



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Variabilidad fenotípica en la raíz de *Arabidopsis thaliana* y su correlación con expresión génica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A
P R E S E N T A:

PAMELA ACEVES GARCÍA



DIRECTOR DE TESIS:
Ma. De La Paz Sánchez Jiménez
2015

Ciudad Universidad, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Aceves
García
Pamela
57 86 14 57
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308047891

2. Datos del tutor

Dra.
Ma. de la Paz
Sánchez
Jiménez

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Mariana
Benítez
Keinrad

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Adriana
Garay
Arrollo

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Aurora
Zlotnik
Espinosa

6. Datos del sinodal 4

Biól.
Rodrigo
González
Barrios De la Parra

7. Datos del trabajo escrito

Variabilidad fenotípica en la raíz de *Arabidopsis thaliana* y su correlación con expresión génica.
85 pp
2015

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos académicos

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

Agradezco a César Iván Ojeda y a Mariana Benítez por transmitirme sus vastos conocimientos sobre morfometría, a Rodrigo Muñoz y Leonardo Calzada por su amistad y ayuda con los análisis estadísticos y la realización del mapa geográfico, respectivamente. A todos los miembros del jurado por su constante apoyo, por las enseñanzas que me brindaron a lo largo de mi carrera y las sugerencias que enriquecieron este proyecto.

El financiamiento para insumos y otras actividades relevantes a esta investigación provino de proyectos de investigación CONACYT: 240180, 180380, 167705, 152649 y UNAM-DGAPA-PAPIIT: IN203113, IN203214, IN203814.

Esta tesis se realizó gracias al apoyo de beca para tesis de licenciatura del proyecto “Becas de Titulación 2014 para la Educación Superior” otorgado por la Secretaría de Educación Pública (SEP), a través de la Coordinación Nacional de Becas de Educación Superior (CNBES).

Agradecimientos personales

A mi mamá, Myrna, por ser mi ejemplo de inspiración y fortaleza; gracias por tu apoyo, dulzura, confianza y amor incondicional toda mi vida. A mi papá José Antonio, gracias por tus consejos, enorme diversión y amor infinitos, porque hiciste de mi infancia lo mejor que alguien pudiera desear. A mis abuelos Isaura y Guillermo, por su sabiduría, charlas de vida y apoyo en todo momento; por criarme como suya y amarme de la misma forma. Mi hermano, Marco, una persona tan especial en mi vida y con el cual paso los mejores momentos de risas, pláticas de ciencia y burlas inocentes. Ustedes, mi familia, sin los cuales no hubiera logrado nada de lo que soy, les agradezco su guía constante en todas las etapas de mi vida. Gracias por su cuidado, apoyo moral y económico, su eterna confianza y por el lazo tan grande y lleno de virtud que formamos. No pude desear una mejor familia. Este triunfo es para ustedes. Los amo.

A mis amigos de la preparatoria y universidad, excelentes personas con las que pasé experiencias inolvidables. Gracias a ustedes ésta fue la mejor etapa de mi vida, llena de fiesta, baile y a la vez, de nuevos conocimientos en cada reunión. Son los mejores y sé que lograrán grandes cosas. A mis primas Yaz, Karen, Dany y a mis amigos externos, gracias por todas las aventuras que pasamos y por su absoluta confianza.

A Diego Hernández, que me brindó su compañía, cariño y apoyo. Te agradezco por toda nuestra historia y por hacerme crecer tanto como persona. Siempre estarás en mí.

A mis compañeros del laboratorio, por su ayuda incondicional y las buenas charlas, por hacer del espacio de trabajo un lugar ameno y divertido. Gracias sobre todo a los epichicos por compartir tan buenas ideas y brindarme su apoyo cuando lo requería.

A mi tutora, Marypaz, por la dedicación y paciencia que me tuvo durante la realización de este proyecto; por todos los conocimientos y la motivación que me transmitió desde el inicio, y lo seguirá haciendo. Eres mi ejemplo en el ámbito profesional.

A mis profesores, por encaminarme y forjarme para ser una buena bióloga, por transmitirme su pasión al estudio de la vida. Especialmente a David Romeu de quien aprendí tanto no sólo en el ámbito académico.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma máter*.

“El cosmos es todo lo que es, todo lo que fue y todo lo que alguna vez será. Nuestras más ligeras contemplaciones del cosmos nos hacen estremecer y sentir como una suerte de cosquilleo que nos llena los nervios, una voz silenciosa, una ligera sensación como si de un recuerdo lejano se tratase o como si cayéramos desde una gran altura. Sabemos que nos aproximamos al mayor de los misterios.”

Carl Sagan

Nunca olvides el placer de hacer ciencia...

Índice

1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	9
2.1 Variación Natural.....	10
2.11 El papel de la genética en la variación natural.....	10
2.12 El papel de la epigenética en la variación natural.....	12
2.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> : un excelente modelo para el estudio de la variación natural.....	15
2.3 Estructura de la raíz de <i>A. thaliana</i>	18
2.4 Genes involucrados en el desarrollo de la raíz.....	21
2.41 Factores transcripcionales.....	21
2.42 Factores epigenéticos.....	24
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. HIPÓTESIS.....	28
5. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo general.....	29
5.2 Objetivos particulares	29
6. MATERIALES Y MÉTODO	30
6.1 Material biológico	30
6.2 Determinación de las condiciones ambientales.....	30
6.3 Condiciones de crecimiento	30
6.4 Cinética de crecimiento.....	31
6.5 Análisis morfométricos.....	31
6.6 Análisis de las raíces mediante microscopía de luz.....	33
6.7 Análisis de las raíces mediante microscopía confocal	33
6.8 Pruebas estadísticas y correlaciones.....	34
6.9 Extracción de RNA y RT-PCR.....	34
6.10 Reacciones en Cadena de la Polimerasa	35
7. RESULTADOS.	36
7.1 Distribución geográfica y ambiental de los ecotipos de <i>A. thaliana</i>	36
7.2 Variabilidad fenotípica de la roseta en diferentes ecotipos de <i>A. thaliana</i>	40

7.3 Variabilidad fenotípica de la raíz en diferentes ecotipos de <i>A. thaliana</i> .	42
7.4 Correlación entre el tamaño de la raíz y las condiciones ambientales del lugar de origen....	45
7.5 Análisis morfométricos de la raíz.	48
7.6 Relación entre el tamaño de la raíz y la longitud del meristemo.....	54
7.7 Variación en la organización del QC y las células iniciales de RAM entre ecotipos.	59
7.8 Expresión <i>in silico</i> de los genes MADS-box y factores epigenéticos en la parte aérea de los ecotipos de <i>A. thaliana</i> .	61
7.9 Expresión de genes MADS-box y factores epigenéticos en la raíz de los ecotipos de <i>A. thaliana</i> .	64
7.10 Análisis comparativo de la expresión génica de los MADS-box y factores epigenéticos en raíz y en parte aérea.....	66
8. DISCUSIÓN.....	68
8.1 Influencia del origen geográfico y sus condiciones ambientales en las variaciones morfológicas de la raíz de los ecotipos de <i>A. thaliana</i>	68
8.2 Variaciones morfológicas de la raíz entre ecotipos de <i>A. thaliana</i> .	70
8.3 Variabilidad morfológica de la raíz y expresión génica de los MADS-box y factores epigenéticos	72
9. CONCLUSIONES	77
10. GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	78
11. REFERENCIAS	79
12. ANEXO	84

1. RESUMEN

La variabilidad fenotípica presente en las poblaciones de seres vivos ha permitido que los organismos puedan responder de manera diferencial ante las condiciones de su ambiente para sobrevivir. Sus causas son diversas y complejas, e incluyen los efectos genéticos y epigenéticos, que se encargan de integrar las señales ambientales para poder dar una respuesta molecular y morfo-fisiológica adecuada. Para estudiar esto, *Arabidopsis thaliana* resulta un excelente modelo por la gran diversidad de fenotipos que encontramos entre poblaciones, así como por la distribución geográfica y ambiental diversa en la que se localizan. Para entender algunos de los mecanismos moleculares que intervienen en la diversidad fenotípica de la raíz de *A. thaliana*, en este proyecto se describieron las diferencias en la morfología de la raíz en distintas variedades de la especie (i.e ecotipos) demostrando variabilidad en la longitud total y forma de la raíz, longitud y organización del meristemo, así como en la expresión de genes esenciales para el desarrollo de este órgano, como son los factores transcripcionales MADS-box (*XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19*) y las metiltransferasas de los factores TrxG y PcG, implicados en la regulación epigenética. Las diferencias encontradas en el tamaño y arquitectura radicular son de especial interés para comprender la capacidad de adaptación natural de las plantas a un ambiente determinado, por lo que su relación con la expresión génica en función de las condiciones ambientales de origen de cada ecotipo se discuten en este trabajo.

2. INTRODUCCIÓN

Las diferencias morfológicas, fisiológicas y de desarrollo que están presentes entre las poblaciones de seres vivos han permitido que los organismos puedan responder de manera diferencial ante las condiciones de su ambiente para sobrevivir. La variación natural que se encuentra entre las poblaciones ha sido atribuida principalmente a las mutaciones, una fuerza evolutiva que puede actuar junto con la selección natural para aumentar la adecuación de un fenotipo, confiriéndole cierta ventaja sobre otros en un medio ambiente determinado (Weigel, 2012). De hecho, los humanos hemos aprovechado esa variación intraespecífica desde hace miles de años para la domesticación y el mejoramiento genético de una gran cantidad de plantas (Alonso-Blanco *et al.*, 2005). Aunque las modificaciones en el genotipo alguna vez fueron vistas como la única causa de la variación fenotípica, en la actualidad se ha reconocido que los mecanismos epigenéticos pueden estar involucrados (O'Malley & Ecker, 2012), ya que se encargan de integrar las señales ambientales para poder dar una respuesta molecular y morfo-fisiológica adecuada.

Las plantas, al ser organismos sésiles, requieren responder ante las condiciones adversas que se les presenten a través de la plasticidad en diversos caracteres, lo cual les permite ajustar su morfología como el tamaño de hoja o raíz, generando mayor diversidad fenotípica. La plasticidad fenotípica se entiende como la capacidad de los genotipos individuales para producir diferentes fenotipos cuando se exponen a condiciones ambientales distintas (Pigliucci *et al.*, 2006); sin embargo, a través del tiempo los cambios generados pueden heredarse transgeneracionalmente fijándose en las poblaciones, lo que se conoce como asimilación genética (Waddington, 1942). Al respecto, en las plantas se han hecho diversos estudios sobre los mecanismos generadores de la variabilidad fenotípica y *Arabidopsis thaliana* resulta un excelente modelo en estudios de genética, biología molecular, evolución y desarrollo por la gran diversidad de fenotipos que encontramos en la especie, la distribución geográfica y ambiental tan amplia en la que se localizan, así como la amplia información disponible, que se requiere para llevar un análisis integral sobre el tema.

2.1 Variación Natural

Las observaciones de Charles Darwin fueron esenciales para la comprensión de la variación natural pues dedicó gran parte de “El origen de las especies” a dilucidar dicho concepto y sus implicaciones, concluyendo que las diferencias individuales que se heredan son el precursor para generar a las variedades, las cuales tienen un menor número de diferencias que las existentes entre especies del mismo género (Darwin, 1859). Actualmente definimos a la variación natural como la distribución de características morfológicas, fenológicas, de desarrollo y bioquímicas que se expresan dentro y entre los distintos taxones, cuyas causas son diversas y además complejas pues incluyen a los efectos genéticos y epigenéticos (Kalisz & Kramer, 2008).

2.1.1 El papel de la genética en la variación natural

La variación genética es una medida de los cambios que se encuentran en una secuencia a nivel de DNA en los individuos de una población (Reece *et al.*, 2014). La variación genética tiene su origen en las mutaciones, que son alteraciones en la secuencia de DNA, las cuales suceden mayoritariamente durante la replicación de éste o debido a mutágenos (Futuyma, 1942). Las mutaciones pueden involucrar el cambio de una sola base nitrogenada, así como fragmentos de un cromosoma, tales como el movimiento de los elementos transponibles (TEs), recombinaciones aberrantes, etc. Las mutaciones en general se consideran eventos azarosos; es decir, no se puede predecir la localización ni dirección que seguirán, y tienen consecuencias evolutivas sólo si se transmiten a la siguiente generación; sin embargo, recientemente el paradigma entorno a este fenómeno ha cambiado, pues se demostró la existencia de mutaciones interpretativas o que ocurren en respuesta a cambios del medio ambiente (Jablonka & Lamb, 2005). La tasa de mutación en general es muy baja, en promedio suceden con una tasa de 3×10^{-8} mutaciones sobre nucleótido por generación en humanos (Xue *et al.*, 2009). En *A. thaliana* se encontró que durante 30 generaciones en el ecotipo Col-0 se presentaron 99 sustituciones y 17 deleciones e inserciones; concluyendo que la tasa de mutación fue de 7×10^{-9} por par de base por generación y la mayoría son del tipo transición G:C→A:T (Ossowski *et al.*, 2010).

Por lo tanto, si consideramos que *A. thaliana* tiene 125 millones de pares de bases, se presentarían 0.875 mutaciones por gameto por generación.

El estudio de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) resulta muy útil para la detección del nivel de variación presente en las poblaciones. Los polimorfismos se definen como aquellas variantes alélicas que tienen una frecuencia mayor al 1% en las poblaciones (Futuyma, 1942). En *A. thaliana* se demostró que aunque los polimorfismos son poco frecuentes, existe más variación genética de la que se esperaría para esta especie que mayoritariamente se autopoliniza (Koorneef *et al.*, 2004). Algunos autores afirman que dentro de esos polimorfismos se incluye un número grande de alelos raros entre las poblaciones (Schmid *et al.*, 2006), conformados en su mayoría por mutaciones no sinónimas, lo que sugiere que la selección natural ha estado involucrada en este fenómeno (Nordborg *et al.*, 2005). Para encontrar la relación entre la variabilidad genética y la adaptación de la especie a un entorno determinado, se han realizado análisis de genética de poblaciones que han arrojado resultados bastante controversiales; sin embargo, los estudios más recientes y con un tamaño muestral mayores demuestran que sí hay una asociación entre el origen geográfico y la variabilidad genética (Nordborg *et al.*, 2005; Schmid *et al.*, 2006; Pico *et al.*, 2008; Brennan *et al.*, 2014); es decir, las diferentes regiones geográficas presentan genotipos particulares y de esta forma, se demuestra que existe aislamiento por distancia entre las poblaciones de *A. thaliana*.

Por otro lado, una parte de la variación genética surge a través de la recombinación. En muchos organismos que presentan reproducción sexual, la variación se da por la unión de gametos genéticamente distintos dando lugar al entrecruzamiento entre cromosomas homólogos y a la segregación independiente de cromosomas no homólogos. La recombinación tiene efectos distintos en la variación: puede ser negativa si provoca que se pierdan combinaciones favorables de genes, pero también puede ser positiva al generar combinaciones múltiples de alelos que generan más variación por generación que la mutación en sí misma (Futuyma, 1942; Eguiarte, 1986).

Durante varios años la variabilidad fenotípica se atribuyó únicamente a la genética y ha sido estudiado más detalladamente bajo este enfoque; sin embargo, actualmente se sabe que los mecanismos epigenéticos están involucrados en la generación de distintas respuestas morfo-fisiológicas, que incluso pueden tener un efecto sobre los procesos adaptativos, explicando así una relación entre los cambios epigenéticos heredables y las características ecológicas de los hábitats (Richards *et al.*, 2012).

2.12 El papel de la epigenética en la variación natural

El término epigenética se definió por primera vez en 1940 por Conrad Waddington, como el estudio de los genes, sus productos, y las interacciones causales de estos que conducen a la formación de un fenotipo (Waddington, 1942), esclareciendo lo complicado que era hacer una relación lineal entre el genotipo y el fenotipo. Actualmente esta definición se ha transformado para explicar los cambios mitóticos y/o meióticos en la función génica que no pueden ser explicados por cambios en el DNA (Feil & Fraga, 2011) y que además son procesos que subyacen la plasticidad y canalización durante el desarrollo de un organismo originando efectos persistentes a través de las generaciones (Jablonka & Raz, 2009). Conforme pasa el tiempo los estudios epigenéticos son cada vez mayores y más profundos, haciendo de esta disciplina un área fascinante y novedosa que está modificando los paradigmas de la herencia y la variación.

La cromatina es una unidad compuesta por los nucleosomas, los cuales están formados por un octámero de histonas donde se enrolla el DNA, y que son capaces de regular y estructurar regiones específicas del genoma (Luger *et al.*, 1997). Dicha regulación se puede dar a través de modificaciones covalentes en el DNA y en las histonas como son: metilaciones, acetilaciones, ubiquitinaciones, sumoilaciones, ADP ribosilaciones y/o fosforilaciones (Li *et al.*, 2007). Estas modificaciones están a cargo de proteínas que se unen directa o indirectamente a regiones del DNA, las cuales son capaces de regular la expresión de los genes controlando su transcripción a través del movimiento dinámico de la cromatina. A diferencia de los cambios genéticos que son muy estables, los cambios epigenéticos pueden ser reversibles (Holliday, 2006).

Diversos estudios han esclarecido el efecto de la epigenética en la variación natural pues se ha encontrado que entre los individuos existe variación en la cantidad y posición de marcas epigenéticas, como la metilación del DNA, la cual puede crear cambios en la expresión de ciertos genes y en algunas ocasiones heredarse establemente a las siguientes generaciones (Vaughn *et al.*, 2007; Kalisz & Kramer, 2008; Lira-Medeiros *et al.*, 2010; Becker *et al.*, 2011). Debido a esto, se determinó lo que se conoce como “epialelos” y que se define como aquellas variantes alélicas a nivel transcripcional resultado de las diferencias en las marcas epigenéticas (O'Malley & Ecker, 2012). Por ejemplo, se han identificado epialelos como *SUPERMAN (SUP)* o *FLOWERING WAGENINGEN (FWA)* que al presentar distintos niveles de metilación del DNA tienen efectos diferentes sobre la morfología de la flor (Jacobsen & Meyerowitz, 1997; Soppe *et al.*, 2000). Estudios realizados en variantes genéticas de *A. thaliana* han demostrado que la epigenética tiene un papel relevante en la diversidad fenotípica, como es el caso del gen *Qua-Quine Starch (QQS)*, involucrado en el metabolismo del almidón en hojas, en donde se observa que en 29 poblaciones distintas dicho gen está metilado en el promotor y presenta expresión baja; al contrario de 7 poblaciones en donde el gen está desmetilado y tiene una alta expresión (Silveira *et al.*, 2013). Además, realizando otros estudios se comprueba que la variación en este gen es independiente de los polimorfismos en la secuencia y se hereda establemente. Otro ejemplo muy estudiado es el del gen *FLC* de *Arabidopsis*, el cual se sabe que está regulado por complejos antagónicos que metilan las histonas y se encargan de reprimir o activar al gen, contribuyendo a las diferencias entre variedades de plantas anuales de verano y anuales de invierno durante el proceso de vernalización (Song *et al.*, 2012).

Estos ejemplos indican que la epigenética contribuye de manera muy importante en la variación fenotípica. Específicamente en organismos sésiles como las plantas que dependen tanto de las condiciones ambientales en las que están creciendo (temperatura, luz, suelo, humedad, etc.), las marcas epigenéticas constituyen un método versátil y rápido de regulación de la expresión génica que es menos permanente que la variación genética (Kalisz & Kramer, 2008).

En palabras de Herrera and Bazaga (2010): “...los mecanismos epigenéticos podrían agregar una capa adicional de complejidad a la variación fenotípica heredable, y por lo tanto a la diversidad y el potencial evolutivo de las poblaciones naturales”.

La extraordinaria variación que existe en las plantas ha sido estudiada con diversos fines, desde el aspecto ecológico hasta el económico; y la profundización en el tema usando a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* es de gran utilidad debido a las características que presenta como: ciclo de vida corto, gran número de descendencia, su pequeño genoma repartido en cinco cromosomas y la disponibilidad sin precedentes de datos genéticos y genómicos (Alonso-Blanco *et al.*, 2009) recopilados en bases de datos como www.arabidopsis.org, que es de libre acceso. Además de que las investigaciones en *A. thaliana* tienen aplicaciones potenciales para una gran mayoría de plantas con flor pues ésta mantiene las características de muchas otras angiospermas, como es la flor hermafrodita, la morfología, el desarrollo y respuestas que genera ante su medio ambiente. Por lo tanto, diversos estudios realizados en esta especie han sido extrapolados a muchas otras.

2.2 *Arabidopsis thaliana*: un excelente modelo para el estudio de la variación natural.

Arabidopsis thaliana (L.) Heyhn ($2n=10$) es una planta anual perteneciente a la familia Brassicaceae que mide de 10 a 30 cm de alto y tiene un ciclo de vida de 6 a 8 semanas. Su tallo es erecto y puede presentarse simple o ramificado. Tiene hojas basales en forma de roseta con tricomas unicelulares y también puede presentar hojas en el tallo que son sésiles (caulinares). Sus flores presentan cuatro pétalos blancos, son hermafroditas, predominantemente con autofecundación y están arregladas en una inflorescencia tipo corimbo. Sus frutos son silicuas que miden de 5 a 20 mm y cada uno produce alrededor de 30 semillas de color marrón con un tamaño de 0.3-0.5 mm de largo (Fig.1) (Al-Shehbaz & O'Kane, 2002).

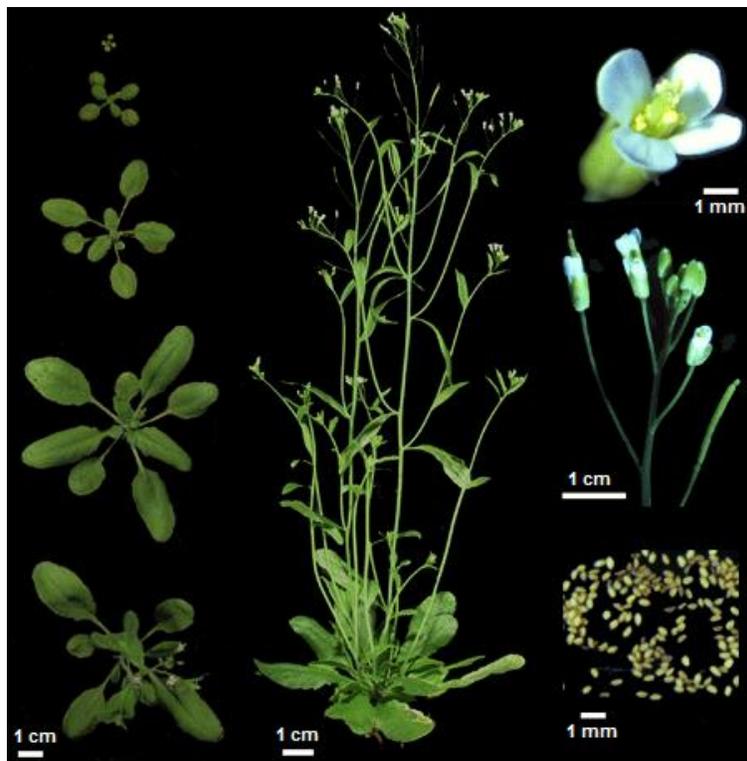


Figura 1. *Arabidopsis thaliana*. A la izquierda se representan las etapas vegetativas a diferentes edades; en el centro una planta adulta en estado de floración; a la derecha una flor, los pedicelos sosteniendo a las flores, una silicua y debajo está un cúmulo de semillas (IJPB scientific teams leaders, 2010).

A. thaliana resulta excelente para el estudio de la variación pues es una especie que muestra una amplia gama de variantes fenotípicas entre líneas silvestres, las cuales son conocidas como “ecotipos” o “accesiones”. La palabra ecotipo fue acuñada por Turesson (1922) y la define como: “el producto que surge como resultado de la respuesta genotípica de las ecoespecies a un hábitat particular [...], con capacidad reproductiva entre ellas pero impedimento a través de barreras ecológicas con otros”. Es muy interesante notar el uso de la palabra “ecoespecie” en su afán por resaltar que las especies representan unidades que se diferencian “a través de la acción de los factores ecológicos predominantes del hábitat” (Turesson, 1922). Actualmente se utiliza el término “accesión” para determinar una muestra recolectada en una localización específica, la cual no incluye pero tampoco excluye la adaptación local. Para fines prácticos de este trabajo, se aludirá al término “ecotipo” para resaltar la diferencia ambiental y geográfica entre las poblaciones de estudio, bajo el supuesto de adaptación de los ecotipos demostrado por Rutter and Fenster (2007) y Weigel (2012), entre otros.

En todo el mundo se han recolectado alrededor de 2000 ecotipos, principalmente en el Hemisferio Norte (América, Europa y Asia) pero con algunos representantes del Hemisferio Sur, como el continente Africano (Koornneef *et al.*, 2004). Estas variantes naturales se han encontrado en diversas condiciones como hábitats abiertos o perturbados, en suelos arenosos y laderas rocosas, orillas de los ríos, bordes de caminos, prados o bajos arbustos y a nivel del mar o altitudes hasta de 4250 msnm (Shindo *et al.*, 2007).

La variante natural más usada de *A. thaliana* es Columbia (Col-0) y ha sido estudiada con gran profundidad en la mayoría de los análisis genéticos y morfológicos; sin embargo, otros ecotipos han sido escasamente descritos, provocando mi interés y fascinación por descubrir más acerca de la variabilidad de la especie.

Dentro de toda esta variación, algunos rasgos del desarrollo como el tiempo de floración o de latencia de las semillas han tenido especial atención porque son de interés aplicado al mejoramiento de los cultivos; sin embargo, el estudio de la variación natural de la raíz ha sido poco estudiada. A pesar de esto, la raíz resulta un excelente modelo pues se

puede encontrar una gran diversidad morfológica y fisiológica, llamada "heterorhizy" (Hodge *et al.*, 2009). Dichas variaciones pueden ocurrir entre poblaciones, pero también en la raíz de un solo individuo, pues es un órgano que presenta tanto células en constante división celular localizadas apicalmente, como células completamente diferenciadas localizadas basalmente. Además, la morfogénesis de la raíz, como otros órganos de las plantas, resulta de la interacción entre la genética y el medio ambiente, permitiendo a estos organismos sésiles adaptar su morfología y el desarrollo de órganos a las condiciones ambientales encontradas.

