



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Papel de *XAANTAL1* en módulos que regulan
la proliferación y la diferenciación celular durante el desarrollo
de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ESTEPHANIA ZLUHAN MARTÍNEZ

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. ADRIANA GARAY ARROYO
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

COMITÉ TUTOR:
DRA. MARÍA ELENA ÁLVAREZ-BUYLLA ROCES
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DRA. MARTHA VERÓNICA PONCE CASTAÑEDA
HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SXXI IMSS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. NOVIEMBRE, 2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Papel de *XAANTAL1* en módulos que regulan
la proliferación y la diferenciación celular durante el desarrollo
de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ESTEPHANIA ZLUHAN MARTÍNEZ

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. ADRIANA GARAY ARROYO
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

COMITÉ TUTOR:
DRA. MARÍA ELENA ÁLVAREZ-BUYLLA ROCES
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DRA. MARTHA VERÓNICA PONCE CASTAÑEDA
HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SXXI IMSS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. NOVIEMBRE, 2017



Lic. Ivonne Ramirez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 14 de agosto de 2017, aprobó el siguiente jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del Posgrado en Ciencias Biológicas, de la alumna **ZLUHAN MARTÍNEZ ESTEPHANIA** con número de cuenta **516012014** con la tesis titulada "**PAPEL DE XAANTAL 1 EN MODULOS QUE REGULAN LA PROLIFERACIÓN Y LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DURANTE EL DESARROLLO DE LA RAÍZ DE *Arabidopsis thaliana***", bajo la dirección de la **DRA. ADRIANA GARAY ARROYO**:

Presidente:	DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN
Vocal:	DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
Secretario:	DRA. MARÍA ELENA ÁLVAREZ BUYLLA ROCES
Suplente:	DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA
Suplente	DRA. VERÓNICA PONCE CASTAÑEDA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a. 25 de octubre de 2017


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó gracias al apoyo del Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México; y al apoyo de beca de proyecto de maestría por parte del CONACYT titulado: “Papel de *XAANTALI* en módulos que regulan el ciclo celular y proliferación celular durante el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*”.

El financiamiento para insumos y otras actividades relevantes a esta investigación provino de proyectos de investigación CONACYT: 240180 y 180380; y PAPIIT, UNAM: IN211516, ININ208517, IN205517 y IN204217.

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Adriana Gary Arroyo en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México y bajo la coordinación en conjunto con las doctoras que formaron parte del comité tutor: la Dra. María Elena Álvarez-Buylla Roces, del Instituto de Ecología, y la Dra. Martha Verónica Ponce Castañeda del CMN Siglo XXI, IMSS.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco a los miembros de mi jurado; la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, el Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra, la Dra. María Elena Álvarez-Buylla Roces, el Dr. José Luis Reyes Taboada y a la Dra. Martha Verónica Ponce Castañeda; por ayudar a mejorar esta tesis con los comentarios y sugerencias que me dieron, además de la paciencia para la realización de los trámites.

Por otro lado, agradezco la asistencia técnica en microscopía confocal del Dr. Vadim Pérez del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, CMN Siglo XXI, IMSS.

Vuelvo a recalcar el fuerte agradecimiento hacia mi tutora, la Dra. Adriana Garay Arroyo, que me ha visto crecer durante este periodo, en todo momento me ha apoyado y ha confiado en mí, más que una tutora es una gurú y amiga que me ha enseñado muchas cosas. También quiero agradecer a la Dra. Ma. Elena Álvarez-Buylla que siempre ha visto en mí cosas que a veces yo no logro ver y siempre haciéndonos ver las cosas de una manera diferente. Y a la Dra. M. Verónica Ponce Castañeda, por aportar tantas ideas a este proyecto que le dieron un aspecto mucho más integrativo y me sacaron de mi campo de conocimiento.

De igual manera agradezco a las demás doctoras y al equipo en general del Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México; a la Dra. Berenice García Ponce y la Dra. María de la Paz Sánchez, por siempre estar accesibles a ayudarte y a cuestionarte. A Diana Romo, encargada de la coordinación administrativa, que hace que todo pueda girar en el laboratorio. También a la Dra. Yamel Ugartechea Chirino, que siempre me ha ayudado con varias técnicas, mucho del trabajo aquí realizado fue gracias a su apoyo, además de que es una gran persona con quien convivir. A de Laura Rodríguez y la Dra. Teresa Romero, en la preparación de soluciones, medios y materiales diversos, importantes para realizar la investigación de esta tesis, pero sobre todo por vernos evolucionar, platicar con nosotros y ayudarnos con dudas.

Obviamente toda esta tesis se realizó en un gran laboratorio, con grandes compañeros, en el mejor ambiente, así que no puedo dejar de agradecerle a todos mis camaradas del laboratorio, desde los que ya se fueron hasta las nuevas generaciones, que en muchos momentos me

ayudaron de manera académica (como Joel Herrera con varios resultados de esta tesis y Stefan Steckenborn con varios protocolos) o me hicieron pasar grandes ratos, dejándose sonsacar por mí para salir de vez en cuando. Porque al final y al cabo pasamos más tiempo en el laboratorio que en nuestras casas y creamos grandes vínculos entre nosotros. Pero no sólo el ambiente de laboratorio fue importante, también todos los amigos que hice durante este periodo que forman parte de la comunidad del Instituto de Ecología, con los cuales compartí grandes momentos de calidad y relajación al formar parte del cineclub y por supuesto de las reuniones post-cineclub.

Continuando con los agradecimientos cada vez más personales, estoy infinitamente agradecida de haber tenido a personas que quiero mucho formando parte de lo que fue este proceso, como Olmo Estrada, que soportó mis crisis existenciales, pero sobre todo me dio grandes momentos de alegría que hicieron el proceso más llevadero; y a mis viejos amigos, que no importa que nuestras vidas estén tomando otro rumbo, aunque pase el tiempo vernos siempre es increíble. Algunos no los vi tanto como me hubiera gustado (Carla Santini, Emiliano Rodríguez Mega y Jimena Acosta), y otros que no sé que hubiera hecho sin ellos, Gabriela Castillo y Jalil Rodarte, seguro ni saben lo importante que es tenerlos en mi vida, así como no saben de qué fue mi proyecto.

Por último y para nada menos importante, al contrario, tal vez de las cosas más importantes que debo agradecer es tener a la familia que tengo, no me imagino una mejor y no me imagino pasando por todos estos procesos sin ellos; somos un gran equipo. Los quiero mucho. Esta tesis va para ustedes.

Gracias a todas las plantas que dieron sus vidas para llevar a cabo la realización de este proyecto.

CONTENIDO

RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	12
INTRODUCCIÓN	14
1. Arabidopsis y los diferentes procesos de desarrollo	15
1.1 Arabidopsis como planta modelo y raíz como sistema de estudio.....	15
1.1.1 Meristemos	15
1.1.2 Raíz	16
2. Ciclo celular	18
2.1 Ciclo celular en plantas	21
3. Retinoblastoma.....	22
3.1 Retinoblastoma en animales.....	22
3.1.1 Estructura y función de pRb.....	23
3.1.2 Papel de Retinoblastoma en proliferación y diferenciación celular	26
3.2 Retinoblastoma en plantas.....	27
4. Otros componentes de proliferación y diferenciación celular	28
4.1 Factores de transcripción bHLH	28
4.1.1 Familia MRF de bHLHs.....	29
4.1.2 MRFs en proliferación celular.....	30
4.2 Factores de transcripción MADS-box	31
4.2.1 MEF2 de humanos	32
4.2.2 MADS-box en plantas.....	33
ANTECEDENTES.....	37
HIPÓTESIS	40
OBJETIVO GENERAL	40
OBJETIVOS PARTICULARES.....	40
METODOLOGÍA	41
Material vegetal.....	41
Condiciones de crecimiento y esterilización	43
Generación de cruzas	43
Genotipificación.....	44
Cinéticas de crecimiento y análisis de velocidad	45
PCR Tiempo real (cuantitativa).....	45

Microscopía y cuantificación celular	48
Análisis estadísticos	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
Sitios de regulación transcripcional por genes MADS y bHLH's (cajas CArG y cajas E).....	50
Regulación transcripcional de RBR y XAL1	52
Vía de regulación del desarrollo.....	59
Cinéticas de crecimiento y tamaño de raíz.....	60
Zonas de desarrollo de la raíz.....	64
Organización del Nicho de Células Troncales	78
Análisis de expresión a lo largo de la raíz.....	81
Participación de un bHLH tipo MyoD	84
Participación del jasmonato en la vía de XAL1 y RBR	94
CONCLUSIONES	98
REFERENCIAS	99
ANEXO.....	111

RESUMEN

El desarrollo depende de las decisiones celulares entre dos procesos que están íntimamente relacionados: la proliferación y la diferenciación. Los factores de transcripción son componentes claves del balance de estos dos procesos en el desarrollo. Específicamente, en animales, se ha estudiado extensivamente la participación de genes de la familia MADS box tipo II (*MEF2C*) en las diferentes etapas de la miogénesis. En plantas, esta familia de genes ha sido muy estudiada en *Arabidopsis thaliana* y se ha visto que participa en todos los procesos de desarrollo estudiados, aunque su participación en el desarrollo de la raíz no se ha elucidado. En nuestro laboratorio se demostró que parte del fenotipo que presenta la raíz en mutantes de pérdida de función del gen MADS-box: *XAANTALI(XALI) /AGL12*, que se expresa fuertemente en la raíz y que funciona como un promotor del crecimiento, se debe a que altera el ciclo celular regulando la expresión de componentes moleculares involucrados en este proceso. Sus mutantes de expresión baja tienen un fenotipo de raíz corta y las plantas con sobreexpresión promueven la proliferación en el nicho de células troncales.

