinasa, miembro de la familia de genes *CRINCLY*. *ACR4* es un factor clave para promover las divisiones celulares asimétricas en células fundadoras y simultáneamente, limita el número de estas divisiones una vez que la organogénesis ha comenzado. También se ha observado que *ACR4* suprime las divisiones proliferativas en células del periciclo cercanas al PRL que no

participan durante este proceso organogénico, de este modo, evitando divisiones celulares extras. En la mutante de pérdida de función *acr4* hay un incremento significativo en el número total de eventos de iniciación de RL's pero una menor densidad de RL's emergidas, además existen PRL's muy cercanos uno de otro o fusionados, así como un alto porcentaje de PRL's en la misma posición en polos opuestos del xilema (De Smet *et al.*, 2008).

Regulación de la maquinaria del ciclo celular durante el establecimiento del sistema radical.

Los procesos del desarrollo de raíces como la proliferación celular en el MAR y la iniciación y morfogénesis del PRL, dependen de la estricta regulación de la maquinaria del ciclo celular y su progresión. Actualmente, se han identificado y descrito genes relacionados con la regulación de la maquinaria del ciclo celular y la importancia que estos tienen durante el desarrollo de raíces de las plantas, principalmente aquellos involucrados en el mantenimiento del MAR y el desarrollo de RL's (revisado en Kuijt y Schnittger, 2007).

El gen *HOBBIT* (*HBT*) se ha reportado como un gen esencial para la formación del MAR. El análisis de la mutante *hbt* mostró la presencia de un desarrollo anormal en la región embrionaria basal durante la embriogénesis, región que da lugar a la hipófisis y posteriormente a la formación del CQ y células iniciales de la columela. En etapas posteriores del desarrollo embrionario, el fenotipo consiste de un desarrollo aberrante en la región central adyacente a la región basal del embrión que dará lugar a las iniciales de los demás tejidos, incluyendo a la cofia lateral. Post-embriónariamente en la mutante *hbt*, las plántulas presentan un MAR no funcional y la cofia lateral no está especificada, por tanto, la actividad de *HBT* es esencial tanto para el desarrollo adecuado de la hipófisis durante la embriogénesis temprana y en etapas posteriores participa en la especificación de la cofia lateral y de un MAR mitóticamente activo (Willemsen *et al.*, 1998). Se ha reportado que *HBT* codifica para un gen homólogo de la subunidad CDC27 del complejo de promoción de anafase (APC), que post-embriónariamente regula la división y la expansión/diferenciación celular en los meristemas. En la mutante *hbt*, las células no se diferencian apropiadamente (Blilou *et al.*, 2002; Pérez-Pérez *et al.*, 2008; Serralbo *et al.*, 2006). El defecto en la diferenciación celular en la mutante *hbt* se debe a un decremento en los niveles de endorreducción (endociclo) (Pérez-Pérez *et al.*, 2008; Serralbo *et al.*, 2006), generando a su vez una inhibición en la expansión celular e irregularidades en su

forma debido a una alteración en la regulación de los microtúbulos corticales (Serralbo *et al.*, 2006).

Por otro lado, se han reportado dos proteínas llamadas SKP2A y SKP2B con un dominio F-box y repeticiones ricas en leucinas (LRR), similares en secuencia a la proteína humana SKP2, que forma parte del complejo de ligasa E3 que contiene Skp, Cullin, F-box (SCF) (del Pozo *et al.*, 2002). Se sabe que el complejo SCF participa en el control de la estabilidad de muchos reguladores del ciclo celular (revisado en del Pozo & Estelle, 2000). SKP2A forma parte del complejo SCF que tiene actividad de ubiquitin-ligasa E3 y cataliza la ubiquitinación de varias proteínas del ciclo celular para su degradación. SKP2A regula positivamente la división celular, en parte, por la degradación del represor de transcripción E2FC/DBP. Las plantas que sobre-expresan SKP2A presentan incremento en el número de células en G2/M, reducen el nivel de ploidía en las células y desarrollan un alto número de primordios de raíces laterales. SKP2A, a su vez, es degradado vía Ub/26S (ubiquitinación/proteosoma 26S) y su estabilidad es dependiente de auxina, regulando su degradación (Jurado *et al.*, 2008). Mientras que, SKP2B es una proteína que regula negativamente la progresión del ciclo celular, reprimiendo la división celular en el MAR y en las células fundadoras que dan lugar a la formación de raíces laterales. SKP2B es expresado en células fundadoras, en PRL's y en el MAR. La mutante *skp2b* desarrolla un mayor número de PRL's en las etapas I y II, sugiriendo que SKP2B participa en la primera división anticlinal de las células fundadoras (Manzano *et al.*, 2012)

Otro gen importante en la regulación de la maquinaria del ciclo celular y del desarrollo de raíces es *HIGH PLOIDY2* (*HPY2*), que codifica para una proteína con actividad de SUMO-ligasa E3. La proteína HPY2 contiene un dominio SP-RING, está localizada nuclearmente y funciona como un represor del inicio del endociclo en el MAR. La pérdida de función de *HPY2* resulta en una transición prematura del ciclo mitótico al endociclo, conduciendo a una disminución del tamaño del MAR. *HPY2* es predominantemente expresado en células en proliferación del MAR y funciona río abajo de los factores de transcripción PLT. La expresión de HPY2 en células en proliferación sugiere que la función principal de HPY2 es mantener a las células meristemáticas en el ciclo mitótico. Además, los niveles de expresión de genes propios de la maquinaria del ciclo celular como *CDKB1* (expresado en la fase S y M), *CYCB1* y *CDKB2* (expresados en la transición G2-M) están reducidos en la mutante *hyp2-1* (Ishida *et al.*, 2009).

Otros reguladores importantes del ciclo celular en el desarrollo del sistema radical son las proteínas CCS52A1 y CCS52A2. Estas dos isoformas funcionan como activadores específicos de sustrato del APC, ambas regulan el mantenimiento del MAR aunque a través de diferentes mecanismos. El CCS52A1 participa en el establecimiento del límite entre el MAR y la zona de elongación ya que su función estimula la salida del ciclo mitótico y la entrada al endociclo, de manera que restringe el tamaño del MAR. Por otro lado, CCS52A2 actúa directamente en el control de la identidad del centro quiescente y mantenimiento de las células troncales mediante la represión de la actividad mitótica en las células del CQ. La raíz de la mutante *ccs52a1* es más larga que la del Wt y se pueden observar más células en división en el MAR, mientras que el crecimiento fue afectado fuertemente en las raíces de la mutante *ccs52a2* que presentaron un menor número de células en división en el MAR (Vanstraelen *et al.*, 2009).

ANTECEDENTES.

El desarrollo de la raíz ha sido estudiado extensamente con ayuda de distintos enfoques y métodos. Un enfoque importante ha sido la generación y caracterización de mutantes en un solo gen. Actualmente, un gran número de mutantes con defectos en el desarrollo de raíces han sido descritas y analizadas a nivel celular, molecular y genético (Koornneef y Scheres, 2001). A partir del análisis del fenotipo de una mutante afectada en un único gen se puede deducir el papel del mismo en cualquier proceso de desarrollo (Benfey *et al.*, 2010; Koornneef y Scheres, 2001). Las mutaciones pueden ser generadas por medio del uso de mutágenos clásicos como radiación y exposición a agentes químicos como Etil-Metano-Sulfonato (EMS) o con mutagénesis por inserción, usando el T-DNA proveniente de *Agrobacterium tumefaciens* y/o la introducción de elementos transponibles (Koornneef & Scheres, 2001).

Dependiendo del objetivo de la investigación se selecciona el método de mutagénesis que se usará. Hasta ahora el mutágeno más usado para generar un amplio espectro de fenotipos mutantes es el EMS (Curtis y Grossniklaus, 2007; Malmberg, 2004; Koornneef y Meinke, 2010; Westhoff *etal*, 1998). El EMS agrega grupos etilos a las guaninas y causa transición de GC a AT. Específicamente en esta situación, una base de una sola cadena es reemplazada por otra con las mismas características químicas, como una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina (Griffiths *et al*, 2008; Westhoff *etal*, 1998). De esta manera, se provocan mutaciones puntuales en genes únicos causando el fenotipo mutante y resultando en la alteración del curso normal del desarrollo (Westhoff *etal*, 1998)

En el grupo del Dr. Dubrovsky (Intituto de Biotecnología, UNAM), se generó una colección de mutantes de *A. thaliana* (del ecotipo Ler) por EMS. A partir de una población de más de 17,000 plantas M2 resultantes de la mutagénesis con EMS, se seleccionaron líneas mutantes que presentaron defectos en el patrón de desarrollo de raíces. Dentro de éstas, al igual que la mutante *moots koom 1 (mko1)* reportada en Hernández-Barrera *et al.*, (2011), se aisló a la mutante “*short lateral root*” (*sl*). Específicamente, la mutante *sl* se seleccionó por su fenotipo aberrante en el sistema radical que consiste de una raíz primaria (RP) bastante corta y un menor número de raíces laterales con morfología aberrante. Estudios preliminares mostraron que el crecimiento reducido de la RP se debió a una menor producción celular en el MAR, relacionado con afectaciones de la duración

del ciclo celular y que el número reducido de RL's y morfología afectada se debió a la morfogénesis aberrante durante el desarrollo de PRL's.

HIPÓTESIS.

El gen *SL* regula la duración del ciclo celular en el meristemo apical de la raíz primaria y participa durante el desarrollo de primordios de raíces laterales.

OBJETIVOS.

Objetivo general.

Caracterizar el desarrollo del sistema radical de la mutante "*short lateral root*" (*sl*) y determinar el posible papel del gen *SL*.

Objetivos particulares.

- Análisis de la raíz primaria.

Determinación de la tasa de crecimiento, la longitud celular promedio de células diferenciadas y células en dominio de transición, el tamaño del meristemo apical, la producción celular, la duración del ciclo celular y el número de ciclos celulares que experimenta una célula en el meristemo, en la mutante *sl*.

- Análisis de raíces laterales.

Estimación de la densidad e índice de iniciación de primordios de raíces laterales, así como el análisis de su morfogénesis.

- Análisis del patrón de expresión de la respuesta auxina con la ayuda de la línea transgénica (*DR5::GFP*) en el meristemo apical de la raíz primaria y en las diferentes etapas del desarrollo del PRL.
- Determinación de la identidad del gen afectado responsable del fenotipo de la mutante *sl*.

METODOLOGÍA.

Medio de cultivo *in vitro* y condiciones de crecimiento.

Las semillas del tipo silvestre (Wt) y de la mutante (*sl*) se sembraron en cajas Petri cuadradas conteniendo medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) al 0.2 X, suplementado con 1% de sacarosa, pH 5.7 y 0.8% de agar. Las cajas se mantuvieron en posición vertical bajo condiciones controladas en una cámara de crecimiento con una temperatura de 22°C y un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad y una intensidad lumínica de 105 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Determinación de la dinámica de crecimiento de la raíz primaria.

Después de la germinación, se tomaron mediciones de la longitud alcanzada por la raíz cada 24 h durante diez días de crecimiento en medio MS. Los datos se obtuvieron haciendo mediciones con ayuda del programa "Image J" (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), y se compararon por medio de un análisis estadístico (*t* de Student) en la aplicación "SigmaPlot 12".

Preparaciones de raíces para análisis al microscopio.

Método de aclaración en sal saturada de Ioduro de Sodio (NaI) para el análisis del meristemo apical de la raíz primaria.

Las raíces se fijaron con una solución de Paraformaldehído al 4% en PIPES 0.025 M, durante 24 h. La solución fijadora se reemplazó por una solución de glicerol al 30% y DMSO al 2%, incubándose a temperatura ambiente por 24h. Por último, las raíces se montaron en solución de Ioduro de Sodio (Dubrovsky, *et al.* 2009). Este método permitió observar con mayor detalle y hacer cuantificaciones en el meristemo apical.

Método de aclaración de raíces de Malamy & Benfey (1997) modificado para análisis de primordios de raíces laterales.

El método fue modificado para obtener una mejor resolución de PRL's, necesaria para el análisis en la mutante *sl*. Los tejidos de las raíces se fijaron con una solución de Paraformaldehído al 2% en PIPES al 0.025M durante 24h a una temperatura de 4°C. Posteriormente se lavaron con agua destilada e incubaron a 62°C en una solución de HCl (0.24N) en metanol al 20% por 60 min. En seguida, se colocaron en una solución básica

de NaOH al 0.7% en etanol al 60% a temperatura ambiente durante 20 min. Por último, se efectuó una deshidratación gradual con soluciones de etanol (40, 20 y 10%), incubando durante 48h por cada una. Una vez terminada la última incubación, en la misma solución se agregó glicerol al 50% y se dejó durante 48h más. Las raíces fueron montadas en portaobjetos con glicerol al 50%.

Análisis con microscopia de Contraste Diferencial de Interferencia (DIC)

Para este análisis se utilizó un microscopio Axiovert 200 M Zeiss equipado con dispositivos ópticos para contraste diferencial de interferencia (Oberkochen, Germany)

Determinación de la longitud celular promedio de células diferenciadas y de células en el dominio de transición de la RP.

Para determinar la longitud promedio de células diferenciadas, se midió la longitud total de diez células continuas del cortex en la misma fila celular y se estimó el promedio. En cuanto a la longitud celular promedio en el dominio de transición, se determinó a partir de la división de la longitud total de este dominio entre el número de células que la ocupan.

Determinación del tamaño del meristemo apical de la RP.

En un plano medio óptico se cuantificó el número de células del cortex en una sola fila celular, tanto en el dominio de transición como en el dominio de proliferación y se midió la longitud abarcada por ambos dominios.

Estimación de la tasa de producción celular en el meristemo apical de la RP.

La tasa de producción celular se determinó colectando datos de manera individual para cada raíz, $n= 38$ (Wt) y 39 (s), de la tasa de crecimiento, entre los días 9 y 10 posteriores a la germinación, y de la longitud celular promedio de células diferenciadas del cortex. Estos datos se sustituyeron en la fórmula $P=V/l_e$ (Ivanov & Dubrovsky, 1997), en donde V es la tasa de crecimiento de la raíz y l_e es el promedio de la longitud de 10 células completamente elongadas del córtex.

Estimación de la duración del ciclo celular en el meristemo apical de la RP.

Para determinar la duración del ciclo celular se utilizaron los datos de la tasa de crecimiento entre los días 9 y 10 posteriores a la germinación, la longitud celular promedio

de células diferenciadas del cortex y el número de células correspondiente al tamaño del dominio de proliferación. Estos datos se sustituyeron en la fórmula $T = \ln 2 N_m l_e / V$ (Ivanov y Dubrovsky, 1997), en donde N_m es el número de células meristemáticas en un solo tejido, l_e es la longitud promedio de células completamente elongadas y V es la tasa de crecimiento de la raíz. Los datos utilizados fueron colectados individualmente, $n = 38$ (Wt) y 39 (s).