2.3 Estructura de la raíz de *A. thaliana*

A diferencia de la mayoría de los animales, las plantas pueden generar órganos durante toda su vida gracias a un cúmulo de células que se mantienen indiferenciadas y con proliferación activa, las cuales están localizadas en un sitio delimitado llamado “meristemo” que se encarga de proveer las células del desarrollo post-embriionario (Stahl & Simon, 2010). Las plantas tienen dos meristemos principales: el meristemo apical del brote o tallo (SAM) que dará lugar a los órganos aéreos y el meristemo apical de raíz (RAM) que dará lugar a los órganos que crecen debajo de la tierra (Hodge *et al.*, 2009).

La raíz se puede clasificar en tres zonas principales, comenzando por la parte más apical se encuentra 1) el RAM, conformado por el dominio de proliferación en el cual las células se dividen activamente y por el dominio de transición en el que las células dejan de dividirse y crecen a una tasa muy baja; 2) zona de elongación, en el cual las células provenientes del meristemo comienzan a crecer rápidamente y 3) zona de diferenciación, donde las células detienen su crecimiento y adquieren su estado final de diferenciación (Fig. 2) (Ivanov & Dubrovsky, 2013).

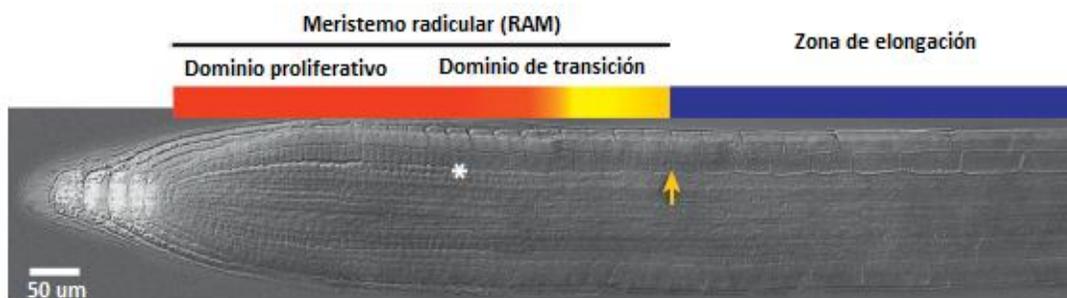


Figura 2. Clasificación de las zonas que conforman la raíz de *A. thaliana*. El meristemo radicular (RAM) se compone de dos dominios: el proliferativo, donde las células se dividen activamente, y el de transición en el cual las células detienen su división. Cuando las células comienzan a crecer rápidamente en tamaño se alcanza la zona de elongación. El * indica el término del dominio proliferativo y la flecha amarilla el término del RAM (Modificado de Ivanov & Dubrovsky, 2013).

La especificación del RAM ocurre durante la embriogénesis y su organización es muy regular, conteniendo en el centro a un grupo de cuatro células con muy baja actividad de proliferación, denominadas centro quiescente (QC), las cuales están rodeadas de las llamadas células iniciales. Las células iniciales van a dar lugar a todos los tipos celulares de la raíz y tras la primera división originan una célula que permanecerá indiferenciada y otra que se va incorporando a la zona proliferativa de cada uno de los tejidos. Existen cuatro tipos de células iniciales: las que están en la parte superior originan al tejido vascular y periciclo, a los lados se encuentran las que darán lugar a la endodermis y córtex, las más externas pero laterales dan origen a la cofia lateral y epidermis, y en la parte inferior del QC se encuentran las células iniciales de la columela (Fig.3). Como consecuencia, el equilibrio entre la proliferación y la diferenciación celular mantiene el tamaño del meristemo radicular (Zhang *et al.*, 2007).

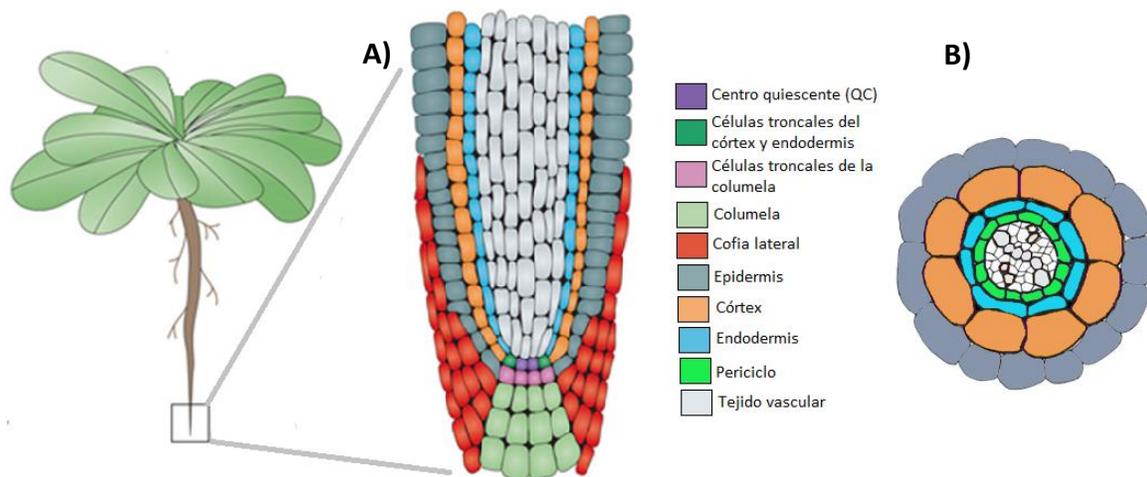


Figura 3. Morfología del meristemo radicular (RAM) de *A. thaliana*. A) Corte longitudinal. El meristemo se compone de un nicho central (QC) rodeado por las células iniciales que dan lugar a cada tejido; B) Corte transversal donde se observan los tejidos maduros (Modificado de Sparks *et al.*, 2013).

Por otra parte, las raíces laterales surgen a partir de divisiones celulares del periciclo, las cuales generan un primordio que crece a través de capas de células exteriores y cuando se alcanzan a formar de tres a cinco capas de células se establece un meristemo autónomo. Tras la activación de ese meristemo por la organización y

establecimiento de las células iniciales, la raíz lateral emerge de la principal y continúa creciendo (Laskowski *et al.*, 1995; Hodge *et al.*, 2009).

En *A. thaliana* la raíz primaria presenta una etapa de crecimiento constante mientras el RAM es funcional, es decir, cuando se mantiene activo produciendo células continuamente durante el desarrollo radicular; sin embargo, el RAM puede disminuir su actividad o agotarse bajo ciertas condiciones y la raíz detiene su crecimiento (Reyes-Hernandez *et al.*, 2014), etapa que puede ser reversible o irreversible (Shishkova *et al.*, 2008). Esta capacidad de ajuste durante el desarrollo radicular, permite a los individuos modificar su arquitectura y les confiere ventajas en un ambiente de suelo heterogéneo. Por ejemplo, las raíces primarias profundas a menudo se asocian con plantas que tienen una mayor tolerancia a la sequía (Gifford *et al.*, 2013); cantidades bajas de fósforo causan reducción en el tamaño de la raíz primaria mientras que las laterales aumentan en número y tamaño (Ristova & Busch, 2014), y diferentes concentraciones de nitrógeno causan cambios morfológicos diversos en la raíz (Zhang *et al.*, 2007).

Los ecotipos de *A. thaliana* que viven en distintos ambientes y regiones del mundo presentan diferencias a nivel morfológico que han sido estudiadas principalmente en las hojas (Balazadeh *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012); sin embargo, poco se sabe sobre la variabilidad que puede existir en la raíz y cómo los mecanismos genéticos y epigenéticos están involucrados en la generación de los distintos fenotipos. Tales cambios que se dan a nivel molecular y tienen un efecto sobre la morfología provocan respuestas diferenciales entre las poblaciones que pueden tener una importancia adaptativa (Richards *et al.*, 2012). Por ejemplo, la variabilidad de la raíz provoca que la absorción de agua y nutrientes sea diferencial (Hodge *et al.*, 2009), lo cual finalmente afecta el desarrollo de la parte aérea de las plantas y podría tener aplicaciones en la mejora de cultivos. Por lo tanto, los análisis a nivel molecular específicos de cada ecotipo son de relevancia para comprender el papel de la genética y/o epigenética en la generación de variabilidad fenotípica de la especie.

2.4 Genes involucrados en el desarrollo de la raíz

Diversos estudios realizados mediante el uso del Mapeo de *loci* de caracteres cuantitativos (QTL, por sus siglas en inglés) han demostrado que la mayoría de los caracteres morfológicos son poligenéticos (Mackay *et al.*, 2009); sin embargo, estudios genéticos han confirmado que existen genes esenciales que dirigen la morfología de la raíz, como *SCARECROW (SCR)*, *SHORTROOT (SHR)* (Sozzani *et al.*, 2010) y la familia de genes MADS-box, que son factores transcripcionales (TFs) (Burgeff *et al.*, 2002; Tapia-Lopez *et al.*, 2008; Garay-Arroyo *et al.*, 2013). De esta forma, diversos complejos como los factores transcripcionales y los factores epigenéticos regulan la expresión de genes controlando así espacial y temporalmente la aparición de ciertos caracteres durante el desarrollo de la raíz.

2.4.1 Factores transcripcionales

Los diferentes estudios genómicos y genéticos a través de mutantes han permitido el descubrimiento de genes involucrados en el desarrollo radicular, como son los factores transcripcionales que regulan la expresión de genes blanco, y de esta forma coordinan la proliferación y diferenciación de los diferentes tipos celulares que conforman a la raíz. En el estudio llevado a cabo por Birnbaum *et al.* (2003) se encontró que de 1411 factores transcripcionales presentes en un 90% del genoma de *Arabidopsis*, 577 estaban altamente expresados en raíz y 311 mostraron expresión específica del tejido. La presencia tan evidente de estos factores es necesaria para el establecimiento y mantenimiento del meristemo radicular, la formación de raíces laterales, iniciación de pelos radiculares y la regulación de cascadas génicas que pueden conducir a cambios morfológicos, fisiológicos y/o metabólicos (Montiel *et al.*, 2004).

Dentro de todos los factores transcripcionales, los pertenecientes a la familia MADS-box son de especial interés por su papel en todas las etapas de desarrollo de *Arabidopsis*, el cual se ha comparado al de los genes *HOX* en animales (Ng & Yanofsky, 2001). Los genes MADS-box comparten un dominio muy conservado llamado caja MADS (MADS-box), que consta de ~60 aminoácidos que se unen al DNA en secuencias consenso conocidas como cajas CArG [CC(A/T)₆GG]. Su nombre se debe a las iniciales de los

primeros genes de esta familia que fueron clonados: *MINICHROMOSOME MAINTENANCE1* (*MCM1*) de *Saccharomyces cerevisiae*, *AGAMOUS* (*AG*) en *A. thaliana*, *DEFICIENS* (*DEF*) en *Antirrhinum majus* y *SERUM RESPONSE* (*SRF*) en humano (Smaczniak *et al.*, 2012).

La familia MADS-box puede dividirse en dos linajes, los del tipo I y tipo II, de acuerdo a su estructura proteica. Los del tipo I tienen sólo la secuencia de alrededor de 180pb que codifica para el dominio MADS conservado. El tipo II está mucho más estudiado y se conforma por una estructura llamada MIKC, que contiene el dominio MADS en la región N-terminal, seguido por la región I (intervención) que mide alrededor de 30 residuos de aminoácidos y por una estructura caracterizada por sus residuos hidrofóbicos denominada K (similar a queratina) que mide alrededor de 70 residuos de aminoácidos, las cuales son esenciales para la dimerización y la formación de complejos proteicos. Por último se encuentra la región C-terminal (de tamaño variable) que está involucrada en la interacción proteína-proteína y la regulación de transactivación (Fig.4) (Smaczniak *et al.*, 2012).

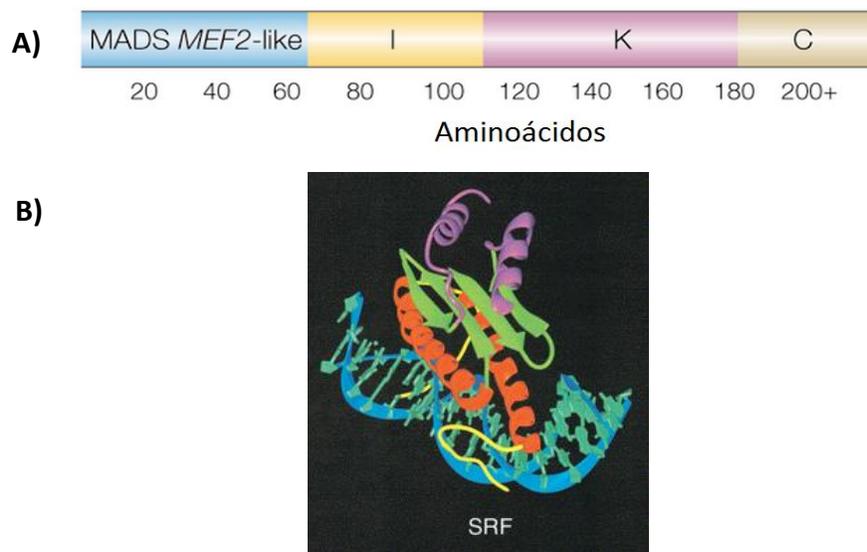


Figura 4. Estructura proteica de los MADS-Box. A) Clasificación de las cuatro regiones que componen a las proteínas MADS-Box tipo II (Ng & Yanofsky, 2001); B) Estructura tridimensional de SRF. Se puede observar que se compone de hojas beta plegadas (verde), alfa hélices (rojo y morado) y un dominio MADS en el sitio N-terminal (amarillo) unido al DNA (azul) (Santelli & Richmond, 2000).

Los factores transcripcionales de la familia MADS-box tipo II son genes maestros que se expresan en tejidos vegetativos, óvulos y embriones, desempeñando funciones muy importantes en casi todos los procesos de desarrollo de las plantas, desde la embriogénesis hasta la formación de la flor. En la raíz se tiene reportado que se expresan por lo menos 50 genes MADS-box (Zhang *et al.*, 2007), dentro de los cuales se encuentran los siguientes genes *AGAMOUS-LIKE (AGL)*: *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19*, los cuales fueron analizados en el presente estudio. Este grupo de genes participan en la transición a la floración; sin embargo, todos se expresan mayoritariamente en la raíz (Rounsley *et al.*, 1995.; Schonrock *et al.*, 2006). *XAL1/AGL12* es un gen que se expresa en el floema de la raíz (Fig. 5), y se ha caracterizado como promotor del desarrollo radicular pues la mutante de pérdida de función es de raíz corta (Fig. 6), además de que presenta una menor tasa de producción celular, un tamaño de meristemo más pequeño que el silvestre y el ciclo celular está alterado (Tapia-Lopez *et al.*, 2008). *XAL2/AGL14* se expresa particularmente en la cofia, la epidermis, la endodermis y la columela, así como en el sistema vascular de las células diferenciadas y en los primordios de raíces laterales. Se sabe que este gen es un regulador positivo del transporte de auxinas a través de la regulación transcripcional de genes que codifican para las proteínas PIN1 y PIN4. La mutante de pérdida de función de este gen tiene alteraciones en el nicho de células troncales de la raíz y desorganización de las células de la columela. Se le ha determinado una función de promotor del desarrollo radicular pues su mutante es de raíz corta (Fig.6), presenta una tasa menor de producción de células meristemáticas, así como irregularidades en la proliferación de las células del periciclo (Garay-Arroyo *et al.*, 2013). Por otra parte, las mutantes de pérdida y ganancia de función de *AGL17* no presentan anomalías en el desarrollo (Fig.6); sin embargo, al adicionar ciertas hormonas o nutrientes la mutante presenta raíz larga, lo que indicaría que posiblemente *AGL17* está involucrado en la regulación de la arquitectura radicular en respuesta a estímulos externos específicos, como es el caso del ácido jasmónico (Zhang *et al.*, 2007). A pesar de que la mayor expresión de *AGL19* también se observa en la raíz (en cofia y epidermis) (Fig.5), la función que desempeña permanece como una interrogante y actualmente está

siendo estudiada, pues sólo se han reportado algunos artículos para el caso de floración (Schonrock *et al.*, 2006).

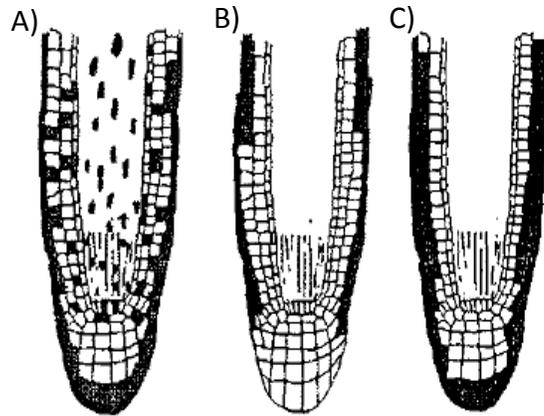


Figura 5. Patrones de expresión de los genes MADS-box en la raíz. A) *XAL1/AGL12*; B) *AGL17*; C) *AGL19*. Las células coloreadas en negro denotan la expresión de los genes correspondientes en cada tejido de la raíz. Si las células se encuentran en blanco representa una expresión nula de dichos genes (Modificado de Burgeff, 2002).

Los fenotipos que originan las mutantes de pérdida de función de estos genes se han estudiado en el ecotipo Col-0, y algunos de ellos recuerdan a la morfología observada en otros ecotipos (e.g. ecotipos de raíz corta). Por lo tanto, el análisis de la expresión de estos genes en otras variedades naturales de *A. thaliana* podría ser un indicativo del papel que juegan estos genes en la variabilidad fenotípica de la raíz. Sin embargo, los factores transcripcionales no son los únicos implicados en el desarrollo, y algunos otros como los factores epigenéticos podrían estar involucrados de manera muy interesante, ya que se encargan de sensar el ambiente y a través de la dinámica de la cromatina dar una respuesta molecular sobre sus genes blanco.

2.42 Factores epigenéticos

Los factores epigenéticos involucrados en el desarrollo radicular no han sido tan estudiados como en la parte aérea; sin embargo, estudios recientes apuntan a que los complejos proteicos Polycomb y Trithorax son reguladores principales de la identidad celular y que actúan para mantener el equilibrio entre la proliferación celular y la

diferenciación en raíz (Aichinger *et al.*, 2011; Napsucialy-Mendivil *et al.*, 2014; Petrone, 2015).

Los complejos Trithorax (TrxG) y Polycomb (PcG) son un conjunto de proteínas conservadas evolutivamente que regulan la expresión genética tanto en animales como en plantas. Su función provoca cambios en la estructura de la cromatina para regular varios procesos celulares y de desarrollo. El complejo TrxG mantiene un estado de cromatina más laxo y promueve la expresión transcripcional mediante la trimetilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4me3). Está formado por histona-metiltransferasas como ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX (ATX1), que contienen un dominio SET (acrónimo de las proteínas de *Drosophila*: Su(var)3-9 and Enhancer of zeste) el cual le confiere su actividad catalítica, a su vez por proteínas reguladoras que conforman el complejo COMPASS y por factores remodeladores de la cromatina dependientes de ATP (Pien & Grossniklaus, 2007; Sánchez *et al.*, 2015). Por otra parte, PcG funciona en complejos denominados Polycomb Repressive Complex 1 y 2 (PRC1 y PRC2), siendo PRC2 el que posee la actividad catalítica a través de diversas enzimas como CURLY LEAF (CLF), que cataliza la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) asociada a la compactación de la cromatina y a la represión génica; mientras que el complejo PRC1 reconoce dicha marca, se une a ella y estabiliza dicha represión (Pien & Grossniklaus, 2007; Sánchez *et al.*, 2015).

La función de las metiltransferasas de ambos complejos (TrxG y PcG) se ha estudiado recientemente en la raíz a través de mutantes de pérdida de función. Estos estudios han demostrado que ATX1, la metiltransferasa del complejo TrxG, está involucrada en el control del crecimiento de la raíz primaria mediante la regulación de la duración del ciclo celular, la producción celular y la transición de a la elongación en el meristemo radicular, además de que las células del centro quiescente tienen una forma irregular y están más expandidas que en las silvestres (Napsucialy-Mendivil *et al.*, 2014). En nuestro laboratorio se encontró que ATX1 se expresa preferencialmente en la zona de proliferación del RAM más que en la zona de diferenciación y que la mutante de pérdida de función presenta una raíz más corta que el control (Fig.6) (Petrone, 2015). Asimismo

observamos que la función de *ATX1* se requiere para la activación transcripcional de los genes MADS-box *XAL2/AGL14* y *AGL19*, y probablemente de *XAL1/AGL12* y *AGL17* (Petrone, 2015; Vega *et al.*, datos no publicados). Por otra parte, se sabe que en el RAM la proteína CLF, la metiltransferasa del complejo PcG, y el remodelador de cromatina PICKLE (PKL) determinan antagónicamente la actividad meristemática, pues niveles elevados de H3K27me3 mediados por CLF reprimen a los genes marcadores del meristemo y a las células troncales causando un decremento en el crecimiento meristemático, al contrario de lo que sucede con PKL (Aichinger *et al.*, 2011). Sin embargo, la mutante de pérdida de función de *CLF* no muestra diferencias en el tamaño de la raíz con respecto al control (Fig.6). Además, se ha demostrado que en la raíz el fenotipo se complementa cuando se realiza una doble mutante de estas enzimas, lo que reafirma su función antagónica (Fig. 6). Otros miembros del laboratorio han descrito que *CLF* se requiere para reprimir la expresión de los genes MADS-box *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19* implicados en el desarrollo de la raíz, sugiriendo la importancia del complejo PcG en este órgano de la planta (Petrone *et al.*, datos no publicados; Vega *et al.*, datos no publicados).

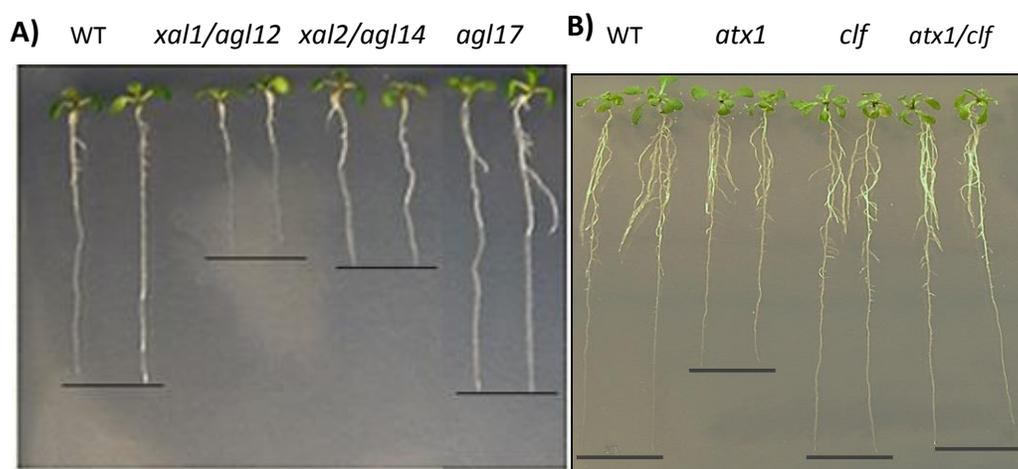


Figura 6. Comparación del fenotipo que presentan las mutantes de pérdida de función. A) Plantas mutantes de los genes MADS-box a los 7 días post-siembra y B) Plantas mutantes de las metiltransferasas de los factores epigenéticos TrxG y PcG, respectivamente, a los 10 días post-siembra. La raíz control (no mutante) se denomina WT (wild-type). Las líneas horizontales marcan el tamaño final alcanzado (Modificado de Cerón, 2012; Vega *et al.*, datos no publicados).

3. JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente, el estudio de la variación natural a través de un análisis sistémico usando herramientas moleculares y morfológicas es esencial para comprender los mecanismos que generan y mantienen la variabilidad en las poblaciones. Los ecotipos de *A. thaliana* provenientes de sitios ambientales y geográficos tan diversos son muy útiles para cumplir con ese fin, pues los análisis en floración y parte aérea demuestran que existe una gran variedad de caracteres morfológicos y fisiológicos que han tenido especial interés aplicado al mejoramiento de los cultivos; sin embargo, poco se sabe sobre la variación de la raíz y las implicaciones que esto conlleva. Se debe recordar que la raíz es un órgano plástico que juega un papel muy importante en la fijación y nutrición de las plantas, y que la variación encontrada puede ocasionar que la absorción de agua y nutrientes sea diferencial, teniendo consecuencias diversas en la parte aérea. Además, se ha descrito que un adecuado desarrollo radicular requiere de la presencia de genes específicos, dentro de los cuales se encuentran los factores transcripcionales MADS-box y factores epigenéticos que están involucrados en la coordinación y control de caracteres que deben regularse espacio-temporalmente. Por consiguiente, los análisis morfológicos y los patrones de expresión génica son muy útiles como una primera aproximación para encontrar la relación entre los cambios en la actividad de genes implicados en el desarrollo y la variabilidad fenotípica, lo cual permite a las poblaciones responder de manera diferencial ante las condiciones de su ambiente.

Por lo tanto, en este proyecto se generará información que contribuirá a conocer la posible influencia del ambiente en la generación de la variabilidad fenotípica de la especie, la cual puede ser explicada por distintos mecanismos moleculares y que tiene un gran potencial para estudios futuros de genética y epigenética de plantas. Además, la caracterización morfológica de los ecotipos es importante para estudios posteriores de genética pues es la base para la búsqueda de alelos naturales en un contexto genotipo-medio ambiente específico que nos permite una perspectiva más realista de la función de los genes.

4. HIPÓTESIS

Las condiciones ambientales heterogéneas de donde provienen los ecotipos han generado gran variabilidad morfológica en la raíz de *A. thaliana*, la cual se pueden explicar por variaciones en la homeostasis del meristemo y por cambios en la expresión de genes implicados en su desarrollo, como son los factores transcripcionales MADS-box y factores epigenéticos de los complejos TrxG y PcG.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Describir y analizar la variación morfológica y de expresión génica de los factores transcripcionales tipos MADS-box II y factores epigenéticos *ATX1* y *CLF* asociados al desarrollo de la raíz en los ecotipos de *Arabidopsis thaliana*.