Decidimos incorporar en este estudio el gen de susceptibilidad a Retinoblastoma ya que la proteína homóloga de *Arabidopsis* *RBR* (por sus siglas en inglés *RETINOBLASTOMA-RELATED*) está involucrada en el desarrollo de la raíz y es un regulador crítico del ciclo celular en animales. La reducción de la expresión de este gen da lugar a plantas con una raíz primaria en ocasiones más larga y con más capas de células iniciales de columela y en contraste, en las plantas que sobreexpresan *RBR*, las células iniciales de columela se diferencian más rápido sustentando la participación de esta proteína en la toma de decisiones entre proliferar y diferenciarse. Estos fenotipos de *RBR* son muy interesantes ya que son contrarios a lo que pasa en las mutantes de pérdida de función y sobreexpresoras de *XALI* respectivamente. Por otro lado, hay datos experimentales previos que sugieren la participación de remodeladores de la cromatina en plantas con lo cual se va conformando una red de regulación muy similar a la de animales.

No se conoce el papel que tiene *XALI* en las decisiones entre proliferación/diferenciación en la raíz, por lo que el objetivo de este proyecto fue investigar el papel de *XALI* en la red de regulación donde se encuentra *RBR* con el propósito de identificar los componentes de la red

subyacente que interviene en las decisiones de proliferación y diferenciación celular en la raíz.

Para llevar a cabo lo anterior y entender cómo se llevan a cabo las decisiones entre proliferar y/o diferenciarse, usamos como modelo la red de regulación en animales específicamente en desarrollo de músculo, e incluimos los componentes conservados en plantas incluyendo genes MADS box, del ciclo celular, los remodeladores de la cromatina, los factores de transcripción tipo bHLH y el gen de susceptibilidad a Retinoblastoma. Se hicieron cruza de plantas mutantes para *XALI* y para *RBR*, se analizaron los fenotipos y la expresión de estos genes por microscopía y qRT-PCR.

Mediante cruza de las mutantes de ambos genes se determinó que *RBR* juega un papel importante en mantener la estructura del nicho de células troncales en la raíz y que *XALI* parece jugar un papel más importante en la zona de diferenciación de la misma ya que los fenotipos en ambas zonas son muy parecidos a los que se encuentran en las mutantes sencillas de cada uno de los genes; es decir, la ausencia del otro gen no es suficiente para alterar el fenotipo. Por análisis de expresión de qRT-PCR se encontró que *RBR* y *XALI* regulan su expresión mutuamente, además de regular la expresión de algunos bHLHs. Finalmente, haciendo análisis de expresión por qRT-PCR, encontramos dos candidatos de genes tipo bHLH, que podrían estar participando en la red como lo hace el gen de esta familia en animales: *MyoD*.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la arquitectura de la red de regulación genética se podría encontrar conservada entre plantas y animales, donde *XALI* y *RBR* son componentes que participan en la proliferación y diferenciación celular.

ABSTRACT

Development depends on the cellular decisions between two processes that are intimately related: proliferation and differentiation. Transcription factors are key components of the balance of these two processes in development. Specifically, in animals, it has been studied extensively the participation of genes of the family MADS box type II (*MEF2C*) at different stages of myogenesis. In plants, this family of genes has been widely studied in the development of *Arabidopsis thaliana* and has been involved in all the studied processes of development, although its involvement in root development has not been elucidated.

In our laboratory, it was demonstrated that part of the phenotype that presents the root in mutants of loss of function of the MADS-box gene: *XAANTALI (XALI) / AGL12*, which is strongly expressed in the root and works as a growth promoter, alters the cell cycle by regulating the expression of molecular components involved in this process. Their low expression mutants have a short root phenotype and plants with overexpression promote proliferation in the stem cell niche.

We decided to incorporate in this study the Retinoblastoma susceptibility since the homologous protein of *Arabidopsis RBR (RETINOBLASTOMA-RELATED)* is involved in the development of the root and is a critical regulator of the cell cycle in animals. Reduction of the expression of this gene gives rise to plants with a primary root sometimes longer and with more layers of columella initials and in contrast, in plants that overexpress RBR, columella initials differentiate themselves more quickly sustaining the participation of this protein in the decision making between proliferate and differentiate. These phenotypes of *RBR* are very interesting since they are contrary to what happens in the mutants of loss of function and overexpressors of *XALI* respectively. On the other hand, there are previous experimental data that suggest the participation of remodelers of the chromatin in plants with which a regulating network, very similar to that of animals.

The role of *XALI* in the decisions between root proliferation/differentiation is not known, so the objective of this project was to investigate the role of XAL1 in the regulatory network where RBR is located in order to identify the components of the underlying network involved in cell proliferation and differentiation decisions at the root.

To carry out the above and understand how decisions are made between proliferation and/or differentiation, we used as a model the network of regulation in animals, specifically in muscle development, and we include conserved components in plants like MADS box genes, cell cycle, chromatin remodelers, bHLH type transcription factors and the Retinoblastoma susceptibility gene. Mutant plant crosses were made for *XALI* and for *RBR*, the phenotypes and expression of these genes were analyzed by microscopy and qRT-PCR.

By crossing the mutants of both genes, it was determined that *RBR* plays an important role in maintaining the structure of the stem cell niche at the root and that *XALI* appears to play a more important role in the differentiation zone of the same since phenotypes in both areas are very similar to those found in the single mutants of each of the genes; that is, the absence of the other gene is not sufficient to alter the phenotype. By expression analysis of qRT-PCR it was found that *RBR* and *XALI* regulate their expression mutually, in addition to regulating the expression of some bHLHs. Finally, by doing expression analysis by qRT-PCR, we found two candidates for bHLH-type genes, which could be participating in the network as does the prototype gene of this family in animals: *MyoD*.

The results obtained in this thesis suggest that the architecture of the gene regulation network could be found conserved between plants and animals, where *XALI* and *RBR* are components involved in cell proliferation and differentiation.

INTRODUCCIÓN

Las plantas y animales provienen de un ancestro común que se estima divergió hace 1.6 billones de años, dando origen a linajes que evolucionaron de manera independiente en cuanto a su desarrollo multicelular (Meyerowitz, 1999). Se han descrito varios mecanismos moleculares de señalización y regulación génica que son únicos para cada grupo de organismos (Meyerowitz, 1999); pero, no cabe duda de que estos dos grupos provienen de un ancestro común eucarionte unicelular y que esto puede verse en la clara homología de genes que controlan el desarrollo a nivel epigenético (Meyerowitz, 1999; Meyerowitz, 2002). El descubrimiento de otras familias génicas conservadas a través de la comparación de genomas y proteomas ha sido de gran utilidad para entender la conservación y diversidad de procesos de desarrollo entre los diferentes organismos (Meyerowitz, 1999). Un ejemplo de un proceso que se ha conservado entre plantas y animales, es el ciclo celular, sus componentes y su arquitectura funcional (Gutiérrez, 2005). La regulación espacio-temporal de los procesos donde se ve involucrado el ciclo celular, es decir la proliferación y la diferenciación, es fundamental para mantener la morfogénesis normal en ambos tipos de organismos, aunque todavía no se entiende cómo se integran y acoplan estos dos procesos (Gutiérrez, 2005). Lo que sí es claro es que, en los organismos multicelulares, la proliferación celular debe estar coordinada con la diferenciación celular, la morfogénesis y los programas específicos del desarrollo, por lo que plantas y animales han desarrollado estrategias similares para su crecimiento y formación de patrones (Gutiérrez, 2005).

Comparar el desarrollo de las plantas con el de los animales nos permite aprender no sólo acerca de los mecanismos del desarrollo, sino también de la lógica de éste; no sólo de cómo se desarrollan plantas y animales independientemente, sino también qué aspectos del desarrollo son organismo-específicos y cuáles se han estado utilizando y mantenido a través de la evolución del desarrollo multicelular (Meyerowitz, 1999). Es por esto que en este trabajo analizaremos ciertos aspectos del desarrollo en plantas, para lo cual utilizaremos a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (de aquí en adelante *Arabidopsis*), y los compararemos con lo que se sabe en algunos procesos de desarrollo de animales.

1. Arabidopsis y los diferentes procesos de desarrollo

1.1 Arabidopsis como planta modelo y raíz como sistema de estudio.

El incremento del estudio del papel de la genética y la disponibilidad de herramientas para los estudios de biología molecular, han resultado en la búsqueda de modelos de organismos que pueden estar sujetos a análisis más detallados. Por lo anterior, para los estudios enfocados en plantas, se ha usado a *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo ya que tiene ciertas ventajas sobre otras plantas como son: un ciclo de vida corto (tarda de 8 a 12 semanas en completar su ciclo de vida), un tamaño físico pequeño (alrededor de 10 cm, sin contar la raíz) que facilita la manipulación experimental, una producción prolífica de semillas en un organismo que se autopoliniza, aunado a la secuenciación completa de su genoma y que se cuenta con una gran cantidad de herramientas moleculares para su estudio, como el hecho de tener líneas mutantes en casi todos sus genes (Koornneef y Meinke, 2010).

Además de ser un sistema modelo para el estudio de las plantas, recientemente *Arabidopsis* se ha convertido en una invaluable herramienta para entender los mecanismos moleculares que afectan a las enfermedades humanas. Esto se debe a que la comparación de los genomas de *Arabidopsis* y humanos revelan un alto porcentaje de identidad en genes implicados en enfermedades humanas que se encuentran presentes en la planta, incluyendo aquellos involucrados en desordenes neurodegenerativos y cáncer (Xu y Moller, 2011). Muchos de estos genes son letales en el ser humano mientras que la gran mayoría participan en otros procesos en el desarrollo de las plantas y no son letales en *Arabidopsis*.

1.1.1 Meristemos

Mientras que la organogénesis en muchos animales ocurre durante la embriogénesis, el inicio de la formación de órganos y el crecimiento en plantas es un proceso reiterativo y continuo que ocurre de manera post-embionaria durante toda la vida del organismo, lo cual puede durar cientos de años en algunas especies. Este crecimiento ocurre a partir de meristemos, que son un conjunto de células indiferenciadas con la capacidad de autoperepetuarse y células en constante proliferación celular; en plantas, los principales meristemos se encuentran en el ápice tanto del vástago aéreo como de la raíz (Van den Berg *et al.*, 1997; Sablowski, 2011).