Estimación del número de ciclos celulares en el meristemo apical de la RP.

De igual manera que los parámetros estimados anteriormente, se colectaron los datos de manera individual para determinar el número de ciclos celulares que ocurren en una célula durante su paso en el meristemo. El número de ciclos celulares se determinó por la fórmula $p = (\ln N_m / \ln 2) - 1$, en donde N_m es el número de células en el meristemo.

Estimación de la densidad de PRL's.

La densidad se calculó como $d = N_{PRL} L^{-1}$ (Dubrovsky *et al*, 2009), en donde N_{PRL} es el número de primordios en la “zona de formación de raíces laterales” (zona que abarca desde el primordio iniciado más distal a la raíz lateral emergida más distal) y L es la longitud de esta misma zona, calculado para cada raíz individual, $n = 28$ (Wt) y 30 (s).

Estimación del índice de iniciación de RL's.

El índice de iniciación se estimó mediante $I_{LRI} = 100 d l_e$ (Dubrovsky *et al*, 2009) en donde d es el número de primordios iniciados en la “zona de formación de raíces laterales” y l_e es la longitud promedio de células diferenciadas del córtex, calculado para cada raíz individual, $n = 28$ (Wt) y 30 (s).

Análisis de la morfogénesis del PRL.

Para este análisis se observaron, foto-documentaron y compraron los primordios de raíces laterales en sus diferentes etapas según Malamy & Benfey (1997) por cada raíz primaria individual, $n = 28$ (Wt) y 30 (s). Para la foto-documentación se utilizó una cámara a color CoolSNAPc (Valley International Corporation, Austin, TX, USA)

Análisis del patrón de expresión del marcador de respuesta a auxina *pDR5::VENUS-N7*.

Para el análisis del patrón de expresión de la respuesta a auxina se hicieron cruza de la mutante *sl* con la línea transgénica *pDR5::VENUS-N7*. Posteriormente en la generación F2, se seleccionaron plantas con el fenotipo mutante y que expresaran *pDR5::VENUS-N7*. Por último, se analizó la RP y PRL's de plantas únicamente de la generación F3 ($n = 15$ en *Wt* y *sl*). Para contrastar la expresión de *pDR5::VENUS-N7*, las plantas se trataron por 5 minutos antes de su observación al microscopio, con una solución de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Ioduro de Propidio (IP) que tiñe las paredes celulares. Este análisis se hizo con un microscopio de escaneo laser confocal Zeiss LSM 510 Meta. Para la excitación de GFP se utilizó un láser de Argón de 480 nm y para la excitación del Ioduro de Propidio se utilizó un láser de Helio/Neón de 543 nm.

Análisis molecular para la identificación del gen *SL*.

Con el fin de determinar la identidad molecular del gen *SL*, se analizaron las secuencias de los genes candidatos que resultaron a partir de la secuenciación masiva de plantas de la población de mapeo por Illumina. De esta lista de genes se seleccionó al gen candidato en el locus AT5G61800 debido a que fue el único que realmente mostraba un cambio, en la secuencia codificante, resultante de la mutagénesis por EMS. Para corroborar la mutación se confirmó por re-secuenciación de la región donde se ubicó el cambio predicho, utilizando los oligonucleótidos 5'-CCAATCGATAGTGCCTTGCAAC-3' y 5'-CGAAACCAAATCACGTAAGGGC-3' que amplifican una región de 150 pb. Además, con ayuda de estos mismo oligonucleótidos, se analizó el transcrito por medio de un RT-PCR de punto final de dos líneas de inserción de T-DNA de la colección SALK, SALK_018496 y SALK_018510 (S-496 y S-510 respectivamente) que presentaron la inserción en sitios cercanos al extremo 5' en el locus AT5G61800.

RESULTADOS.

Fenotipo de la mutante *sl*.

Para los diferentes análisis reportados en este trabajo se utilizaron únicamente plantas germinadas en el mismo día post-siembra, esto debido a que en la mutante *sl* existe una heterogeneidad en el porcentaje de germinación a lo largo de varios días (Torres-Martínez, 2012). Por tanto, se procuró seguir la germinación minuciosamente para seleccionar sólo a los individuos de *sl* que germinaron de manera simultánea (48 h post-siembra aproximadamente) con individuos del tipo silvestre (Wt). Además, en la mutante *sl*, la edad de 10 días post-germinación (dpg) es suficiente para detectar algunas RL's emergidas, lo cual es importante para hacer un análisis cuantitativo más confiable sobre la iniciación de PRL's. De este modo, esta edad fue escogida para homogeneizar todos los datos obtenidos durante los diferentes análisis (tanto del desarrollo de RP y RL's) y así tener una visión más integral de las afectaciones en el desarrollo causadas por la mutación en el gen *SL*.

La mutante *sl* tiene un sistema radical bastante compacto en comparación al Wt, con una RP muy corta y RL's apenas visibles para la edad en que se hicieron los análisis (Fig. 6 A-D). Sin embargo, esta mutación parece no afectar el desarrollo del sistema del brote, según observaciones realizadas en etapas adultas (Fig. 6 E y F; Fig. Sup. 1).

Análisis del desarrollo de la raíz primaria.

Para el análisis del desarrollo de la RP en la mutante *sl*, se determinó su tasa de crecimiento por un periodo de 10 dpg. En este primer estudio se encontró que la tasa de crecimiento de la RP por día en la mutante era mucho menor que en el Wt. Incluso se pudo observar una diferencia significativa desde el primer día post-germinación en donde la RP de *sl* alcanzó una longitud de 0.9 mm mientras que en el Wt presentó una longitud de 1.7 mm y esta diferencia se fue acentuando durante el tiempo del experimento (Fig. 7 A). Para el último día del experimento la longitud final alcanzada de la RP en la mutante fue de 16.5 mm, en contraste con la longitud final del Wt de 79.6 mm, reflejando una reducción de casi un 80% en el crecimiento de la RP de *sl* (Fig. 6 A y B; Fig. 7 A). Estos datos indican que la mutante presenta un desarrollo muy lento de la RP, reflejando un menor tamaño en comparación al tipo silvestre. En general, estos datos apuntan a que

algunos mecanismos relacionados con en el crecimiento del órgano (proliferación y/o elongación celular) se encuentran afectados.

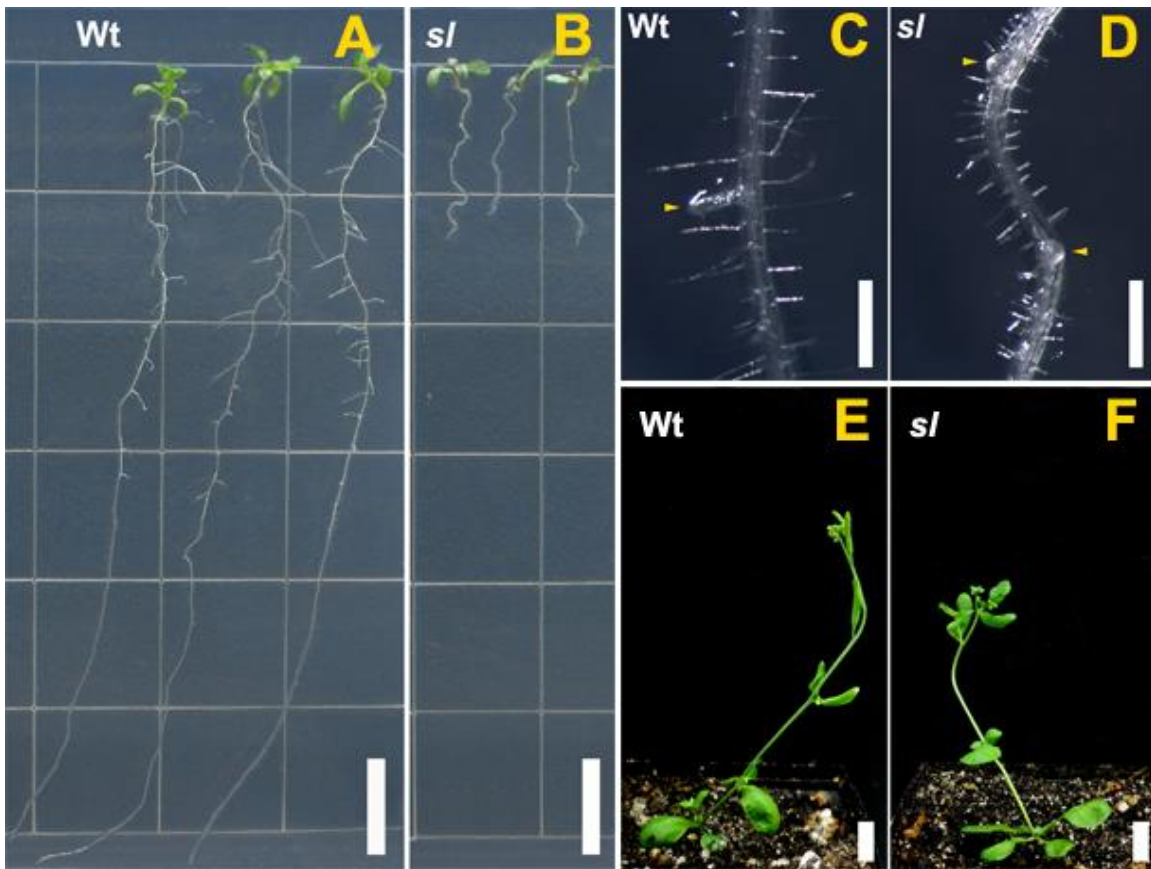


Fig. 6. Fenotipo de la mutante *sl*. (A y B) Arquitectura del sistema radical en plantas de Wt (TS) (A) y de la mutante *sl* (B) de 10 dpg. (C y D) Raíces laterales emergidas, señaladas con puntas de flechas amarillas en plantas TS Wt (C) y en *sl* (D). Arquitectura del sistema del brote en plantas de 30 dpg en el Wt (E) y en *sl* (F). Barra de escala = 1 cm (A, B, E y F), 0.5 mm (C y D).

Con la finalidad de establecer qué proceso relacionado con el crecimiento de la RP estaba afectado y era responsable del fenotipo de raíz corta en la mutante *sl*, se hizo un análisis a nivel celular y se determinaron parámetros que ayudaron a comprender cómo estaban alterados los procesos de proliferación y/o elongación celular en la mutante. Para el caso de la elongación celular, primero se estimó la longitud promedio de 10 células del córtex en una sola fila celular de la zona de diferenciación. Estos datos muestran que la RP de plantas de Wt alcanzó una longitud celular promedio de 170 μm , mientras que la de la mutante tuvo una longitud promedio menor, de 136 μm (Fig. 7 G). Esta reducción, de un 20%, sugirió que posiblemente algún mecanismo relacionado con el proceso de

elongación celular esté afectado en la mutante, como el establecimiento apropiado de la zona elongación, que esto a su vez depende del establecimiento de las otras zonas de desarrollo así como de sus límites, subyaciendo una regulación compleja por interacciones hormonales (revisado en Jung y Mc Couch, 2013) o el proceso de elongación por sí mismo. Otra posibilidad es que la reducción de la RP no esté relacionada con la elongación celular y que las células que salen del meristemo, para experimentar elongación rápida, lo hacen de un menor tamaño en la mutante. Con el fin de descartar alguna de las posibilidades antes mencionadas, se determinó la longitud promedio de las células en el dominio de transición. El resultado que este análisis arrojó fue que no existe diferencia significativa entre las longitudes promedio de las células en el dominio de transición (Fig. 7 H) y apoya la idea de que la mutante *sl* esté afectada en algún mecanismo del proceso de elongación celular. Sin embargo, la disminución de un 20% de la longitud celular promedio de células diferenciadas del cortex en la mutante *sl* con respecto al Wt no es tan dramática como la reducción total de la RP en la mutante, lo que indica que además de la elongación celular también la proliferación celular está reducida en la mutante y aparentemente en mayor grado.