5.2 Objetivos particulares

- Describir las diferencias en la morfología de la raíz a nivel celular (meristemo) y en la arquitectura radicular a través de estudios de morfometría en 12 ecotipos (Col-0, Bay-0, CIBC10, Cvi-0, FR-2, HR5, Ler, Ove-0, Se-0, Sha, Ta-0 y Ws) de *A. thaliana*.
- Analizar la expresión de los factores transcripcionales tipo MADS-box II (*XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19*) y factores epigenéticos *ATX1* y *CLF* en la raíz de los diferentes ecotipos de *A. thaliana*.
- Realizar análisis de expresión *in silico* de los factores transcripcionales y epigenéticos anteriormente descritos en la parte aérea de los ecotipos.
- Establecer la relación entre la variabilidad fenotípica y la expresión génica en relación con las condiciones ambientales (temperatura y precipitación) de origen de cada ecotipo.

6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Material biológico

En este proyecto se utilizó como material biológico a los siguientes ecotipos de la planta *Arabidopsis thaliana*: Col-0, Bay-0 (N954), CIBC10 (N22229), Cvi-0 (N1096), FR-2 (N1168), HR5 (N22205), Ler, Ove-0 (N1434), Se-0 (N1502), Sha (N6180), Ta-0 (N1548) y Ws, los cuales fueron comprados al NASC por sus siglas en inglés “Nottingham Arabidopsis Stock Centre”, con excepción de los ecotipos Col-0, Ler y Ws que son las variedades naturales más comunes que se trabajan en el laboratorio y estaban disponibles.

6.2 Determinación de las condiciones ambientales

Las coordenadas geográficas y la altitud del lugar de origen de cada ecotipo fueron obtenidas en la base de datos 1001 genomas de *Arabidopsis* del Instituto Salk (Alonso *et al.*, 2003), disponible en <http://signal.salk.edu/atg1001/3.0/gebrowser.php>. Las condiciones ambientales de precipitación y temperatura por localidad se adquirieron a través de la base de datos sobre el agua de la FAO: AQUASTAT (FAO, 2015), disponible en <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/quickwms/climate.htm> y se realizaron los promedios en verano e invierno. Los valores de verano corresponden a la media de los meses marzo, abril, mayo, junio, julio, agosto y septiembre; y los de invierno a los meses de octubre, noviembre, diciembre, enero y febrero.

6.3 Condiciones de crecimiento

Las semillas fueron desinfectadas con una solución al 20% de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) y 0.01% de polisorbato-20 (Tween-20, Sigma-Aldrich), manteniéndolas en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente y realizando cuatro series de lavados con agua estéril. Con el fin de sincronizar el metabolismo y la germinación, las semillas fueron estratificadas durante 120 horas a 4°C en oscuridad.

Después de ese tiempo, las semillas fueron sembradas en cajas petri con medio MSS que contiene: MS al 0.2X (Murashige y Skoog 1962, MP Biomédicals), MES monohidratado al 0.05% (Sigma-Aldrich), sacarosa al 1% (Sigma-Aldrich) y agar al 1% (Becton, Dickinson and Company) a un pH de 5.6 ajustado con KOH al 1M.

Si el experimento lo requiriera, las plántulas de 7 u 8 días se transferían a tierra (Tierra Metro Mix 200) esterilizada por autoclave. Todas las plantas se germinaron y crecieron a una temperatura de 22 °C, con luz blanca y fría a una intensidad aproximada de 110 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ en condiciones de día largo (16 hrs luz/ 8 hrs oscuridad).

6.4 Cinética de crecimiento.

Para realizar la cinética de crecimiento se hizo un marcaje de la longitud que alcanzaba la raíz cada 24 horas desde el primer día después de la germinación hasta el décimo día post-siembra (10 dps). Este experimento se realizó con 4 réplicas biológicas y un tamaño de muestra mayor a 30 para cada ecotipo. El tamaño obtenido por día se calculó con el software Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

Los gráficos del tamaño total y la tasa de crecimiento se realizaron mediante el software R (R Development Core Team, 2008).

6.5 Análisis morfométricos.

Para los análisis de morfometría se sembraron sólo cuatro plantas por caja con medio MSS y se dejaron crecer por 9 dps para que tuvieran suficiente espacio y su desarrollo radicular no influyera en la planta adyacente. Es importante mencionar que a esa edad las diferencias significativas entre los ecotipos son las mismas que a los 10 dps, por lo que los análisis morfométricos y los de cinética de crecimiento son resultados comparables.

Para el estudio de la arquitectura radicular, los análisis de morfometría son muy útiles pues están basados en un marco matemático que describe la forma de una manera completa y facilita la inspección gráfica de la variación morfológica. El método más extendido en morfometría geométrica consiste en representar en cada muestra las posiciones de puntos específicos (*landmarks*) y establecer una correspondencia uno-a-uno entre todas las muestras incluidas en el análisis. Al realizar dicho ajuste se estandarizan las imágenes pero se pierden ciertos grados de libertad como el tamaño, posición y orientación (Klingenberg, 2011).

Para este ensayo se determinaron en total seis *landmarks* mostrados en la Fig.7 (Rosas *et al.*, 2013).

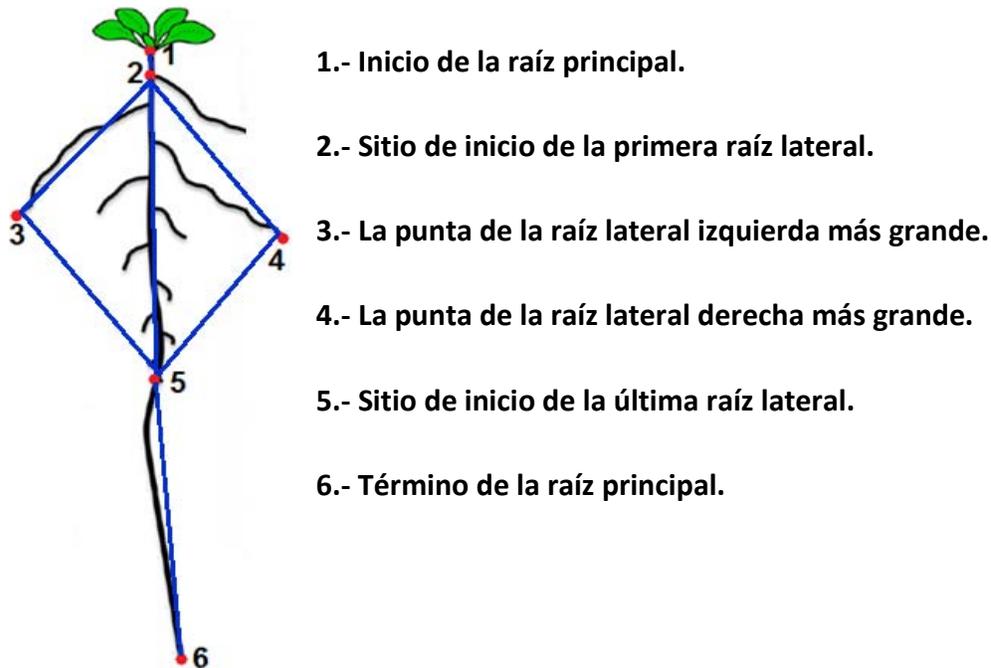


Figura 7. Localización de los *landmarks* a lo largo de la raíz.

Después de colocar los *landmarks* correspondientes en cada raíz, se realizó un ajuste de *Procrustes*, que es un método de alineamiento en morfometría que permite minimizar las diferencias de posición, escala y rotación de los *landmarks*. Enseguida se determinó el *wireframe*, que está compuesto por 7 aristas que unen a los *landmarks* para formar un polígono (Fig.7).

Como una primera aproximación de la visualización de las formas entre ecotipos, se realizaron los análisis morfométricos en las 12 variedades de *A. thaliana* con un tamaño de muestra alrededor de 10 a 15 plantas por cada una. Sin embargo, para obtener resultados robustos se requiere que el tamaño de muestra sea igual o mayor a 30 plantas por ecotipo. Para elegir los ecotipos que se analizarían se realizó una tabla de distancias de Procrustes (Fig. S 2) y se eligieron los ecotipos con las distancias mayores (Cvi-0 y Ws), intermedias (Sha) y más bajas (FR-2 y Col-0) para identificar los patrones morfométricos.

Con estos cinco ecotipos se procedió a realizar los análisis morfométricos usando el software MorphoJ (Klingenberg, 2011), y cada ecotipo se representó con 30 individuos.

MorphoJ (Klingenberg, 2011) es una herramienta computacional que permite el estudio de la variación fenotípica a través de diferentes análisis multivariados como: componentes principales, que explica los rasgos que causan la mayor variación en la forma; y variables canónicas, que reduce la variación entre los grupos (i.e ecotipos) para agruparlos y distinguirlos de acuerdo a su forma. Los niveles de significancia se obtuvieron en el mismo software MorphoJ mediante una prueba de ANOVA.

6.6 Análisis de las raíces mediante microscopía de luz

Para observar los meristemas radiculares de las plantas, las raíces fueron aclaradas con una solución de aclaramiento (80% de hidrato del cloral y 10% de glicerol) y se dejaron crecer por 6 dps. Aquellas que se requerían para la visualización de diferencias morfológicas en el nicho de células troncales se tiñeron con lugol 1% y se dejaron crecer por 4 dps, pues es una edad en la que el meristemo se encuentra bien organizado en el ecotipo Col-0. Posteriormente se visualizaron en un microscopio óptico Olympus BX60 a un aumento de 40X.

Para determinar el tamaño del meristemo se contó sólo una fila de células del córtex a partir del centro quiescente hasta la primera célula que se encontraba en la zona de elongación. Las mediciones de la longitud del meristemo y el tamaño celular de algunos ecotipos se realizaron con el software Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

6.7 Análisis de las raíces mediante microscopía confocal

Para observar las plantas por microscopía confocal se montaron las raíces en medio MSS con 5µg/ml de yoduro de propidio (IPr). Se usó el microscopio confocal Olympus FV 1000 perteneciente al Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM, a una longitud de onda de 535 nm con láser de diodo.

6.8 Pruebas estadísticas y correlaciones

La media, la desviación y el error estándar se calcularon con Microsoft Excel 2010 (Redmond, Washington: Microsoft).

Los niveles de significancia de los ensayos de cinética de crecimiento y tamaño meristemático se obtuvieron mediante pruebas de ANOVA (una sola vía) con test de Tukey, usando el software PRISMA (Moher *et al.*, 2009).

La correlación entre el tamaño total y las condiciones ambientales se realizó mediante la prueba de Spearman (no paramétrico), usando el software R (R Development Core Team, 2008).

6.9 Extracción de RNA y RT-PCR

La extracción de RNA se realizó a partir de ~100 mg de tejido de raíz. El tejido fue triturado sin descongelar hasta formar un polvo fino y cada muestra fue resuspendida en 1 ml de Trizol (Invitrogen) que se dejó incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después se realizó una extracción con 0.2 ml de cloroformo centrifugando a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El RNA en solución fue precipitado con 1ml de isopropanol frío incubándose durante 30 minutos a -20°C. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Una vez precipitado el RNA se lavó 3 veces con etanol 70% y se resuspendió en 25µl de H₂O miliQ.

Las muestras se cuantificaron en el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y para corroborar su integridad y concentración se corrieron en un gel semidesnaturalizante de agarosa-TBE al 1.2%. Para ello las muestras de RNA (150 ng) se diluyeron en 6 µl de buffer de carga, el cual contiene 9.5% de formamida y 0.025% de SDS. Las muestras se desnaturalizaron a 70°C durante 10 minutos y posteriormente se corrieron en un gel de agarosa a 100 V. La integridad de las muestras se determinó por la visualización de los RNAs ribosomales (Fig. S 3) y para calibrar las muestras se ajustó la concentración por densitometría.

Las muestras calibradas se utilizaron para realizar la síntesis de DNA complementario (cDNA) mediante la técnica de RT-PCR, utilizando el kit "FirstStrand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT" (Invitrogen). La reacción se realizó en un volumen

final de 20 µl y para ello se agregó 0.5 µM de oligonucleótido dT y 0.5 mM de dNTPs Mix con 1000 ng de RNA. Esta reacción se incubó a 65°C por 5 minutos. Posteriormente, a cada muestra se le adicionó 1X de amortiguador First Strand, 10mM de DTT, 40 unidades de RNAsaout y 200 unidades de la enzima SuperScript II RT. La síntesis de cDNA se realizó a 42°C por 50 minutos y la enzima se inactivó a 70°C por 15 minutos.

6.10 Reacciones en Cadena de la Polimerasa

El cDNA obtenido se utilizó para realizar ensayos de PCR semicuantitativos con el kit “FirstStrand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT: Basic PCR Protocol” (Invitrogen) en un volumen final de 15 µl. Para esto se le adicionó a 1 µl de cDNA 1X de amortiguador para PCR, 1.5 mM de MgCl₂, 0.8 mM de dNTPs, 0.4 µM del par de oligonucleótidos que ya estaban diseñados y disponibles en el laboratorio para cada gen de interés y 0.06 unidades de *Taq* DNA Polimerasa. La reacción se llevó a cabo bajo condiciones específicas para cada par de oligonucleótidos (Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificación de los genes de interés y sus condiciones de uso.

Gen	Nombre del primer	Secuencia 5' -> 3'	Condiciones de PCR	Tamaño del fragmento
XAL1/AGL12	AGL12 RT-F	TGGTCGTGGTTCTTCTCTGCTAC	94°C - 30''; 58°C - 30''; 72°C - 45'' 28 ciclos	388pb
	AGL12 RT-R	TGTCTCCATGACTGCGAAGTTAGC		
XAL2/AGL14	AGL14- F458	GTAGAAAAGATATCAAAAAGCGAA	94°C - 30''; 58°C - 30''; 72°C - 45'' 28 ciclos	458pb
	AGL14- R458	GGAGGAAACTTTTTGAAGTGT		
AGL17	AGL17-OEAB154F	CTACTATTGAACGATTCAATACGGCT	94°C - 30''; 66°C - 30''; 72°C - 1'30'' 35 ciclos	600pb
	AGL17-OEAB157R	CTTTGGTTTGCTCTCCGACATG		
AGL19	AGL19-F430	GAGACGAAACATCTGGATTG	94°C - 30''; 52°C - 30''; 72°C - 40'' 28 ciclos	288pb
	AGL19-Rnorth	ACGTTGATTGTGATGATGC		
ATX1	MP-ATX1pcr-F	GGCGGGAGATATGATGATTGAA	94°C - 30''; 55°C - 30''; 72°C - 30'' 28 ciclos	273pb
	MP-ATX1pcr-R	TCTTCCATTTAGGGATATGCC		
CLF	CLF-PCq-F	AACCAAGTGAGGAGAAGGTCAA	94°C - 30''; 58°C - 30''; 72°C - 30'' 28 ciclos	230pb
	CLF-PCq-R	CTCTTTGGGCAACCGCAGTA		

7. RESULTADOS.

7.1 Distribución geográfica y ambiental de los ecotipos de *A. thaliana*.

Los diferentes ecotipos de *A. thaliana* se han localizado y recolectando en diferentes partes del mundo, principalmente en el Hemisferio Norte. Para este estudio se utilizaron los ecotipos Columbia (Col-0), Bayreuth (Bay-0), CIBC10, Cape Verde Islands (Cvi-0), Frankfurt (FR-2), HR5, Landsberg erecta (Ler), Ovelgoenne (Ove-0), San Eleno (Se-0), Shakdara (Sha), Tabor (Ta-0) y Wassilewskija (Ws) (Tabla 2), los cuales se eligieron por su distribución geográfica, que incluye a un ecotipo del continente americano (Columbia, EUA), de Asia (Pamiro-Alay, Tadjikistan), y algunos representantes de origen Europeo (Alemania, Reino Unido, España, República Checa y Rusia), además de un ecotipo cercano al Ecuador perteneciente a Cabo Verde (Fig. 8).

Tabla 2. Información sobre el sitio de origen de los ecotipos de estudio.

Ecotipo	Nombre	Stock de NASC	Origen geográfico	Latitud	Longitud
Col-0	Columbia		Columbia, EUA	38.50	-92.50
Bay-0	Bayreuth	N955	Bay, Alemania	49.00	11
CIBC10	CIBC	N28146	Ascot/ Berks, Inglaterra	51.41	-0.64
Cvi-0	Cape Verde Islands	N1096	Islas de Cabo Verde	15.11	-23.62
FR-2	Frankfurt	N1169	Frankfurt, Alemania	50.00	8.50
HR5	HR	N28352	Ascot/ Berks, Inglaterra	51.40	-0.65
Ler	Landsberg erecta		Landsberg, Alemania	52.80	15.50
Ove-0	Ovelgoenne	N1435	Ovelgoenne, Alemania	53.50	8.50
Se-0	San Eleno	N1503	San Eleno, España	41.58	2.50
Sha	Shakdara	N6180	Pamiro-Alay, Tadjikistan	39.00	72.00
Ta-0	Tabor	N1548	Tabor, República Checa	49.50	14.50
Ws	Wassilewskija		Wassilewskija, Rusia	52.30	30

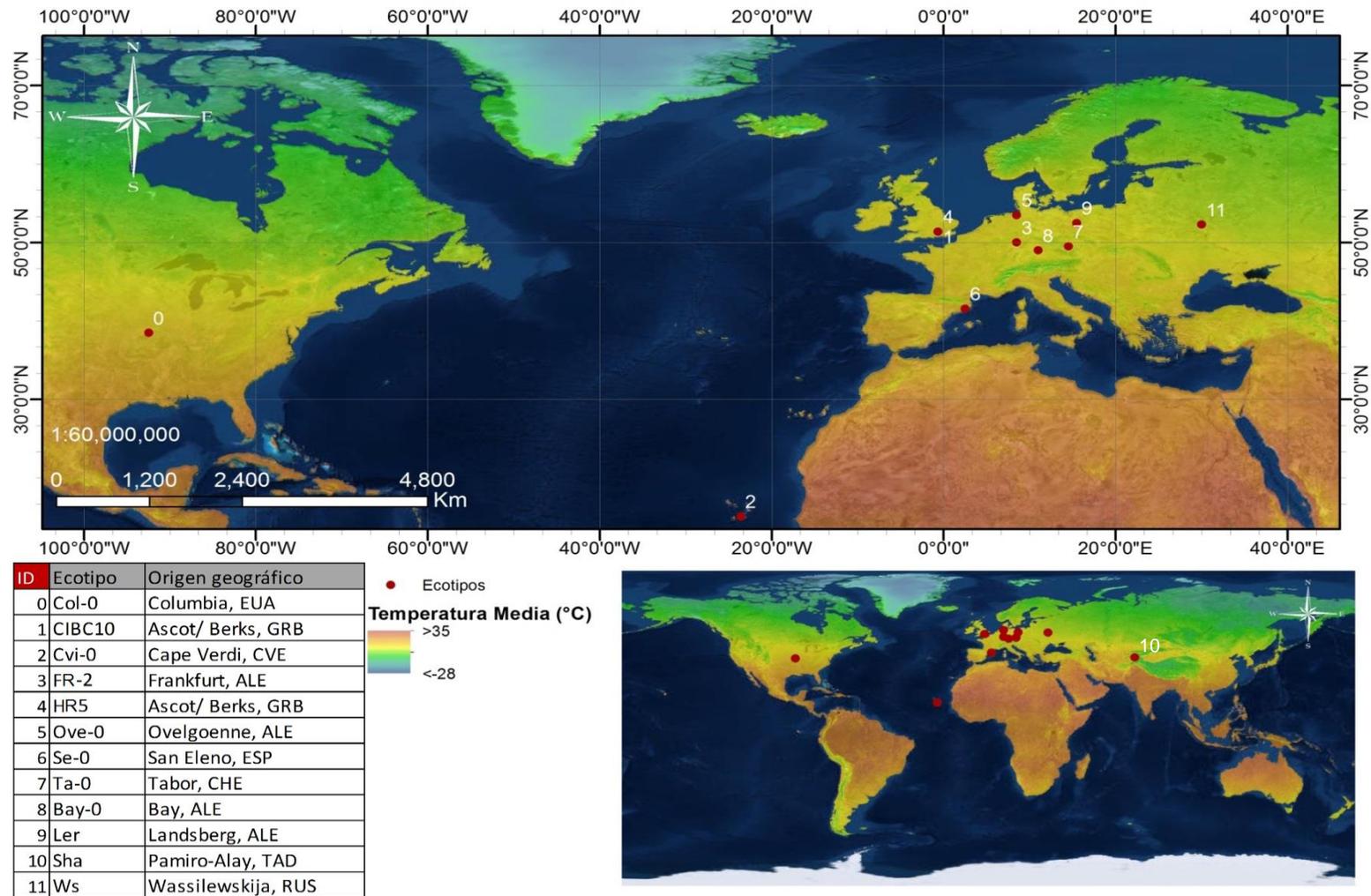
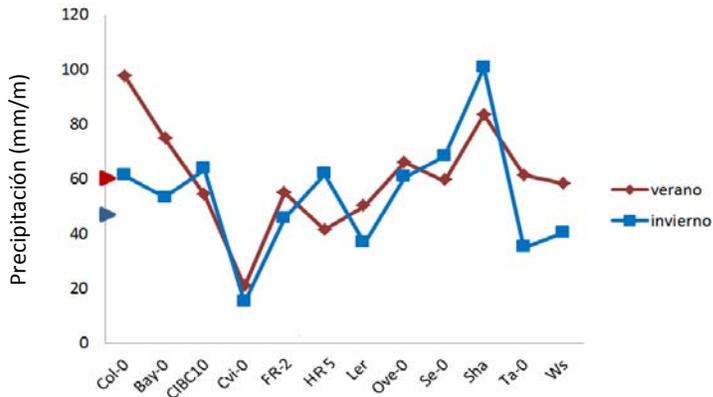


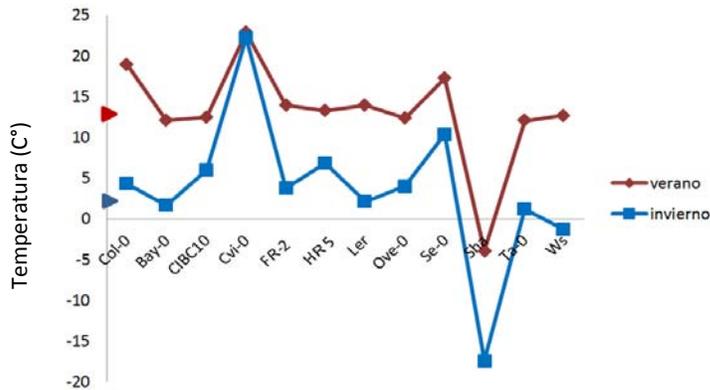
Figura 8. Localización del sitio de origen de los ecotipos de estudio. Aportado por Leonardo Calzada.

Encontrar estas poblaciones en lugares tan diversos geográficamente implica que las condiciones ambientales a las que las plantas están expuestas también son variables, como se puede observar en las Figs. 9A y B, en donde se muestra que los ecotipos Cvi-0 (Islas de Cabo Verde) y Sha (Tadjikistan) habitan en zonas de precipitación y temperaturas contrastantes. De hecho, Cvi-0 y Sha son las variedades de *A. thaliana* que residen en sitios con las temperaturas más extremas de una base de datos de 58 ecotipos obtenida de Salk Arabidopsis, 1001 genomes (Alonso *et al.*, 2003), disponible en <http://signal.salk.edu/atg1001/3.0/gebrowser.php>. El ecotipo Sha es un caso particularmente interesante pues las temperaturas a las que puede sobrevivir en verano e invierno son bajo el punto de congelación, y además la altitud que alcanza es la más elevada, cerca de los 3400 msnm, seguida de Cvi-0 que se encuentra a los 1200 msnm; ambas son altitudes muy grandes al comparar con el promedio de los ecotipos restantes, que es de 325 msnm (Fig. 9C).

A)



B)



C)

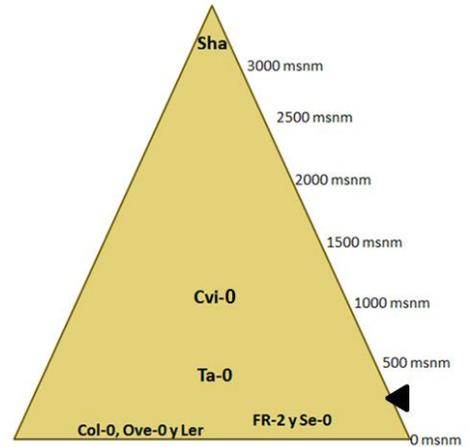


Figura 9. Condiciones ambientales del sitio de origen de cada ecotipo. A) Niveles de precipitación; B) Temperatura promedio en verano e invierno del lugar de origen de cada ecotipo. Las flechas rojas sobre el eje Y corresponden a la precipitación y temperatura promedio en verano (60.16 mm/m y 13.14°C), y las azules al promedio en invierno (53.40 mm/m y 3.62°C). C) Altitud del lugar de origen de cada ecotipo. La flecha negra indica la altitud promedio (325 msnm).

7.2 Variabilidad fenotípica de la roseta en diferentes ecotipos de *A. thaliana*.

De los ecotipos arriba descritos, es importante mencionar que el ecotipo Col-0 es el más estudiado en diferentes áreas de la biología molecular y genética, y por ende, del cual se tiene mayor información disponible, por lo que en este trabajo representará al grupo control.

Al analizar el fenotipo aéreo de los ecotipos seleccionados para este estudio se encontró variación en la morfología de las hojas (Fig.10), principalmente en el tamaño y la forma. Por ejemplo, los ecotipos CIBC10 y Ler presentan hojas pequeñas con una forma ovada, mientras que las de Cvi-0 y Sha son lanceoladas y de margen entero; es decir, sus hojas no presentan ondulaciones; contrario a lo que se observa en algunas hojas de HR5, Se-0 y Ta-0 que tienen márgenes dentados. Además observaciones preliminares sugieren que el tiempo de floración también es distinto, pues a los 25 dps sólo los ecotipos Col-0, FR-2, Bay y Ws presentan escapo con un pequeño brote floral. Estos resultados demuestran que los ecotipos de *A. thaliana* tienen diferencias en distintos caracteres aéreos; sin embargo, se requiere realizar análisis de cantidad de tricomas, estomas o ensayos de tiempo de floración para describir más sobre la variabilidad en este órgano.