Una característica del conjunto de células indiferenciadas y de los meristemos en general, es

que continuamente proveen de células precursoras más especializadas para sostener el crecimiento y formar nuevos órganos (Sablowski, 2004). En animales, a pesar de que la organogénesis se completa durante la embriogénesis, se conservan conjuntos de células indiferenciadas, llamadas células madre, como en los meristemos, que confieren la capacidad de renovar constantemente componentes de los órganos y tejidos, como ocurre, por dar unos ejemplos, en la hematopoyesis, en el intestino y en los músculos, donde las células indiferenciadas tienen que regular su capacidad de autorenovación y de diferenciación para mantener los tejidos y órganos ya existentes (Reya *et al.*, 2001).

Por lo anterior, la comparación de este mecanismo entre ambos tipos de organismos puede realzar aspectos importantes en el estudio de la biología de estos procesos. Tanto en plantas como en animales, las células indiferenciadas son mantenidas por señales intracelulares de corto alcance muy específicas y tiene una división celular más lenta (Sablowski, 2004). Finalmente se puede decir que muchos de los componentes de señalización no parecen estar conservados ni tener relación entre plantas y animales, pero otros si se conservan, como aquellos involucrados en la regulación de la cromatina; éstos últimos pueden pre-datar la evolución de organismos multicelulares (Sablowski, 2004).

1.1.2 Raíz

La raíz de *Arabidopsis* se ha convertido en un sistema experimental modelo, fundamental para entender las bases moleculares y celulares del desarrollo. En la raíz se pueden encontrar, en cualquier momento del desarrollo, las distintas fases por las que atraviesa una célula: el nicho de células troncales, una zona meristemática dividida en dos dominios: uno de proliferación activa y uno de transición, una zona de alargamiento celular y una última zona de diferenciación (Fig. 1) (Dolan *et al.*, 1993). Además, la raíz es un órgano con una estructura celular relativamente sencilla, transparente, de fácil manipulación, con pocos tipos celulares y en donde se cuenta con una gran cantidad de herramientas moleculares para su estudio. Por otro lado, la raíz de *Arabidopsis* es un sistema experimental muy útil para el estudio de la organogénesis de plantas, ya que se puede ver como un conjunto de cilindros concéntricos, con solamente cuatro capas que rodean el tejido vascular: de afuera hacia el centro se encuentra la epidermis, el córtex, la endodermis y los haces vasculares (Benfey y Sheres, 2000). En la parte apical de la raíz se encuentra el meristemo de la raíz o RAM (por

sus siglas en inglés Root Apical Meristem) donde a su vez se encuentra el Nicho de Células Troncales (NCT) formado por un organizador central conocido como centro quiescente (CQ) que presenta una baja tasa de división celular, rodeado por cuatro células iniciales o troncales que van a dar lugar a todos los tipos celulares de la raíz. Las células del CQ actúan, entre otras cosas, para mantener a las células iniciales en un estado indiferenciado (Dolan *et al.*, 1993, van den Berg *et al.*, 1995 y van den Berg *et al.*, 1997).

Las células que se originan del nicho de células troncales pasan por una fase de proliferación celular en el dominio de proliferación del meristemo seguido del dominio de transición en donde baja la tasa de división celular y progresivamente se empiezan a elongar. Posteriormente, las células transitan a la zona de elongación, donde el tamaño de las células puede ser 20 veces más grande que las del meristemo, debido a una rápida expansión celular mediada por la vacuola. Al alcanzar su tamaño final en la zona de maduración, adquieren sus características celulares finales como es la formación de pelos radiculares en las células de la epidermis (Fig. 1) (Barrada *et al.*, 2015).

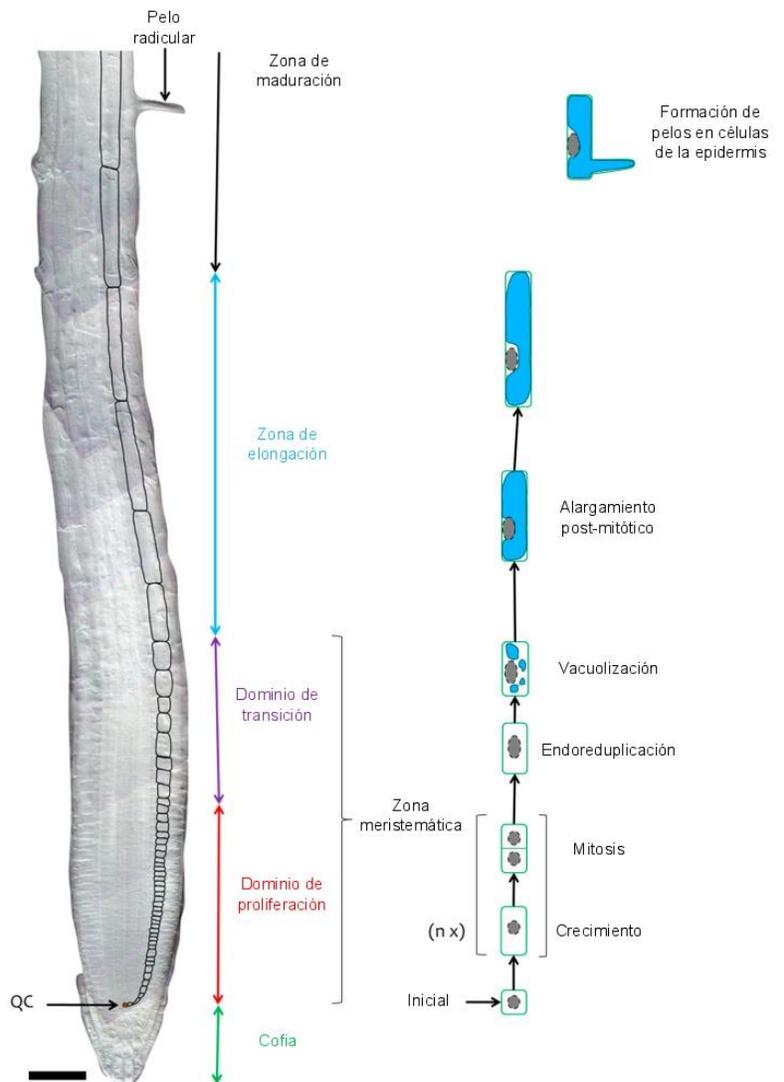


Figura 1. Mecanismos celulares involucrados en la zonación de la raíz primaria.

Fotografía de una raíz de *Arabidopsis* donde se observan las diferentes zonas de desarrollo:

la zona meristemática compuesta por el dominio de proliferación donde las células se dividen por mitosis, y el dominio de transición, donde las células se siguen dividiendo pero a una tasa más baja, empiezan a crecer más y a vacuolizarse; la zona de elongación, donde las células alcanzarán su tamaño final y la zona de maduración donde las células adquieren sus características finales (Modificado de Barrada *et al.*, 2015).

2. Ciclo celular

Cuando las células eucariontes están proliferando, tienen un ciclo celular que comprende

cuatro fases: la fase de síntesis (S), donde el DNA es replicado; la fase de mitosis (M), donde el material replicado es segregado dando como resultado dos células hijas; dos fases de crecimiento G (del inglés growth) G1 y G2, que interceden entre la fase S y M respectivamente y, también se ha señalado una quinta fase conocida como G0, la cual es un estado quiescente que asegura que las células no sigan el ciclo celular en condiciones desfavorables y que está presente en la diferenciación terminal (Budirahardja y Gönczy, 2009).

En tejidos maduros y diferenciados, las células a menudo entran en un ciclo de endoreduplicación donde la fase S no es seguida por la fase M, sino por otra fase G1, resultando en células con un mayor número de copias de su genoma (poliploidía) sin que haya citocinesis (Harashima *et al.*, 2013). La poliploidía, es un mecanismo normal en el desarrollo de muchos organismos incluyendo animales, insectos, gasterópodos y plantas. Se ha propuesto que el mecanismo de endoreduplicación y poliploidía podría conferir ciertas ventajas a las células como aumentar su tamaño y, por consiguiente, aumentar el tamaño total del organismo y como protección contra mutaciones por tener múltiples copias de cada uno de los genes (Orr-Weaver, 2015). Se cree que las células ajustan su volumen citoplasmático con respecto al contenido nuclear de DNA; esto se ha visto en fruto de jitomate en donde hay una clara relación entre la endoreduplicación y el tamaño final de los mismos (Chevalier *et al.*, 2014; Orr-Weaver, 2015). También se ha propuesto que las células que están endoreduplicando son necesarias para sostener la producción masiva de proteínas y una actividad metabólica alta necesaria en algunos tejidos, como en la embriogénesis en animales y el rápido crecimiento del hipocotilo en plantas (Lee *et al.*, 2009; Orr-Weaver, 2015).

Uno de los dogmas centrales del control del ciclo celular es que las progresiones de las diferentes fases del ciclo están controladas, principalmente, por la actividad de una clase específica de cinasas serina/treonina, denominadas cinasas dependientes de ciclina (CDK's) (Harashima *et al.*, 2013). Estas cinasas se encuentran presentes en diversos organismos eucariontes desde hongos como *Saccharomyces cerevisiae*, anfibios como *Xenopus laevis*, insectos como *Drosophila melanogaster*, mamíferos como ratón (*Mus musculus*), humano (*Homo sapiens*) y en diversas plantas: las algas verdes como *Chlamydomonas reinhardtii*, musgos como *Physcomitrella patens*, plantas con flor como *Arabidopsis thaliana*, arroz

(*Oryza sativa*) y maíz (*Zea mays*). Lo anterior demuestra que estas cinasas son factores importantes del control del ciclo celular en una gran diversidad de organismos; sin embargo, hay diferentes grupos de cinasas cuya función varía entre organismos y hasta entre especies sugiriendo que hay una divergencia funcional que ha ocurrido durante la evolución de los eucariontes (Harashima *et al.*, 2013).