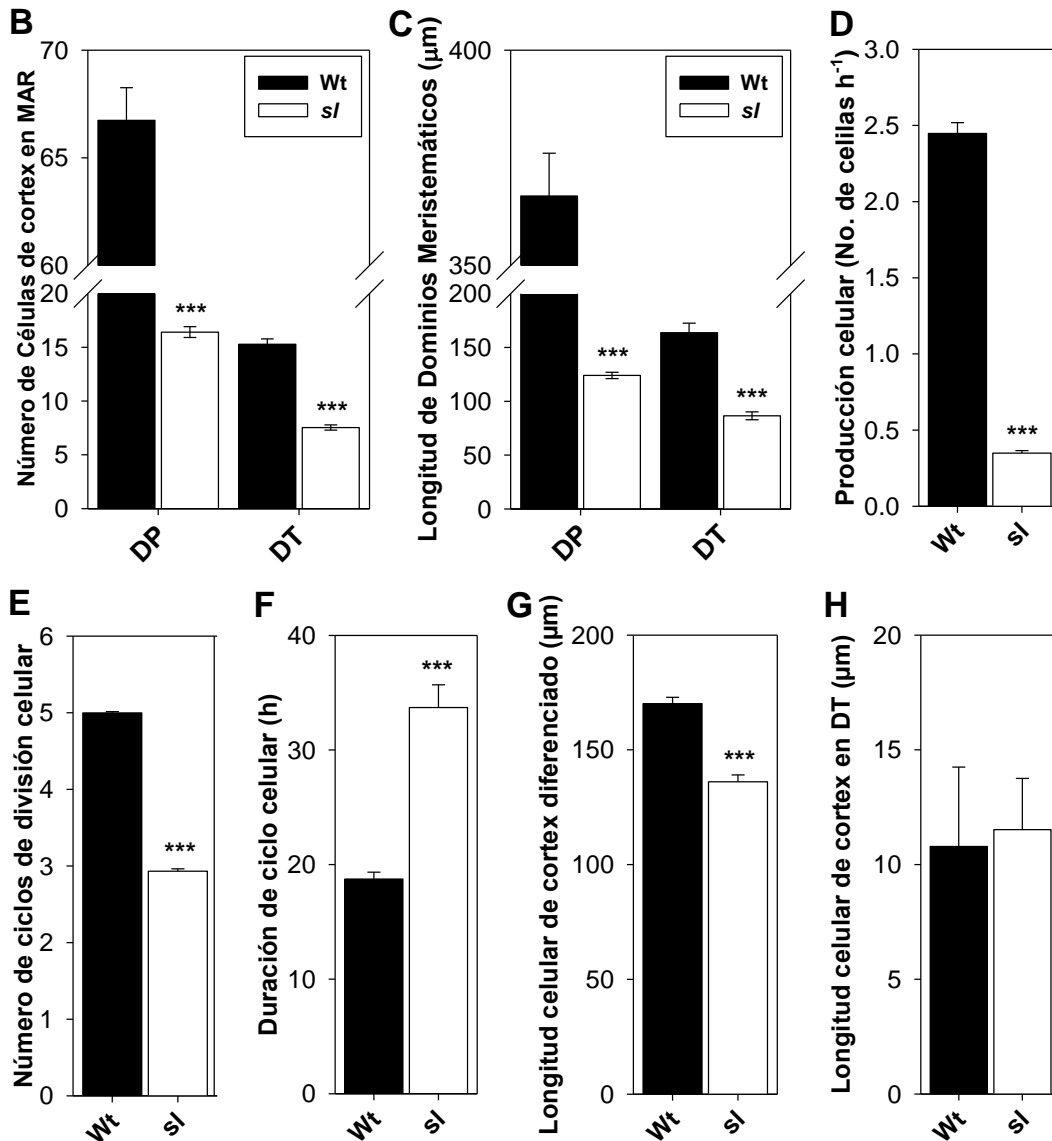
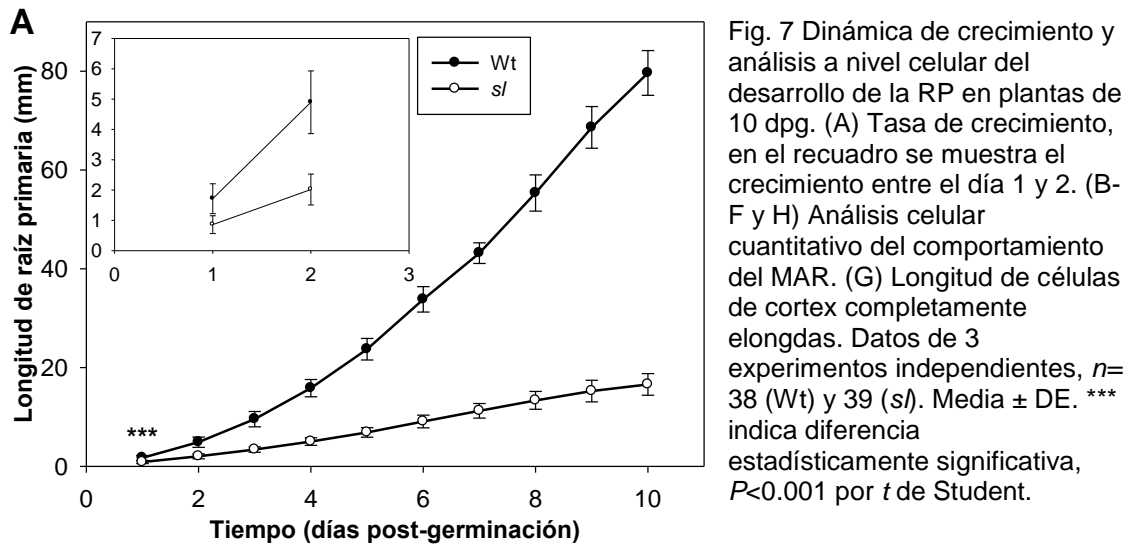
Con el objetivo de determinar qué tan afectada se encuentra la proliferación celular en *sl*, se cuantificó el número de células del cortex en una fila celular, dentro de los dos dominios (de proliferación y de transición) que componen el meristemo apical de la raíz (MAR) y la longitud promedio de ambos dominios. A partir de este análisis se determinó que existe una diferencia significativa entre el Wt y la mutante *sl*, con una reducción correlacionada tanto en el número de células como en la longitud promedio para ambos dominios (Fig. 7 B y C; Fig. 8 A y B). En el dominio de proliferación, el número de células del cortex promedio fue de aproximadamente 66 para Wt y 16 para *sl*, correlacionando estrechamente con una longitud promedio de 365 μm y 122 μm del dominio, respectivamente, resultando en una disminución de un 70% aproximadamente en la mutante para ambos parámetros (Fig. 7 B y C; Fig. 8 A y B). Por otro lado, en el dominio de transición el número de células promedio fue cerca de 15 para el Wt y 7 para la mutante, en donde también se pudo observar una correlación en la reducción de casi un 50% para la longitud promedio del dominio, de 160 μm en el Wt a 85 μm en *sl* (Fig. 7 B y C; Fig. 8 A y B). Estos resultados sugieren que el dominio de proliferación celular en el MAR de la mutante *sl* se encuentra más afectado que el dominio de transición, y que este último está reducido probablemente, como un reflejo de la alteración en procesos relacionados con la proliferación celular. Además, esta fuerte reducción en el MAR

permite observar la presencia de tejidos diferenciados, como pelos radicales, bastante cerca al ápice de la raíz en la mutante *sl* (Fig. 8)

Para profundizar más en el análisis del grado de perturbación del dominio de proliferación celular en la mutante *sl*, se estimaron los parámetros de producción celular, duración de ciclo celular y número de ciclos celulares que experimenta una célula en el dominio de proliferación celular del MAR. La producción celular está fuertemente disminuida en la mutante de casi un 90%, con una producción celular de 2.4 células por hora en la Wt y de 0.3 en *sl* (Fig. 7 D). Esto indica que probablemente la duración del ciclo celular y/o el número de ciclos de división celular que experimenta una célula está afectado en esta mutante.

Para corroborar cuál de las situaciones antes mencionadas ocurre en el meristemo de *sl*, se determinaron ambos parámetros. En el caso del número de ciclos de división celular, éste disminuyó un 41% en *sl* con respecto al Wt, de 2.9 a 4.9 ciclos, respectivamente (Fig. 7 E). En la duración del ciclo celular se evidenció que en el Wt un ciclo de división celular dura 18.6 h y en la mutante 33.6 h, que corresponde a un aumento del 45% en el tiempo de división celular en *sl* en comparación con el Wt (Fig. 7 F). Estos resultados indican que ambos mecanismos vinculados con procesos del ciclo celular están afectados en la mutante y son responsables, en conjunto, de la fuerte reducción en la producción celular afectando el tamaño del MAR (Fig. 8).

Por último, con el fin de tratar de comprender el fenotipo aberrante de la RP en la mutante *sl* y verificar si éste se debe a alteraciones relacionadas con la señalización por auxina, se analizó el patrón de expresión del marcador de respuesta a auxina *pDR5::VENUS-N7*. Sin embargo, este análisis mostró que no hay diferencias en el patrón de expresión de este marcador y por tanto la señalización de auxina no está afectada (Fig. 8 C y D; Fig. Sup. 2 C y D). Este dato sugiere que el gen *SL* regula el desarrollo de la RP, independientemente de la vía de señalización por auxina.



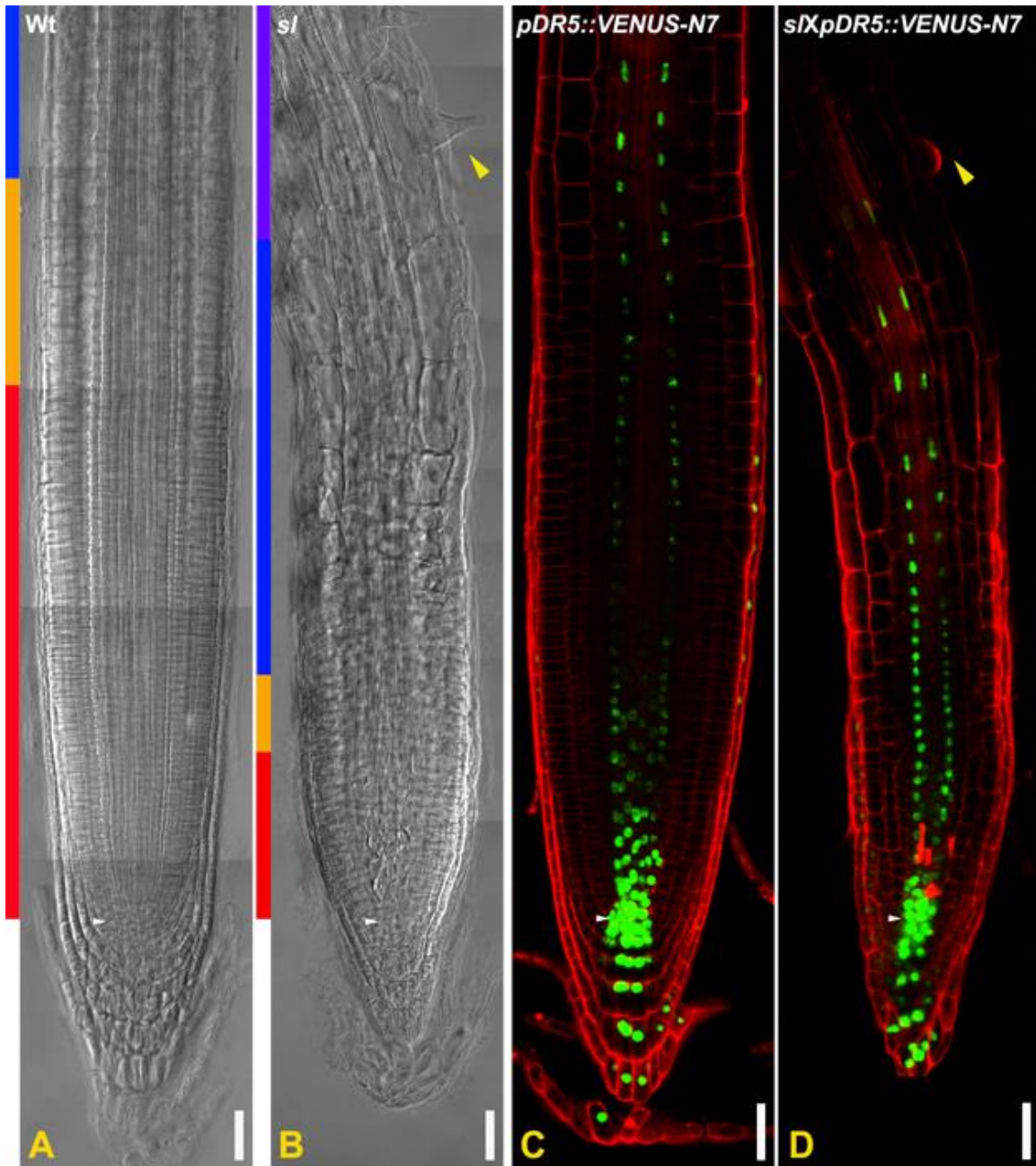


Fig. 8. (A y B) Patrón longitudinal de las zonas de crecimiento en raíces aclaradas y observadas con Óptica Nomarski del Wt, en (A) y mutante *sl*, en (B). La barra de colores a la izquierda de cada panel, indica las diferentes zonas de desarrollo (rojo: dominio de proliferación celular del MAR, amarillo: dominio de transición del MAR, azul: zona de elongación, púrpura: zona de diferenciación. (C y D) Análisis de expresión de la línea marcadora de respuesta a auxina *pDR5::VENUS-N7* con microscopía laser confocal de barrido. La fluorescencia en rojo es producida por la tinción de paredes celulares con IP, utilizado para contraste. Análisis realizados en RP de plantas de 10 dpv. Las cabezas de flechas en blanco señalan la posición del CQ y las flechas en amarillo indican la presencia de pelo radical más distal. Barra de escala = 40µm

Análisis del desarrollo de raíces laterales.

El desarrollo de RL's se ve fuertemente afectado en la mutante *sl* debido a que, aparentemente, desarrolla menos o ninguna raíz lateral en comparación a Wt en plantas de 10 dpv (Fig. 6 A-D). Esto sugiere que en la mutante *sl* puede estar afectada la iniciación y/o el desarrollo de los primordios de raíces laterales (PRL's), a través de sus diferentes etapas, afectando la emergencia de RL's. Para obtener mayor información sobre el proceso de iniciación de RL's, se determinaron dos parámetros que permitieron cuantificar este proceso. Por un lado, se estimó la densidad de raíces laterales, que permite conocer el número de PRL's que se inician por unidad de distancia (mm) (Dubrovsky *et al*, 2006); en este análisis se determinó que la densidad para Wt fue de 1 PRL mm⁻¹ y para la mutante fue de 1.7, existiendo un aumento de un 40% de eventos de iniciación de RL's en la mutante *sl* (Fig. 9). Sin embargo, se sabe que las diferencias en la longitud promedio de células del cortex en la zona de diferenciación puede enmascarar los cambios en la densidad de raíces laterales analizadas a nivel celular (Dubrovsky *et al*, 2009). Por tanto, también se estimó el Índice de iniciación de PRL's, que indica el número de PRL's a lo largo de 100 células del cortex (Dubrovsky *et al*, 2009). Este análisis indicó que existe un índice de iniciación de PRL's de 16.1 en el Wt y de 22.7 en *sl* (Fig. 9), que corresponde a un aumento de un 30% de los eventos de iniciación de RL's en la mutante *sl*. Estos resultados indican que en la mutante *sl* hay un mayor número de eventos de iniciación de RL's y sugieren que el reducido número de RL's en la mutante se debe a alteraciones durante el desarrollo de los PRL's que retardan la emergencia.

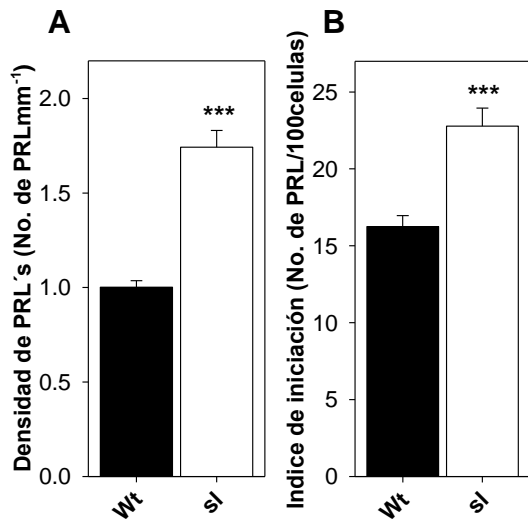


Fig. 9 Densidad (A), e Índice de iniciación (B), de raíces laterales del tipo silvestre (Wt) y de la mutante (*sl*). Plantas de 10 dpv. Los datos analizados corresponden a 3 experimentos independientes, $n=28$ (Wt) y 30 (*sl*). *** indica diferencia estadísticamente significativa de $P<0.001$, en prueba *t* de Student.