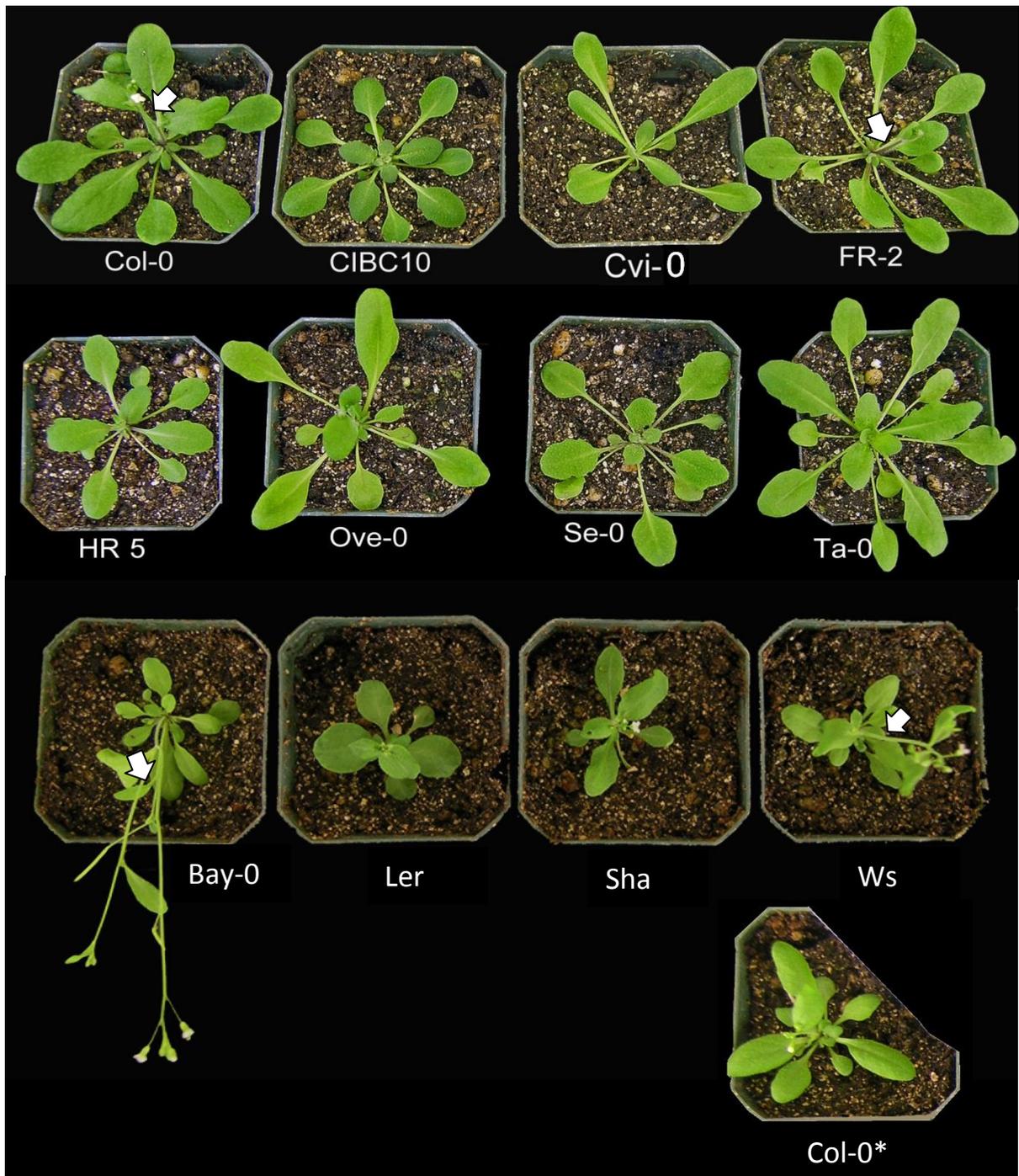
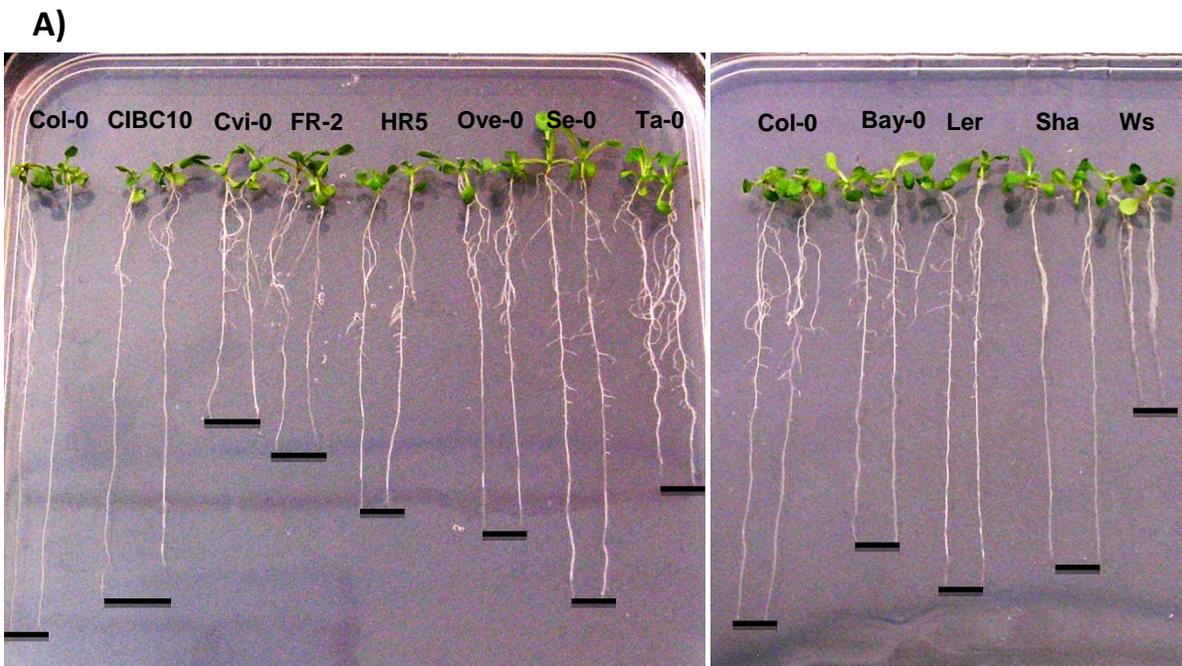


Figura 10. Variación morfológica en la roseta de los diferentes ecotipos de *A. thaliana*. Plantas de 25 días post-siembr. Muestras de dos ensayos diferentes: el primero abarca desde el ecotipo Col-0 hasta Ta-0 y el segundo desde Bay-0 hasta Ws. Col-0* es la planta control del segundo ensayo.

7.3 Variabilidad fenotípica de la raíz en diferentes ecotipos de *A. thaliana*.

El análisis de la variación natural en la raíz es esencial para comprender los diferentes mecanismos moleculares y respuestas fenotípicas relacionadas con la adaptación de las plantas a diversas condiciones ambientales. Al analizar la longitud de la raíz de los ecotipos, se encontró que claramente presentan diferencias en su tamaño (Fig.11A). Para cuantificar estas diferencias se realizaron mediciones del tamaño total, y se verificó que son significativamente distintos respecto a Col-0 (Fig. 11B). En estos análisis se percibe que las raíces más largas fueron las de los ecotipos Col-0 y CIBC10, con tamaños de 6.30 cm y 6.37 cm a los 10 dps, respectivamente, y éstas duplican el tamaño de los ecotipos de raíz más corta como Ws y Cvi-0, que tienen un tamaño de 3.66 cm y 3.54 cm, respectivamente (Fig.11B).



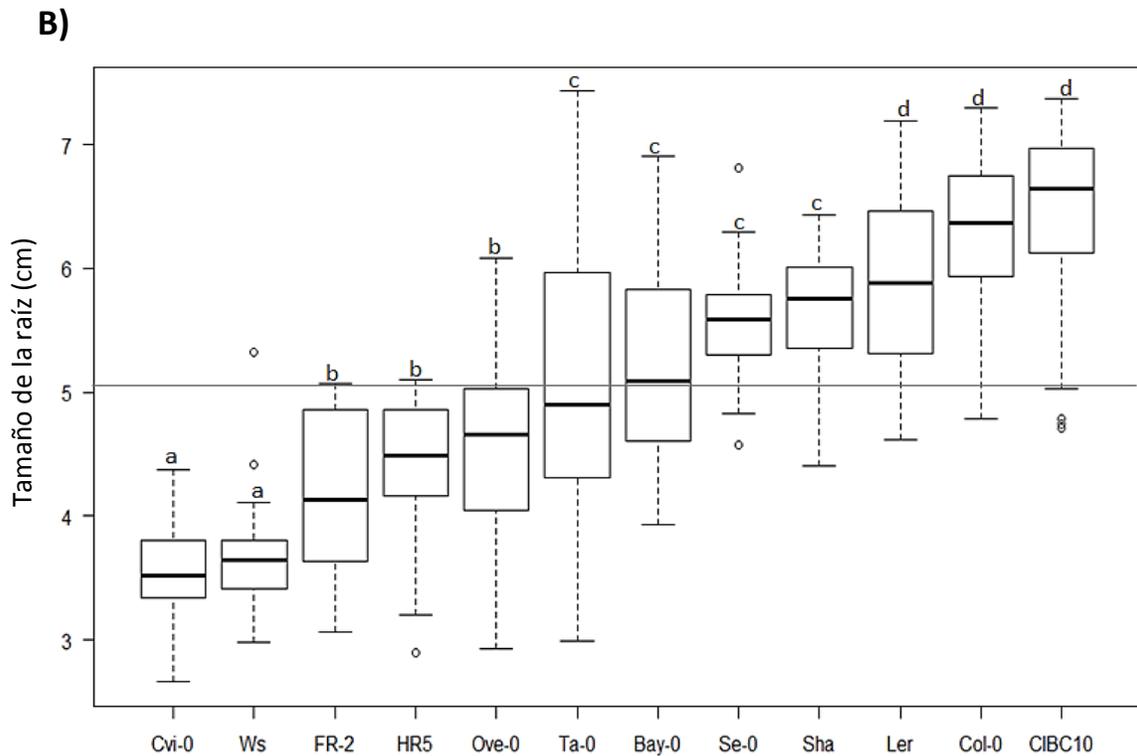


Figura 11. Tamaño radicular de los ecotipos a los 10 dps. A) Fenotipo del tamaño total alcanzado; B) Tamaño de la raíz en centímetros. Las cajas representan el rango intercuartil (25% y 75%), la línea gruesa horizontal la mediana (50%), y las líneas punteadas (los bigotes) los valores máximos y mínimos. Los puntos aislados representan datos extremos. La línea horizontal que atraviesa el gráfico muestra el valor promedio de todos los ecotipos (promedio=5.07). Las letras minúsculas distintas indican tamaños significativamente diferentes (ANOVA, $p < 0.001$). Resultado promedio de 4 réplicas biológicas con $n > 30$ para cada ecotipo.

Los resultados anteriores demuestran que la mayoría de los ecotipos tienen tamaños de raíz significativamente diferentes a los 10 dps, lo cual puede deberse a diferencias en los tiempos de protrusión radicular o en la tasa de crecimiento de la raíz. Para evaluar esto se realizó una cinética de crecimiento radicular (Fig.12), en donde se observa que la emergencia de la raíz (a simple vista) y el crecimiento radicular inicial es muy similar en todos los ecotipos, sin embargo a partir del quinto día de crecimiento comienza a divergir el tamaño de la raíz entre ecotipos, siendo muy evidentes los ecotipos con tamaños finales extremos (Col-0, CIBC10 y Cvi-0, Ws) (Fig.12). La tasa de crecimiento

se definió como la longitud de la raíz sobre hora (mm/hr) y ésta permitió establecer el comportamiento que siguen los ecotipos por día, demostrando que la mayoría mantienen constante su crecimiento, como Col-0 y CIBC10, pues la tasa de crecimiento es proporcional al tamaño de la raíz con un coeficiente de regresión de $R^2=0.86$ y 0.83 (p value $<2.2 \times 10^{-16}$), respectivamente. Y por otra parte, los ecotipos de raíz más corta, Cvi-0 y Ws, muestran una desaceleración en su tasa de crecimiento, exhibiendo un patrón no lineal entre la tasa de crecimiento y el tamaño radicular $R^2=0.6236$ y 0.5953 (p value $<2.2 \times 10^{-16}$), respectivamente (Fig. S 1). Sin embargo, el patrón no es igual para estos dos, pues mientras Cvi-0 crece a una menor tasa desde el cuarto día con respecto al resto, Ws tiene un crecimiento similar a los demás, pero éste se reduce en el séptimo día (Fig. 12 y Fig. S 1).

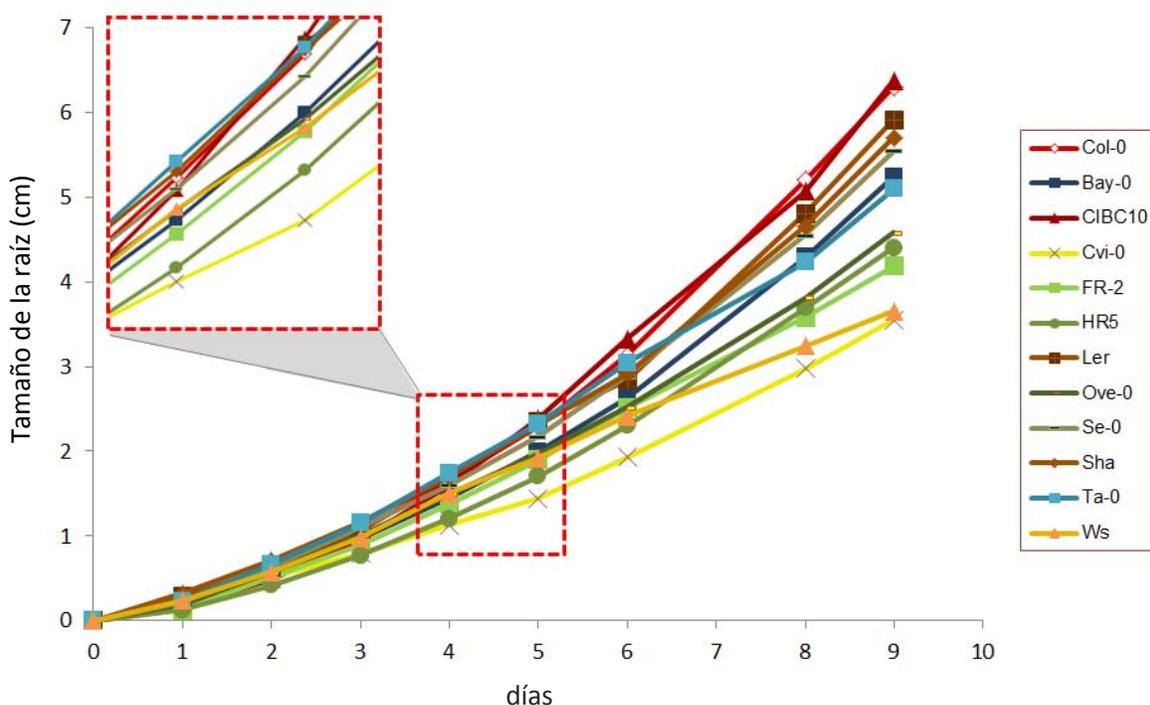


Figura 12. Cinética de crecimiento radicular de los diferentes ecotipos de *A. thaliana*. El cuadro ampliado muestra que en el quinto día las diferencias en el crecimiento son mayores. Resultado promedio de 4 réplicas biológicas con $n>30$ para cada ecotipo.

7.4 Correlación entre el tamaño de la raíz y las condiciones ambientales del lugar de origen.

La deriva génica y la selección natural son dos fuerzas evolutivas que actúan sobre la variabilidad de los caracteres en las poblaciones. Mientras la primera se da azarosamente, la segunda depende de las presiones ecológicas a las que están sujetas los individuos, afectando su adecuación (Eguiarte, 1986). De esta forma, es probable que la variabilidad observada en el crecimiento de las raíces haya sido moldeada por una presión ambiental, pues la raíz es un órgano subterráneo muy plástico que puede responder a diferentes concentraciones o tipos de nutrientes, temperatura, humedad, etc. Así, la acumulación de estos cambios a lo largo del tiempo causarían las variaciones que observamos en la especie.

Con el fin de estudiar la correlación entre alguna variable ambiental, como la temperatura o la precipitación y el tamaño de la raíz, se realizó una prueba de Spearman. Los resultados obtenidos indican que la correlación entre la temperatura y el tamaño radicular es negativa y muy baja entre ambas variables, del -5.1% para la temperatura en verano y -6.6% en invierno. Sin embargo, al estudiar la precipitación, el valor obtenido fue de 38.5% para la precipitación en verano y de 40.4% para la precipitación en invierno. Es decir, el tamaño de la raíz correlaciona más fuertemente con la precipitación que con la temperatura del lugar de origen, lo cual tiene sentido si se considera que la raíz es un órgano subterráneo que se encuentra en estrecha relación con la cantidad de humedad a su alrededor. Además es importante notar que cuando se compara el tamaño contra la precipitación en verano (Fig.13A), época en que la cantidad de lluvia es mayor, los ecotipos con valores ambientales más extremos tienen un tamaño de raíz opuesto; es decir, los ecotipos que viven en ambientes con precipitaciones muy elevadas, son aquellos que presentan raíces largas, como es el caso de Bay-0, Sha y Col-0; mientras que los ecotipos que habitan en los ambientes más secos, presentan una raíz más corta como Cvi-0 y HR5. En cambio, cuando se busca una relación con la precipitación en invierno, el patrón anteriormente descrito sólo se observa en los ecotipos más contrastantes, Cvi-0 y Sha (Fig.13B).

En cuanto a los ecotipos restantes se puede observar que las condiciones de precipitación en las que habitan no son extremas y su tamaño de raíz es heterogéneo, como el ecotipo Ta-0 que presenta un valor de precipitación intermedio y el tamaño radicular de sus individuos es muy variable, abarcando casi todo el rango de tamaños posibles (Fig.13A). Estos resultados sugieren que sólo las condiciones de precipitación extremas podrían ser un factor de presión ambiental al que algunos ecotipos han respondido evolutivamente.

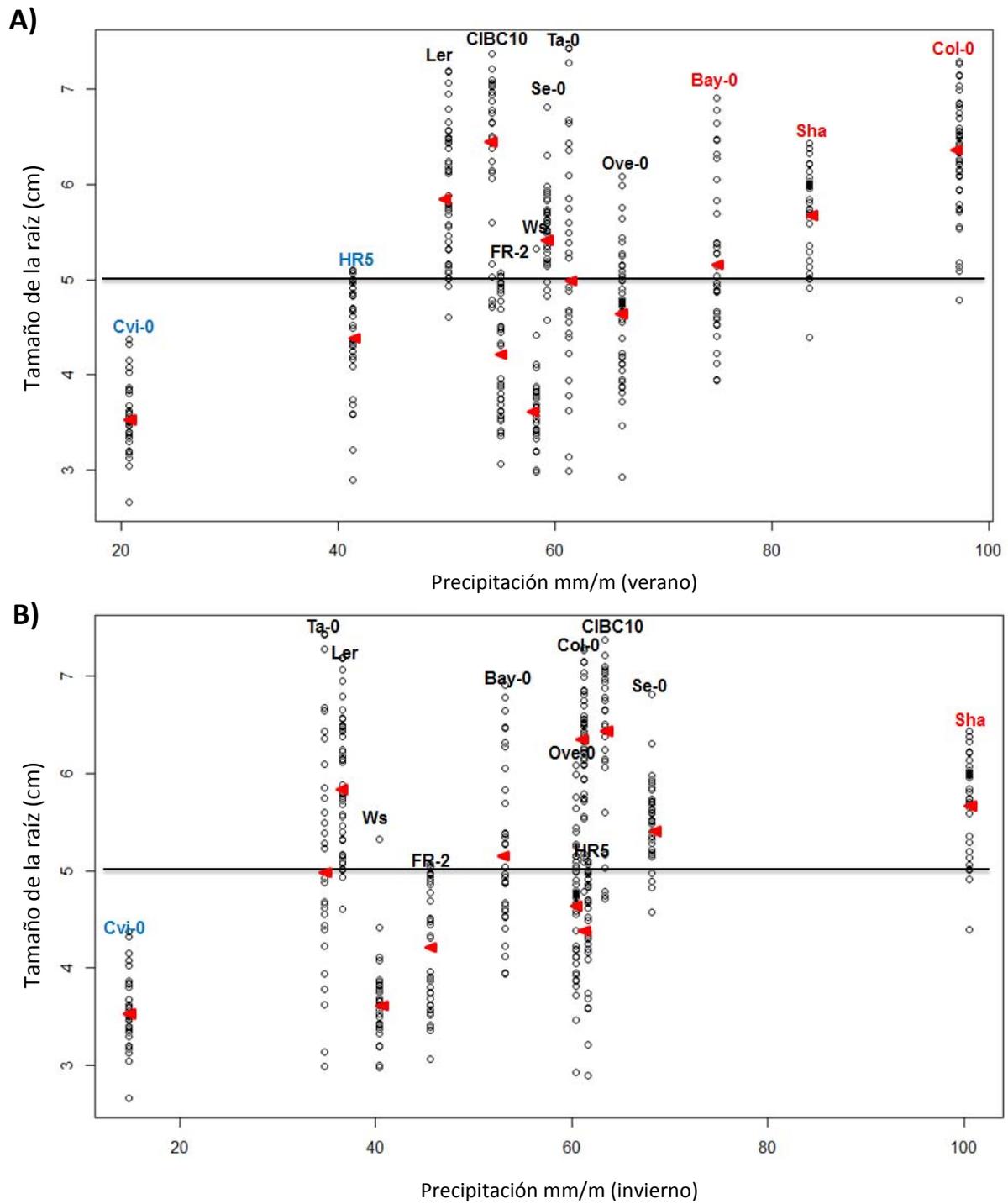
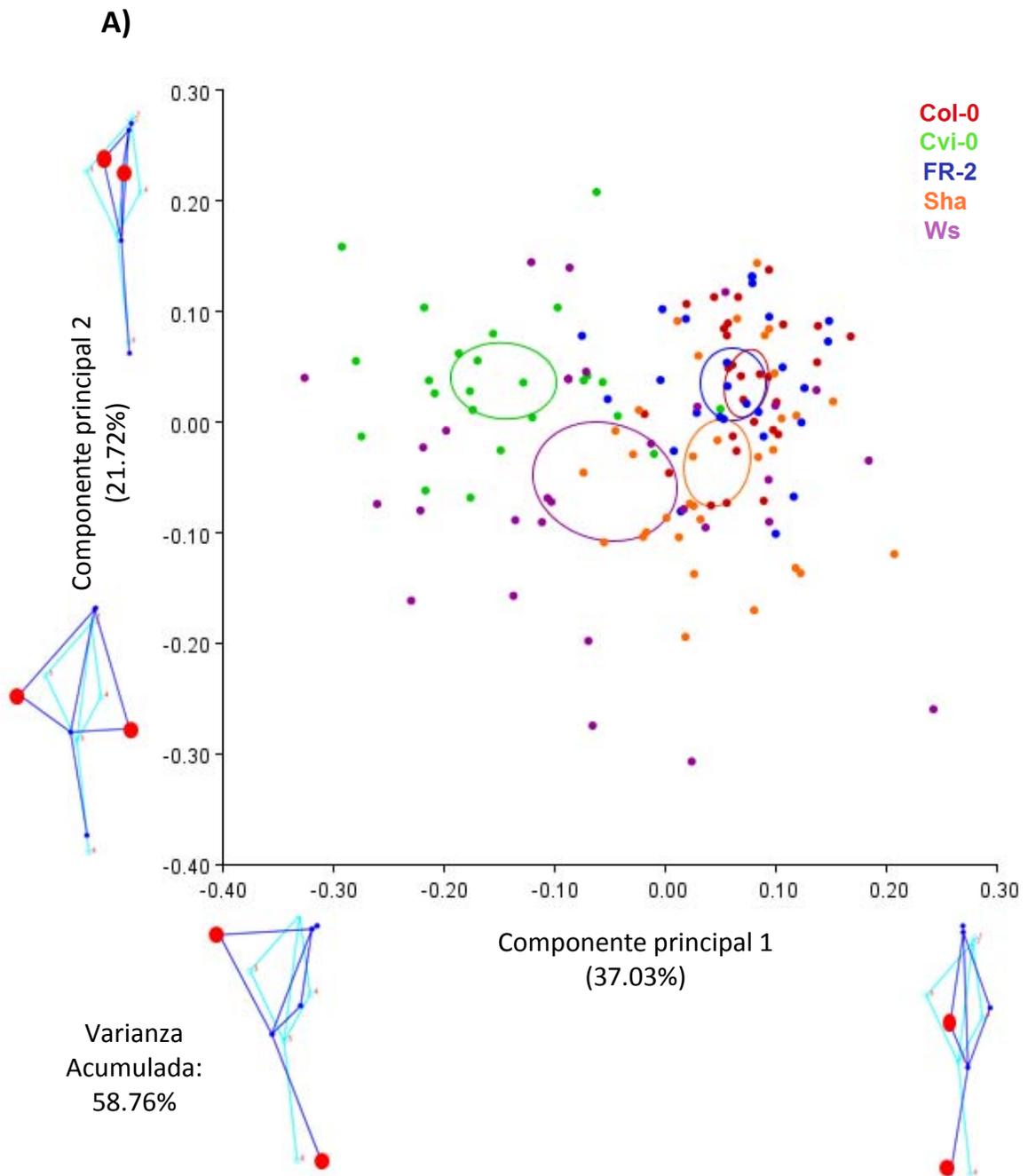


Figura 13. Correlación del tamaño radicular con la precipitación en A) verano y B) invierno. Cada punto indica el tamaño radicular de un individuo perteneciente a un ecotipo específico (n>30 para cada ecotipo). Las flechas rojas representan el valor promedio del tamaño de cada ecotipo. La línea negra que atraviesa la gráfica muestra el valor promedio del tamaño radicular de todos los ecotipos (promedio=5.07).