La actividad funcional de las CDK's necesita de la formación de complejos heterodiméricos con las proteínas denominadas Ciclinas que son proteínas que reciben su nombre debido a que su concentración oscila a lo largo del ciclo celular (Budirahardia y Gönczy, 2009). La combinatoria de estos complejos es la que determina los diferentes puntos de control del ciclo celular ya que las ciclinas son sintetizadas periódicamente antes de cada fase del ciclo en la que serán requerida (Budirahardia y Gönczy, 2009). La función de las CDK's también está regulada al ser fosforiladas y esto puede controlarse a través de la unión con cinasas inhibitoras de CDK's (CKI por sus siglas en inglés) o a través de otras fosforilaciones que resultan en la inhibición de su actividad (como las que llevan a cabo las cinasas Wee1 y Myt1). En mamíferos, existen dos familias de CKI's: la familia INK4 y la familia KIP/Cip (Budirahardia y Gönczy, 2009; Francis, 2007).

Dentro del ciclo celular, la disponibilidad de factores de crecimiento y nutrientes determina si una célula pasa de la fase G1 a S o se mantiene en G0. Se ha demostrado que hay proteínas que son esenciales para tomar esta decisión y una de ellas es la llamada proteína supresora de tumores codificada por el gen de susceptibilidad a retinoblastoma (pRb) que está altamente conservada en eucariontes. Esta proteína normalmente secuestra a factores de transcripción de la familia de los E2F's, provocando que no se unan a su secuencia en el DNA y que la cromatina se mantenga compactada en esos sitios donde se da la transcripción de genes que participan en la duplicación del DNA; esto da como resultado que no progrese el ciclo celular (Dick, 2007; Dick y Rubin 2013; Budirahardia y Gönczy, 2009). Las ciclinas junto con las CDK's fosforilan a pRb provocando que se libere E2F, el cual se une a secuencias en sus blancos para poder llevar a cabo la transcripción de genes requeridos para la transición G1/S y los subsecuentes pasos del ciclo celular (Budirahardia y Gönczy, 2009).

2.1 Ciclo celular en plantas

Al igual que en animales, la progresión del ciclo celular ocurre a través de las fases G1, S, G2 y M y es un proceso regulado por los mismos complejos formados por ciclinas y CDK's, que fosforilan proteínas blanco claves en cada transición de fase. Las CDK's también son activadas por los diferentes tipos de ciclinas e inhibidas por proteínas inhibidoras de cinasas (KIP; Kinase Inhibitory Protein). La regulación específica de las CDK's, en cada fase del ciclo celular de las plantas, es controlada por la síntesis y degradación ordenada de las ciclinas y los inhibidores de CDK's (Barrada *et al.*, 2015). Finalmente, en plantas también se encuentra una proteína parecida a pRb, la proteína relacionada a Retinoblastoma (RBR en plantas), que controla la actividad de los factores de transcripción E2Fs (Sablowski y Dornelas, 2013; Gutierrez, 2005).

Sin embargo, hay diferencias en el control del ciclo celular en plantas con respecto a la que se ha encontrado en animales; por ejemplo, se sabe que en plantas hay más genes que codifican para ciclinas (50 genes; Gutierrez, 2005) de los que se encuentran en animales. De éstos, 10 codifican para ciclina-D (CYCD) (Inagaki y Umeda, 2011) mientras que en animales hay únicamente tres ciclinas tipo D (D1, D2, D3) (Musgrove, *et al.*, 2011). De manera interesante CYCD1 en animales y CYCD3;1 en plantas, son las que tienen la función central en el control de la transición de fase G1/S (Musgrove, *et al.*, 2011; Desvoyes *et al.*, 2013) aunque se ha demostrado que algunas de las ciclinas son específicas de plantas o con interacciones que sólo ocurren en plantas (Sablowski y Dornelas, 2013; Scofield *et al.*, 2014). Esta abundancia de proteínas en plantas podría ayudar a explicar porque la morfología vegetal es más robusta ante cambios en la regulación de los componentes del ciclo celular; por ejemplo, la sobreexpresión (SE) de la ciclina *CYCB1;1* (involucrada en la transición de fase G2/M) da lugar a una raíz más larga debido a una alteración en la división celular sin que se presenten divisiones descontroladas por lo que no hay desarreglos en la misma (Schnittger *et al.*, 2002). En contraste, la SE de la ciclina B de animales da lugar a células cancerígenas en donde si hay una alteración descontrolada (Egloff *et al.*, 2006). Por otro lado, también ocurre que hay algunos componentes que sí se encuentran en animales y en plantas no, como es el caso de la ciclina E, con dos copias en animales que tienen funciones redundantes en algunos procesos y en otros tienen funciones independientes y que no existe en plantas (Caldon y Musgrove, 2010; Sablowski y Dornelas, 2013).

Otra característica conservada entre plantas y animales, es la función de los factores de transcripción *E2Fs* que promueven la replicación del DNA y la regulación de los mismos por la proteína de RBR (Sablowski y Dornelas, 2013). En cuanto a los factores de transcripción E2F, *Arabidopsis* contiene 6 (denominados E2F de la *a* a la *f*) y dos tipos de proteínas que dimerizan con éstos: *DPa* y *DPb*. Los E2F's *a/b/c* tienen una organización típica que les permite unirse al DNA heterodimerizando con DP's e interactuando con RBR. Los otros tres miembros de los E2F's (*d*, *e* y *f*) son atípicos ya que tienen duplicado el sitio de unión al DNA funcionan sin la necesidad de formar dímeros. Se ha demostrado que E2Fa, en cooperación con *DPa*, regulan la transcripción de los genes de la fase S del ciclo celular (Mariconti, *et al.*, 2002; Gutierrez, 2005). La vía de la regulación Retinoblastoma/E2F, y no sólo los componentes, está conservada en plantas y esto se ha demostrado ya que la SE de E2Fa-*DPa* y de *CYCD3;1* inducen una proliferación celular descontrolada y un retraso en la diferenciación, mientras que la inactivación de RBR también da una proliferación descontrolada (Desvoyes *et al.*, 2013).

3. Retinoblastoma

3.1 Retinoblastoma en animales

La proteína codificada por el gen de susceptibilidad al Retinoblastoma (pRb) es el primer supresor de tumores descubierto a partir del estudio de este tumor intraocular maligno de la infancia temprana, que se origina en la retina. Se trata de una proteína particularmente interesante que debe de tener un origen ancestral, antes de la divergencia entre plantas y animales, ya que al menos, una especie de cada uno de los subgrupos de eucariontes, tiene un gen de pRb incluyendo a los grupos excavata, como *Naegleria gruberi*, amoebozoa como *Polysphondylium pallidum* y apusozoa como *Thecamonas trahens* (Desvoyes *et al.*, 2013). Además, pRb no sólo participa en la regulación de la proliferación celular, sino en mantener un estado de quiescencia, en la coordinación de la diferenciación celular, supervivencia, senescencia y estabilidad del genoma (Chinnam y Goodrich, 2011). Por todo lo anterior, se ha propuesto que esta proteína es un nodo central dinámico: un integrador que recibe señales y las traduce en cambios específicos en el genoma mediante complejos proteicos que participan en una variedad de procesos moleculares relevantes para la célula, incluyendo transcripción de genes, reparación de DNA y mitosis (Chinnam y Goodrich, 2011).

3.1.1 Estructura y función de pRb

pRb de animales es miembro de una pequeña familia de genes que incluye a los genes *RBI* (*p105*), *p107* y *RB2* (*p130*), cuya estructura es muy similar entre sí y que probablemente surgieron por una duplicación en tandem. *RBI* es el gen que más se conoce debido a que se ha estudiado más (Claudio *et al.*, 2002; Chinnam y Goodrich, 2011); se sabe que su proteína (pRb) consta de 928 amino ácidos con dos dominios y una región desordenada: el primer dominio llamado “pocket” (bolsillo) es un dominio interno de la proteína y está formado por dos subdominios altamente conservados (A y B). Estos dos motivos estructurales llamados pliegues de ciclina, están formados por dos núcleos estructurales de tres o cinco hélices proteicas que ayudan a mediar las interacciones proteína-proteína (Fig. 1) (Dick, 2007; Chinnam y Goodrich, 2011; Dick y Rubin, 2013, Chemes *et al.*, 2013). El segundo dominio, se encuentra en el extremo amino-terminal y también está compuesto de dos pliegues de ciclina muy parecidos a los que presenta el dominio “pocket”. Finalmente, la proteína tiene una región carboxilo terminal que consta de aproximadamente 150 residuos en donde no se encuentra ninguna zona bien estructurada; considerada intrínsecamente desordenada (Fig. 2) (Dick y Rubin, 2013). A pesar de que el dominio carboxilo esta poco estructurado, la región mínima necesaria para la función de pRb, incluye al dominio pocket y al carboxilo- terminal; esta región se denomina “pocket largo” (Dick, 2007) (Fig. 2).

La organización de los dominios de pRb le permite tener uniones independientes con otras proteínas que pueden modular o regular su actividad (Dick y Rubin, 2013). Se sabe que el dominio “pocket” cuenta con una hendidura que permite la unión de proteínas que contengan los aminoácidos ‘L-X-C-X-E’ (donde X representa cualquier amino ácido) y se ha documentado un gran número de proteínas que contienen este motivo (Dick y Rubin, 2013). Ejemplo de este tipo de proteínas son la CYCD, proteínas remodeladoras de la cromatina (HDAC’s, HP1, Suv39h1, DNMT1), DNA polimerasas, helicasas, etc. (Dick, 2007; Desvoves *et al.*, 2013) (Fig. 2).