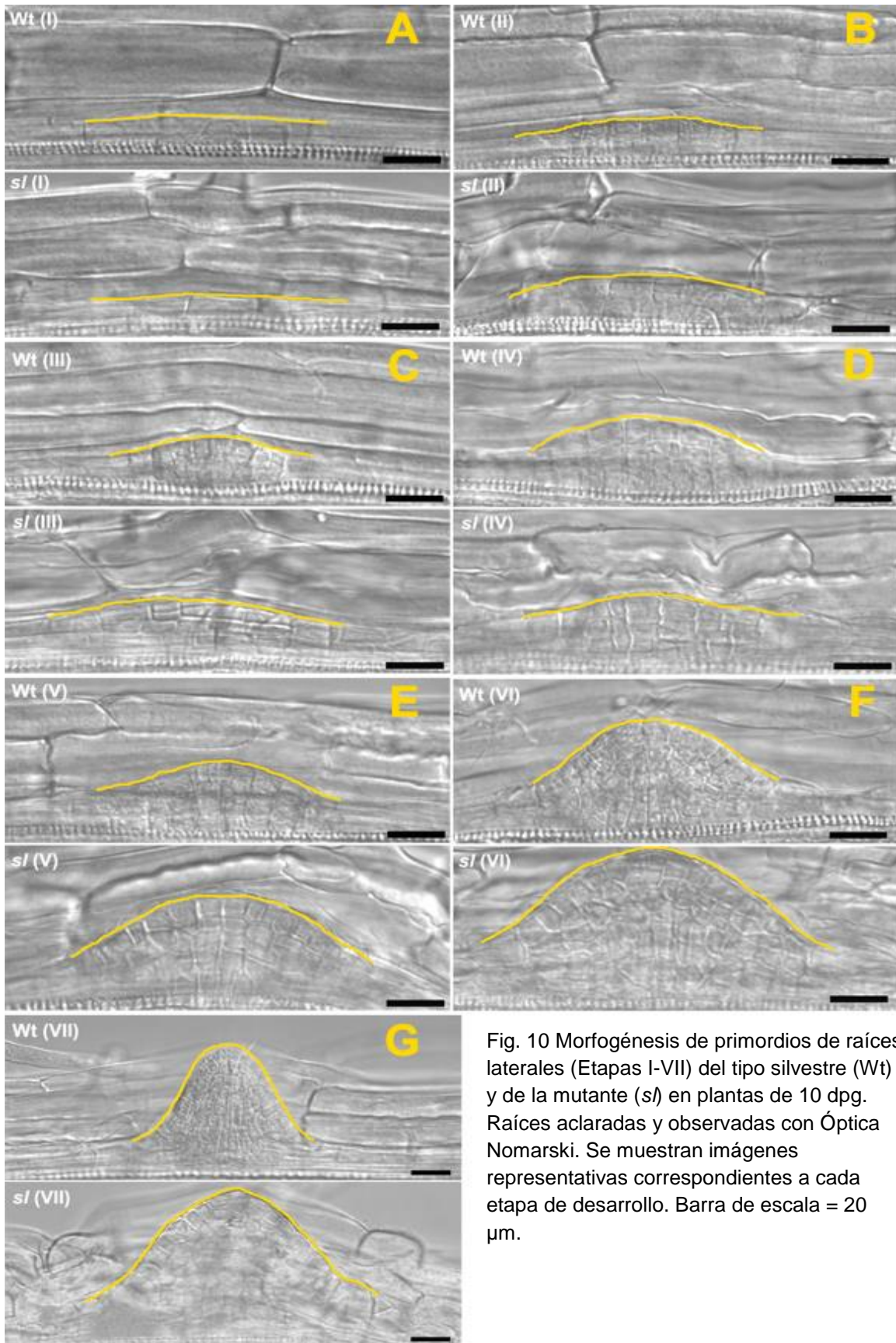


Fig. 10 Morfogénesis de primordios de raíces laterales (Etapas I-VII) del tipo silvestre (Wt) y de la mutante (*sl*) en plantas de 10 dpv. Raíces aclaradas y observadas con Óptica Nomarski. Se muestran imágenes representativas correspondientes a cada etapa de desarrollo. Barra de escala = 20 μ m.

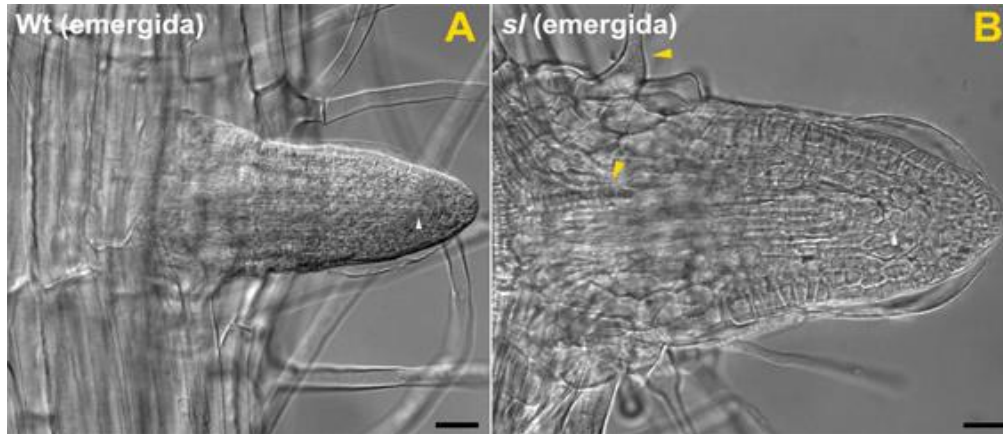


Fig. 12. Morfología de la RL del tipo silvestre (Wt), en A y de la mutante (*s/*), en B de plantas de 10 dpv. Raíces aclaradas y observadas con Óptica Nomarski. Barra de escala = 20 μ m.

Con la finalidad de comprender cómo y qué tan afectado está el desarrollo de los PRL's, se analizó de manera cualitativa la morfogénesis de éstos. Este análisis muestra que existen algunas diferencias durante la morfogénesis de los PRL's entre la mutante *s/* y el Wt (Fig. 10). En la mutante *s/* existe una alteración de la morfogénesis notoria a partir de la etapa III del desarrollo (Fig. 10 C) en adelante, debido a una expansión en los bordes radiales que delimitan el PRL. Esa expansión es aparentemente, el resultado de la ocurrencia de divisiones celulares extras y el incremento del tamaño celular en estas porciones del primordio (Fig. 10 C-G). Estas características aberrantes también se acentúan en etapas posteriores del desarrollo del PRL (etapas IV-VII) en la mutante *s/*. Sin embargo, la simetría del primordio y el patrón de divisiones celulares en la región central del PRL, que va a dar origen al MAR de la raíz lateral, no parecen estar afectada (Fig. 10 C-G). Observaciones post-emergencia de las RL's muestran que este patrón aberrante en los bordes expandidos se mantiene y está relacionado con la ocurrencia de procesos de diferenciación celular, debido a la presencia de tejidos diferenciados evidentes (pelos radicales y tejidos vasculares), bastante cercanos al ápice de la RL (Fig. 11), fenómeno similar al que ocurre en la RP (Fig. 8 A y B). Además, estas alteraciones en la morfogénesis estuvieron correlacionadas con una reducción en la respuesta a auxina, evidenciadas al analizar el patrón de expresión de *pDR5::VENUS-N7* en las diferentes etapas del desarrollo del PRL (Fig. 12). Estos datos en conjunto sugieren que la reducción en el número de RL's en la mutante *s/* se debe a la morfogénesis aberrante durante el desarrollo del PRL, vinculada con una alteración en la vía de señalización de auxina, afectando el proceso de emergencia.

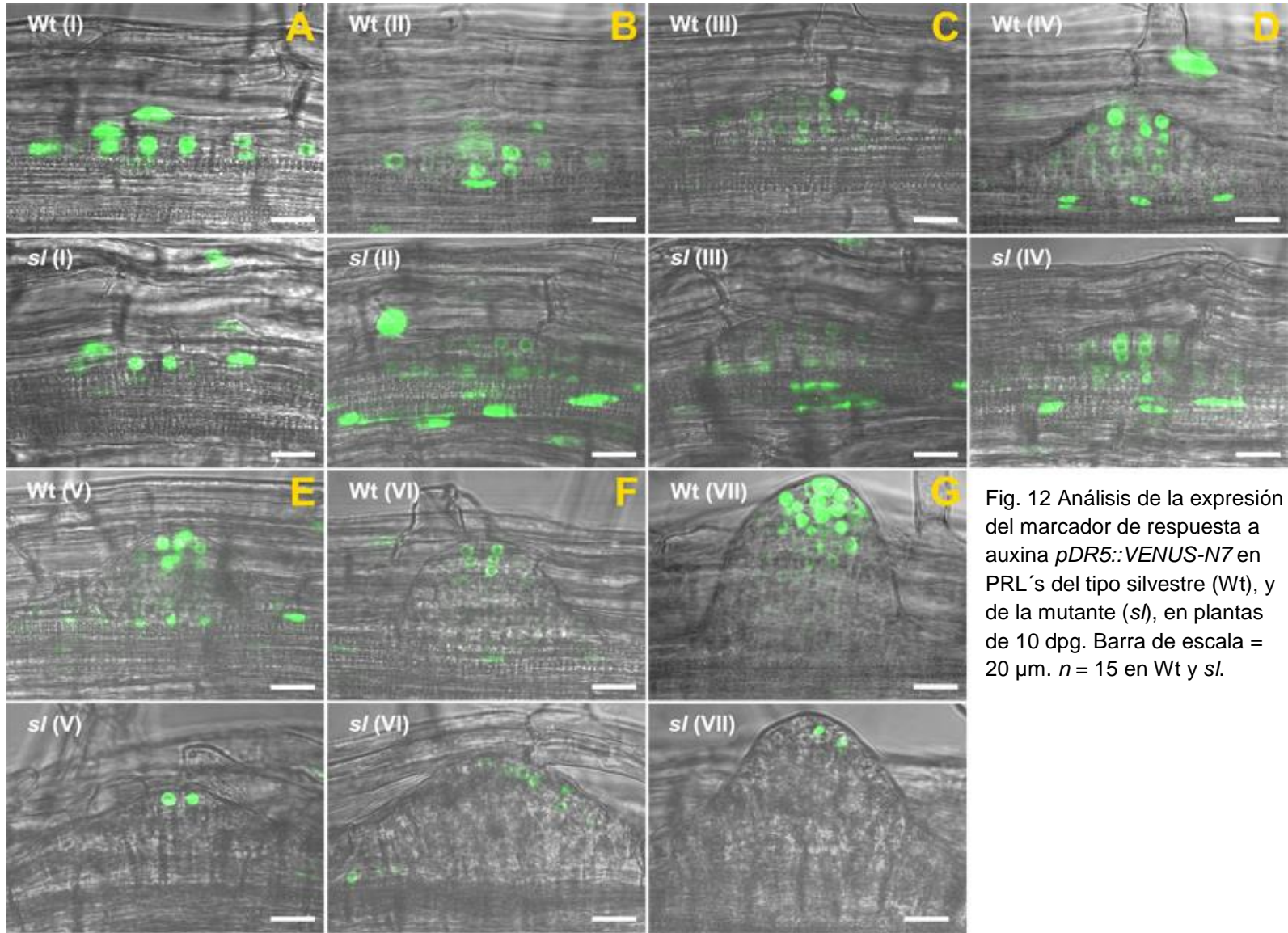


Fig. 12 Análisis de la expresión del marcador de respuesta a auxina *pDR5::VENUS-N7* en PRL's del tipo silvestre (Wt), y de la mutante (*sl*), en plantas de 10 dpv. Barra de escala = 20 μ m. $n = 15$ en Wt y *sl*.

Identificación del gen *SL*.

Con la finalidad de comprender a que se debía el fenotipo de la mutante *sl* se trató de identificar al gen *SL*. Para esto, se realizaron análisis *in silico* de genes candidatos obtenidos con ayuda del programa SHOREmap y de secuencias generadas con el método Illumina a partir de una población de mapeo (Schneeberger *et al.*, 2009). Dicha población de mapeo se estableció por la cruce entre la mutante *sl* (en el fondo de Ler) con el ecotipo Columbia-0 (Ugartechea-Chirino y Reyes-Hernandez_comunicación personal). Por medio de estos análisis se encontró al gen candidato más probable correspondiente al locus AT5G61800. El transcrito que se genera a partir de este locus es de 1567 nucleótidos, sin intrones y codifica para una proteína de 499 residuos de aminoácidos, que pertenece a la superfamilia "Pentatricopeptide repeat" (PPR) (Fig. 13 A y B; Fig. Sup. 3), con localización predicha en la mitocondria. Para corroborar la mutación se re-secuenció la región en donde se encontró el cambio predicho por el análisis de la secuencia utilizando los oligonucleótidos 5'-CCAATCGATAGTGCCTTGCAAC-3' y 5'-CGAAACCAAATCACGTAAGGGC-3', para amplificar una región de 150 pb. Este análisis confirmó el cambio de una Guanina (G) por una Adenina (A) en la posición 586 de la región codificante, resultando en una mutación no sinónima de una Alanina (A) por una Tirosina (Y) en el residuo 196 de la proteína predicha (Fig. 13 A y B; Fig. Sup. 3). Además se analizaron 2 líneas de inserción de T-DNA de la colección SALK, SALK_018496 y SALK_018510 (S-496 y S-550, respectivamente), que presentaron la inserción en sitios cercanos al extremo 5' (Fig. 13 A). Sin embargo, cuando se analizó su fenotipo, estas líneas SALK presentaban fenotipos similares al del tipo silvestre (ecotipo Col-0) (Fig. 13 C y D). Por último, un estudio por RT-PCR con los mismos oligonucleótidos utilizados en la re-secuenciación, mostró que en ambas líneas (S-496 y S-510) aún se detectaba el transcrito de AT5G61800 (Fig. 13 E). Estos datos en conjunto sugieren que las líneas S-496 y S-510 no presentan la inserción del T-DNA en el locus AT5G61800 y que éste último es un candidato fuerte para ser el gen mutado en *sl*.