7.5 Análisis morfométricos de la raíz.

Al observar los distintos patrones de crecimiento radicular que presentaban las poblaciones de *A. thaliana* fue muy evidente que éstas no variaban sólo en el tamaño total sino también en la forma que adquirirían en el espacio (Fig.17). Para establecer la variación morfométrica que presentaban los ecotipos y facilitar la inspección gráfica, se llevaron a cabo análisis de morfometría geométrica a través del software MorphoJ (Klingenberg, 2011). De los doce ecotipos de estudio se seleccionaron cinco representativos y se realizaron los análisis completos en estos grupos. Es importante indicar que el ecotipo HR5 desde un inicio se descartó de estos análisis pues carecía casi por completo de raíces laterales o éstas eran muy pequeñas (Fig.17).

Mediante el análisis de componentes principales (PCA) (ver materiales y métodos) se identificaron los caracteres en la raíz que están creando la mayor varianza entre los grupos. En este análisis se concluyó que los componentes 1, 2 y 3 explican en conjunto el 72.99% de la varianza total entre los ecotipos (Fig. 14A y B). Las medidas más importantes se identificaron por sobrepasar el valor absoluto 0.3 en los eigenvalores (Catena *et al.*, 2003) y corresponden a los *landmarks* 3 y 6 para el componente principal 1, que determinan la distancia que existe de la raíz lateral derecha hacia la raíz principal y la inclinación de la raíz principal. Para el componente principal 2 los *landmarks* que explican la mayor varianza son el 3 y el 4, los cuales reflejan la distancia que existe de ambas raíces laterales hacia la principal (Fig. 14A); y para el componente principal 3 el *landmark* 4 que refleja la orientación de la raíz lateral izquierda con respecto a la principal (Fig. 14B).



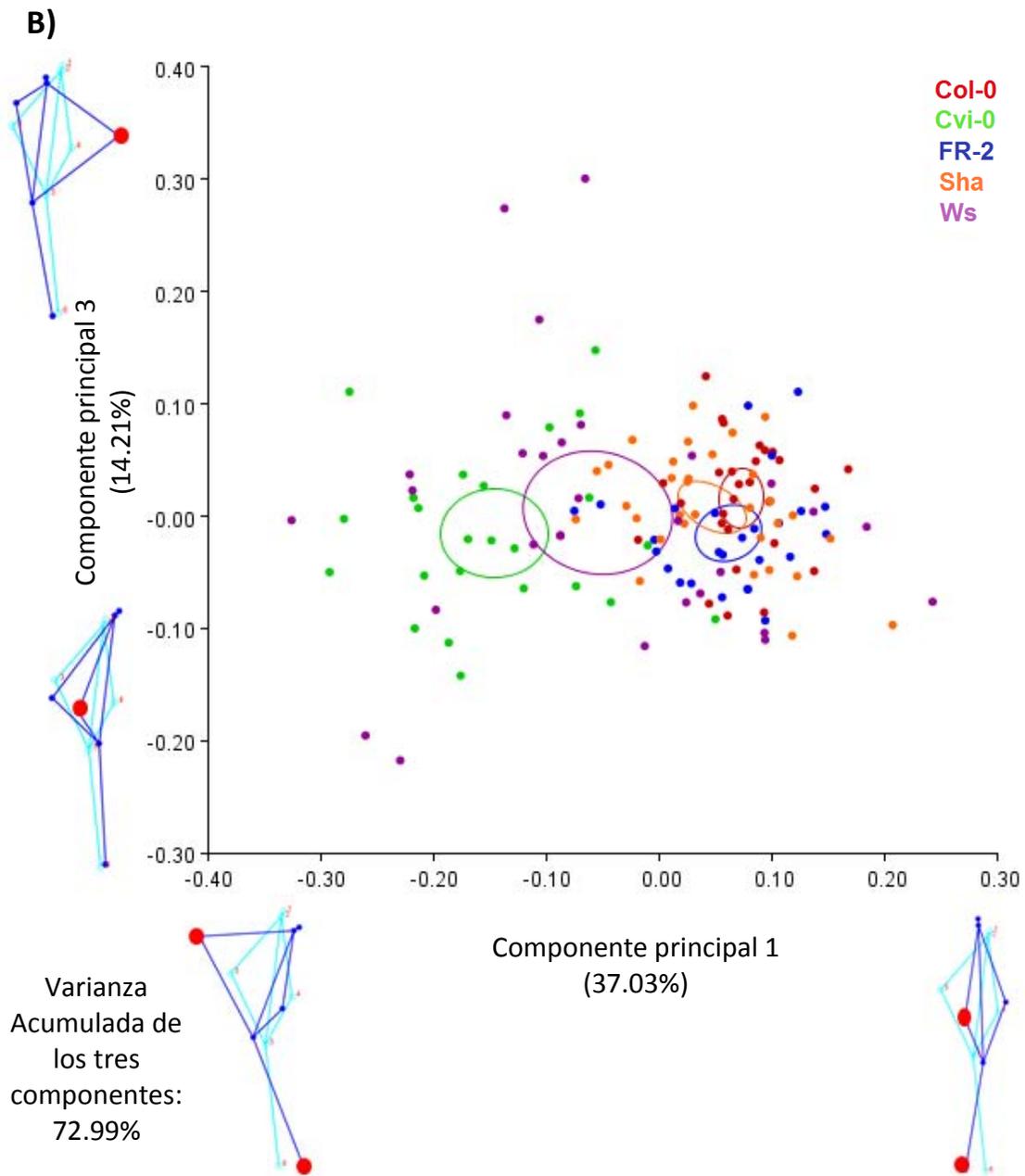


Fig. 14. Análisis de componentes principales para la morfología de la raíz. A) Componente principal 1 vs. Componente principal 2; B) Componente principal 1 vs. Componente principal 3. Los círculos rodean las formas promedio de cada ecotipo. Las figuras en azul marino adyacentes a cada eje representan las formas que pueden tomar las raíces más opuestas de los componentes principales correspondientes. Las raíces en azul claro representan la forma promedio. En rojo se muestran los *landmarks* que causan la mayor variación para cada componente. Ensayo con una $n=30$ para cada ecotipo. ANOVA, $P<0.05$.

Después de identificar los caracteres que crean la mayor varianza entre los grupos se realizó un análisis de variables canónicas con el fin de comprobar el patrón morfométrico que presenta cada grupo establecido *a priori* (i.e. ecotipos), y de esta forma observar sus similitudes y diferencias en el espacio multivariado. El análisis de variantes canónicas identificó los individuos que pertenecen a cada ecotipo y los agrupó de forma tal que se maximizaran las diferencias entre grupos y se minimizaran dentro de cada uno. En la Fig.15 se observa que casi todos los ecotipos presentan formas muy similares a la promedio, pues la mayoría de la nube de puntos-individuos se distribuye cerca de las coordenadas [0,0]; excepto Cvi-0, que es el grupo más alejado del promedio y del grupo control. Además la mayoría de los ecotipos tiende a presentar una apertura grande de las raíces laterales con respecto a la principal, lo cual se demuestra en la mayor proporción de datos-individuos por debajo del valor 0 en el eje Y de la gráfica de variables canónicas (Fig. 15). Resultados similares se observan en la variabilidad morfométrica (Fig.16C y D).

Adicionalmente se puede observar que el grupo más restringido es Col-0, pues sus individuos son muy similares entre sí (Fig.15) y además su población se distribuye muy cercanamente a la forma promedio (Fig.16B). FR-2 es el grupo más parecido a Col-0, seguido de Sha; sin embargo, en este último es evidente que la extensión de las raíces laterales es mayor, aunque también simétrica (Fig. 16D). Por otra parte Ws es un grupo que presenta una gama muy amplia de formas entre sus individuos, incluyendo casi todas las existentes en el espacio (Fig.15); su forma promedio es muy similar a la de Cvi-0 que se caracteriza por tener la raíz lateral izquierda muy alejada de la principal y el eje que conecta el *landmark* 2 con el 5 (raíz principal de donde emergen las laterales) está muy inclinado respecto a Col-0 (Fig. 16D). Esto puede deberse a la inclinación que tienen ambos ecotipos de la raíz principal durante el desarrollo (Fig. 17), lo cual se discutirá más adelante.

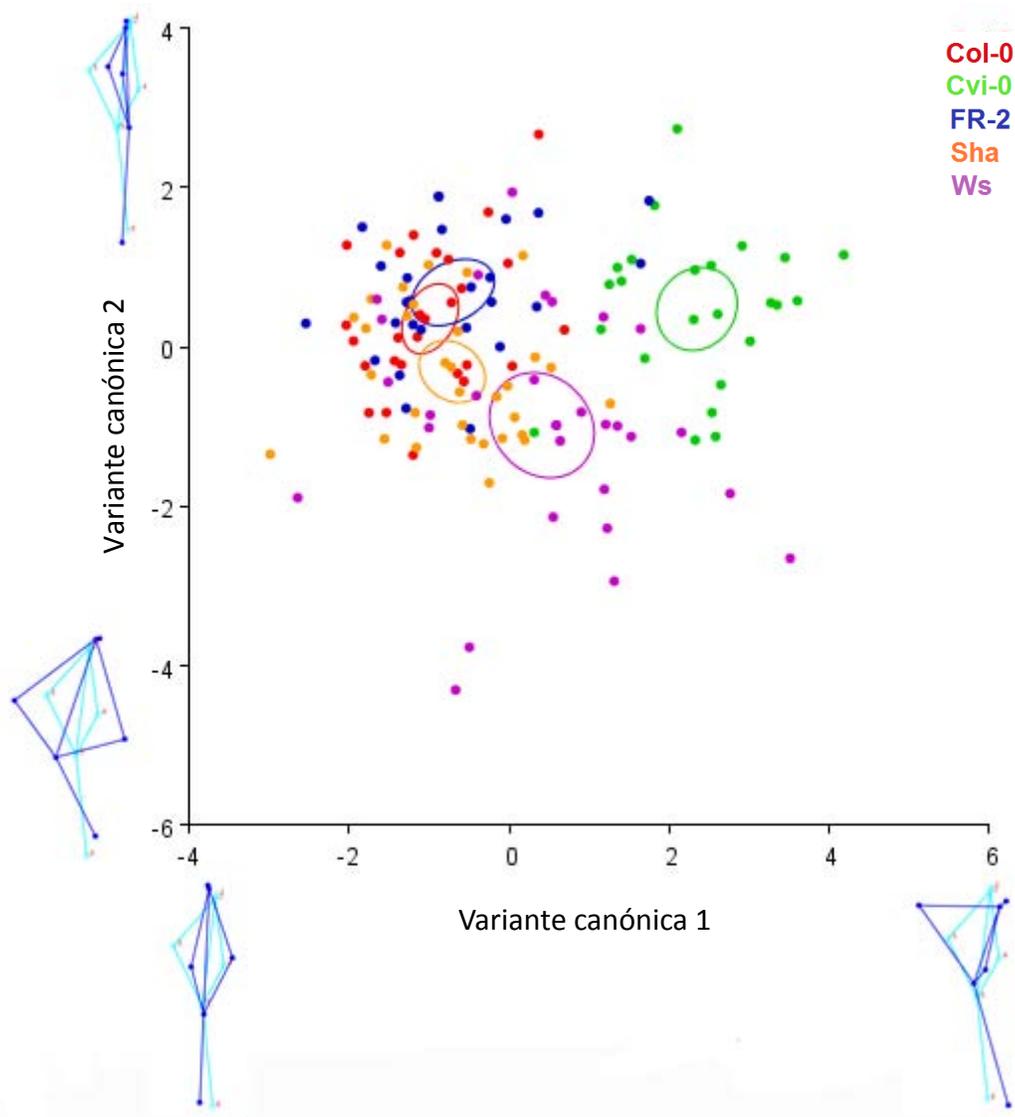


Figura 15. Espacio de formas obtenido mediante análisis de variantes canónicas. Los círculos rodean las formas promedio de cada ecotipo. Las figuras en azul marino adyacentes a cada eje representan las formas que pueden tomar las raíces más opuestas de los componentes principales correspondientes. Las raíces en azul claro representan la forma promedio. Ensayo con $n=30$ para cada ecotipo, $P < 0.05$

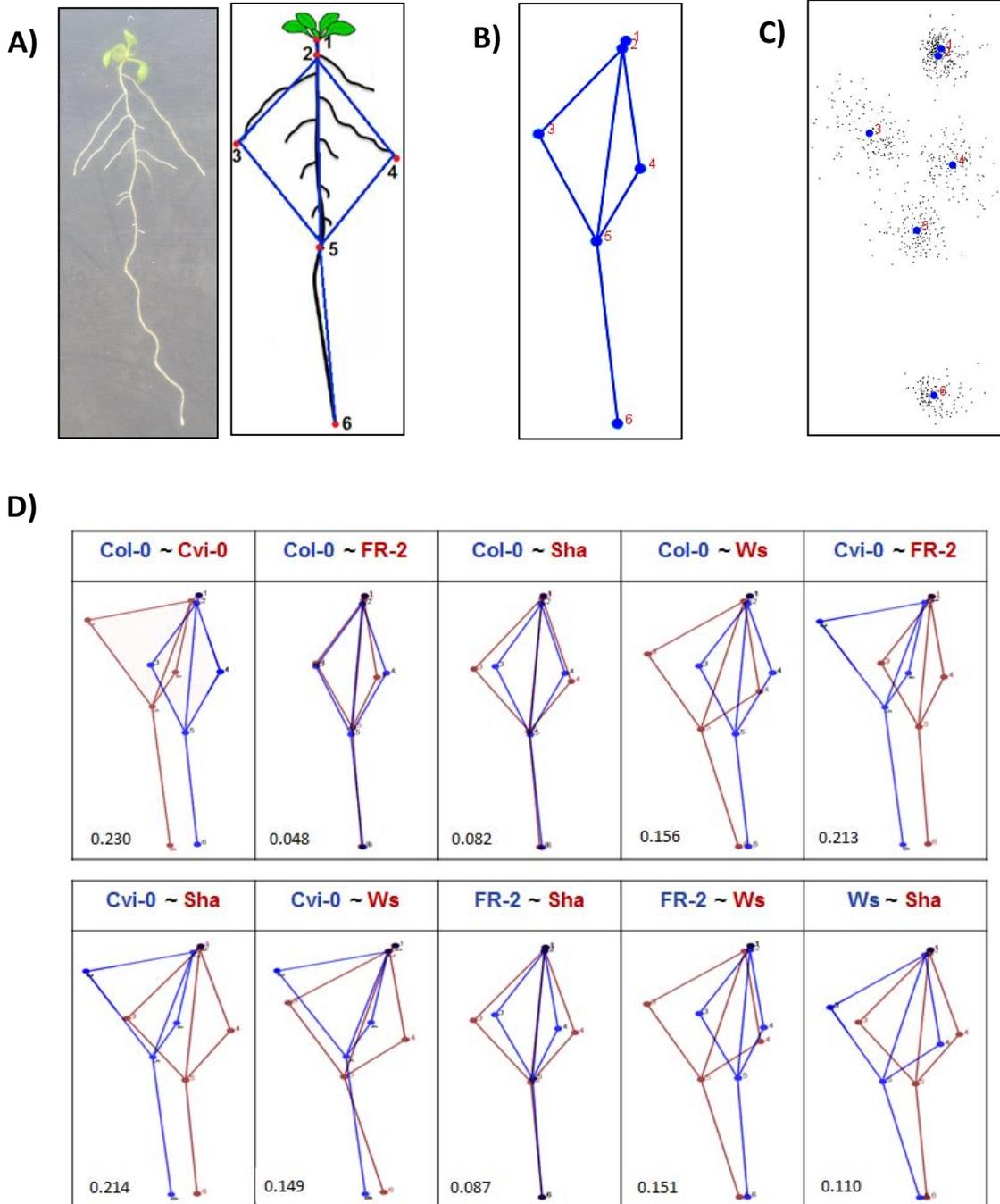


Figura 16. Variabilidad morfométrica en los ecotipos de *A. thaliana*. A) Conexiones entre *landmarks* para crear el polígono que representa la forma de la raíz; B) Forma promedio de la raíz; C) Variación total de la posición de los *landmarks*. Cada punto indica la posición del *landmark* respecto al promedio (puntos grandes azules). D) Comparaciones pareadas entre la forma promedio de cada uno de los ecotipos. Los números indican la distancia de *procrusters* entre los grupos. Ensayo con una n=30 para cada ecotipo. ANOVA, P<0.001.

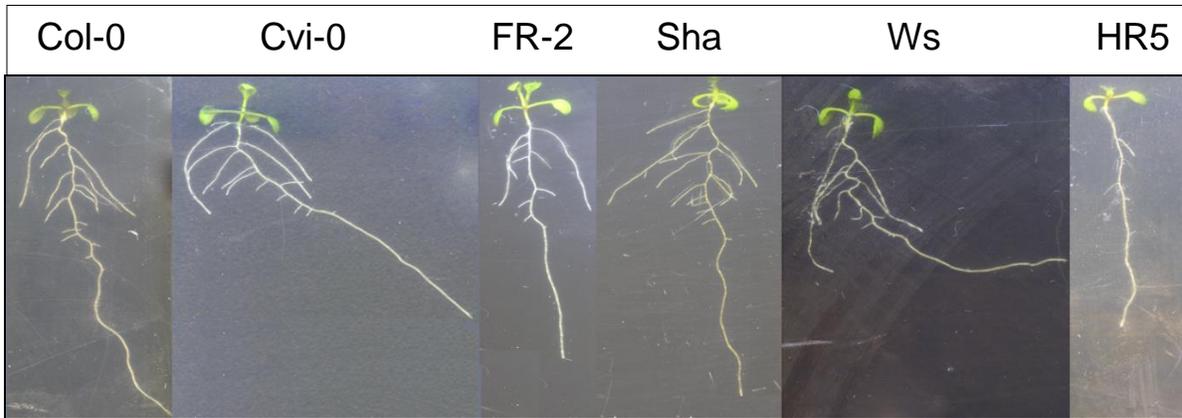


Figura 17. Morfología radicular de los ecotipos. Nótese la inclinación durante el desarrollo de los ecotipos Cvi-0 y Ws; y el corto tamaño de las raíces laterales de HR5.

7.6 Relación entre el tamaño de la raíz y la longitud del meristemo.

El crecimiento de la raíz está determinado esencialmente por un equilibrio entre la proliferación y la expansión celular, dos procesos correlacionados que determinan el tamaño final de la raíz. La proliferación se lleva a cabo en el meristemo, y cuando se producen más células en un tiempo determinado, entonces una mayor cantidad de ellas pueden pasar a la zona de elongación y expandirse, haciendo que la tasa de crecimiento de la raíz sea más rápida (Baskin, 2013). Por lo tanto, para evaluar si las diferencias encontradas en el tamaño total de la raíz de los ecotipos se deben a tasas diferenciales de proliferación en el RAM, se midió el tamaño del meristemo y se hicieron conteos del número de células que conformaban dicha zona.

Para definir la longitud del meristemo se realizaron mediciones desde el centro quiescente hasta la primera célula de la zona de elongación, y se encontró que sólo tres ecotipos son significativamente diferentes a Col-0: Bay-0 y Ta-0, que presentan un tamaño mayor al control, y Ws que tiene un meristemo más pequeño respecto a Col-0 (Fig.18). Posteriormente, para determinar si las diferencias en el tamaño meristemático se deben a una cantidad de células diferencial entre ecotipos, se procedió con el conteo de las células del córtex presentes en el meristemo radicular. Mediante estos análisis se encontró que

seis ecotipos muestran diferencias significativas respecto a Col-0 en el número de células que conforman al RAM (Fig.18). Entre ellos se encuentran CIBC10, Ler y Ta-0 con una cantidad de células mayor que el control, y Cvi-0, Ove-0 y Ws con una cantidad menor que Col-0.

Lo anterior muestra que sólo en Ta-0 y Ws la longitud del meristemo y la cantidad de células van en el mismo sentido, de forma significativa (Fig. 18). Sin embargo, lo observado en los ecotipos restantes también es muy interesante, pues a pesar de que existe una correlación del 69% entre el número de células y la longitud del meristemo, existen casos en los que estas dos variables son opuestas. Por ejemplo, aunque el ecotipo Bay-0 tiene un meristemo más grande respecto a Col-0 (una diferencia de 47 μm), el número de células es similar entre ellos (44.07 ± 4.54); contrario es el caso de Ler, que tiene significativamente mayor número de células meristemáticas (una diferencia de 9 células) pero su longitud del meristemo es similar ($327.19 \mu\text{m} \pm 40.93$) (Fig.18). Esto se puede explicar por el tiempo en que las células alcanzan el dominio de transición, que es la zona en que las células dejan de dividirse e incrementan su tamaño lentamente. Al respecto, el dominio de transición en el ecotipo de Bay-0 se observa en la célula con posición 30, mientras que el dominio de transición en Col-0 se da hasta la célula 35 (Fig.19). Por lo tanto, aunque su meristemo tiene un número celular no significativamente distinto al de Col-0, el tamaño en micrómetros es mayor porque varias de ellas están dejando de dividirse antes que en el control y son células más alargadas. Mientras que Ler presenta el patrón contrario, porque a pesar de que su meristemo tiene un tamaño muy similar al de Col-0, está compuesto por un número mayor de células que se siguen dividiendo y se muestran muy pequeñas incluso en el dominio de transición (Figs. 19 y 20). Otros casos interesantes son los de Cvi-0 y Ws, dos ecotipos que presentan el mismo número de células meristemáticas (37.67 ± 3.16) pero su RAM difiere por 33 μm , así como los casos de Ta-0 y Ler o Sha y Se-0 que contienen más o menos 51.62 ± 6.88 y 40.73 ± 4.53 células corticales, pero su RAM difiere por 44 y 71 μm , respectivamente (Fig.18). Estas diferencias en la longitud del RAM son debidas a la variación en el tamaño de las células que están próximas a elongarse, como se muestra en Cvi-0, Ta-0 y Sha que tienen

células más grandes que Ws, Ler y Se-0 (Fig. 19). Por lo tanto, estos datos sugieren que en algunos casos el número celular no determina el tamaño del meristemo, pues el tamaño de las células y el tiempo en que éstas alcanzan el dominio de transición son diferentes entre los ecotipos (Fig.20).

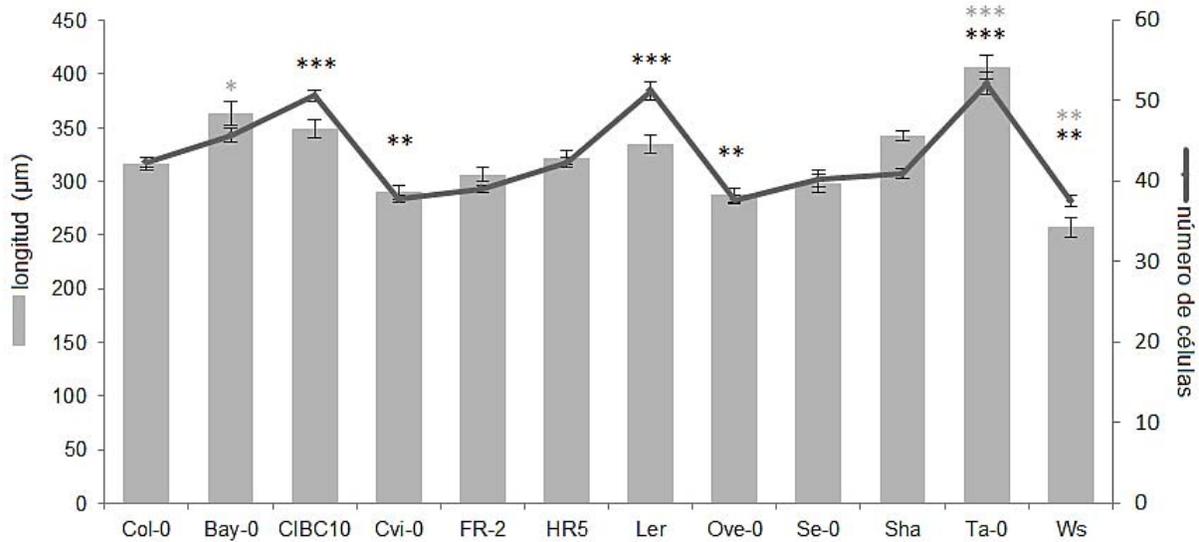


Figura 18. Tamaño promedio del meristemo radicular de los ecotipos a los 6 dps. Las barras grises muestran la longitud promedio del meristemo en micrómetros y las líneas negras el número de células del córtex que conforman al RAM. Las barras sobre cada gráfico representan el error estándar. Resultado promedio de 3 réplicas biológicas con n=30 para cada ecotipo. ANOVA, P<0.001 (***), P<0.01 (**) y P<0.05 (*) respecto a Col-0. Los asteriscos grises indican la significancia de la longitud (µm) y los negros del número celular.