Otro factor muy importante que modula la función de la proteína de pRb, son las modificaciones post-traduccionales; se ha visto que la fosforilación de esta proteína resulta en su inactivación con la consecuente desrepresión transcripcional y progresión del ciclo celular (Dick y Rubin, 2013) aunque se han documentado excepciones a esto; por ejemplo,

se ha visto que en ratones transgénicos de pRb no fosforilable, las células epiteliales no detienen su ciclo celular, sino que sólo es más lento, por lo que debe haber otros mecanismos de regulación del ciclo celular independientes de Retinoblastoma (Dick, 2007). La fosforilación no solamente está mediada por CDK's sino también por otras cinasas cada una de las cuales fosforila sitios determinados dando lugar a cambios estructurales específicos (Dick y Rubin, 2013). También se han identificado sitios de acetilación y metilación y no se ha demostrado su función en pRb pero se ha visto que, en otras proteínas, estas modificaciones se dan como una señal de respuesta a daño al DNA y a procesos de diferenciación (Dick y Rubin, 2013) (Fig. 2).

A pesar de que se han identificado dominios muy importantes de interacción de pRb con muchas proteínas involucradas en diferentes procesos del desarrollo, es el conjunto de modificaciones post-traduccionales las que más influyen en las diferentes funciones que pueda tener esta proteína (Dick, 2007). Se sabe que líneas celulares donde se encuentra mutado el sitio de unión con los motivos L-X-C-X-E, tienen la capacidad de controlar el ciclo celular, sin que haya la interacción directa con las ciclinas D (Dick, 2007). De igual manera, alterar los sitios de fosforilación y acetilación involucrados en ciclo celular, perturban la proliferación, pero no de una manera drástica, por lo que se puede decir que no son indispensables para este proceso. Finalmente, la modificación de estos sitios, altera otros procesos como la diferenciación a pesar de que, estas marcas, no se han relacionado a dichos procesos (Dick, 2007).

Todas estas características, le confieren a pRb la capacidad de ser un integrador en múltiples funciones que se van a describir a continuación.

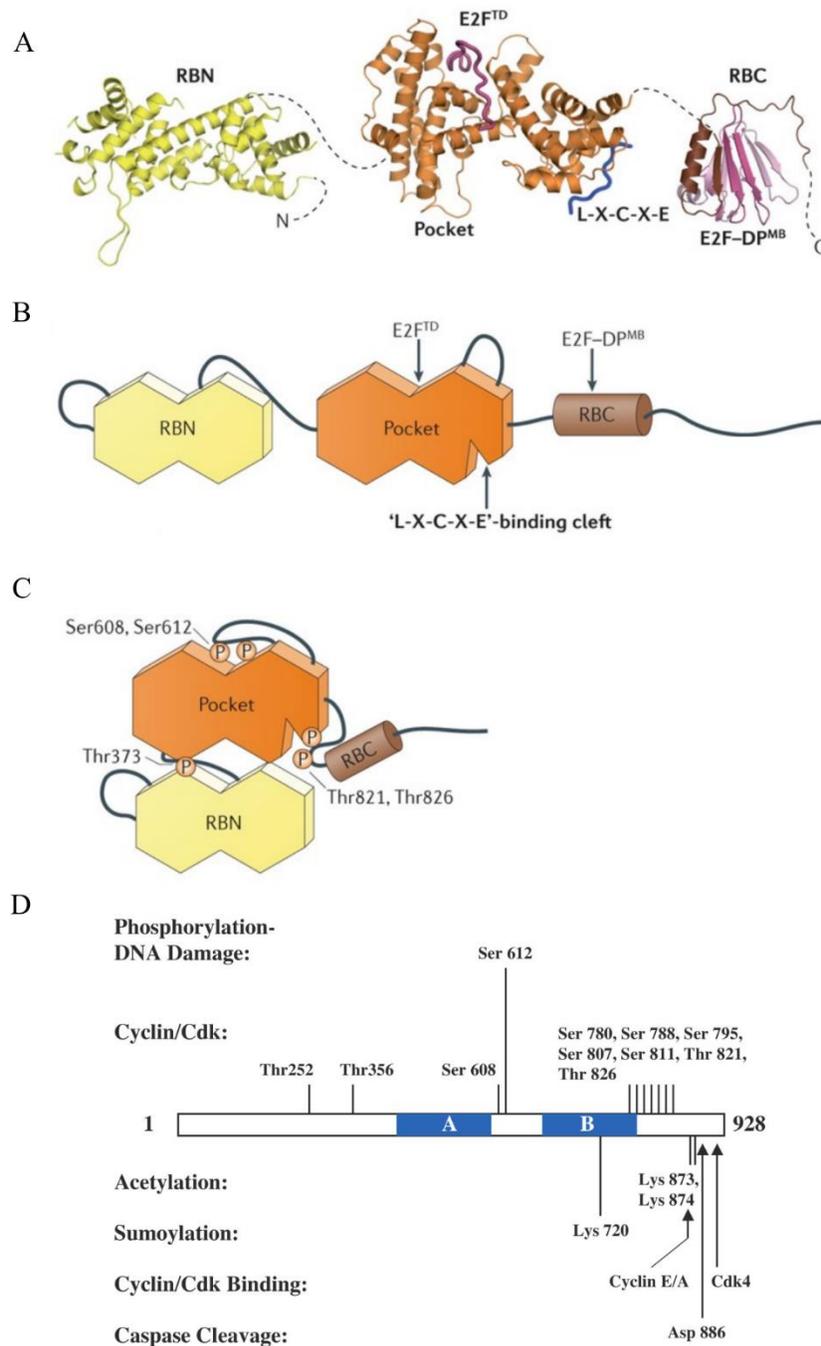


Figura 2. Dominios de la proteína de Retinoblastoma y los diferentes sitios de modificaciones post-traduccionales. A) Modelo de la proteína activa de Retinoblastoma, a partir de datos de cristalografía, con sus diferentes dominios y en complejo con E2F y un péptido con motivo LXCXE. B) Diagrama esquemático de los dominios de la proteína: dominio RB amino-terminal (RBN), dominio Pocket y dominio RB carboxilo-terminal

(RBC). Se marcan los sitios de unión con otras proteínas que han sido reportados. C) Estructura esquemática de la proteína inactiva en su conformación fosforilada. D) Sitios de modificaciones pos-traduccionales dentro de la secuencia proteica de Retinoblastoma (A y B en azul: subdominios del dominio Pocket) Se pueden observar sitios de fosforilación, acetilación, sumoilación, marcas para la unión de caspasas y sitios de unión de ciclinas/CDKs (Modificado de Dick 2007; Dick y Rubin 2013).

3.1.2 Papel de Retinoblastoma en proliferación y diferenciación celular

La regulación de la proliferación a través de pRb, como lo mencionamos anteriormente, ocurre a través de la interacción con los factores de transcripción E2F's. Existen, al menos, tres diferentes mecanismos por los cuales pRb es capaz de regular negativamente la actividad transcripcional de los E2F's sobre sus blancos. El primero es por medio de la heterodimerización de pRb con E2F (RB/E2F) la cual es posible cuando pRb está hipofosforilada en los sitios S608/612 y T356/373 por las CDK's; el segundo, es la competencia de la proteína pRb por el mismo sitio de unión de factores transcripcionales y acetil transferasas que normalmente interactúan con E2F y ayudan a activar la transcripción (Chinnam y Goodrich, 2011). Finalmente, el tercer mecanismo se da a través de modificaciones de la cromatina mediadas por remodeladores de la cromatina que forman complejos con pRb y afectan la expresión de los genes (De Falco *et al.*, 2006; Talluri y Dick, 2012).

A pesar de que la regulación de pRb sobre E2F es característica en la proliferación celular, se ha demostrado que los factores transcripcionales E2F's son dispensables (mientras que pRb no lo es) para que continúe la proliferación por lo que se sugiere que la regulación transcripcional de los E2F's no debe de ser la única manera de regular la función de pRb como supresor de tumores (Chinnam y Goodrich, 2011). Se reportó recientemente que pRb puede regular al Ciclosoma o Complejo Promotor de la Anafase (APC/C; por sus siglas en inglés) a través de diferentes interacciones proteicas independientes de E2F, algunas todavía no muy bien definidas. Este complejo tiene una importante participación en la degradación de proteínas principalmente durante la transición de fase M/G1, por lo que está involucrado en la toma de decisiones entre proliferación, diferenciación y apoptosis (Ramanujan y Tiwari, 2016).

Por otro lado, se ha visto que pRb está involucrado en diversos sistemas de diferenciación en animales que incluyen ojos, cerebro, sistema nervioso periférico, músculo, hígado, placenta, pulmones, cerebelo, pituitaria y retina (De Falco *et al.*, 2006). La expresión de *RB* está regulada en muchos procesos de diferenciación y se sabe que también muchos genes blanco de E2F's participan en los mismos. Además, se ha reportado que tanto pRb como los E2F's interactúan de manera independiente con factores transcripcionales tejido-específicos (De Falco *et al.*, 2006), aunque se desconoce cómo es que el heterodímero E2F/pRb regula la diferenciación tejido-específica. El proceso de diferenciación más estudiado en animales donde está involucrado pRb, es el de diferenciación de músculo. En este proceso, pRb es requerido para la diferenciación terminal de miocitos; para que esto ocurra, es necesaria la participación y presencia de otro componente que es el factor transcripcional MyoD (proteína de diferenciación miogénica). Tanto MyoD como pRb necesitan estar presentes en este proceso de diferenciación, pero se ha visto que no tienen interacciones proteína-proteína; ambos factores promueven la activación transcripcional del coactivador MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) para las etapas finales de la diferenciación muscular (Novitch *et al.*, 1999; De Falco *et al.*, 2006). Por otro lado, pRb se une directamente a desacetilasas de histonas tipo I (HDAC I) y previene la desacetilación de los blancos transcripcionales de MyoD y la hiperacetilación de éste, volviéndolo funcional (De Falco *et al.*, 2006).