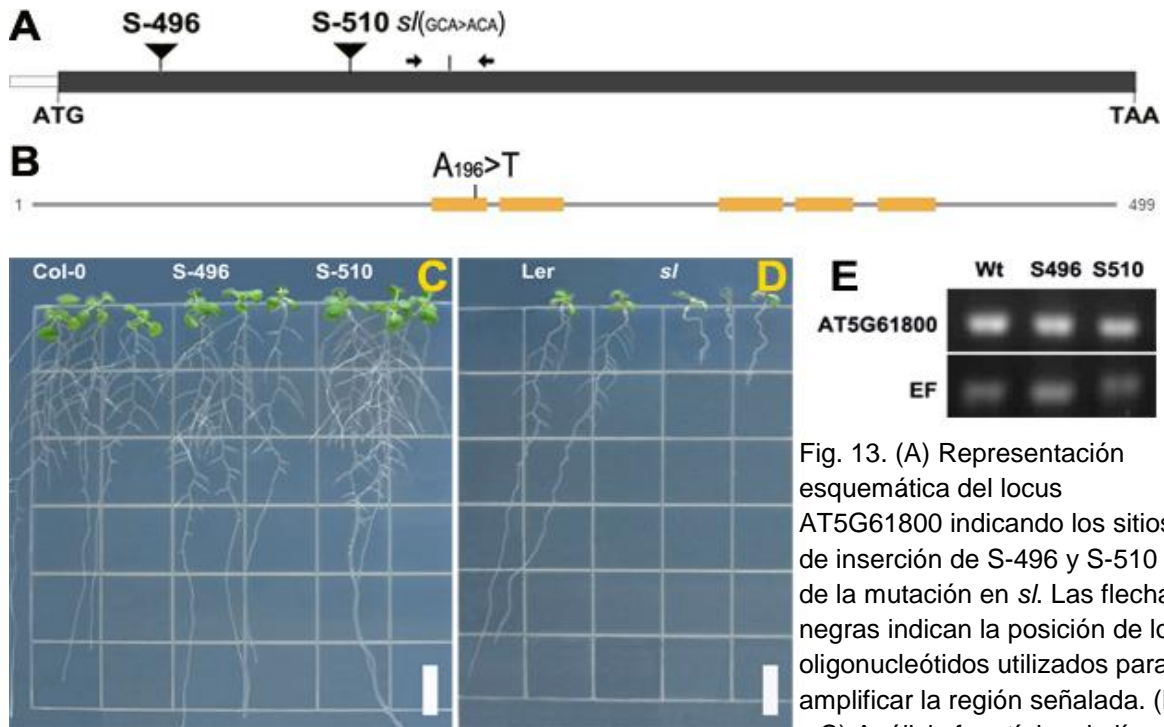


Fig. 13. (A) Representación esquemática del locus AT5G61800 indicando los sitios de inserción de S-496 y S-510 y de la mutación en *sl*. Las flechas negras indican la posición de los oligonucleótidos utilizados para amplificar la región señalada. (B y C) Análisis fenotípico de líneas de inserción SALK y la mutante *sl*. Plantas de 10 dpv. Barra de escala = 1 cm. (D) Análisis de expresión por RT-PCR del locus AT5G61800 en plantas Wt y las líneas de SALK. El Factor de elongación (EF) fue usado como control.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Desarrollo de la raíz primaria en la mutante *sl*.

Los resultados obtenidos de los análisis en el desarrollo de la RP en la mutante *sl* indican que el tamaño reducido de ésta es debido a alteraciones tanto en procesos de proliferación celular como de elongación/diferenciación celular. Sin embargo, la reducción de un 80% en el tamaño de la raíz en la mutante *sl*, en comparación con el Wt (Fig. 1 A y B; Fig. 2 A), se debe principalmente a la disminución en la tasa de producción celular de casi un 90% (Fig. 2 D), más que a la reducción del tamaño de las células completamente elongadas, que disminuyó solamente un 20% (Fig. 2 G). En general, podemos concluir que en la mutante *sl*, el fenotipo de la raíz corta predominantemente es consecuencia de los procesos afectados en la proliferación celular. Los datos sugieren que el gen *SL* participa tanto en la elongación como en la proliferación celular durante el desarrollo de la RP pero principalmente tiene un papel importante en la proliferación celular. Actualmente se sabe que la actividad de diferentes hormonas junto con sus redes regulatorias, controlan el crecimiento de la raíz regulando procesos específicos (proliferación, diferenciación y expansión celular) de manera localizada. Por tanto, es probable que el papel de *SL* pueda estar relacionado con la actividad de alguna de estas hormonas en algún nivel de su regulación (síntesis, transporte o señalización).

Se ha evidenciado que la hormona auxina desempeña un papel muy importante durante el establecimiento del sistema radical. La presencia de una respuesta a auxina, determinada por la actividad del promotor sintético *DR5* en el MAR, correlaciona con el correcto desarrollo de la RP, regulando de manera múltiple la formación del patrón, la orientación y el alcance de las divisiones celulares en el MAR (Sabatini *et al.*, 1999). Además, esta respuesta a auxina es establecida por la acción coordinada de las proteínas transportadoras de eflujo pertenecientes a la familia PIN-FORMED (PIN). Los genes *PIN* están involucrados, de manera indirecta, en la determinación del tamaño de la zona de proliferación celular. El análisis realizado en combinaciones de dobles mutantes de los genes *PIN1-4* y *7*, muestran reducciones en el tamaño del MAR y de la RP en general. Especialmente combinaciones con *PIN2*, principal componente del transporte de auxina basipétalo, en dobles, triples y cuádruples mutantes, evidenciando el papel importante de *PIN2* en el control de la longitud del MAR. Por otro lado, las mismas combinaciones de mutaciones de dobles y triples mutantes en estos genes afectan la longitud celular promedio de células diferenciadas, lo cual correlaciona con un tamaño

reducido de la zona de elongación. En general, la actividad de las proteínas PIN puede de manera individual, afectar el tamaño del MAR, el de la zona de elongación y el tamaño celular final de células diferenciadas (Blilou *et al.*, 2005). Sin embargo, análisis realizados del patrón de expresión del promotor *DR5* en el fondo de la mutante *sl* no evidenció alteraciones de la respuesta auxina, sugiriendo que *SL* participa durante la proliferación y la elongación celular en la RP de una manera independiente de la actividad de auxina.

A diferencia de la señalización por auxina, las citocininas principalmente regula el tamaño del MAR controlando la tasa de células que entran a la zona de elongación (Dello-loio *et al.*, 2007; Dello-loio *et al.*, 2008; Moubayidin *et al.*, 2010; Moubayidin *et al.*, 2013). No obstante, en estos trabajos mencionados no determinan directamente esta tasa. Las citocininas actúan en el dominio de transición, donde antagonizan el efecto de la auxina que principalmente promueve la división celular. La aplicación de citocinina exógena causa una disminución en el tamaño del MAR. Específicamente, las citocininas controlan el tamaño del MAR por medio de la determinación de la posición del dominio de transición y de esta manera regula la tasa del número de células que entran a la zona de elongación celular. La triple mutante *ipt3ipt5ipt7*, afectada en la biosíntesis de citocininas, presenta un mayor número de células del cortex en el MAR, reflejando una mayor tasa de crecimiento en la RP. Por tanto, bajos niveles de citocinina en el dominio de transición son suficientes para incrementar el tamaño del MAR (Dello-loio *et al.*, 2007). Además, el modo en que las citocininas antagonizan a la auxina en el dominio de transición es a través de su blanco *SHY2*, que regula negativamente a los genes *PIN* y simultáneamente la auxina promueve la degradación de *SHY2* en el MAR, manteniendo la actividad de *PIN* y la proliferación celular. De esta manera la interacción entre citocinina y auxina a través del gen *SHY2*, regula el tamaño del MAR y el crecimiento de la raíz (Dello-loio *et al.*, 2008). Siguiendo este escenario, probablemente la mutación en *SL* pudiese favorecer la señalización de la citocinina de manera que desplace el dominio de transición a una posición más cercana al ápice la raíz como se puede apreciar en el fenotipo de RP y RL's en la mutante *sl*. Por tanto, sería necesario hacer más pruebas para confirmar esta hipótesis, analizando tanto el contenido de citocinina como los niveles de expresión de los genes blancos directos de la señalización por citocinina. Con base en lo anterior, no podemos descartar la posibilidad de que en la mutante *sl* esté afectada la actividad de esta hormona en el desarrollo de la RP.

Además del efecto provocado por la interacción antagónica entre auxina y citocinina en la regulación del tamaño del MAR y así el desarrollo de la RP, se sabe que otras hormonas regulan el desarrollo de la RP tanto a nivel de la proliferación celular en el MAR como a nivel de la elongación celular. La giberelina (GA) regula el desarrollo de la RP positivamente. El análisis de la mutante deficiente en GA, *ga1-3*, indicó que presenta raíces más cortas, mientras que plantas mutantes que carecen de las proteínas DELLA, proteínas reguladoras negativas de la vía de señalización por GA, presentan RP con mayor longitud en comparación a el Wt (Fu y Harberd, 2003). Específicamente, por un lado, la GA regula la elongación celular a través de su señalización directa en la endodermis (Shani *et al.*, 2013). Cuando se induce una forma estable de la proteína DELLA en la endodermis de la zona de elongación, ocurre una inhibición de la elongación celular (Ubeda-Tomás *et al.*, 2008). Aunque, por otro lado, se ha reportado que la GA también promueve la proliferación celular en el MAR a través de su señalización, del mismo modo que en la zona de elongación, (Achard *et al.*, 2009; Ubeda-Tomás *et al.*, 2009). El análisis de plántulas tratadas con el inhibidor de la síntesis de GA, paclobutrazol (PAC), resulta en una tasa de crecimiento reducida de la RP debido a una reducción del tamaño del MAR y de la longitud de las células maduras. Las mutantes en la biosíntesis de GA, *ga1* y *ga3ox*, tienen una tasa de producción celular reducida, generando un MAR de menor tamaño, sin embargo, el tratamiento con GA exógena fue capaz de rescatar el tamaño del MAR en estas mutantes (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009). Aparentemente, la GA regula la proliferación y elongación celular, específicamente en la endodermis y de este modo controla indirectamente las tasa de división y de elongación celular en los otros tejidos de la raíz (Achard *et al.*, 2009; Ubeda-Tomás *et al.*, 2009). Además, esta regulación en el MAR es debida al efecto que tiene la señalización de GA en la maquinaria del ciclo celular. La acumulación de las proteínas DELLA incrementan los niveles de expresión de los de los genes que codifican inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKI) como Kip-related proteins (KRP) y SIAMESE (SIM). De manera partículas, la señalización por GA, induce la expresión de los genes *KRP2* y tres miembros de la familia SIM (*SIM*, *SMR1* y *SMR2*), reprimiendo la progresión del ciclo celular (Achard *et al.*, 2009). Sin embargo, no se sabe si este mecanismo, de la actividad de GA, participa de la misma manera tanto en la zona de elongación como en la la del MAR (Achard *et al.*, 2009; Ubeda-Tomás *et al.*, 2008; Ubeda-Tomás *et al.*, 2009). Por tanto, el análisis de mutantes relacionadas con la síntesis o la señalización de GA y de los efectos farmacológicos del inhibidor de la síntesis de GA revelan mecanismos

afectados semejantes a los que ocurren en el desarrollo de la RP en la mutante *sl*. Esto sugiere que probablemente existe una relación entre el fenotipo de *sl* y el fenotipo provocado por la actividad de GA. Sin embargo, es necesario efectuar análisis para corroborar si la mutante *sl* está afectada en la síntesis, transporte o señalización de GA y su impacto en la progresión del ciclo celular. De esta manera, el aumento en la duración del ciclo celular en *sl* en el MAR puede estar relacionado con la acumulación de proteínas represoras DELLA y por tanto, con el aumento de los niveles de CKI's. Además, la hipotética deficiencia de la actividad de GA en la mutante *sl* estaría relacionada con el fenotipo reportado de retraso en el tiempo de germinación en esta mutante (Torres-Martínez, 2012), debido al importante papel de GA como inductor de la germinación (Koornneef y van der Veen, 1980; Nambara *et al.*, 1991; Jacobsen y Olszewski, 1993; Ogawa *et al.*, 2003; Yamauchi *et al.*, 2004).

Al igual que la actividad mediada por GA, las hormonas Brasinoesteroides (BR), participan en el desarrollo de la RP, regulando tanto la proliferación como la elongación celular (González-García *et al.*, 2011; Hacham *et al.*, 2011). La longitud celular promedio y el número de células meristemáticas, así como la longitud total del MAR están reducidos en la mutante de pérdida de función del receptor de BR's, *bri1*. La alteración en la expansión celular en el MAR de la mutante *bri1* es más pronunciada en el dominio de transición. Los BR controlan el tamaño del MAR por medio de su señalización específicamente en la epidermis, independientemente del mecanismo de regulación antagonista de auxina-citocinina en el MAR (Hacham *et al.*, 2011). Asimismo, el análisis de las mutantes de ganancia de función *bes1*, con hipersensibilidad a BR, y de la mutante *bri1*, insensible a BR, mostró que éstas poseen mayor y menor longitud total promedio en células diferenciadas, respectivamente, en comparación al Wt. De esta manera, los BR regulan positivamente la expansión celular tanto en el MAR como en la zona de elongación (elongación rápida). El análisis en estas mismas mutantes *bes1* y *bri1*, evidenció que ambas presentan raíces más cortas que el Wt. Este escenario es reproducible cuando se analiza el efecto de la aplicación exógena de BR; en muy bajas concentraciones promueve el crecimiento de la raíz, mientras que concentraciones altas inhiben el crecimiento y reducen el tamaño del MAR; así el efecto de los BR en el tamaño del MAR es de manera dosis-dependiente. En relación con esto, las mutantes de pérdida (*bri1*) y de ganancia (*bes1*) de función tienen número reducido de células en el MAR. Por tanto, una señalización balanceada de BR controla el tamaño del MAR y el desarrollo

adecuado de la raíz. Además, los BR regulan positivamente el mantenimiento y la identidad del CQ. La aplicación exógena de BR potencia la expresión de marcadores de identidad del CQ (González-García *et al.*, 2011). A pesar de la actividad de BR regulando positivamente la identidad del CQ, la señalización por BR promueve la diferenciación de las células troncales distales (células iniciales de la columela) como se puede observar por la presencia de gránulos de almidón (presente sólo en células diferenciadas de la columela) en estas células (González-García *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar que la alteración en el balance de la señalización por BR reduce el tamaño del MAR y afecta la elongación celular de manera similar al efecto provocado por la mutación en *SL*, en esta mutante no se pueden observar efectos aparentes en la identidad del CQ. Además, también se ha observado que la señalización por BR afecta los niveles de expresión bajo la regulación del promotor *DR5* (Mouchel *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2003; Nemhauser *et al.*, 2004), la cual no está afectado en la mutante *sl*. Por otro lado sería interesante analizar el patrón de expresión de marcadores del CQ y el estado de diferenciación/indiferenciación de las células iniciales de la columela para establecer cómo participa *SL* en el adecuado mantenimiento del nicho de células troncales.