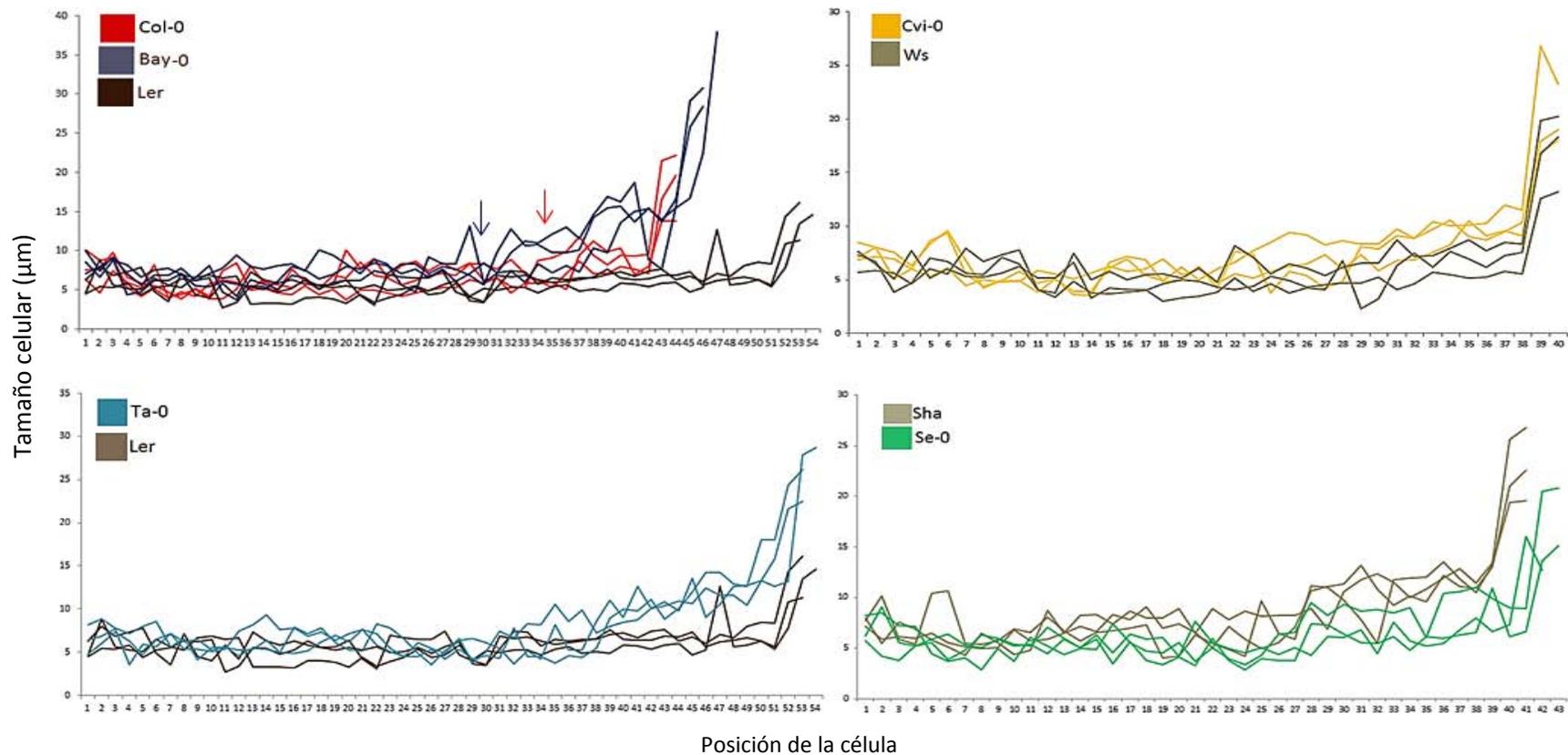


Figura 19. Tamaño de las células respecto a su posición en el RAM. Los números en el eje X indican la posición de las células comenzando desde la célula inicial (posición 1) hasta las primeras células que se empiezan a elongar. Las flechas de color azul y rojo señalan el inicio del dominio de transición en Bay-0 y Col-0, respectivamente. Plantas de 6 dps. Resultados con n=3 para cada ecotipo.

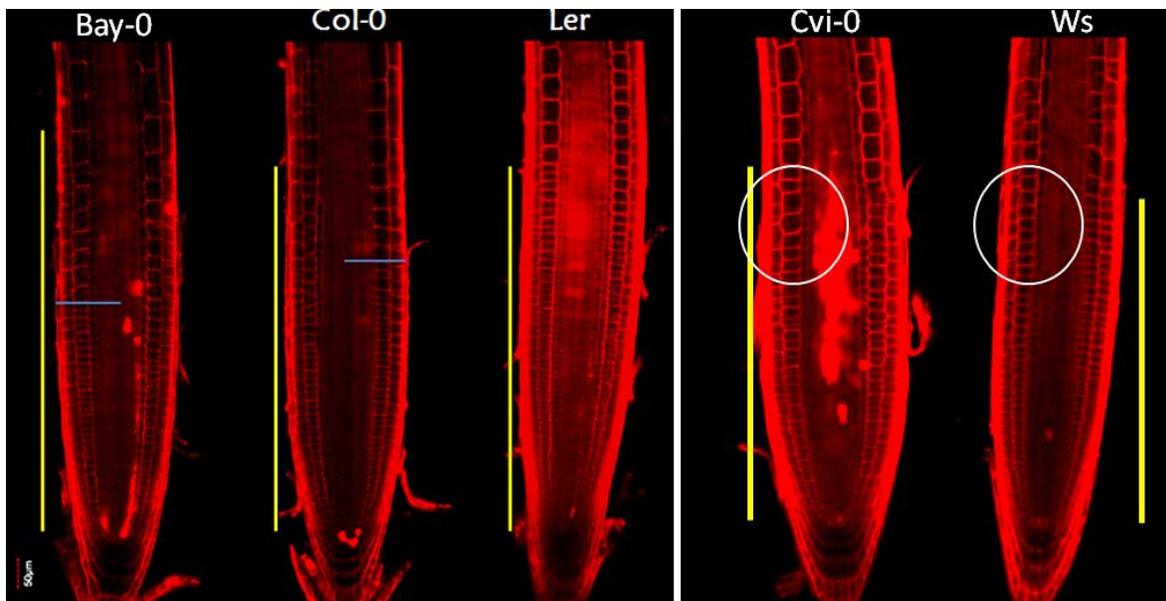


Figura 20. Fenotipos del RAM de plantas a los 6 dps por microscopía confocal (20X). La línea vertical amarilla representa la longitud del meristemo, la línea horizontal azul donde comienzan el dominio de transición y los círculos encierran una zona del dominio de transición para comparar el tamaño celular entre Cvi-0 y Ws. Nótese que en Ler no se puede definir el dominio de transición pues es muy difuso.

Por otra parte, la asociación entre el tamaño del RAM y la longitud total de la raíz fue específica para cada ecotipo. Por ejemplo, se encontró que la longitud del RAM medido a través del número de células que lo conforman, estaba directamente relacionado con el tamaño radicular en los ecotipos Cvi-0, Ove-0 y Ws pues un meristemo pequeño generaba una raíz más corta respecto al control (Fig. 21); mientras que CIBC10, Ler y Ta-0 presentaron un RAM más grande que Col-0, pero la longitud total de la raíz no es significativamente diferente. En contraparte, tamaños pequeños de raíz como Bay-0, FR-2, HR5 y Se-0 presentaron un tamaño de meristemo similar al de Col-0 (Fig.21), que es el ecotipo de raíz más larga (Fig. 11). De acuerdo con estos resultados, la longitud del RAM no siempre determina el tamaño radicular, por lo que es muy probable que el tamaño radicular de algunos ecotipos esté siendo influenciado por eventos que suceden en la zona de elongación y/o diferenciación de la raíz.

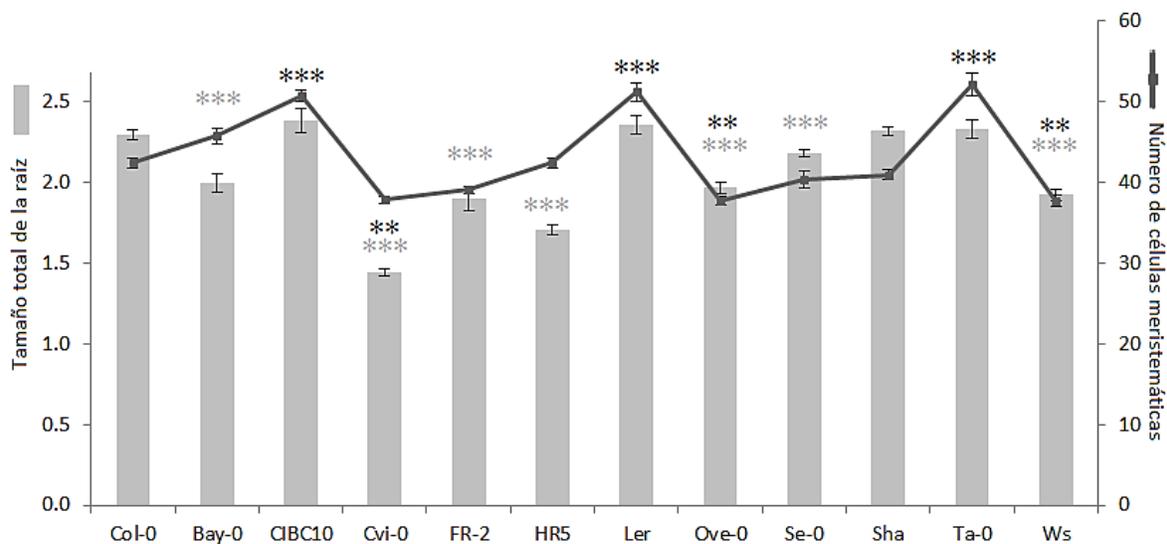


Figura 21. Asociación entre el número de células que conforman el meristemo y el tamaño total de la raíz. Las barras representan el error estándar. Resultado promedio de 3 réplicas biológicas con n=30 para cada ecotipo. ANOVA, $P < 0.001$ (***) , $P < 0.01$ (**) y $P < 0.05$ (*) respecto a Col-0. Los asteriscos grises indican la significancia del tamaño total de raíz y los negros del número celular.

7.7 Variación en la organización del QC y las células iniciales de RAM entre ecotipos.

A través de análisis de microscopía, se encontró que los ecotipos Cvi-0, HR5 y Sha presentaban disimilitudes entre sus individuos con respecto a Col-0. A los 4 días post-siembra el ecotipo Col-0 tiene bien definidas sus células del centro quiescente y en general, una sola capa de células iniciales de la columela. Por debajo de ésta se encuentran las células diferenciadas de la columela que son capaces de almacenar almidón y teñirse de morado con la aplicación de lugol.

Sin embargo, no todos los ecotipos se comportan de igual manera, pues algunos individuos de Cvi-0 y HR5 presentan dos filas de células iniciales de la columela. Además, el meristemo del ecotipo Cvi-0 es más ancho que el resto, debido a un alargamiento evidente de las células iniciales. Asimismo, en el ecotipo Sha no es posible delimitar adecuadamente el nicho de células troncales pues las células teñidas con lugol aparecen

justo debajo de donde debería encontrarse el CQ y se pierde la delimitación de las células iniciales de la columela. Estos datos muestran la diversidad que existe en la morfología del meristemo entre los ecotipos, pero se requieren estudios más detallados para realizar análisis estadísticos y comprender las implicaciones biológicas que esto conlleva.

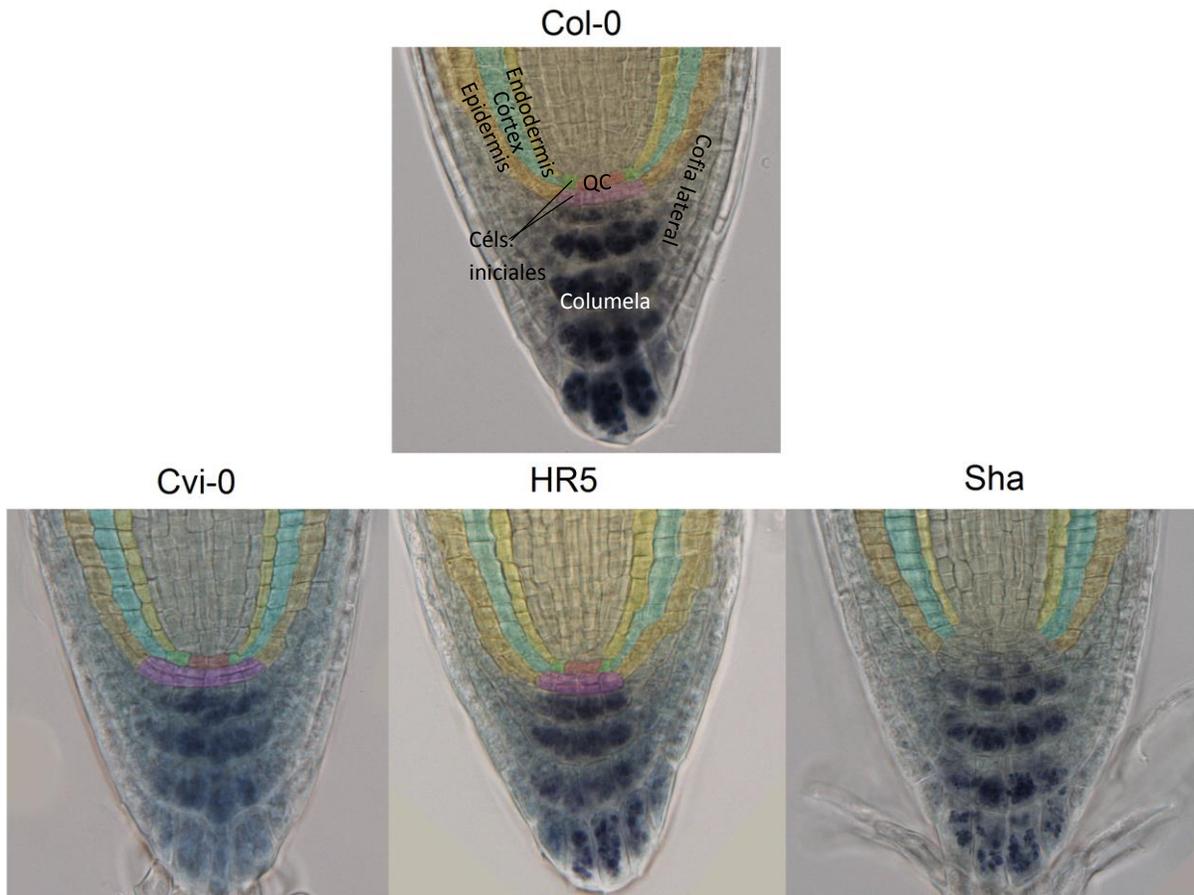


Figura 22. Variabilidad en la morfología del nicho de células troncales de algunos ecotipos de *A. thaliana*. En rojo se muestra el QC (centro quiescente), en verde las células iniciales del córtex/endodermis y en morado las células iniciales de la columela. Se observan en morado los gránulos de almidón de la columela que se tiñen con el lugol. En Sha no se puede delimitar adecuadamente el nicho de células troncales. Plantas de 4 dps. Raíces representativas de un tamaño de muestra=20 para cada ecotipo.

7.8 Expresión *in silico* de los genes MADS-box y factores epigenéticos en la parte aérea de los ecotipos de *A. thaliana*.

Los estudios anteriores demuestran que existe una gran variación morfológica en los ecotipos, tanto en la parte aérea (Fig. 10) como en la raíz, que se estudió a nivel de la arquitectura radicular y meristemático. Por lo tanto, conocer los mecanismos moleculares que están interviniendo es esencial para el estudio integral de la variabilidad.

Como una primera aproximación se decidió realizar un análisis de expresión génica, pues se ha demostrado que los cambios regulatorios de genes a menudo contribuyen a las adaptaciones de las especies, así como a la variación entre las poblaciones en fenotipos complejos (Pai *et al.*, 2015). La base de datos del portal “The Arabidopsis Information Resource” (TAIR) contiene información de transcriptomas donde se pueden explorar los niveles de expresión, aunque sólo están disponibles los datos para la parte aérea de plántulas de 4 días de algunos ecotipos (<http://bbc.botany.utoronto.ca>). Por consiguiente, se realizó el análisis *in silico* de la expresión de diversos genes que codifican para factores transcripcionales y factores epigenéticos de los complejos TrxG y PcG.

Se ha descrito que un adecuado desarrollo radicular requiere de la presencia de algunos factores transcripcionales, y los genes MADS-box han sido caracterizados como reguladores del desarrollo en diversos tejidos de Arabidopsis. Los genes *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19* se expresan principalmente en la raíz en Col-0, y recientemente se ha demostrado su importancia en el desarrollo de este órgano (Burgeff *et al.*, 2002; Tapia-Lopez *et al.*, 2008; Garay-Arroyo *et al.*, 2013). Por otra parte, estudios recientes sugieren que los complejos epigenéticos PcG y TrxG están involucrados en la identidad celular pues actúan para mantener el equilibrio entre la proliferación y la diferenciación en raíz, mediante su capacidad de reprimir o activar la transcripción, respectivamente (Aichinger *et al.*, 2011; Napsucialy-Mendivil *et al.*, 2014). Además resultados de nuestro laboratorio sugieren que estos complejos son reguladores de la expresión de los genes MADS-box que participan en el desarrollo radicular (Petrone, 2015; Vega *et al.*, datos no publicados).

Los resultados obtenidos de los análisis *in silico* muestran que todos los genes se expresan de manera diferencial en cada ecotipo, en mayor o menor medida. Por ejemplo, de los factores transcripcionales, *XAL1/AGL12* es el que presenta mayor expresión en casi todos los ecotipos si se compara contra los demás genes MADS-box (Fig. 23A). En el ecotipo FR-2 se encontró la mayor expresión de *XAL1/AGL12* (4.5 veces mayor que Col-0), aunque se vieron niveles muy bajos de los MADS-box restantes. El ejemplo contrario se observa en el ecotipo Ove-0 que tiene una expresión 3.2 veces mayor que Col-0 del gen *XAL2/AGL14* y una expresión muy baja de *XAL1/AGL12* (Fig. 23A). Por otra parte, los ecotipos también presentan diferencias en la expresión de los factores epigenéticos, tanto en los genes que codifican para las metiltransferasas como en los complejos restantes (COMPASS-like y PRC2) que conforman los complejos PcG y TrxG. Dentro de los factores del grupo TrxG, las metiltransferasas muestran patrones de expresión similares a las del complejo COMPASS-like (Fig. 23C). De los factores del grupo PcG también la expresión de las metiltransferasas y de los componentes de PRC2 es homogénea; sin embargo, es muy evidente la elevada expresión que presenta MEA en Cvi-1 (Fig. 23D).

Como los patrones de expresión más altos dentro de los complejos COMPASS-like y PRC2 pueden estar enmascarando las diferencias que encontramos en las metiltransferasas, se realizó un gráfico que incluye sólo a *ATX-1* y *CLF* (Fig. 23B), pues además son los genes que más adelante se analizaron por RT-PCR en la raíz. En estos se encontró que todos los ecotipos presentan diferente expresión de ambos factores epigenéticos y en la mayoría su expresión es muy contrastante, excepto en HR5 que es similar (Fig. 23B).

A pesar de que esta información sólo está disponible en la parte aérea de los ecotipos, es una primera aproximación al comportamiento de los genes en las variedades naturales de la especie y con estos datos disponibles se logró comparar la expresión obtenida en la raíz de los genes de interés.

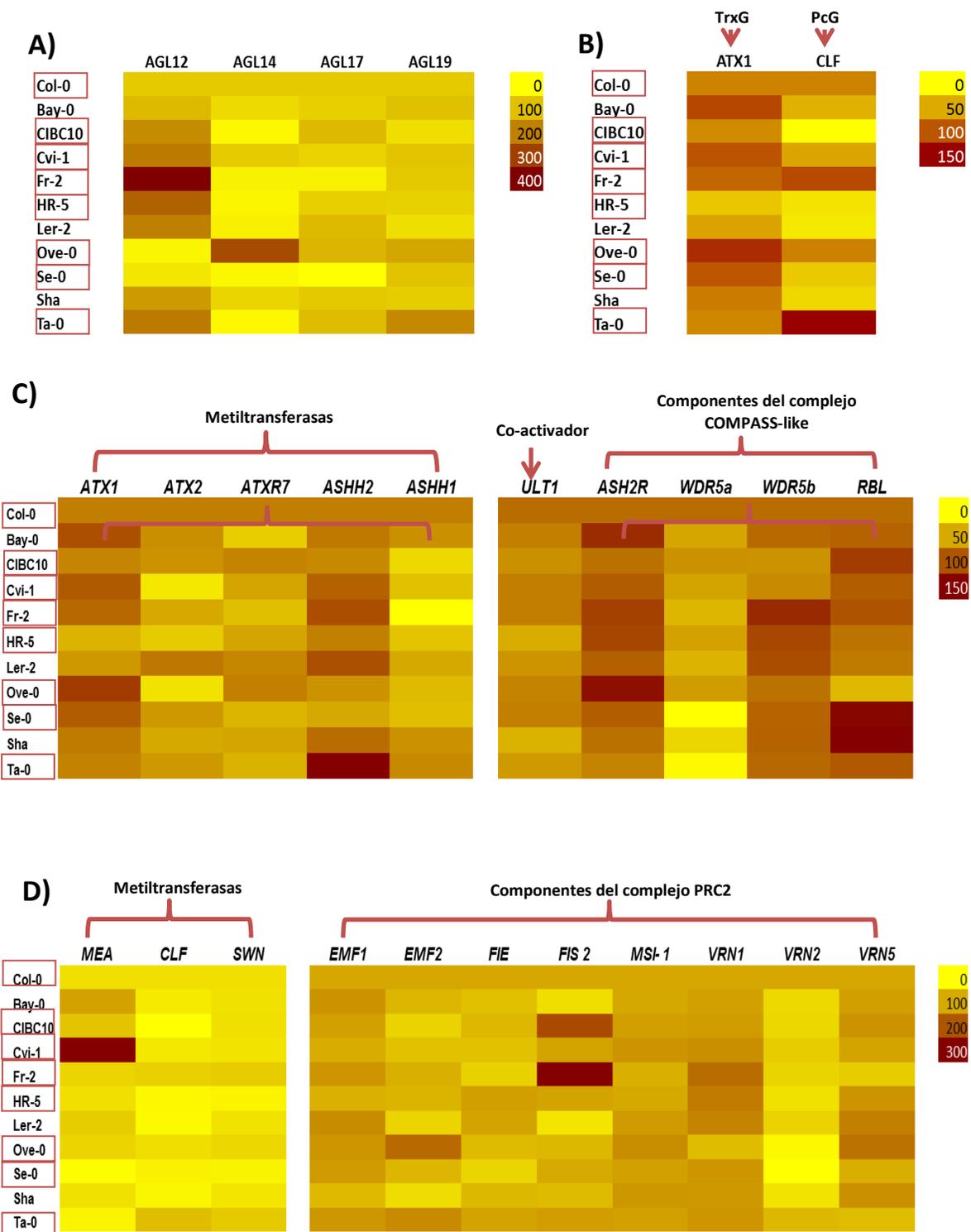


Figura 23. Expresión relativa de los genes MADS-box y factores epigenéticos en la parte aérea de los ecotipos. A) Factores transcripcionales MADS-box tipo II; B) *ATX-1* y *CLF*, las metiltransferasas más representativas de los factores epigenéticos TrxG y PcG, respectivamente; C) Componentes

del grupo TrxG, a la izquierda se muestran las enzimas metiltransferasas y a la derecha los complejos restantes; y D) Componentes del grupo PcG, a la izquierda se muestran las enzimas metiltransferasas y a la derecha las proteínas del complejo PRC2. Plantas de 4 días de crecimiento. Los datos de expresión se muestran en porcentaje respecto a Col-0 (100%) y estos valores se representan en colores degradados como se indica en cada panel. Los ecotipos encerrados en cuadros de color rojo son los que se eligieron para los análisis de expresión en la raíz. Datos obtenidos de Winter *et al.* (2007).

7.9 Expresión de genes MADS-box y factores epigenéticos en la raíz de los ecotipos de *A. thaliana*.

Después de comprobar que existen diferencias en la expresión de esos genes en la parte aérea de las plantas, se procedió a realizar ensayos de RT-PCR semicuantitativo en ocho ecotipos a los 6 dps, usando únicamente tejido de raíz. Esto con la finalidad de explorar la variación en genes esenciales que dirigen la morfología de este órgano.

Los resultados visualizados mediante electroforesis demuestran que los ecotipos presentan diferencias en la expresión de todos los MADS-box (Fig. 24A). El ecotipo Col-0 (grupo control) presenta una alta expresión de *XAL1/AGL12*, la cual se mantiene en Ta-0 y disminuye sólo un poco en los ecotipos restantes; no obstante, es muy evidente una disminución de expresión en el ecotipo Cvi-0 y una ligera disminución en HR5. Por otra parte, el gen *XAL2/AGL14* se expresa en niveles muy altos en Ove-0 y Cvi-0, y su expresión es casi nula en HR5, asimismo muestra una disminución en CIBC10. Entre todos los ecotipos, FR-2 es muy interesante pues tiene niveles de expresión muy elevadas de todos los genes MADS-box, siendo la mayor en *AG17*, un gen que mantiene su alta expresión en Ove-0 y disminuye mucho en el ecotipo Cvi-0 y Ta-0 (aunque Ta-0 se debe tomar con precaución porque los resultados no han sido consistentes en todas las réplicas biológicas realizadas). Además, es interesante notar que el patrón de expresión de *XAL1/AGL12* y *AGL17* es muy similar en casi todos los ecotipos (excepto en Ta-0); por lo que son dos genes que se co-expresan. Finalmente para el gen *AGL19* se muestran expresiones bajas en general, pues sólo los ecotipos FR-2 y Ove-0 tienen una expresión elevada (Fig. 24A).

También se realizó dicho análisis en las dos principales metiltransferasas clave en el desarrollo radicular de las plantas y que conforman los complejos epigenéticos TrxG y PcG, como son *ATX1* y *CLF*, respectivamente. En la Fig.24B se observa que la expresión de las metiltransferasas *ATX-1* y *CLF* también es diferente entre los ecotipos. Sin embargo, cada ecotipo tiene niveles muy similares de ambos genes; mientras que FR-2 y Ove-0 son los ecotipos que presentan la mayor expresión de los factores epigenéticos, la expresión más baja la presenta Cvi-0, HR-5 y Se-0. Es interesante observar que el patrón de expresión de estos factores es casi igual al presente en AGL19 (excepto en Ta-0), por lo que es posible que haya alguna regulación entre estos.