3.2 Retinoblastoma en plantas

En plantas, el gen que codifica para RBR, se descubrió por primera vez en maíz y se ha visto que está presente, al menos con una copia, en todos los taxones. Su secuencia es similar a la de humanos y comparte la misma organización proteica (Desvoyes *et al.*, 2013), por lo que es concebible que muchas de sus funciones estructurales también se compartan entre plantas y animales.

Debido a esto, se ha buscado estudiar el papel de RBR en plantas; sin embargo, las plantas mutantes de RBR son gametofíticamente letales debido a que las esporas haploides, que de manera normal se dividen de forma multicelular para formar los gametofitos, fallan en la regulación del arresto mitótico, sufriendo una excesiva proliferación celular y perdiendo el control de la gametogénesis (Ebel *et al.*, 2004). Por esta razón los análisis que se han hecho hasta ahora para estudiar la función de este gen, han sido mediante diferentes técnicas para silenciar a *RBR*, como silenciamiento inducido viralmente, inactivación mediante proteínas

virales o por RNA's de interferencia (Desvoyes *et al.*, 2006, Wildwater, *et al.*, 2005, Park *et al.*, 2005). Por medio de estas técnicas, se ha encontrado que, dependiendo de la etapa del desarrollo en el que se encuentre la planta, el silenciamiento condicional de *RBR* induce la activación de los ciclos mitótico y de endoreduplicación (Desvoyes *et al.*, 2006) y un retraso en la diferenciación (Park *et al.*, 2005). Por otro lado, la sobreexpresión de *RBR* tiene el efecto opuesto y reprime tanto a la proliferación celular como a la endoreduplicación (Desvoyes *et al.*, 2006; Desvoyes *et al.*, 2013).

Recientemente se está describiendo una red compleja de regulación genética de la coordinación entre proliferación y salida del ciclo celular hacia la diferenciación donde *RBR* se está posicionado en el entrecruzamiento de esta red, ya que está emergiendo como un regulador maestro de una gran variedad de procesos celulares (Desvoyes *et al.*, 2013). A pesar de que se comparten muchos de los mecanismos y genes del ciclo celular entre plantas y animales, la mayoría de los procesos son mejor conocidos en animales y hace falta profundizar en los mecanismos de regulación que se están llevando a cabo en plantas a través de *RBR*.

Dentro de la red de animales que se ha descrito entre proliferación y diferenciación, en conjunto con pRb se han descrito otros componentes clave, como factores de transcripción tipo bHLH y tipo MADS-box, a su vez conservados en plantas, los cuales describiremos más adelante, junto con las interacciones que tienen para formar la red de regulación.

4. Otros componentes de proliferación y diferenciación celular

4.1 Factores de transcripción bHLH

Un componente conservado es del tipo de los factores de transcripción tipo bHLH (Hélice-bucle-Hélice básica, por sus siglas en inglés basic Helix-Loop-Helix) los cuales se encuentran en todos los eucariontes, se agrupan por su dominio bHLH y están involucrados en muchos procesos reguladores que van desde la neurogénesis en mamíferos hasta las respuestas ambientales en plantas (Sailsbery y Dean, 2012). El dominio bHLH está conformado por alrededor de 60 aminoácidos, mientras que el dominio de unión al DNA, localizado en el extremo N-terminal, está compuesto de aproximadamente 13 aminoácidos. Las dos alfa hélices de este FT contienen 15 aminoácidos separados por un bucle variable en longitud,

esta estructura le permite a la proteína unirse a otras alfa hélices formando homodímeros y heterodímeros que estabilizan la interacción con el DNA y promueven la transcripción (Sailsbery y Dean, 2012). Un ejemplo de esto, es que varios miembros de esta familia regulan la miogénesis mediante la heterodimerización de ciertos bHLHs con otros factores bHLH que se expresan de manera ubicua, conocidos como proteínas E, y que se unen al DNA en la secuencia consenso CANNTG, conocida como caja E (Black *et al.*, 1998; Wang y Baker, 2015).

A través de un análisis comparativo filogenético de las secuencias de bHLHs de diferentes especies: humano (*Homo sapiens*), rata (*Rattus norvegicus*), ratón (*Mus musculus*), *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y Arabidopsis; se han clasificado recientemente a los bHLHs en seis clados (Stevens *et al.*, 2008). En clasificaciones anteriores se les agrupaban en siete clados diferentes ya que el análisis se hacía basándose únicamente en comparaciones de funcionalidad y en el dominio bHLH de unión al DNA (Ledent y Vervoort, 2001; Skinner *et al.*, 2010). La clasificación de Stevens y colaboradores (2008) considera la secuencia completa y esto le permite que la comparación sea más robusta.

4.1.1 Familia MRF de bHLHs

Dentro de los FT tipo bHLH, MyoD es necesario en la diferenciación muscular y forma parte del clado C de la familia de FT bHLH y del subclado conocido como MRF (factores reguladores de la miogénesis) compuesto por *MyoD*, *Myf5*, *MRF4* y *Myog* (Singh y Dilworth, 2013; Skinner *et al.*, 2010; Sartorelli y Caretti, 2005). Se ha propuesto que los genes de la miogénesis (MRF's) evolucionaron de un gen ancestral de MRF el cual pasó por dos eventos de duplicación génica y de subsecuentes mutaciones divergentes. Durante la segunda duplicación, un linaje dio origen a *MyoD* y *Myf5* que presentan un dominio característico MYF5 en el extremo carboxilo terminal de la proteína, mientras que el otro linaje dio origen a *Myog* y *MRF4* donde no está presente este dominio (Singh y Dilworth, 2013; Zhao *et al.*, 2014).

El genoma de los vertebrados en general contiene los cuatro genes MRF, mientras que el genoma de tres invertebrados, *Caenorhabditis elegans*, *Anthocidaris crassispina* y *Drosophila melanogaster*, sólo contienen un gen MRF (Zhao *et al.*, 2014). Debido a su

origen, estos cuatro genes (*MyoD*, *Myf5*, *MRF4* y *Myog*) tienen cierta redundancia funcional, aunque no son completamente intercambiables ya que su función se encuentra establecida de una manera jerárquica y se expresan diferencialmente en distintos momentos del desarrollo (Rescan, 2001; Singh y Dilworth, 2013). *MyoD* y *Myf5* se encuentran presentes en mioblastos indiferenciados, aunque no activan la transcripción; sin embargo, cuando se transducen las señales extracelulares para la diferenciación celular, *MyoD* y *Myf5* se vuelven transcripcionalmente competentes y activan el programa miogénico (Rescan, 2001; Sartorelli y Caretti, 2005). Por otro lado, *Myog* junto con *MRF4*, están mayormente asociados con la diferenciación terminal y la homeóstasis de la miofibra. En este proceso de desarrollo, *MyoD* regula positivamente la expresión de *Myog*, que a su vez regula de manera negativa la expresión de *Myf5*, deteniendo la proliferación celular de los mioblastos mientras que *MRF4* es regulado positivamente por *MyoD* y *Myog* (Singh y Dilworth, 2013). Como se puede apreciar en este ejemplo, hay una jerarquía que ayuda a que la transcripción no sea activada prematuramente en células indiferenciadas (Sartorelli y Caretti, 2005), este mecanismo podría estar funcionando en otros procesos de desarrollo.

4.1.2 MRFs en proliferación celular

Adicionalmente, se ha demostrado que los factores de transcripción MRF no sólo participan en la diferenciación celular, sino que se ha encontrado que las mutantes de *MyoD* y *Myf5* presentan también defectos en la proliferación celular y en la expresión de factores del ciclo celular. Además, la expresión y la concentración de las proteínas de *MyoD* y *Myf5* es regulada durante las diferentes etapas del ciclo celular (Singh y Dilworth, 2013); por ejemplo, *MyoD* puede ser fosforilada por el complejo CDK/CYCB y esta fosforilación es capaz de reprimir su actividad transcripcional durante la mitosis. Esto es importante ya que se ha visto que esta proteína regula la progresión del ciclo celular y que, en mutantes de pérdida de función, el ciclo celular se detiene (Parker *et al.*, 2012). Finalmente, se ha visto que el factor determinante para pasar de la proliferación a la diferenciación, es la expresión de *MyoG* ya que este gen regula factores determinantes para detener el ciclo celular y potenciar la diferenciación (Singh y Dilworth, 2013).

De manera muy interesante, en el clado C del árbol filogenético de los bHLH's, en donde se encuentran clasificados los MRFs, también se encuentran muchos otros bHLHs

pertenecientes a plantas que se ha visto se encuentran involucrados en diversos procesos como es en la respuesta a hormonas vegetales (Brasinoesteroides), diferenciación de estomas, tolerancia al frío, desarrollo de frutos, etc. (Chandler *et al.*, 2009; Kanaoka, *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2015; Reymond *et al.*, 2012). Por otro lado, también se han descrito muchos otros bHLHs de plantas que solo se encuentran en plantas y se cree que la diversidad génica de esta familia ocurrió después de la diversificación de eucariontes (Stevens *et al.*, 2008; Skinner *et al.*, 2010), en particular a nosotros nos interesan los genes que puedan estar tanto en plantas como en animales, posiblemente formando parte de una misma red de regulación de la proliferación y diferenciación celular.

4.2 Factores de transcripción MADS-box

Otro componente conservado son los FT de la familia MADS-box que ha sido identificada por la similitud de su secuencia primaria entre numerosas proteínas de diversos tipos de organismos eucariontes, incluyendo levaduras, plantas, insectos, anfibios y mamíferos. El dominio MADS es un motivo conservado en el dominio de unión a DNA de estas proteínas; su nombre hace referencia a los cuatro miembros encontrados originalmente: *MCM1* de *Saccharomyces cerevisiae*, *AG* de *Arabidopsis*, *DEFA* de *Antirrhinum majus* y *SRF* de humanos (Shore y Sharrocks, 1995). Estos factores de transcripción parecen ser específicos de eucariontes ya que nunca se han identificado ni en bacterias ni en archeobacterias (Gramzow *et al.*, 2010).