Otra hormona importante que regula el desarrollo de la raíz es el etileno (Achard *et al.*, 2003; Beaudoin *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2000; Iwama *et al.*, 2007; Le *et al.*, 2001; Olga-Martínez *et al.*, 2007). Por un lado se sabe que el etileno regula el desarrollo de la raíz ejerciendo su efecto en el proceso de elongación celular. Las raíces de plántulas tratadas con etileno muestran reducción de la longitud celular en la zona de elongación celular de manera dependiente de la concentración. Como resultado se observan tejidos diferenciados bastante cercanos al ápice. En relación con esto, en las raíces de plántulas tratadas con el inhibidor de síntesis de etileno, aminoetoxivinil glicina (AVG) y en las raíces de mutantes insensibles a etileno *etr1* y *ein2*, se observan células con mayor longitud que en el control (Le *et al.*, 2001). Por otro lado, el etileno modula la división celular en el CQ (Olga-Martínez *et al.*, 2007). En la mutante de pérdida de función *eto1* las células del centro quiescente se dividen. Estas mutantes producen excesivas cantidades de etileno debido a que el gen *ETO1* codifica para una ubiquitin-ligasa que regula negativamente los niveles de ACIDO AMINOCICLOPROPANO CARBOXÍLICO SINTASA (ACS5), esta enzima cataliza el paso limitante en la síntesis de etileno. Además, tanto en raíces de la mutante *eto1* como en raíces de plántulas del Wt tratadas con el precursor de etileno, ácido carboxílico 1-amino-1-ciclopropano (ACC), sometidas

al efecto del inhibidor de biosíntesis de etileno AVG suprime las divisiones supernumerarias en el CQ. Sin embargo, aparentemente la identidad de las células del CQ derivadas de las divisiones extra no es afectada por etileno (Ortega-Martínez *et al.*, 2007). Con base en los resultados de este trabajo, el fenotipo de la mutante *sl* parece no estar relacionado con etileno. Además, a diferencia del fenotipo de *eto1* provocado por la sobreproducción de etileno, la mutante *sl* no presenta divisiones celulares extra en el CQ (Fig. Sup. 2).

Contrario al efecto de la interacción entre ácido absísico (ABA) y etileno en la inhibición del desarrollo de la raíz (Beaudoin *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2000; Iwama *et al.*, 2007), también se ha reportado que concentraciones bajas de ABA estimulan el crecimiento de la raíz y esta estimulación es independiente de la vía de señalización por etileno (Ghassemian *et al.*, 2000). El ABA inhibe la división celular en el CQ y suprime la diferenciación celular tanto en células troncales distales como proximales en el MAR. En raíces de plántulas de mutantes deficientes de ABA (*aba1*, *aba2*, *aba3*) y en plantas del Wt tratadas con un inhibidor de la síntesis de ABA, fluridona, se pueden observar divisiones celulares extras en el CQ y diferenciación celular en células iniciales de la columela. Además, el efecto del tratamiento con ABA exógeno incrementa el número de células en el MAR, tanto en el dominio de proliferación celular como en el dominio de transición, mientras que tratamientos con fluridona reduce el número de células en ambos dominios. Sin embargo, el análisis de expresión de *CYCB1* muestra que raíces tratadas con ABA no presentan mayor tasa de proliferación celular y por tanto el tamaño incrementado del MAR es debido a la reducción de la tasa de diferenciación celular (Zhang *et al.*, 2010) o debido a la inhibición de la transición a elongación celular de las células del MAR. Por el contrario, aunque la reducción los niveles de ABA reduce el tamaño del MAR en ambos dominios como en la mutante *sl*, en esta mutante no se observan divisiones celulares extra en el CQ (Fig. Sup. 2), reduciendo la posibilidad de que el fenotipo del MAR en la mutante *sl* se deba a la acción de ABA.

Recientemente se ha reportado el efecto positivo de las estrigolactonas en el desarrollo de raíces incrementando su tamaño. La longitud de la raíz primaria de mutantes deficientes e insensibles a estrigolactonas, *max*, es menor en comparación al Wt debido a una reducción en el número de células en el MAR. Por lo contrario, plantas tratadas con la estrigolactona sintética, GR24, incrementan la longitud de la RP, resultado de un

aumento en el número de células en el MAR, tanto en el dominio de proliferación como en el de transición. Además, la estrigolactona modula los niveles de auxina; la mutante deficiente de estrigolactona *max4*, presenta incremento en el nivel de expresión del gen reportero fusionado al promotor *DR5* (Ruyter-Spira *et al*, 2011). Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente, en la mutante *sl* no se observaron cambios en la expresión regulado por el promotor *DR5*, por tanto, la actividad de estrigolactona no parece estar afectada en esta mutante.

En resumen, alteraciones en la actividad de diversas hormonas provocan fenotipos bastante parecidos al de la mutante *sl*, como afectaciones tanto en el proceso de proliferación celular como en el de elongación celular. Sin embargo, a pesar que la alteración de la actividad por auxina está descartada para afectar el desarrollo en la mutante *sl*, es difícil, basándose solamente por análisis de fenotipo, atribuir el desarrollo aberrante de la RP de *sl* al efecto particular de una hormona o al efecto concertado entre algunas de ellas, incluyendo la posibilidad de que pueda estar afectada la interacción entre estas y el efecto que puedan tener en la regulación de la maquinaria del ciclo celular.

Sin embargo, tampoco podemos excluir el hecho de que las hormonas no tengan algún papel fundamental en el fenotipo de la mutante *sl*. De hecho, actualmente se conocen genes que son importantes para el control de la progresión de la mitosis en el meristemo apical de la raíz. No obstante, solamente *HOBBIT/CDC27B* que codifica para un homólogo de la subunidad CDC27 del complejo de promoción de anafase, es requerido para acoplar procesos de proliferación y elongación/diferenciación celular en los meristemas, la mutante de pérdida de función *hbt* tienen afectada tanto la división como elongación celular (Blilou *et al.*, 2002; Pérez-Pérez *et al.*, 2008; Serralbo *et al.*, 2006). Aunque aparentemente el fenotipo de la mutante hipomórfica *hbt* es bastante parecido al de la mutante *sl* e incluso el papel de ambos genes (*HBT* y *SL*) en la RP parece traslaparse, es necesario realizar un análisis a nivel molecular, para descartar la posibilidad de que *SL* sea un alelo de *HBT* o incluso participe en la misma vía. Así, el hecho que los procesos de proliferación celular están afectados principalmente en la mutante *sl*, sugiere fuertemente que el gen mutado pueda participar de manera directa o indirecta en la maquinaria del ciclo celular. Mientras tanto en estos momentos no contamos con datos suficientes para verificar esta posibilidad.

Desarrollo de primordios de raíces laterales en la mutante *sl*.

Con base en el fenotipo de la mutante *sl*, se puede observar que aparentemente hay un menor número de RL's en comparación al tipo silvestre, sin embargo, los análisis cuantitativos realizados en este trabajo demostraron que en la mutante *sl* existe un mayor número de eventos de iniciación. Esto sugiere que, por un lado, el menor número de RL's evidentes en la mutante *sl* se debe principalmente a afectaciones durante el desarrollo de los PRL's que a su vez, retardan el proceso de emergencia y, por otro lado, al hecho de que el gen *SL* regula negativamente la iniciación de PRL's. En relación con las afectaciones durante el desarrollo de PRL's, los análisis a nivel celular demostraron la existencia de una morfología aberrante en etapas tardías del desarrollo de PRL's, acompañadas por una disminución en la expresión del marcador de respuesta a auxina *pDR5::VENUS-N7* en estas mismas etapas. Estos resultados en conjunto indican que, a diferencia de lo que ocurre en la RP, la actividad de auxina está afectada durante la morfogénesis tardía del PRL y esto retarda el proceso de emergencia. Por otro lado, el hecho que en etapas tardías del desarrollo del PRL en *sl* las células estén más grandes y que la emergencia ocurra de forma lenta, sugiere que de modo similar al fenotipo de la RP, en los PRL's también esté afectada la proliferación celular y, que de igual manera se deba a un aumento en la duración del ciclo celular, vinculada con un menor número de ciclos de división celular que experimentan estas células.

En línea con lo anterior, se sabe que la señalización por auxina durante el desarrollo del PRL no sólo es importante para la morfogénesis apropiada, sino que también esta señalización regula la expresión de genes que codifican para enzimas que participan en la remodelación de pared celular como el caso de la *EXPANSINA14 (EXP14)*, que es regulada directamente por LBD18 (Lee *et al.*, 2013) y de otros genes que también codifican para este tipo de enzimas pero que su expresión es regulada a través de la señalización por el péptido INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISISION (IDA) y los receptores tipo cinasa HAESA (HAE) y HAESA-LIKE2 (HSL2) (Kumpf *et al.*, 2013). En conjunto este tipo de regulación por auxina es importante para el paso del PRL a través de los tejidos que lo cubren (endodermis, cortex y epidermis).

Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, en la mutante *sl* existe una regulación diferencial por auxina en el desarrollo entre la RP y los PRL's. Se ha reportado que el desarrollo de RL's puede llevarse a cabo en dos fases desde el punto de vista de la

regulación por auxina. En la primera fase la iniciación del PRL es dependiente principalmente de la fuente de auxina proveniente del ápice de la RP, mientras que, en una segunda fase, la fase de emergencia, ésta es dependiente de la auxina proveniente de hojas. Los análisis que soportan este hecho son que la emergencia de PRL's puede ser inhibida por la remoción de tejidos aéreos pero esto tiene un efecto mínimo en la iniciación (Bhalerao *et al.*, 2002). Además, en relación con lo anterior, debido a la interacción entre estrigolactona y auxina; experimentos con la aplicación exógena de estrigolactona en plántulas, resultan en la disminución de los niveles de auxina en las hojas y esto provoca una significativa reducción de la densidad de RL's (Ruyter-Spira *et al.*, 2010).

Por otro lado, debido al hecho de que en la mutante *sl* exista un mayor número de eventos de iniciación, podemos formularnos la hipótesis de que esto es un resultado del aumento de la concentración de auxina en el ápice de la RP. No obstante será necesario efectuar análisis cuantitativos de la concentración de auxina libre en la RP de *sl* para corroborar dicha hipótesis.

En general, el gen *SL* regula de manera compleja el establecimiento del sistema radical en *A. thaliana*. Prueba de esto es el efecto diverso que se puede observar durante el desarrollo de la RP y de la iniciación, morfogénesis y emergencia de PRL's. Esto a su vez, está estrechamente relacionado con una regulación diferencial por la señalización de auxina en desarrollo de la RP y las RLs.

Identificación molecular del gen *SL*.

A través del análisis molecular se identificó el gen candidato responsable del fenotipo mutante en *sl*. Este gen pertenece al locus AT5G61800 que codifica para una proteína PPR. Las proteínas PPR son proteínas de unión a RNA y tienen hasta 30 repeticiones en tándem de motivos PPR (35 aminoácidos). Las proteínas PPR tienen funciones esenciales en el procesamiento post-transcripcional que toma lugar dentro de las mitocondrias y cloroplastos (Small y Peeters, 2000). El motivo PPR está constituido de dos alfa hélices en los extremos y una región inter-helical rica en tirosina (Schmitz-Linneweber y Small, 2008; Small y Peeters, 2000). Sin embargo, poco se sabe sobre el papel de estos genes en el desarrollo de raíz. Prasad *et al* (2005) identificaron al gen *LATERAL ORGAN JUNCTIONS (LOJ)* correspondiente al locus AT2G39230 que codifica

para una proteína con motivo PPR. El análisis del patrón de expresión de este gen, con expresión específica en todos los sitios de unión de órganos laterales, incluyendo la unión entre RL's y RP, sugiere su papel importante durante el desarrollo de órganos laterales. Por otro lado Zhu *et al.* (2012) aislaron una mutante de pérdida de función *SLOW GROWTH2 (SLO2)* que codifica para una proteína PPR. La mutante *slo2* se caracteriza por presentar un tamaño reducido en varios órganos incluyendo hojas, raíces y órganos florales debido a un crecimiento lento. Además, el análisis del patrón de expresión a partir del promotor de *SLO2* muestra una fuerte expresión en el ápice de la RP. En conjunto estos datos apuntan fuertemente a que *SL* puede ser un alelo del locus AT5G61800. Sin embargo, será necesario hacer más análisis y ensayos moleculares así como la complementación genética para corroborar lo anterior.

CONCLUSIONES.

- El gen *SL* es requerido para el crecimiento de la raíz primaria principalmente debido a su papel importante para el mantenimiento de la proliferación celular. En la mutante *s/* la duración el ciclo celular está significativamente aumentada, mientras que el número de ciclos celulares y el tamaño del meristemo apical de la raíz están significativamente disminuidos.
- EL gen *SL* regula la iniciación, morfogénesis y emergencia de raíces laterales de manera diferencial en forma dependiente de la señalización por auxina.
- EL gen *SL* participa de manera compleja en el correcto desarrollo y establecimiento del sistema radical en *A. thaliana*.

BIBLIOGRAFIA.

Achard, P. Gusti, A. Cheminant, S. Alioua, M. Dhondt, S. Coppens, F. Beemster, G. y Genschik, P. 2009. Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 19, 1-6.

Achard, P. Vriegen, W. Van Der Straeten, D. y Harberd, N. 2003. Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* 15, 2816-2825.

Aida, M. Beis, D. Heidstra, R. Willemsen, V. Blilou, I. Galinha, C. Nussaume, L. Noh, Y. Amasino, R. y Scheres, B. 2004. The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119, 109-120.

Beaudoin, N. Serizet, C. Gosti, F. y Giraudat, J. 2000. Interactions between Abscisic Acid and Ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12, 1103-1115.

Benfey, P. Bennett, M. y Schiefelbein, J. 2010. Getting to the root of plant biology: impact of the *Arabidopsis* genome sequence on root research. *Plant J* 61, 992-1000.

Benfey, P. Linstead, P. Roberts, K. Schiefelbein, J. Hauser, M. y Aeschbacher. 1993. Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 119, 57-70.

Benjamins, R. y Scheres, B. 2008. Auxin: the looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 443-465.

Benková, E. y Hejácíko, J. 2009. Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Mol. Biol.* 69, 383-396.

Berckmans, B. Vassileva, V. Schmid, S. Maes, S. Parizot, B. Naramoto, S. Magyar, Z. Kamei, C. Koncz, C. Bögre, L. Persiau, G. De Jaeger G. Friml, J. Beeckman, T. y De Veylder, L. 2011. Auxin-dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of *Arabidopsis* E2Fa by Lateral Organ Boundary Proteins. *Plant Cell* 23: 3671-3683.

Bhalerao, R. Eklöf, J. Ljung, K. Marchant, A. Bennett, M. y Sandberg, G. 2002. Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* 29, 325-332.