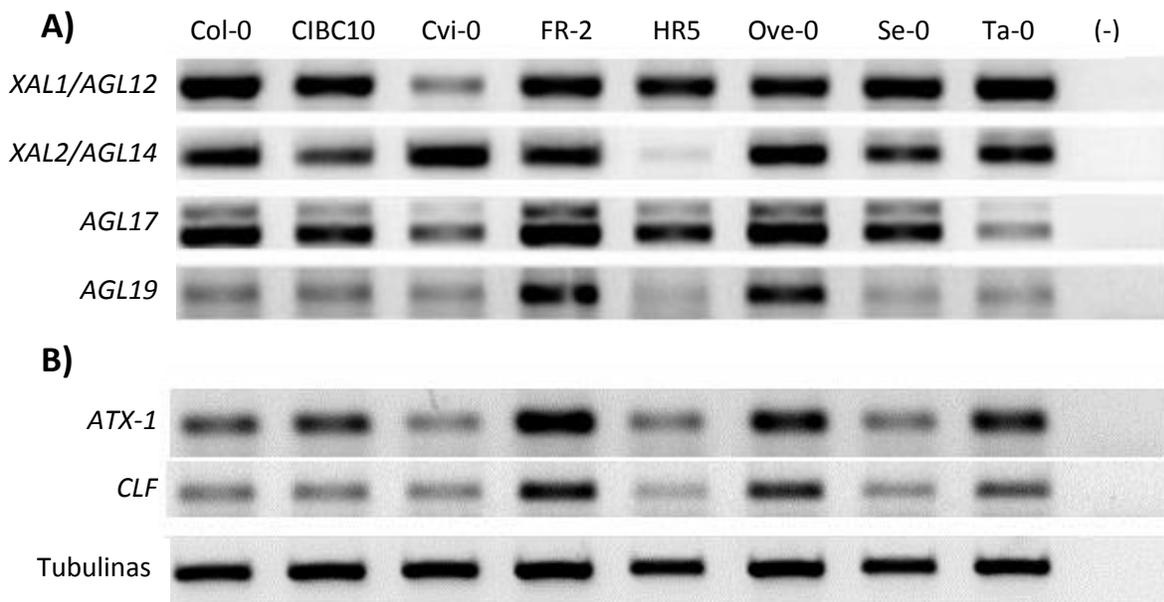
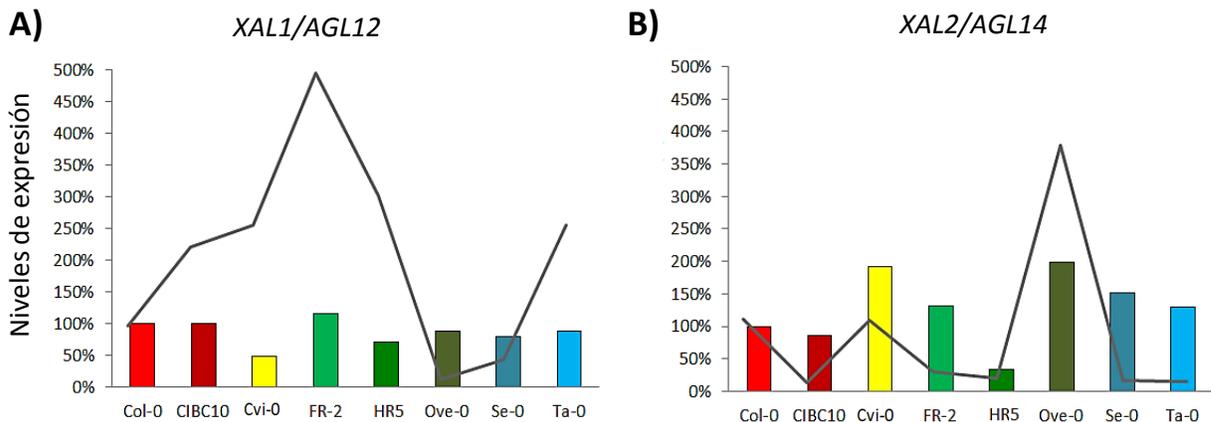


Figura 24. Expresión de los genes de interés en cada ecotipo a los 6 dps. A) Genes MADS-box: *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19*; B) Factores epigenéticos *ATX-1* Y *CLF*. Geles representativos de 3 réplicas biológicas.

7.10 Análisis comparativo de la expresión génica de los MADS-box y factores epigenéticos en raíz y en parte aérea.

Para lograr comparar la expresión obtenida mediante RT-PCR de la raíz y la expresión de la parte aérea mediante análisis *in silico*, con los datos obtenidos se determinó el porcentaje de expresión de cada ecotipo normalizado con la expresión en Col-0, que representa el 100% (Fig.25). Los resultados obtenidos sugieren que la expresión en ambos órganos es distinta y además para algunos ecotipos es mayor en la parte aérea, contrario al conocimiento de que los genes MADS-box *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19* se expresaban más en la raíz, debido a que la mayoría de las investigaciones se realizan sólo en el ecotipo Col-0. Como se puede observar en la Fig.25, la mayoría de los ecotipos presentan una mayor expresión de *XAL1/AGL12* en la parte aérea (destaca este patrón en FR-2), excepto Ove-0 y Se-0. Por el contrario el gen *XAL2/AGL14* está mayoritariamente expresado en raíz en casi todos los ecotipos, excepto Ove-0. En cuanto a los genes *AGL17* y *AGL19*, la expresión es muy variable de acuerdo con el ecotipo. Por otra parte, en los factores epigenéticos *ATX1* y *CLF* se observa que la expresión en la raíz y en la parte aérea es muy similar, lo cual puede deberse a que estos factores se requieren continuamente en ambos órganos para la regulación génica durante el desarrollo de la planta.



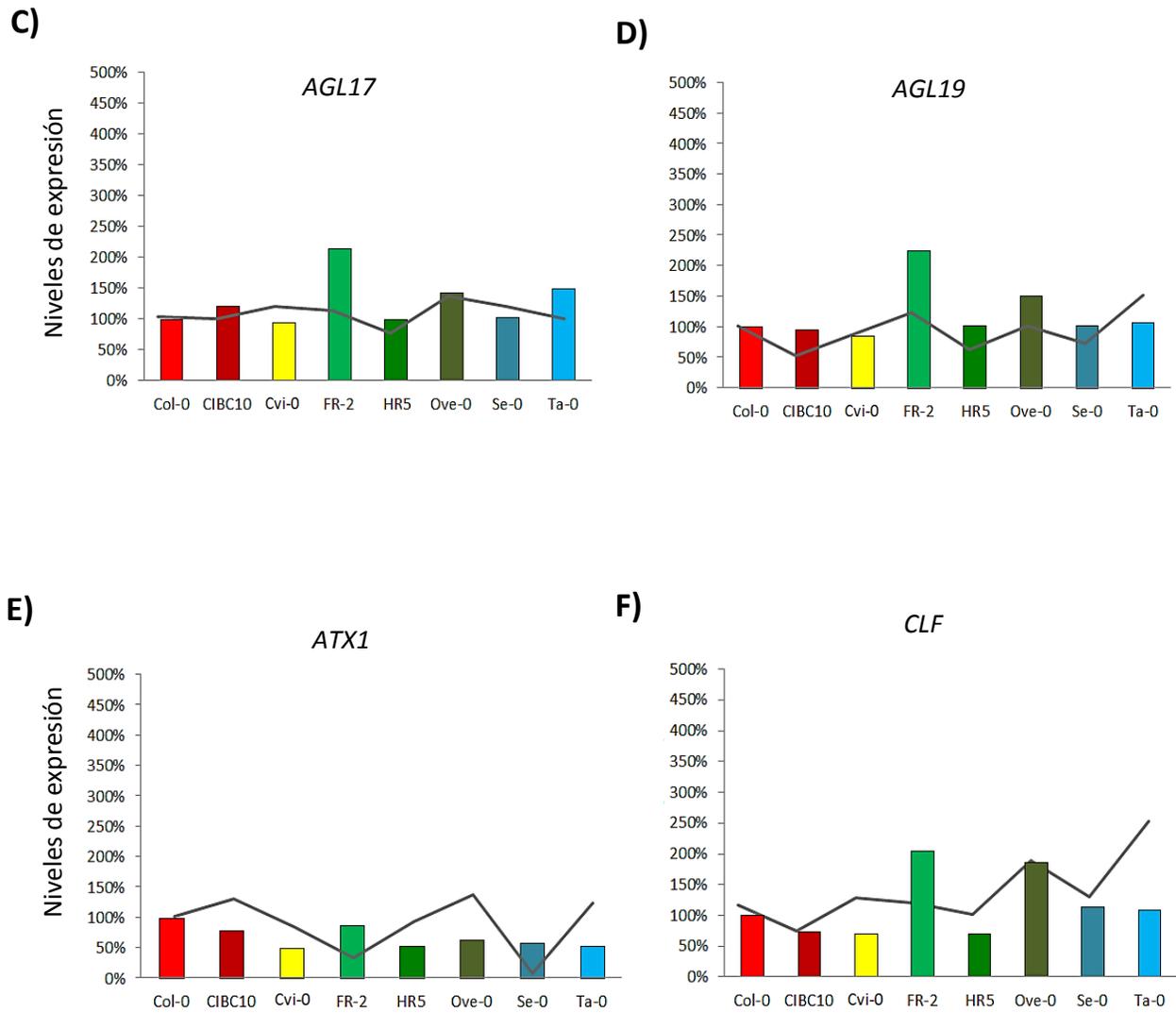


Figura 25. Comparación de los niveles de expresión en parte aérea y raíz. A) *XAL1/AGL12*; B) *XAL2/AGL14*; C) *AGL17*; D) *AGL19*; E) *ATX-1*; F) *CLF*. El nivel de expresión se midió a través de la densidad integrada, que refleja la intensidad de la banda en los geles de agarosa. Los resultados son respecto a Col-0 (100%) para homogenizar los datos. Las barras representan el nivel de expresión en la raíz obtenido mediante RT-PCR (datos de la figura 24) y la línea indica el nivel de expresión en parte aérea obtenido *in silico* (datos de la figura 23).

8. DISCUSIÓN

La variación natural es un tópico que ha atraído especial atención en el campo de la biología desde hace décadas pues se considera la fuente principal para el cambio evolutivo y para la posible adaptación de las poblaciones a diferentes condiciones ambientales (Eguiarte, 1986). En este proyecto, los ecotipos fueron crecidos bajo las mismas condiciones de luz y temperatura; y sin embargo, presentaron diferencias notorias en el fenotipo y la expresión de algunos genes, lo que refleja la variación genética y/o epigenéticamente estable que existe entre ellos y que ha sido descrita en diversos estudios (Koornneef *et al.*, 2004; Nordborg *et al.*, 2005; Johannes *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos fueron analizados de acuerdo a las distribuciones geográficas y ambientales de origen de cada ecotipo bajo el supuesto de una alta estabilidad fenotípica; sin embargo, es importante considerar que la morfología y/o expresión de genes puede ser distinta en su hábitat natural ante condiciones ambientales determinadas (Weigel, 2012).

8.1 Influencia del origen geográfico y sus condiciones ambientales en las variaciones morfológicas de la raíz de los ecotipos de *A. thaliana*.

Numerosos análisis de genética de poblaciones, han demostrado que sí hay una relación entre el origen geográfico y la distancia genética de los ecotipos de *Arabidopsis* (Nordborg *et al.*, 2005; Schmid *et al.*, 2006; Pico *et al.*, 2008; Brennan *et al.*, 2014), y en este trabajo nuestros resultados siguieron que hay una correlación estrecha entre el tamaño radicular específico de cada ecotipo y las condiciones ambientales de los sitios de origen, como se observó con la precipitación, la cual tiene una correlación positiva con el tamaño de la raíz. Un caso muy parecido se encontró en las poblaciones naturales de *Plantago coronopus*, una planta anual perenne que también se distribuye principalmente en Europa, para la cual se determinó que la precipitación estaba positivamente correlacionada con el tamaño de la planta (Villellas *et al.*, 2014). Diversos estudios han determinado que la sequía tiene un efecto importante en la arquitectura de la raíz, pues ésta incrementa de tamaño y disminuye la producción de raíces laterales en respuesta a

este tipo de estrés (Smith & De Smet, 2012). Sin embargo, los resultados aquí presentes sugieren un patrón contrario: los ecotipos que habitaban en las zonas con menor precipitación, presentaron la raíz más corta y los que residen en zonas con altas precipitaciones, mostraron la raíz más larga. Éste es un resultado inesperado, pero al integrar la información morfométrica se descubrió que Cvi-0, el ecotipo con precipitaciones menos abundantes, exhibe la mayor extensión de raíces laterales, lo que puede servir como un mecanismo compensatorio ante una raíz principal tan corta. Además, se deben realizar análisis adicionales sobre la abundancia de raíces laterales y pelos radiculares presentes en los ecotipos. Sin embargo, también es probable que otros factores estén influyendo más sobre el tamaño radicular, como puede ser la salinidad, y/o presencia y cantidad de nutrientes específicos (Smith & De Smet, 2012).

Asimismo es interesante notar el caso del ecotipo Ta-0, que abarca un rango de tamaños radiculares muy extenso y que posiblemente esté asociado a condiciones ambientales más cambiantes de su lugar de origen, lo cual se puede apreciar en las precipitaciones y temperaturas contrastantes de invierno y verano en su sitio de recolección. Es decir, las poblaciones de Ta-0 podrían presentar un rango de respuestas más grande (mayor plasticidad) que los otros ecotipos y por lo tanto, bajo condiciones de laboratorio, ligeros cambios que suceden y que no son controlables por el investigador podrían haber ocasionado fenotipos tan distintos en este ecotipo.

Las diferencias encontradas en el tamaño radicular podrían ser de especial interés para comprender la capacidad de adaptación natural de las plantas a un ambiente determinado. Por ejemplo, se ha demostrado que aunque el tamaño en el sistema radicular no afecta la obtención de macronutrientes móviles, como el nitrato, sí es de importancia para los macronutrientes inmóviles, como el fosfato, pues la exploración más extensa del volumen de suelo puede ser ventajoso, sobre todo en situaciones de competencia (Pacheco-Villalobos & Hardtke, 2012).

A pesar de que diversos factores ambientales pueden ejercer presiones de selección importantes para la historia evolutiva de la especie, esto no siempre debe darse por sentado pues a veces la estocasticidad (i.e. deriva génica) u otros procesos como la

migración, flujo génico y/o restricciones del desarrollo pueden estar causando los fenómenos que observamos. Para comprobar la acción de la selección natural sobre la variación de diversos caracteres se deben realizar ensayos que logren medir la adecuación de las poblaciones en condiciones ambientales controlables por el investigador.

8.2 Variaciones morfológicas de la raíz entre ecotipos de *A. thaliana*.

La raíz es un órgano muy plástico que se encuentra en constante cambio a través del ajuste en su tasa y dirección de crecimiento; sin embargo, algunas características de la raíz pueden fijarse y conservarse a través de las generaciones e incluso frente a diferentes condiciones ambientales. Los análisis morfológicos realizados en este trabajo indicaron que las raíces de las diferentes poblaciones de *A. thaliana* no varían sólo en tamaño sino también en la forma adquirida en el espacio. Por lo tanto, para corroborar una relación alométrica entre el tamaño y la forma se realizó una regresión lineal y se obtuvo que ésta es muy débil, pues sólo el 7.26% de la variación en la forma se explica por el tamaño ($P < 0.0001$) en todos los ecotipos donde se realizaron análisis morfométricos. Por ejemplo, aunque el ecotipo FR-2 es de raíz corta, su forma es muy similar a Col-0, que es la raíz más larga; sin embargo, los casos de los ecotipos Cvi-0 y Ws que son los de raíz más pequeña es interesante pues también muestran la forma más contrastante respecto a Col-0. Las causas de la variación en la forma son diversas, pero la inclinación en el crecimiento de las raíces principales de estos individuos puede ser la respuesta a las formas que encontramos en estos ecotipos, pues éstas presentan un ángulo de alrededor de 45°; como si tuvieran defectos en el gravitropismo, lo cual obliga a las raíces laterales (sobre todo a las laterales que están en la misma orientación del crecimiento de la raíz principal) a crecer verticalmente y así, presentar esa forma tan particular en los análisis morfométricos.

Asimismo, la longitud de la raíz está influenciada por la tasa de división de las células troncales, la tasa de proliferación y diferenciación de las células del meristemo, así como por la longitud que adquieren las células diferenciadas (Ivanov & Dubrovsky, 2013). Al analizar el meristemo radicular en las diferentes poblaciones de *A. thaliana*, se observó que el número de células del meristemo no siempre es determinante para la longitud del

mismo, pues a pesar de que algunos ecotipos tenían menor número de células, éstas detenían su división prematuramente respecto al control y al ser más grandes (pues están próximas a elongarse), el tamaño del meristemo fue mayor. Esto es importante de considerar para estudios futuros con diferentes ecotipos, pues hay numerosas publicaciones que se basan en los datos obtenidos en el ecotipo Col-0, en donde hay una correlación directa entre número de células del córtex y tamaño del meristemo (Shishkova *et al.*, 2008). Pero más importante aún es la conclusión sobre la relación entre el tamaño meristemático y el tamaño total de la raíz, pues se encontró que en la mayoría de los ecotipos estas dos variables no van en el mismo sentido, pues una raíz corta no necesariamente implica que el meristemo sea significativamente menor a Col-0, y lo mismo sucede para tamaños mayores. Lo anterior podría explicarse por fenómenos que están ocurriendo en la zona de elongación o de diferenciación, y no en el meristemo, y que probablemente está asociado a diferentes gradientes de hormonas (Liu *et al.*, 2014) entre ecotipos o expresión diferencial de genes esenciales en el crecimiento radicular como BREVIS RADIX (BRX), el cual ya se ha estudiado en diversas variedades naturales, y se sabe que explica el 80% de la varianza observada en el tamaño de la raíz (Mouchel *et al.*, 2004); sin embargo, se requieren más estudios para definir los factores moleculares que influyen en las diferencias morfológicas observadas entre ecotipos.

Asimismo se observó que los ecotipos presentan diferencias en la organización y morfología del nicho de células troncales en el meristemo. En el ecotipo Sha la identidad del QC no es claro, por lo que estudiar la expresión del gen *Wuschel-Related Homeobox 5* (WOX5), un marcador del QC, sería importante pues es un regulador esencial de su identidad (Forzani *et al.*, 2014). Por su parte, los ecotipos Cvi-0 y HR5 presentan doble fila de células iniciales de la columela, a diferencia del ecotipo control que sólo tiene una; sin embargo, para definir la identidad de éstas es esencial el uso de un marcador molecular con el cual se pueda definir de qué tipo celular se trata con exactitud. Sin embargo, las implicaciones que todos estos cambios morfológicos del meristemo conllevan de forma natural sigue siendo una incógnita.

8.3 Variabilidad morfológica de la raíz y expresión génica de los MADS-box y factores epigenéticos.

La expresión diferencial de los genes ha sido asociada a la variabilidad de caracteres simples y complejos en diversos organismos como *A. thaliana* (Kliebenstein *et al.*, 2006). En este modelo biológico, el estudio de las variedades naturales (i.e. ecotipos) permite observar interacciones génicas que sólo suceden en fondos genéticos específicos, como la actividad sinérgica de los genes *FRI* y *FLC* que confieren la floración tardía de invierno, y en los cuales se ha observado que las diferencias en su expresión ocasionan regulaciones distintas en el tiempo de floración de algunos ecotipos (Michaels *et al.*, 2003). La morfología de la raíz depende de la acción de diversos factores transcripcionales y de algunos factores epigenéticos como las metiltransferasas *ATX1* y *CLF*. Los genes *XAL1/AGL12* y *XAL2/AGL14* son factores transcripcionales tipo MADS-box, cuya función es necesaria para una adecuada morfología del nicho de células troncales, así como para el crecimiento radicular, tal y como se ha demostrado por mutantes de pérdida de función (Tapia-Lopez *et al.*, 2008; Garay-Arroyo *et al.*, 2013). Asimismo, algunos factores epigenéticos que ayudan en la activación o en la represión transcripcional como *CLF* y *ATX1* también se han visto implicados en el adecuado desarrollo de la raíz (Aichinger *et al.*, 2011; Napsucialy-Mendivil *et al.*, 2014; Petrone, 2015; Vega *et al.*, datos no publicados). Por lo tanto, conocer las diferencias en la expresión de genes involucrados en el desarrollo de la raíz como son los factores transcripcionales MADS-box y factores epigenéticos *ATX1* y *CLF* es de gran utilidad para lograr inferir en estudios futuros los mecanismos que están creando y manteniendo esa variación natural.

Con los ensayos de RT-PCR semicuantitativos se demostró que los genes estudiados presentan una expresión muy variable en cada ecotipo, y son muy interesantes los casos en los que ésta es muy baja con respecto al control, pues las plantas presentan algunas características morfológicas de las mutantes de pérdida de función para los genes correspondientes. Por ejemplo, el ecotipo de raíz más corta (Cvi-0), presenta una cantidad muy reducida del gen *XAL1/AGL12*, el cual se ha caracterizado como un promotor del crecimiento de la raíz pues su mutante tiene la mitad de tamaño radicular que el control

(Tapia-Lopez *et al.*, 2008). Asimismo, HR5 tiene una expresión casi nula de *XAL2/AGL14*, un gen que su mutante presenta raíz corta (Garay-Arroyo *et al.*, 2013), característica que se pueden observar en este ecotipo. Si bien el fenotipo no es idéntico a las mutantes en todos los caracteres estudiados, es probable que estos genes estén jugando un papel importante en la morfología radicular de dichos ecotipos.

Sin embargo, hay algunos resultados inconsistentes en la morfología observada y la función de los genes de estudio, como el ecotipo FR-2 que es de raíz corta y presenta una expresión muy elevada de *XAL1/AGL12* y *XAL2/AGL14*. Esto indica que existen otros genes involucrados en mayor medida para la determinación de la morfología radicular de los ecotipos, lo cual se esperaba pues es bien conocido que la mayoría de los caracteres complejos son el resultado de interacciones multigénicas (Koornneef *et al.*, 2004). Para identificar los posibles candidatos genéticos que juegan un papel importante en la morfología radicular sería conveniente realizar análisis masivos de microarreglos para comparar el transcriptoma de los ecotipos.

Los estudios genéticos usando los ecotipos de *A. thaliana* amplían nuestro concepto actual de la función de los genes, que se basa principalmente en la caracterización de un alelo tipo WT, pues al trabajar con diferentes alelos naturales en un contexto genotipo-medio ambiente y a una escala temporal evolutiva específica nos permite visualizar una perspectiva más realista y dinámica de la función de los genes (Alonso-Blanco *et al.*, 2005). Un ejemplo aplicado a los resultados de este proyecto es el estudio del gen *AGL19* usando los ecotipos FR-2 y Ove-0 que presentaron niveles muy elevados de este gen, del cual se desconoce su función en la raíz, y que sería útil comparar con el resto de los ecotipos que muestran una expresión mucho menor.

A pesar de que no existe en la literatura información sobre alguna interacción entre *XAL1/AGL12* y *AGL17*, el hecho de que ambos se expresen de forma muy similar en cada ecotipo y además su mayor actividad sea en la cofia lateral (Han *et al.*, 2008), sugeriría que probablemente se encuentran bajo la misma red de regulación o están siendo regulados por los mismos mecanismos (e.g. epigenéticos), lo cual tendría que evaluarse con mutantes de pérdida y/o ganancia de función.

Al encontrar diferencias en la expresión de los genes MADS-box se abre la interrogante sobre los mecanismos causantes de dicha variación, ya sea a través de la búsqueda de polimorfismos y/o de la actividad de factores epigenéticos que estén actuando para modificar la expresión de los genes en la raíz. Debido a que en estudios anteriores se demostró la influencia de las metiltransferasas de activación (ATX1) y represión (CLF) sobre los genes MADS-box (Petrone, 2015; Vega *et al.*, datos no publicados) se decidió realizar también ensayos de expresión en estos factores antagónicos. Los resultados indicaron que sí hay diferencias en la expresión de estos genes entre ecotipos, lo cual tiene implicaciones más grandes que sólo su influencia sobre los genes MADS-box, pues estas enzimas se encargan de trimetilizar diversos genes blanco en todo el genoma de *Arabidopsis* (Álvarez-Venegas, 2010). De hecho se sabe que la capacidad de generar variación epigenética puede acelerar el proceso de alcanzar un “pico adaptativo”, pues aunque algunos individuos tengan un genotipo con baja adecuación (éxito reproductivo), aún podrían poseer un fenotipo con alta adecuación y que puede ser heredable. De esta forma, procesos como la asimilación genética podrían actuar y estabilizar genéticamente al nuevo fenotipo (Richards *et al.*, 2012). Por lo tanto, esas variaciones en las enzimas encargadas de colocar las marcas epigenéticas de activación o represión transcripcional podrían estar involucradas en la generación de variabilidad de la raíz, posiblemente bajo un supuesto adaptativo, pues se ha descrito que los complejos PcG y TrxG se encargan de sensor el medio ambiente para dar una respuesta molecular y originar cambios en el fenotipo (Song *et al.*, 2012).

En los resultados de la RT-PCR se observa que el gen *ATX1* se expresa en cantidades ligeramente mayores que *CLF* en todos los ecotipos, lo cual ya se tenía reportado para Col-0 (Schmid *et al.*, 2005); sin embargo, la tendencia es muy similar para ambos genes por ecotipo; es decir, hay poco transcrito de ambos en Cvi-0, HR5 y Se-0 y por otra parte, la expresión es muy alta en FR2, Ove-0 y Ta-0. Estos genes son componentes de dos complejos antagónicos que muestran fenotipos radiculares muy distintos en las mutantes de pérdida de función, pero al ser enzimas que regulan una cantidad tan grande de genes blanco (Álvarez-Venegas, 2010) que deben tener un estado

transcripcional distinto en cada ecotipo (como es el caso de FLC) (Song *et al.*, 2012), su expresión tan similar puede deberse a la homeostasis particular de cada uno. Además es importante considerar que según los resultados de expresión tejido-específico en el ecotipo Col-0 (Winter *et al.*, 2007), *ATX1* y *CLF* presentan ligeros cambios de expresión en cada tejido de la raíz, por lo que su contribución podría ser diferente en la zona de proliferación y de elongación o diferenciación pero las extracciones totales de la raíz no permiten observar este fenómeno. Para tener resultados más concluyentes, sería necesario realizar microdisecciones de la raíz (Limpens *et al.*, 2013) y realizar PCR cuantitativas para evidenciar cambios tan ligeros de expresión.