El dominio MADS, presente en todos los genes que pertenecen a esta familia, es el encargado de unirse al DNA en forma de homo o heterodímero, donde la interacción heterodimérica usualmente ocurre con otra proteína MADS. Los dímeros de estos factores de transcripción se unen a cajas CArG, que son secuencias consenso 5'-CC[A/T]₆GG-3', o con alguna variante ligera (de Folter y Angenent, 2006). Las cajas CArG son muy comunes en los genomas, debido a que son pequeñas y variables por lo que la predicción de genes blanco basándose únicamente en estos motivos, no es confiable (Gramzow y Theissen, 2010).

Se ha visto que, una duplicación ancestral dio como resultado dos linajes dentro de esta familia de factores transcripcionales que se encuentran tanto en hongos como en plantas y animales (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000 a). En las proteínas MADS box del tipo II (tipo MEF), el dominio MADS está localizada en el extremo N-terminal mientras que en las proteínas

MADS box tipo I (tipo SRF) el dominio MADS está localizada más hacia el centro resultando en una proteína con un dominio N-terminal más largo (Shore y Sharrocks, 1995; Álvarez-Buylla *et al.*, 2000a). De manera interesante, los dos linajes regulan genes diferencialmente y esto necesariamente se debe a las diferentes proteínas con las cuales interactúan (Gramzow *et al.*, 2010).

Las proteínas MADS están involucradas en un diverso rango de actividades biológicas, como el desarrollo de células musculares en humanos, *Drosophila* y *Xenopus*, la producción de feromonas en levaduras, el desarrollo de los órganos florales en plantas y en todos los procesos de desarrollo que se han estudiado en *Arabidopsis* (Shore y Sharrocks, 1995; Álvarez-Buylla *et al.*, 2000 a y b).

4.2.1 MEF2 de humanos

MEF2 pertenece a la familia de factores de transcripción tipo MADS-box y está constituido por cuatro factores transcripcionales en humanos (*Mef2a, b, c, d*) (Potthoff y Olson, 2007). Se ha visto que, en estas cuatro proteínas, los primeros 86 amino ácidos comprenden al dominio MADS y el resto de la proteína al dominio adyacente nombrado como MEF2; ambos dominios están altamente conservados y definen a la subclase de genes MADS-box tipo MEF2 o tipo II. Estos dos dominios, están involucrados en mediar la dimerización de las proteínas y su unión al DNA en la caja CArG (como homo- o heterodímeros) (de Folter y Angenent, 2006; Gramzow y Theissen, 2010).

MEF2C se expresa desde etapas tempranas del desarrollo y se ha visto que está involucrado en la proliferación celular regulando genes relacionados al ciclo celular probablemente a través de la regulación que tiene MEF2C sobre *c-jun*. Este último gen, es un FT que regula de manera positiva el ciclo celular (McKinsey *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2003; Estella *et al.*, 2014; Schwabe *et al.*, 2003), y que interactúa con la proteína de MyoD inactivando su actividad en la proliferación (Kitzmann y Fernandez, 2001). Por otro lado, se ha visto que la proteína de MEF2C es degradada durante la mitosis a través del complejo APC/C (Complejo Promotor de la Anafase) y se ha demostrado que es necesaria esta degradación para que sea posible una eficiente progresión del ciclo celular en la transición de fase G2/M durante la miogénesis (Badodi *et al.*, 2015).

MEF2C sirve como el punto final de múltiples vías de señalización y, a pesar de que está presente en altos niveles en etapas tempranas del desarrollo, no se une a los enhancers de los genes de diferenciación hasta etapas más tardías (Potthoff y Olson, 2007). *MEF2C* participa principalmente en procesos de diferenciación de músculo y las cajas CARG están presentes en casi todos los genes músculo-específicos (Black *et al.*, 1998). Finalmente, se sabe que durante el proceso de diferenciación de miocitos, MEF2 interactúa a nivel de proteínas con remodeladores de cromatina; principalmente con desacetilasas de histonas (HDAC's) tipo II (Sartorelli y Caretti, 2005; Canté-Barrett *et al.*, 2014). Estas desacetilasas se pueden unir al dominio MAD-box como parte de complejos multiprotéicos que funcionan como represores de su actividad transcripcional (Potthoff y Olson, 2007) y a su vez se encuentran regulados por una retroalimentación negativa ya que el mismo *MEF2C* es un regulador transcripcional directo de una de las HDACs tipo II que lo reprime (HDAC9) (Haberland *et al.*, 2007).

Se ha visto que *MEF2C* no es un FT exclusivo de músculo ya que también se expresa en procesos de desarrollo de otros tipos celulares como neuronas y condrocitos (Potthoff y Olson, 2007). Además, se está estudiando su fuerte relación con pRb en los procesos de desarrollo para pasar de proliferación a diferenciación celular (De Falco *et al.*, 2006) y en la transición de células normales a células malignas en tumores de mama a través de análisis de coexpresión, donde MEF2C es uno de los genes cuya expresión cambia significativamente entre tejido tumoral y tejido sano (Baca-López *et al.*, 2012), y mediante estos análisis de microarreglos se observó que se coexpresa con *RB*, lo cual abre la posibilidad de que lo pueda regular transcripcionalmente o se encuentren participando en una misma red de manera muy cercana (Comunicación directa del Dr. Enrique Hernández Lemus).

4.2.2 MADS-box en plantas

En plantas, los factores de transcripción MADS-box participan en diversos procesos morfogénéticos y se han duplicado hasta llegar a constituir una familia de 107 miembros en *Arabidopsis*. En contraste, sólo unos pocos genes MADS-box están presentes en animales y hongos: dos en *Drosophila melanogaster*, cinco en humanos y dos en *Saccharomyces cerevisiae*. En estos organismos, estos genes participan en procesos importantes como son la

proliferación y diferenciación celular, y la respuesta de la levadura a feromonas (Gramzow *et al.*, 2010). En plantas, estos factores de transcripción son particularmente importantes ya que participan en el desarrollo de las estructuras vegetativas y reproductivas de un gran número de plantas (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000b). Los genes MADS box tipo II son los que han sido más estudiados en plantas y en ellos se denominan MIKC ya que, a diferencia de otros organismos, los MADS-box tipo II de plantas tienen el dominio de unión al DNA tipo MEF2 (M) característico de la familia más otros tres dominios: un dominio I importante para la formación de dímeros de unión al DNA y la interacción entre proteínas; el dominio K, que conserva características estructurales secundarias tales como la capacidad de formar una serie de α -hélices anfipáticas que les permiten tener interacciones con otras proteínas (Yang y Jack, 2004, Kaufmann *et al.*, 2004) y el dominio C localizado en el extremo C-terminal el cual está involucrado en la activación transcripcional y en la formación de estructuras cuaternarias; cabe mencionar que este último, es el dominio menos conservado (Egea and Cortines, 1999; Becker y Theissen, 2003).

Debido a la alta cantidad de genes MADS box encontrados en plantas y su importancia en el desarrollo durante todo su ciclo de vida, se ha puesto gran interés en su estudio.

5. Relación: Retinoblastoma, MyoD y MEF2C.

Sobre lo que se sabe de la interacción de estos componentes en el proceso de regulación proliferación/diferenciación en animales es que la transcripción de los genes necesarios para que se lleve a cabo la diferenciación muscular requiere de la unión de MyoD a la caja E de sus genes blanco y el consecuente reclutamiento de acetil transferasas de histonas (HAT's), complejos remodeladores de la cromatina (SWI/SNF) y cinasas activadoras de la polimerasa II. Por otro lado, MyoD junto con la función de pRb, se requieren para apagar la maquinaria del ciclo celular (De Falco *et al.*, 2006). De manera interesante, se ha visto que MyoD activa la expresión de *RB*, aunque no se sabe si es de manera directa (Figura 3; De Santa *et al.*, 2007), pero si que lo hace a través de un complejo proteico (Magenta *et al.*, 2003), y se plantea que, teóricamente por análisis de datos de ENCODE (Encyclopedia Of DNA Elements), MyoD se podría unir al promotor y a los enhancers intrónicos del gen de *RB* (Singh y Dilworth, 2013).

La inducción de la biogénesis de músculo también requiere de la regulación de las ciclinas y de los CKI's, como p21 (De Falco *et al.*, 2006). En este proceso, la represión estable de la ciclina D1 es requerida para el arresto del ciclo celular, y para que esto ocurra se ha visto que tanto MyoD, como pRb son necesarios y dependientes, pero no actúan de manera directa, sino a través de la regulación de un gen intermediario llamado *Fra-1* (por sus siglas en inglés FOS-related antigen 1) (Rajabi *et al.*, 2014). Por otro lado, y de manera antagónica, la ciclina D1 inhibe la actividad transcripcional de MyoD (Rajabi *et al.*, 2014) ya que la sobreexpresión de la ciclina D provoca la acumulación nuclear de una CDK que se une al dominio C-terminal de la proteína de MyoD previniendo su unión al DNA y, a su vez la consecuente fosforilación de pRb (De Falco *et al.*, 2006).

Se han reportado estudios que demuestran que, durante la miogénesis, hay una relación transcripcional entre MyoD y pRb; por ejemplo, la expresión de pRb es capaz de regular la actividad transcripcional de MyoD para la inducción de genes de diferenciación, pero, esta regulación, no se da a través de una interacción directa entre estas dos proteínas (Figura 3; De Falco *et al.*, 2006; Smialowski *et al.*, 2005). Se ha postulado que esta regulación de MyoD se puede llevar a cabo a través de la interacción que tienen las HDAC I con pRb ya que estas desacetilasas reprimen la función transcripcional de MyoD y, cuando no están disponibles debido a que pueden estar unidas a pRb, dejan de reprimir a MyoD permitiendo que se una al DNA y lleve a cabo su función (Figura 3; Puri *et al.*, 2001).