Blilou, I. Frugier, F. Folmer, S. Serralbo, O. Willemsen, V. Wolkenfelt, H. Eloy, N. Ferreira, P. Weisbeek, P. y Scheres, B. 2002. The *Arabidopsis* *HOBBIT* gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes Dev.* 16, 2566-2575.

Blilou, I. Xu, J. Wildwater, M. Willemsen, V. Paponov, I. Friml, J. Heidstra, R. Aida, M. Palme, K. y Scheres, B. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433, 39-44.

Celenza, J. Grisafi, P. & Fink, G. 1995. A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* 9, 2131-2142.

Chapman, E. & Estelle, M. 2009. Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Genet.* 43, 265-285.

Cui, H. Levesque, M. Vernoux, T. Jung, J. Paquette, A. Gallagher, K. Wang, J. Blilou, I. Scheres, B. Benfey, P. 2007. An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science* 316, 421-425.

Curtis, M. D. & Grossniklaus, U. 2007. Plant genetics and development. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley and Sons, Ltd: Chichester. 1-10.

Dello-Ioio, R. Nakamura, K. Moubayidin, L. Perilli, S. Taniguchi, M. Morita, M. Aoyama, T. Costantino, P. Sabatini, S. 2008. A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* 322, 1380-1384.

Dello-Ioio, R. Scaglia-Linhares, F. Scacchin, E. Casamitjana-Martínez, E. Heidstra, R. Constantino, P. & Sabatini, S. 2007. Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem by controlling cell differentiation. *Current Biology* 17, 678-682.

De Rybel, B. Vassileva, V. Parizot, B. Demeulenaere, M. Grunewald, W. Audenaert, D. Van Campenhout, J. Overvorrde, P. Jansen, L. Vanneste, S. MÖller, B. Wilson, M. Holman, T. Van Isterdael, G. Brunoud, G. Vuylsteke, M. Vernoux, T. De Veylder, L. Inzé, D. Weijers, D Bennett, M. & Beeckman, T. 2010. A novel Aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Current Biology* 20, 1697-1706.

De Smet, I. & Beeckman, T. 2011. Assymmetric cell division in land plants and algae: the driving force for differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 177-188.

De Smet, I. Lau, S. VoB, U. Vanneste, S. Benjamins, R. Rademacher, E. Schlereth, A. De Rybel, E. Vassileva, V. Grunewald, W. Naudts, M. Levesque, M. Ehrismann, J. Inzé, D. Luschnig, C. Benfey, P. Weijers, D. Van Montagu, M. Bennett, M. Jürgens, G. & Beeckman, T. 2009. Bimodular auxin response controls organogenesis in *Arabidopsis*. *PNAS* 107(6), 2705-2710.

De Smet, I. Vassileva, V. De Rybel, B. Levesque, M. Grunewald, W. Van Damme, D. Van Noorden, G. Naudts, M. Van Isterdael G. De Clercq R. Wang, J. Meuli, N.;Vanneste, S. Friml, J. Hilson, P. Jürgens, G. Ingram, G. Inzé, D. Benfey, P. & Beeckman, T. 2008. Receptor-like kinase ACR4 restricts formative cell divisions in the *Arabidopsis* root. *Science* 322, 594-597.

De Smet, I. Tetsumura, T. De Rybel, B. Frei dit Frey, N. Laplaze, L. Casimiro, I. Swarup, R. Naudts, M. Vanneste, S. Audenaert, D. Inzé, D. Bennett, M. & Beeckman, T. 2007. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* 134, 681-690.

DiDonato, R. Arbuckle, E. Buker, S. Sheets, J. Tobar, J. Totong, R. Grisafi, P. Fink, G. & Celenza, J. 2004. *Arabidopsis* *ALF4* encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. *The Plant Journal* 37, 340-353.

Di Laurenzio, L. Wysocka-Diller, J. Malamy, J. Pysh, L. Helariutta, Y. Freshour, G. Hahn, M. Feldmann, K. & Benfey, P. 1996. The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86, 423-433.

Dittmer, H. 1937. A quantitative study of the roots and root hairs of a winter rye plant (*Secale cereale*). *American Journal of Botany* 24 (7), 417-420.

Dolan, L. Janmaat, K. Willemsen, V. Lindstead, P. Poethig, S. Roberts, K. & Scheres, B. 1993. Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119, 71-84.

Dubrovsky, J. Gambetta, G. Hernández-Barrera, A. Shishkova, S. & González, I. 2006. Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Annals of Botany* 97, 903-915.

Dubrovsky, J. Doerner, P. Colón-Carmona, A. & Rost, T. 2000. Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124, 1648-1657.

Dubrovsky, J. Rost, T. Colón-Carmona, A. & Doerner, P. 2001. Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 214, 30-36.

Dubrovsky, J. Sauer, M. Napsucialy-Mendivil, S. Ivanchenko, M. Friml, J. Shishkova, S. Celenza, J. & Benkova, E. 2008. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *PNAS* 105 (25), 8790-8794.

Dubrovsky, J. Soukup, A. Napsucialy-Mendivil, S. Jeknic, Z. & M. G. Ivanchenko. 2009. The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Annals of Botany* (103): 807-817.

Feng, Z. Sun, X. Wang, G. Liu, H. & Zhu, J. 2012. LBD29 regulates cell cycle progression in response to auxin during lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 110: 1-10.

Fu, X. & Harberd, N. 2003. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 421, 740-743.

Fukaki, H. Nakao, Y. Okushima, Y. Theologis, A. & Tasaka, M. 2005. Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 44, 382-395.

Fukaki, H. Tameda, S. Masuda, H. & Tasaka, M. 2002. Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 29(2), 153-168.

Galinha, C. Hofhuis, H. Luijten, M. Willemsen, V. Blilou, I. Heidstra, R. & Scheres, B. 2007. PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* 449, 1053-1057.

Ghassemian, M. Nambara, E. Cutler, S. Kawaide, H. Kamiya, I. & McCourt, P. 2000. Regulation of Abscisic Acid signaling by Ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12, 1117-1126.

Gilmor, S. Lukowitz, W. Brininstool, G. Sedbrook, J. Hamann, T. Poindexter, P. & Somerville, C. 2005. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins are required for cell wall synthesis and morphogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17, 1128-1140.

Goh, T. Joi, S. Mimura, T. & Fukaki, H. 2012. The establishment of asymmetry in *Arabidopsis* lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and LBD/ASL proteins. *Development* 139: 883-893.

González-García, M. Vilarrasa-Blasi, J. Zhiponova, M. Divol, F. Mora-García, S. Russinova, E. & Caño-Delgado, A. 2011. Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in *Arabidopsis* roots. *Development* 138, 849-859.

Griffiths, A. Wessler, S. Lewontin, R. & Carroll, S. 2008. Introduction to genetic analysis. 9 th edition. W. H. Freeman and company. New York, USA. 838 pp.

Hacham, Y. Holland, N. Butterfield, C. Ubeda-Tomas, S. Bennett, M. Chory, J. Savaldi-Goldstein, S. 2011. Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development* 138, 839-848.

Helariutta, Y. Fukaki, H. Wysocka-Diller, J. Nakajima, K. Jung, J. Sena, G. Hauser, M. & Benfey, P. 2000. The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101, 555-567.

Hernández-Barrera, A. Ugartechea-Chirino, Y. Shishkova, S. Napsucialy-Mendivil, S. Soukup, A. Reyes-Hernández, B. Lira-Ruan, V. Dong, G. & Dubrovsky, J. 2011. Apical meristem exhaustion during determinate primary root growth in the *moots koom 1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 234, 1163-1177.

Hill, M. A. 2013. Main Page. Retrieved June 17, 2013, from: http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Main_Page.

Hirota, A. Kato, T. Fukaki, H. Aida, M. & Tasaka, M. 2007. The auxin-regulated AP2/EREBP gene *PUCHI* is required for morphogenesis in the early lateral root primordium of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19, 2156-2168.

Howell, S. 1998. Molecular genetics of plant development. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 364 pp.

Ishida, T. Fujiwara, S. Miura, K. Stacey, N. Yoshimura, M. Schneider, K. Adachi, S. Minamisawa, K. Umeda, M. & Sugimoto, K. 2009. SUMO E3 ligase HIGH PLOIDY2 regulates endocycle onset and meristem maintenance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21, 2284-2297.

Iwama, A. Yamashino, T. Tanaka, Y. Sakakibara, H. Kakimoto, T. Sato, S. Kato, T. Tabata, S. Nagatani, A. & Mizuno, T. 2007. AHK5 Histidine Kinase regulates root elongation through an ETR1-dependent Abscisic Acid and Ethylene signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 48 (2), 375-380.

Ivanov, V. & Dubrovsky, J. 1997. Estimation of the cell-cycle in the root apical meristem: a model of linkage between cell-cycle duration, rate of cell production, and rate of root growth. *Plant Science* 158(6):757-763.

Ivanov, V. & Dubrovsky, J. 2012. Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends in Plant Science* (2012) 1-7.

Jacobsen, S. & Olszewski, N. 1993. Mutations at the *SPLINDLY* locus of *Arabidopsis* alter Gibberellin signal transduction. *The Plant Cell* 5, 887-896.

Jung, J. & McCouch, S. 2013. Getting to the roots of it: genetic and hormonal control of root architecture. *Frontiers in Plant Sciences* 4, 1-32.

Jurado, S. Díaz-Triviño, S. Abraham, Z. Manzano, C. Gutierrez, C. & del Pozo, C. 2008. SKP2A, an F-box protein that regulates cell division, is degraded via the ubiquitin pathway. *The Plant Journal* 53, 828-841.

Kang, N. Lee, H. & Kim, J. 2013. The AP2/ERRBP gen *PUCHI* co-acts with *LBD16/ASL18* and *LBD18/ASL20* downstream *ARF7* and *ARF19* to regulate lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 0 (0): 1-9.

Koornneef, M. & D. Meinke. 2010. The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The plant journal* (61), 909-921.

Koornneef, M. & Scheres, B. 2001. *Arabidopsis thaliana* as an experimental organism. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley and Sons, Ltd

Koornneef, M & van der Veen, J. 1980. Induction and analysis of Gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet.* 58, 257-263.

Kuijt, S. & Schnittger, A. 2007. The plant cell cycle and its control. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley and Sons, Ltd

Kumpf, R. Shi, C. Larrieu, A. Sto, I. Butenko, M. Péret, B. Riiser, E. Bennett, M. & Aelen, R. 2013. Floral organ abscission peptide IDA and its HAE/HSL2 receptors control cell separation during lateral root emergence. *PNAS* 1-6.

Laskowski, M.; Williams, M.; Nusbaum, H. & Sussex, I. 1995. Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* 121, 3303-3310.

Le, J. Vandebussche, F. Van Der Straeten, D. & Verbelen, J. 2001. In the early response of *Arabidopsis* roots to Ethylene, cell elongation is up- and down-regulated and uncoupled from differentiation. *Plant Physiology* 125, 519-522.

Lee, H. Kim, N. Lee, D. & Kim, J. 2009. *LBD18/ASL20* regulates lateral root formation in combination with *LBD16/ASL18* downstream of *ARF7* and *ARF19* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151, 1377-1389.

Lee, H. Kim, M. Kim, N. Lee, S. & Kim, J. 2013. LBD18 acts as a transcriptional activator that directly binds to the *EXPANSIN14* promoter in promoting lateral root emergence of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 73: 212-224.

Levesque, M. Vernoux, T. Busch, W. Cui, H. Wang, J. Blilou, I. Hassan, H. Nakajima, K. Matsumoto, N. Lohmann, J. Scheres, B. & Benfey, P. 2006. Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in *Arabidopsis*. *Plos Biology* 4(5), 739-752.

Ljung, K. 2013. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140, 943-950. Na

Majer, C. & Hochholdinger, F. 2011. Defining the boundaries: structure and function of LOB domain proteins. *Trends in Plant Science* 18 (1): 47-52.

Malamy, J. & Benfey, P. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Development* 124, 33-44.

Malmberg, R. 2004. Plant mutagenesis and mutant screening. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley and Sons, Ltd: Chichester. 1-5.

Manzano, C. Ramirez-Parra, E. Casimiro, I. Otero, S. Desvoyes, B. De Rybel, B. Beeckman, T. Casero, P. Gutierrez, C. & del Pozo, J. 2012. Auxin and epigenetic regulation of *SKP2B*, an F-box that represses lateral root formation. *Plant Physiology* 160, 749-762.

Meink, D. Cherry, J. Dean, C. Rounsley, S. & Koornneef, M. 1998. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282, 662-667.

Moreno-Risueno, M. Van Norman, J. Moreno, A. Zhang, J. Ahnert, S. & Benfey, P. 2010. Oscillating gene expression determines competence for periodic *Arabidopsis* root branching. *Science* 329, 1306-1311.

Moubayidin, L. Perilli, S. Dello-Ioio, R. Di Mambro, R. Costantino, P. Sabatini, S. 2010. The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Current Biology* 20, 1138-1143.

Moubayidin, L. Di Mambro, R. Sozzani, R. Pacifici, E. Salvi, E. Terpstra, I. Bao, D. van Dijken, A. Dello-Ioio, R. Perilli, S. Ljung, K. Benfey, P. Heidstra, R. Costantino, P. y Sabatini, S. 2013. Spatial coordination between stem cell activity and cell differentiation in the root meristem. *Developmental Cell* 26, 405-415.

Mouchel, C. Osmont, K. & Hardtke, S. 2006. *BRX* mediates feedback between Brassinosteroid levels and auxin signaling in root growth. *Nature* 433, 458-461.

Nakamura, A. Higuchi, K. Goda, H. Fujiwara, M. Sawa, S. Koshiba, T. Shimada, Y. & Yoshida, S. 2003. Brassinolide induces *IAA5*, *IAA19*, and *DR5*, a synthetic auxin response element in *Arabidopsis*, implying a crosstalk point of Brassinosteroid and Auxin signaling. *Plant Physiology* 133, 1843-1853.

Nakajima, K. Sena, G. Nawy, T. & Benfey, P. 2001. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413, 307-311.

Nambara, E. Akazawa, T. & McCourt, P. 1991. Effects of the Gibberellin biosynthetic inhibitor uniconazol on mutants on *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 97, 736-738.

Nemhauser, J. Mockler, T. & Chory, J. 2004. Interdependency of Brassinosteroid and Auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plos Biology* 2(9), 1460-1471.

Ogawa, M. Hanada, A. Yamauchi, Y. Kamiya, Y. & Yamaguchi, S. 2003. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Cell* 15, 1591-1604.

Okushima Y. Fukaki, H. Onoda, M. Theologis, A. & Tasaka, M. 2007. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of *LBD/ASL* genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19, 118-130.