Sin embargo, aún hay que resolver por qué hay diferencias tan evidentes de expresión entre ecotipos, si todo el transcrito que se produce (por ejemplo en FR-2) es traducido a proteína, o si la cantidad del mismo se relaciona con un aumento en la actividad sobre los genes blanco, entre otras interrogantes. Además es necesario realizar análisis de las modificaciones postraduccionales de histonas que generan estas enzimas a través de inmunoprecipitaciones de cromatina para definir su función en la variabilidad radicular de las poblaciones de *A. thaliana*.

Para lograr una comparación robusta se requeriría realizar ensayos de expresión en hoja y raíz mediante un solo método, por ejemplo, microarreglo o PCR cuantitativa; sin embargo, se intentó comparar los resultados disponibles a través de la normalización con el ecotipo Col-0 como una primera aproximación, y se observó que entre la parte aérea (datos *in silico*) y radicular de los ecotipos (RT-PCR) los genes MADS-box *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19* se expresan más en la parte aérea dependiendo del ecotipo de estudio, y anteriormente sólo se conocía su expresión superior en la raíz al trabajar únicamente con Col-0. Ejemplos como éste advierten la importancia de estudiar al menos dos ecotipos para todo tipo de análisis, pues en las investigaciones científicas se tiende a extrapolar a otras especies los resultados obtenidos en el modelo de estudio *A. thaliana*, específicamente del ecotipo usado por excelencia: Col-0; sin considerar que incluso dentro de la misma especie existen grandes diferencias y se pueden obtener datos diferentes y muy relevantes usando distintas variedades naturales.

Como se pudo observar en los resultados de cinética de crecimiento, morfometría, tamaño y morfología de meristemo, y también en expresión génica, Cvi-0 es el ecotipo que presenta mayores diferencias respecto al control e incluso, a todos los demás ecotipos. Esto lo distingue como un buen candidato para estudios de diversas índoles y abre la interrogante sobre su historia evolutiva y cómo ha divergido en tantos caracteres. Una posibilidad es que al estar tan apartado en una isla pequeña exista aislamiento genético por distancia, esto aunado al bajo flujo de genes por tratarse de una especie mayoritariamente autopolinizante (Nordborg *et al.*, 2005).

En conclusión, este trabajo contribuye al conocimiento de la variabilidad fenotípica y su posible correlación con la expresión génica, además de aportar información útil sobre el modelo de estudio más usado en la investigación con plantas; sin embargo, es necesario lograr combinar mayor cantidad de información genética, epigenética, fenotípica y ecológica para definir patrones y causas de la variación que se observa en la especie y responder las preguntas: ¿qué genes y cuáles son los mecanismos que dirigen y mantienen dicha variación? y ¿existe algún valor adaptativo en las diferencias que observamos de la raíz?.

9. CONCLUSIONES

- Existe una amplia variación en la longitud radicular entre ecotipos y ésta correlaciona positivamente sólo con las precipitaciones extremas de los sitios de origen.
- Las diferencias morfométricas de la raíz entre ecotipos son debido principalmente a la distancia que existe de las raíces laterales más largas hacia la principal, y el ecotipo Cvi-0 es el que presenta la forma más distinta respecto al control.
- Entre ecotipos el tamaño de la raíz no siempre es una consecuencia directa de la longitud del meristemo, ya que también está siendo influenciado por eventos que suceden en la zona de elongación y/o diferenciación.
- Existe variabilidad en la organización del nicho de células troncales en los ecotipos Cvi-0, HR5 y Sha con respecto al control.
- Los cambios de expresión en los genes MADS-box *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19* y de los factores epigenéticos *ATX1* y *CLF* entre ecotipos sugieren una influencia en la variabilidad morfológica de la raíz.
- La variación del patrón de expresión de los genes MADS-box entre el tejido aéreo y la raíz de los ecotipos advierte la importancia de no generalizar patrones de expresión en la especie.
- Se requiere una búsqueda más extensa de genes candidatos involucrados en la generación de variabilidad y estudios más detallados de las condiciones ambientales (e.g. suelo).

10. GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

DNA	Deoxyribonucleic Acid <<Ácido desoxirribonucleico>>
cDNA	Complementary DNA <<ADN complementario>>
RNA	Ribonucleic Acid <<Ácido ribonucleico>>
SNP	Single Nucleotide Polymorphism <<Polimorfismos de un solo nucleótido>>
ADP	Adenosine Diphosphate <<Adenosín difosfato>>
QTL	Quantitative Trait Locus «Locus de un Carácter Cuantitativo»
TF	Transcriptional Factor <<Factor de transcripción>>
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
Medio MS	Murashige and Skoog medium
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate <<dodecilsulfato sódico>>
PCR	Polymerase Chain Reaction <<Reacción en cadena de la polimerasa>>
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction <<Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa>>
QC	Quiescent Center <<Centro quiescente>>
SAM	Shoot Apical Meristem <<Meristemo apical de tallo>>
RAM	Root Apical Meristem <<Meristemo apical de raíz>>

11. REFERENCIAS

- Aichinger, E., Villar, CB., Di Mambro, R., Sabatini, S & Kohler, C. (2011). The CHD3 chromatin remodeler PICKLE and polycomb group proteins antagonistically regulate meristem activity in the Arabidopsis root. *Plant Cell* 23: 1047-1060
- Al-Shehbaz, IA & O'Kane, SL, Jr. (2002). Taxonomy and phylogeny of Arabidopsis (brassicaceae). *Arabidopsis Book* 1: e0001
- Alonso-Blanco, C., Aarts, MG., Bentsink, L., Keurentjes, JJ., Reymond, M *et al.* (2009). What has natural variation taught us about plant development, physiology, and adaptation? *Plant Cell* 21: 1877-1896
- Alonso-Blanco, C., Mendez-Vigo, B & Koornneef, M. (2005). From phenotypic to molecular polymorphisms involved in naturally occurring variation of plant development. *Int J Dev Biol* 49: 717-732
- Alonso, JM., Stepanova, AN., Leisse, TJ., Kim, CJ., Chen, H *et al.* (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* 301: 653-657
- Álvarez-Venegas, R. (2010). Regulation by Polycomb and Trithorax Group Proteins in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*: 1-20
- Balazadeh, S., Parlitz, S., Mueller-Roeber, B & Meyer, RC. (2008). Natural developmental variations in leaf and plant senescence in Arabidopsis thaliana. *Plant Biol (Stuttg)* 10 Suppl 1: 136-147
- Baskin, TI. (2013). Patterns of root growth acclimation: constant processes, changing boundaries. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2: 65-73
- Becker, C., Hagmann, J., Muller, J., Koenig, D., Stegle, O *et al.* (2011). Spontaneous epigenetic variation in the Arabidopsis thaliana methylome. *Nature* 480: 245-249
- Birnbaum, K., Shasha, DE., Wang, JY., Jung, JW., Lambert, GM *et al.* (2003). A gene expression map of the Arabidopsis root. *Science* 302: 1956-1960
- Brennan, A., Méndez-Vigo, B., Haddioui, A., Martínez-Zapater, J., Picó, X & Alonso-Blanco, C. (2014). The genetic structure of Arabidopsis thaliana in the south-western Mediterranean range reveals a shared history between North Africa and southern Europe. *BMC Plant Biology* 14: 1-14
- Burgeff, C., Liljegren, S., Tapia-López, R., Yanofsky, M & Álvarez-Buylla, E. (2002). MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of Arabidopsis thaliana roots. *Planta* 214: 365-372
- Cerón, M. (2012). Estudio del gen AGAMOUS-like 19 (AGL19) en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Darwin, C. (1859). *El Origen de las Especies*. México, D.F.: Éxodo. 556 pp.
- Eguiarte, L. (1986). *Una Guía para principiantes a la genética de poblaciones*. México.
- FAO (2015). AQUASTAT Main Database, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Obtenida el 01 enero 2014 de <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/quickwms/climate.htm>
- Feil, R & Fraga, MF. (2011). Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet* 13: 97-109
- Forzani, C., Aichinger, E., Sornay, E., Willemsen, V., Laux, T *et al.* (2014). WOX5 Suppresses CYCLIN D Activity to Establish Quiescence at the Center of the Root Stem Cell Niche. *Current Biology* 24: 1939-1944
- Futuyma, D. (1942). *Evolution*. pp. 173. Sunderland, EUA.

- Garay-Arroyo, A., Ortiz-Moreno, E., de la Paz Sanchez, M., Murphy, AS., Garcia-Ponce, B *et al.* (2013). The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during Arabidopsis root development by regulating PIN expression. *EMBO J* 32: 2884-2895
- Gifford, ML., Banta, JA., Katari, MS., Hulsmans, J., Chen, L *et al.* (2013). Plasticity regulators modulate specific root traits in discrete nitrogen environments. *PLoS Genet* 9: e1003760
- Han, P., Garcia-Ponce, B., Fonseca-Salazar, G., Alvarez-Buylla, ER & Yu, H. (2008). AGAMOUS-LIKE 17, a novel flowering promoter, acts in a FT-independent photoperiod pathway. *Plant J* 55: 253-265
- Herrera, CM & Bazaga, P. (2010). Epigenetic differentiation and relationship to adaptive genetic divergence in discrete populations of the violet *Viola cazorlensis*. *New Phytol* 187: 867-876
- Hodge, A., Berta, G., Doussan, C., Merchan, F & Crespi, M. (2009). Plant root growth, architecture and function. *Plant and Soil* 321: 153-187
- Holliday, R. (2006). Epigenetics: A historical overview. *Epigenetics* 1: 76-80
- IJPB scientific teams leaders. (2010). Arabidopsis thaliana: a model species for plant biology. Obtenida el 17 de marzo 2014 de <http://www.ijpb.versailles.inra.fr/en/arabido/arabido.htm>
- Ivanov, VB & Dubrovsky, JG. (2013). Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends Plant Sci* 18: 237-243
- Jablonka, E & Lamb, M. (2005). *Evolution in four dimensions*. Londres, Inglaterra. 92-101 pp.
- Jablonka, E & Raz, G. (2009). Transgenerational Epigenetic Inheritance: Prevalence, Mechanisms, and Implications for the Study of Heredity and Evolution. *The Quarterly Review of Biology* 84: 131-175
- Jacobsen, S & Meyerowitz, EM. (1997). Hypermethylated SUPERMAN Epigenetic Alleles in Arabidopsis. *Science* 277: 1100-1103
- Johannes, F., Porcher, E., Teixeira, FK., Saliba-Colombani, V., Simon, M *et al.* (2009). Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. *PLoS Genet* 5: e1000530
- Kalisz, S & Kramer, EM. (2008). Variation and constraint in plant evolution and development. *Heredity (Edinb)* 100: 171-177
- Kliebenstein, DJ., West, MA., van Leeuwen, H., Kim, K., Doerge, RW *et al.* (2006). Genomic survey of gene expression diversity in Arabidopsis thaliana. *Genetics* 172: 1179-1189
- Klingenberg, CP. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour* 11: 353-357
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C & Vreugdenhil, D. (2004). Naturally occurring genetic variation in Arabidopsis thaliana. *Annu Rev Plant Biol* 55: 141-172
- Laskowski, M., Williams, M., Nusbaum, C & Sussex, I. (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* 121: 3303-3310
- Li, B., Carey, M & Workman, JL. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* 128: 707-719
- Limpens, E., Moling, S., Hooiveld, G., Pereira, PA., Bisseling, T *et al.* (2013). cell- and tissue-specific transcriptome analyses of *Medicago truncatula* root nodules. *PLoS ONE* 8: e64377
- Lira-Medeiros, C., Parisod, C., Avancini, R., Souza, C., Aires, M & Cavalcanti, P. (2010). Epigenetic Variation in Mangrove Plants Occurring in Contrasting Natural Environment. *PLoS ONE* 5: 1-8
- Liu, J., Rowe, J & Lindsey, K. (2014). Hormonal crosstalk for root development: a combined experimental and modeling perspective. *Front Plant Sci* 5: 116
- Luger, K., Mader, A., Richmond, R., Sargent, D & Richmond, T. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-260

- Mackay, TFC., Stone, EA & Ayroles, JF. (2009). The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nat Rev Genet* 10: 565-577
- Michaels, SD., He, Y., Scortecci, KC & Amasino, RM. (2003). Attenuation of FLOWERING LOCUS C activity as a mechanism for the evolution of summer-annual flowering behavior in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10102-10107
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J & Altman, DG. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Ann Intern Med* 151: 264-269, w264
- Montiel, G., Gantet, P., Jay-Allemand, C & Breton, C. (2004). Transcription factor networks. Pathways to the knowledge of root development. *Plant Physiol* 136: 3478-3485
- Mouchel, CF., Briggs, GC & Hardtke, CS. (2004). Natural genetic variation in Arabidopsis identifies BREVIS RADIX, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *Genes Dev* 18: 700-714
- Napsucially-Mendivil, S., Alvarez-Venegas, R., Shishkova, S & Dubrovsky, JG. (2014). Arabidopsis Homolog of Trithorax1 (ATX1) is required for cell production, patterning, and morphogenesis in root development. *J Exp Bot* 65: 6373-6384
- Ng, M & Yanofsky, M. (2001). Function and Evolution of the Plant MADS-Box Gene Family. *Nature* 2: 186-195
- Nordborg, M., Hu, T., Ishino, Y., Jhaveri, J., Toomajian, C *et al.* (2005). The pattern of polymorphism in Arabidopsis thaliana. *PLoS Biol* 3: 1289-1299
- O'Malley, RC & Ecker, JR. (2012). Epiallelic variation in Arabidopsis thaliana. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 77: 135-145
- Ossowski, S., Schneeberger, K., Lucas-Lledo, JI., Warthmann, N., Clark, RM *et al.* (2010). The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in Arabidopsis thaliana. *Science* 327: 92-94
- Pacheco-Villalobos, D & Hardtke, CS. (2012). Natural genetic variation of root system architecture from Arabidopsis to Brachypodium: towards adaptive value. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367: 1552-1558
- Pai, A., Pritchard, J & Gilad, Y. (2015). The Genetic and Mechanistic Basis for Variation in Gene Regulation. *PLoS Genet* 11
- Petrone, E. (2015). *Función del gen ATX1 en el desarrollo de la raíz de Arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 102 pp.
- Pico, FX., Mendez-Vigo, B., Martinez-Zapater, JM & Alonso-Blanco, C. (2008). Natural genetic variation of Arabidopsis thaliana is geographically structured in the Iberian peninsula. *Genetics* 180: 1009-1021
- Pien, S & Grossniklaus, U. (2007). Polycomb group and trithorax group proteins in Arabidopsis. *Biochim Biophys Acta* 1769: 375-382
- Pigliucci, M., Murren, CJ & Schlichting, CD. (2006). Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J Exp Biol* 209: 2362-2367
- R Development Core Team. (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Obtenida el de <http://www.R-project.org>.
- Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P & Jackson, R. (2014). *Campbell Biology*. Berkeley, California. 481 pp.
- Reyes-Hernandez, BJ., Srivastava, AC., Ugartechea-Chirino, Y., Shishkova, S., Ramos-Parra, PA *et al.* (2014). The root indeterminacy-to-determinacy developmental switch is operated through a folate-dependent pathway in Arabidopsis thaliana. *New Phytol* 202: 1223-1236
- Richards, C., Verhoeven, K & Bossdorf, O. (2012). *Evolutionary significance of epigenetic variation*. Florida, EUA: Springer. 257-271 pp.

- Ristova, D & Busch, W. (2014). Natural variation of root traits: from development to nutrient uptake. *Plant Physiol* 166: 518-527
- Rosas, U., Cibrian-Jaramillo, A., Ristova, D., Banta, JA., Gifford, ML *et al.* (2013). Integration of responses within and across Arabidopsis natural accessions uncovers loci controlling root systems architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 15133-15138
- Rounsley, S., Ditta, G & Yanofsky, M. (1995.). Diverse roles for MADS Box genes in Arabidopsis development. *Plant Cell* 7: 1259-1269
- Rutter, MT & Fenster, CB. (2007). Testing for adaptation to climate in Arabidopsis thaliana: a calibrated common garden approach. *Ann Bot* 99: 529-536
- Sánchez, MdP., Aceves-García, P., Petrone, E., Steckenborn, S., Vega, R *et al.* (2015). TrxG and PcG components of the epigenetic regulatory networks as contributors to plant plasticity. *New Phytol* 10.1111/nph.13486: 1-11
- Santelli, E & Richmond, T. (2000). Crystal Structure of MEF2A Core Bound to DNA at 1.5 Å Resolution. *J. Mol. Biol* 297: 437-449
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M *et al.* (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9: 676-682
- Schmid, K., Torjék, O., Meyer, R., Schmutz, H., Hoffmann, M & Altmann, T. (2006). Evidence for a large-scale population structure of Arabidopsis thaliana from genome-wide single nucleotide polymorphism markers. *Theor Appl Genet* 112: 1104-1114
- Schmid, M., Davison, TS., Henz, SR., Pape, UJ., Demar, M *et al.* (2005). A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nat Genet* 37: 501-506
- Schonrock, N., Bouveret, R., Leroy, O., Borghi, L., Kohler, C *et al.* (2006). Polycomb-group proteins repress the floral activator AGL19 in the FLC-independent vernalization pathway. *Genes Dev* 20: 1667-1678
- Shindo, C., Bernasconi, G & Hardtke, CS. (2007). Natural genetic variation in Arabidopsis: tools, traits and prospects for evolutionary ecology. *Ann Bot* 99: 1043-1054
- Shishkova, S., Rost, TL & Dubrovsky, JG. (2008). Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. *Ann Bot* 101: 319-340
- Silveira, AB., Trontin, C., Cortijo, S., Barau, J., Del Bem, LE *et al.* (2013). Extensive natural epigenetic variation at a de novo originated gene. *PLoS Genet* 9: e1003437
- Smaczniak, C., Immink, RG., Angenent, GC & Kaufmann, K. (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development* 139: 3081-3098
- Smith, S & De Smet, I. (2012). Root system architecture: insights from Arabidopsis and cereal crops. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367: 1441-1452
- Song, J., Angel, A., Howard, M & Dean, C. (2012). Vernalization - a cold-induced epigenetic switch. *J Cell Sci* 125: 3723-3731
- Soppe, WJ., Jacobsen, S., Alonso-Blanco, C., Jackson, JP., Kakutani, T *et al.* (2000). The late flowering phenotype of fwa mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. *Molecular Cell* 6: 791-802
- Sozzani, R., Cui, H., Moreno-Risueno, MA., Busch, W., Van Norman, JM *et al.* (2010). Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* 466: 128-132
- Sparks, E., Wachsman, G & Benfey, PN. (2013). Spatiotemporal signalling in plant development. *Nat Rev Genet* 14: 631-644
- Stahl, Y & Simon, R. (2010). Plant primary meristems: shared functions and regulatory mechanisms. *Curr Opin Plant Biol* 13: 53-58

- Tapia-Lopez, R., Garcia-Ponce, B., Dubrovsky, JG., Garay-Arroyo, A., Perez-Ruiz, RV *et al.* (2008). An AGAMOUS-related MADS-box gene, XAL1 (AGL12), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in Arabidopsis. *Plant Physiol* 146: 1182-1192
- Turesson, G. (1922). The species and the variety as ecological units. *Hereditas* 3: 100-113
- Vaughn, M., Tanurdz, M., Lippman, Z., Jiang, H., Carrasquillo, R *et al.* (2007). Epigenetic natural variation in Arabidopsis thaliana. *PLoS Biology* 5: 1617-1629
- Villellas, J., Berjano, R., Terrab, A & García, MB. (2014). Divergence between phenotypic and genetic variation within populations of a common herb across Europe. *Ecosphere* 5: art56
- Waddington, C. (1942). Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* 150: 563-565
- Weigel, D. (2012). Natural variation in Arabidopsis: from molecular genetics to ecological genomics. *Plant Physiol* 158: 2-22
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G & Provart, N. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* 2
- Xue, Y., Wang, Q., Long, Q., Ng, BL., Swerdlow, H *et al.* (2009). Human Y chromosome base-substitution mutation rate measured by direct sequencing in a deep-rooting pedigree. *Curr Biol* 19: 1453-1457
- Zhang, H., Rong, H & Pilbeam, D. (2007). Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* 58: 2329-2338
- Zhang, X., Hause, R & Borevitz, J. (2012). Natural Genetic Variation for Growth and Development Revealed by High-Throughput Phenotyping in Arabidopsis thaliana. *G3: Genes/Genomes/Genetics* 2: 29-34

12. ANEXO

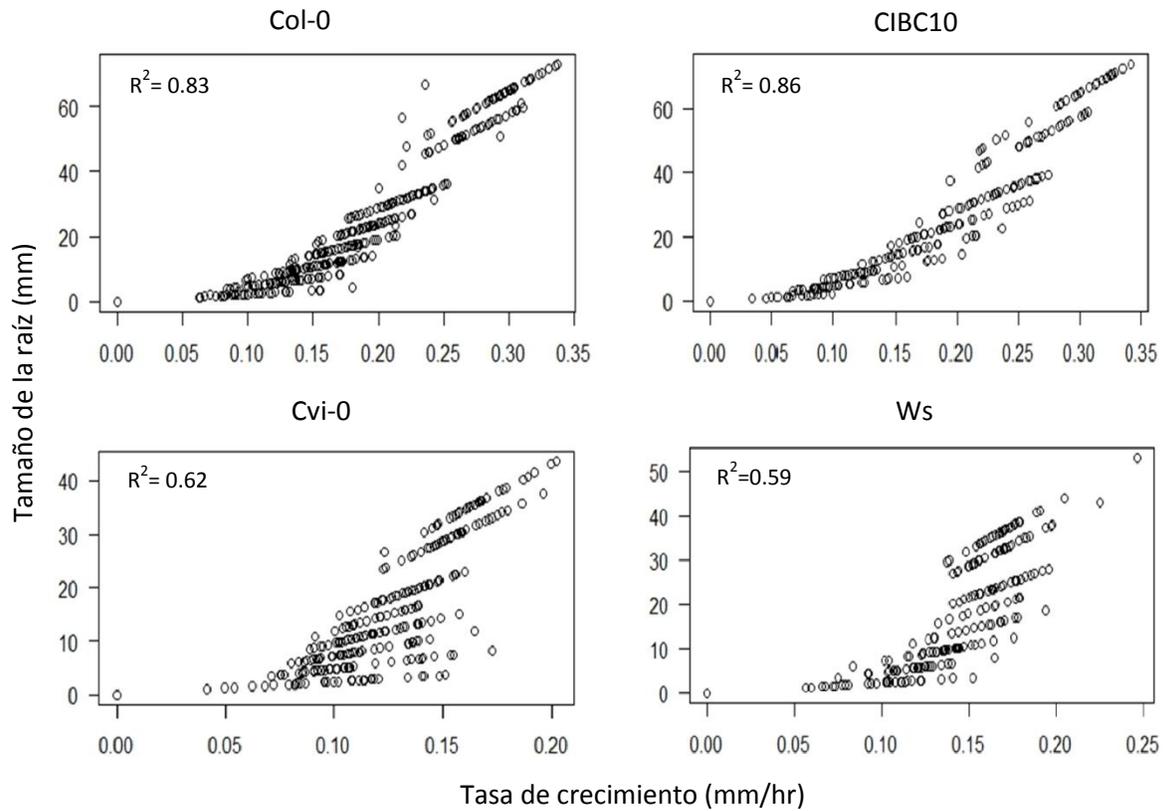


Figura suplementaria 1. Patrones en la tasa de crecimiento de los ecotipos con tamaño opuesto. Cada punto refleja un individuo perteneciente a un ecotipo específico. Resultado promedio de 4 réplicas biológicas con $n > 30$ para cada ecotipo. P value $< 2.2 \times 10^{-16}$.

	Bay-0	CIBC10	Col-0	Cvi-0	FR-2	Ler	Ove-0	Se-0	Sha	Ta-0	Ws
Bay-0	0										
CIBC10	0.12	0									
Col-0	0.08	0.09	0								
Cvi-0	0.24	0.29	0.23	0							
FR-2	0.08	0.11	0.05 !	0.21	0						
Ler	0.16	0.21	0.15	0.10	0.13	0					
Ove-0	0.09	0.14	0.11	0.30	0.12	0.23	0				
Se-0	0.08 !	0.06 !	0.05 !	0.26	0.07	0.17	0.11	0			
Sha	0.08 !	0.14	0.08	0.21	0.09	0.14	0.10	0.11	0		
Ta-0	0.08 !	0.16	0.09	0.26	0.10	0.19	0.07 !	0.11	0.08	0	
Ws	0.13	0.23	0.15	0.15	0.15	0.12	0.18	0.19	0.11	0.14	0

Figura suplementaria 2. Distancia de Procrustes en los análisis morfométricos.

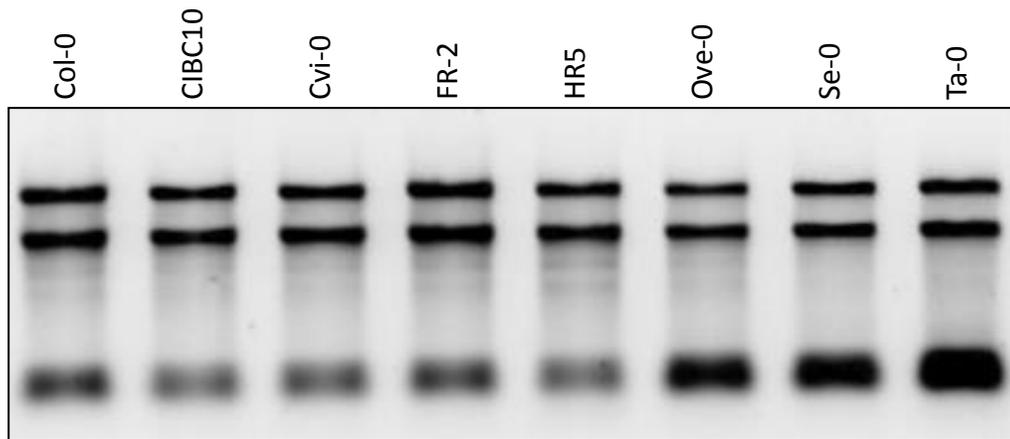


Figura suplementaria 3. Geles del RNA usado para los ensayos de RT-PCR. Las bandas gruesas indican los RNA ribosomales 28 y 18S.