Okushima, Y. Overvoorde, P. Arima, K. Alonson, J. Chan, A. Chang, C. Ecker, J. Hughes, B. Lui, A. Nguyen, D. Onodera, C. Quach, H. Smith, A. Yu, G. & Theologis, A. 2005. Functional genomics analysis of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping function of *ARF7* and *ARF19*. *The Plant Cell* 17, 444-463.

Ortega-Martinez, O. Pernas, M. Carol, R. & Dolan, L. 2007. Ethylene modules stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science* 317, 507-510.

Pérez-Pérez, J. Serralbo, O. Vanstraelen, M. González, C. Criqui, M. Genschik, P. Kondorosi, E. & Scheres, B. 2008. Specialization of CDC27 function in the *Arabidopsis thaliana* anaphase-promoting complex (APC/C).

Petersson, S. Johansson, A. Kowalczyk, M. Makoveychuk, A. Wang, J. Moritz, T. Grebe, M. Benfey, P. Sandberg, G. & Ljung, K. 2009. An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by High-Resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *The Plant Cell* 21(6), 1659-1668.

del Pozo, J. Boniotti, M. & Gutierrez, C. 2002. *Arabidopsis* E2FC functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF (AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell* 14, 3057-3071.

del Pozo, J. & Estelle, M. 2000. F-box proteins and protein degradation: an emerging theme in cellular regulation. *Plant Molecular Biology* 44, 123-128.

Prasad, A. Sivanandan, C. Resminath, R. Thakare, D. & Srinivasan, B. 2005. Cloning and characterization of a Pentatricopeptide protein encoding gene (*LOJ*) that is specifically expressed in lateral organ junctions in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 353, 67-79.

Reyes, J. Muro-Pastor, I. & Florencio, F. 2004. The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology* 134, 1718-1732.

Ruyter-Spira, C. Kohlen, W. Charnikhova, T. van Zeijl, A. van Bezouwen, L. de Ruijter, N. Cardose, C. Lopez-Raez, J. Matusova, R. Bours, R. Verstappen, F. & Bowmeester, H. 2011. Physiological effects of the synthetic Strigolactone analog GR24 on root system architecture in *Arabidopsis*: another belowground role for Strigolactones? *Plant Physiology* 155, 721-734.

Sabatini, S. Beis, D. Wolkenfelt, H. Murfett, J. Guilfoyle, T. Malamy, J. Benfey, P. Leyser, O. Bechtold, N. Weisbeek, P. Scheres, B. 1999. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99, 463-472.

Sabatini, S. Heidstra, R. Wildwater, M. & Scheres, B. 2003. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes & Development* 17, 354-358.

Saini, S. Sharma, I. Kaur, N. & Pati, P. 2013. Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant Cell Rep* 32(6), 741-757.

Sarkar, A. Luijten, M. Miyashima, S. Lenhard, M.; Hashimoto, T. Nakajima, K. Scheres, B. Heidstra, R. & Laux, T. 2007. Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cells. *Nature* 446, 811-814.

Sauer, M. Robert, S. Kleine-Vehn, J. 2013. Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany* 64(9), 2565-2577.

Sena, G. Jung, J. & Benfey, P. 2004. Abroad competence to respond to SHORT ROOT revealed by tissue-specific ectopic expression. *Development* 131, 2817-2826.

Serralbo, O. Pérez-Pérez, J. Heidstra, R. & Scheres, B. 2006. Non-cell-autonomous rescue of anaphase-promoting complex function revealed by mosaic analysis of *HOBBIT*, an *Arabidopsis* *CDC27* homolog. *PNAS* 103 (35), 13250-13255.

Scheres, B. Benfey, P. & Dolan, L. 2002. Root Development. In: The Arabidopsis Book. Rockville, MD. American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0101.

Scheres, B. & Wolkenfelt, H. 1998. The *Arabidopsis* root as a model to study plant development. *Plant Physiol. Biochem* 36 (1-2), 21-32.

Schmitz-Linneweber, C. & Small, I. 2008. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends in Plant Science* 13 (12), 663-670.

Shani, E. Weinstain, R. Zhang, Y. Castillejo, C. Kaiserli, E. Chory, J. Tsien, R. & Estelle, M. 2013. Gibberellins accumulate in the elongating endodermal cells of *Arabidopsis* root. *PNAS* 110 (2), 4834-4839.

Small, I. & Peeters, N. 2000. The PPR motif-a TPR-related motif prevalent in plant organellar protein. *Trends Biochem. Sci.* 25, 46-47.

Schneeberger, K. Ossowski, S. Lanz, C. Juul, T. Petersen, A. Nielsen, K. Jorgensen, J. Weigel, D. y Andersen, S. 2009. SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nature Methodes* 6(8), 550-551.

Sparks, E. Wachsman, G. & Benfey, P. 2013. Spatiotemporal signaling in plant development. *Genetics* 14, 631-644.

Stahl, Y. Wink, R. Ingram, G. & Simon, R. 2009. A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Current Biology* 19, 909-914.

Steeves, T. & Sussex, I. 1989. Patterns in plant development. 2nd. Edition. Cambridge University Press. New York, USA. 388 pp.

Taiz, L. & Zeiger, E. (2002). Plant Physiology, 3rd edition. Sinauer Associates. Sunderland, MA, USA. 792 pp.

Tanaka, H. Dhonukshe, P. Brewer, P. & Friml, J. 2006. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2738-2754.

Teale, W. Paponov, I. & Palme, K. 2006. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Molecular Cell Biology* 7, 847-859.

Torres-Martínez H. 2012. Caracterización fenotípica de la mutante *short lateral root (sl)* de *Arabidopsis thaliana* afectada en el desarrollo del sistema radical. Tesis de Licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 47 pp.

Ubeda-Tomás, S. Federici, F. Casimiro, I. Beemster, G. Bhalerao, R. Swarup, R. Doerner, P. Haseloff, J. & Bennett, M. 2009. Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristems size. *Current Biology* 19, 1194-1199.

Ubeda-Tomás, S. Swarup, R. Coates, J. Swarup, K. Laplaze, L. Beemster, G. Hedden, P. Bhalerao, R. & Bennett, M. 2008. Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nature Cell Biology* 10 (5), 625-628.

Van den Berg, C. Willemsen, V. Hendriks, G. Weisbeek, P. & Scheres, B. 1997. Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390, 287-289.

Vanneste, S. & Friml, J. 2009. Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136, 1005-1016.

Van Norman, J. & Benfey, P. 2009. *Arabidopsis thaliana* as a model organism in systems biology. John Wiley and Sons. *Syst. Biol. Med* 1, 372-379.

Vanstraelen, M. Balaban, M. Da Ines, O. Cultrone, A. Lammens, T. Boudolf, V. Brown, S. De Veylder, L. Mergaert, P. & Kondorosi, E. 2009. APC/C^{CCS52A} complexes control meristem maintenance in the *Arabidopsis* root. *PNAS* 106(28), 11806-11811.

Welch, D. Hassan, H. Blilou, I. Immink, R. Heidstra, R. Scheres, B. 2007. *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.

Westhoff, P. Jeske, H. Jürgens, G. Kloppstech, K. & Link, G. 1998. Molecular plant development: from gene to plant. Oxford University Press. New York, USA. 272 pp

Willemsen, V. Wolkenfelt, H. de Vrieze, G. Weisbeek, P. & Scheres, B. 1998. The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 125, 521-531.

Wilmoth, J. Wang, S. Tiwari, S. Joshi, A. Hagen, G. Guilfoyle, T. Alonso, J. Ecker, J. & Reed, J. 2005. NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *The Plant Journal* 43, 118-130.

Yamauchi, Y. Ogawa, M. Kuwahara, A. Hanada, A. Kamiya, Y. & Yamaguchi, S. 2004. Activation of Gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *The Plant Cell* 16, 367-378.

Zhang, H. Han, W. De Smet, I. Talboys, P. Loya, R. Hassan, A. Rong, H. Jürgens, J. Knox, J. & Wang, M-H. 2010. ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the *Arabidopsis* primary root meristem. *The Plant Journal* 64, 764-774.

Zhu, Q. Dugardeyn, J. Zhang, C. Takenaka, M. kühn, K. Craddock, C. Smalle, J. Karampelias, M. Denecke, J. Peters, J. Gerats, T. Brennicke, A. Eastmond, P. Meyer, E. & Van Der Streaten, D. 2012. SLO2, a mitochondrial pentatricopeptide repeat protein affecting several RNA editing sites, is required for energy metabolism. *The Plant Journal* 71, 836-849.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

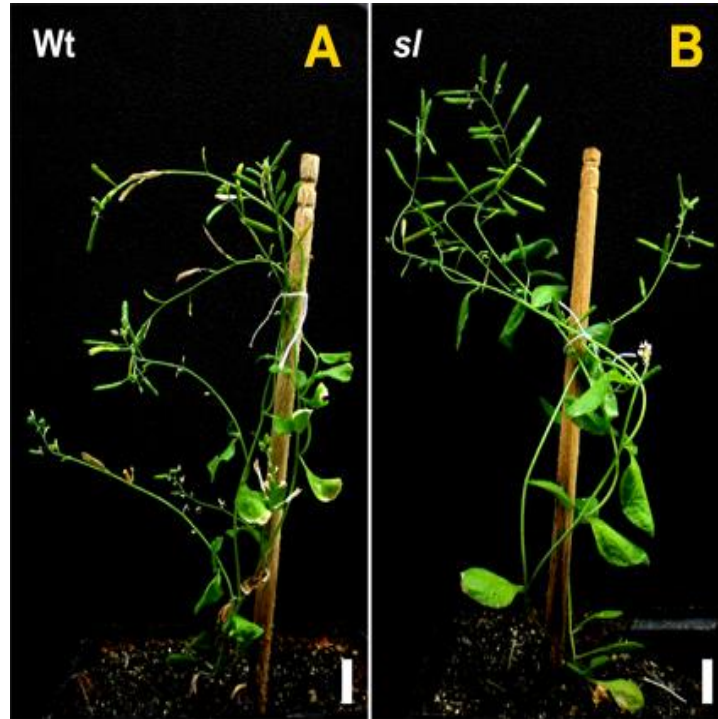


Fig. Sup. 1 Fenotipo del brote en el tipo silvestre (A) y la mutante *sl* (B). Plantas de 60 dpv. Barra = 1cm

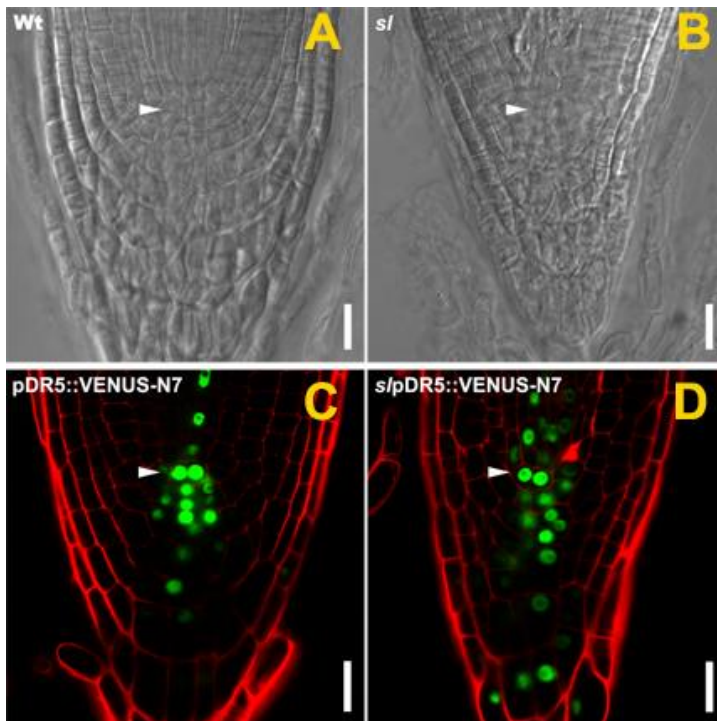


Fig. Sup. 2 Organización del MAR. (A y B) Meristemo apical de la RP con óptica Nomarski en Wt (A) y *sl* (B). (C y D) Expresión del promotor *pDR5::VENUS-N7* con microscopía laser confocal de barrido en Wt (C) y *sl* (D). Análisis realizados en la RP de plantas de 10 dpv. La fluorescencia en rojo de (C y D) es producida por la tinción de paredes celulares con IP como contraste. Las cabezas de flechas en blanco muestran la posición del CQ. Barra de escala = 20µm

AT5G61800

atgataaattatagtagttgttcataatctcttgaagctgtgtagaacccttaaacaatctg
catcagtttcatgcccaattcatcacttccggcagaatctctaagatttcaaacaaaac
tctgttttcgccaatgtcctcttcgccatcacctctatttcacogtctgcgctcggcgctg
aaggaggtcgtgagctacgcgacttcagttttcagattcatcacaacccttcaacgttt
tgtttcaatacgatcattaggatttgtagcgttcatgagccgtcgtctctgtcttctaaa
cgtttcttcgctcgagatgacgacgtcgtctgttccctccagatttccacactttccctttc
gtattcaaggcttgtgcagcaaagaagaatggtgatcttacattagtcagactctgcat
tgtcaagctttgagattcggattgttatctgatttgttcactttgaacactctgattcgt
gttactcattgattgctccaatcgatagtgcccttgcaactgttccgacgaaaatcctcaa
agagatgttgttacctacaatgtgttgatcgacgggttagtgaag**g**cacgtgagattggt
cgtgcaagagagttgtttgattcaatgcccttacgtgatttggtttcgtggaatagtctc
atctctggttatgacgagatgaatcattgcagagaagcaatcaaactcttcgacgagatg
gttgctttgggtctaaaacccgataatgtcgccattgtttcaactctttcagcttgtgca
caatcaggggattggcaaaaagggaagctattcatgattacacgaaaaggaagagactt
ttcattgattccttcttagctactggattggtggatttctatgcaaaatgtggtttcatc
gatacagcgatggagatcttcgaattatggttcagataaaactttattcacatggaatgca
atgatcactgggtcttgcaatgcacggtaacgggtgagctaacggttgattacttccgtaag
atggttagttctggaatcaaaccagacggagtaaccttcataagtgttttagtgggttgc
agccattctgggtctagttgatgaagccaggaaccttttgaccaaagatcctttgtat
gatgttaatagagagatgaagcattacgggtgtatggcggatttgcttgggaagagcagga
ttgatcgaagaagcagcggaaatgatcgagcaaatgcctaagatggaggaaacagagag
aaactcttagcatggagcgg

Fig. Sup. 3. Secuencia de nucleótidos de DNA genómico del locus AT5G61800. El nucleótido en negritas (**g**), indica el sitio de la mutación puntual en *sl*. Las secuencias subrayadas indican los sitios de unión de los oligonucleótidos utilizados.