Una de las actividades de MyoD en la regulación de la diferenciación de músculo, es regular la expresión del FT *MEF2C* al unirse a una caja E en la región reguladora de la expresión de *MEF2C* (Figura 3; Wang *et al.*, 2001). Por otro lado, se sabe que *MEF2C* autoregula su transcripción ya que existe un sitio de unión de este gen al cual se une su propia proteína (Figura 3; Wang *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado que la activación de *MEF2C* ocurre mediante la remoción de HDAC's tipo II que están unidas a la proteína *MEF2C* mediante interacciones proteína-proteína (Sartorelli y Caretti, 2005, Canté-Barrett *et al.*, 2014). Adicionalmente, para que se lleve a cabo la activación transcripcional de *MEF2C*, es necesaria la presencia de pRb, pero se desconoce su mecanismo exacto de regulación (De Falco *et al.*, 2006). *MEF2C* actúa como un regulador central de la miogénesis ya que regula la expresión de numerosos genes de músculo y de factores transcripcionales que participan

en otros procesos (Potthoff y Olson, 2007).

La expresión de *MyoD* es regulada tanto por el factor de respuesta a suero (SRF; por sus siglas en inglés de Serum Response Factor) como por el mismo MEF2C, ambas proteínas pertenecientes a la familia de los factores transcripcionales MADS-box (L'Honore *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2001). Esto crea un asa de regulación transcripcional positiva cuando se lleva a cabo el proceso de diferenciación celular. Además, MEF2C tiene función de coactivador/potenciador del complejo transcripcional formado por las proteínas MyoD/proteína E (Figura 3; Canté-Barrett *et al.*, 2014) ya que se ha demostrado que, en mutantes del sitio de unión de este FT, se ve comprometido el desarrollo del músculo (Wang *et al.*, 2001). el papel que juega *Rb* con *MEF2C* en desarrollo de músculo, lo hace a través del FT tipo bHLH: *MyoD*.

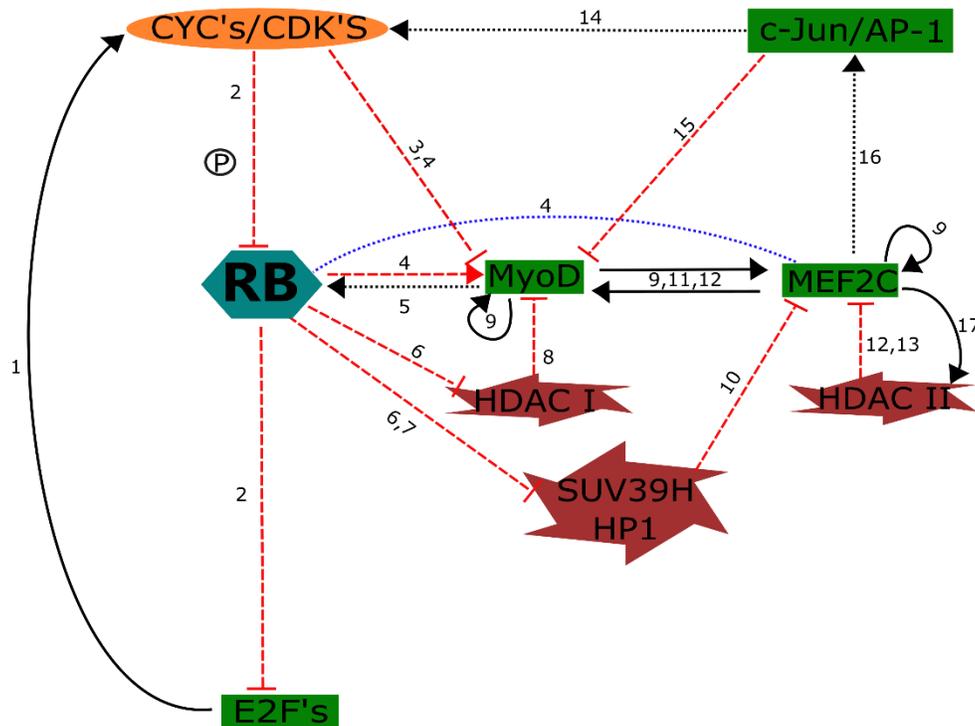


Figura 3. Interacciones entre algunos de los componentes del ciclo celular y la diferenciación celular en animales. Las líneas negras representan regulación transcripcional, las líneas punteadas indican que no se ha demostrado si la regulación es

directa, las líneas rojas representan regulación proteína-proteína y la línea azul representa un tipo de regulación no identificada pero que se sabe que existe y es necesaria. Los elementos color verde = factores de transcripción, naranja = ciclinas/CDK, vino = remodeladores de la cromatina, azul = Retinoblastoma. [(1) Wong *et al.*, 2011; (2) Budirahardja y Gönczy, 2009; (3) Rajab *et al.*, 2014; (4) De Falco *et al.*, 2006; (5) Singh y Dilworth, 2013; (6) Talluri y Dick, 2012; (7) Siddiqui *et al.*, 2007; (8) Puri *et al.*, 2001; (9) Wang *et al.*, 2001; (10) Sincennes *et al.*, 2016; (11) Novitch *et al.*, 1999; (12) Canté-Barrett *et al.*, 2014; (13) Zhang *et al.*, 2002; (14) Schwabe *et al.*, 2003; (15) Kitzmann y Fernandez, 2001; (16) Wei *et al.*, 2003; (17) Potthoff y Olson, 2007]

Como se puede ver en animales, se han estudiado ampliamente los componentes que participan en la proliferación y la diferenciación celular y se ha demostrado que la mayoría de estos componentes en realidad están involucrados en ambos procesos al mismo tiempo, seguramente formando parte de un sistema dinámico o red de regulación, que convergen en estados de equilibrio, como la proliferación o diferenciación, convirtiéndolo en una red multiestable, compuesta por los diversos elementos mencionados. Pero en plantas apenas se están empezando a conocer diferentes factores involucrados en la proliferación y diferenciación celular; de manera interesante las plantas también tienen muchos de los componentes que se encuentran involucrados en estos procesos en animales, como la proteína de pRb, componentes del ciclo celular y factores de transcripción tipo MADS-box y bHLHs; de algunos de estos componentes ya se conocen algunas funciones en el desarrollo, como de *RBR* y de algunos genes MADS-box (que se describirán más adelante), por lo que sería interesante saber si también se encuentran en una misma red de regulación y si existen otros componentes candidatos en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*, como la posible participación de un FT tipo bHLH en plantas, que participe junto con un MADS-box y *RBR*.

ANTECEDENTES

En la raíz de *Arabidopsis*, las alteraciones que se presentan por perturbar la cantidad de proteína de *RBR* dan como resultado características que convergen con el control del ciclo celular. Por ejemplo, se ha demostrado que en ocasiones el silenciamiento de *RBR* puede generar raíces más largas, con meristemos más grandes, mientras que la SE da origen a raíces más cortas y meristemos más pequeños, lo cual lo atribuyen a un cambio en el tamaño del

domio de transición, en donde *ARR12*, que es parte del módulo de señalización por citocinina la cual está involucrado en la diferenciación celular, es requerido junto con *RBR* para activar la transcripción de *ARF19*, involucrado en promover la diferenciación celular (Perilli *et al.*, 2013), aunque otros estudios sugieren que no hay cambios significativos en el tamaño del meristemo con respecto a las líneas silvestres (Wildwater *et al.*, 2005). Por otro lado, también se ha analizado el papel de *RBR* en el meristemo apical aéreo, donde las plantas con disminución de su expresión resultan en la pérdida completa de la estructura meristemática (Borghi *et al.*, 2010) y las plantas de sobreexpresión de *RBR* aceleran la diferenciación del meristemo aéreo disminuyendo la expresión de genes que solamente se expresan en el SAM y aumentando la expresión de genes involucrados en vías del metabolismo que no se expresan en el meristemo (Wyrzykowska, *et al.*, 2006).

El silenciamiento de *RBR* provoca un desarreglo en el nicho de células troncales de la raíz, alteraciones en la división celular asimétrica y un aumento en el número de células iniciales de columela, al tener más divisiones de células indiferenciadas ectópicamente mientras que su sobreexpresión hace que las células iniciales de columela se diferencien prematuramente (Wildwater *et al.*, 2005; Dinney y Benfey, 2005). Para mantener el nicho de células troncales se ha visto que es necesaria la participación de dos factores de transcripción de plantas de la familia GRAS: *SHORTROOT (SHR)* y *SCARECROW (SCR)*. Recientemente se ha reportado que *SCR* interactúa con *RBR* a través del motivo canónico LXCXE, a su vez, *SHR* y *SCR* son reguladores de la expresión de ciclinas como *CYCD6;1*, por lo que *RBR* debe de estar involucrado en el control del ciclo celular en el nicho de células troncales (Cruz-Ramírez, *et al.*, 2012; Cruz-Ramírez, *et al.*, 2013; Desvoyes *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que varios genes tipo MADS-box, del mismo linaje de *MEF2*, nombrados como MADS-box tipo II (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000a), juegan un papel fundamental en el desarrollo de la raíz (Burgeff *et al.*, 2002; Garay-Arroyo *et al.*, 2013; García-Cruz *et al.*, 2016; Gan *et al.*, 2005; Tapia-López *et al.*, 2008). Uno de ellos, *XAANTAL1 (XAL1/AGL12)*, presenta altos niveles de expresión en la raíz de *Arabidopsis* (Tapia-López *et al.*, 2008; García-Cruz *et al.*, 2016). Las líneas mutantes de pérdida de función de *XAL1* tienen raíces más cortas con células troncales alteradas, un ciclo celular más largo (Tapia-López *et al.*, 2008) y un proceso de endoreduplicación y diferenciación celular prematura (García-Cruz *et al.*

al., 2016).

En contraste, las líneas de SE de este gen presentan raíces más largas que la planta silvestre y poseen proliferaciones alteradas (parecidas a tumores) cerca del nicho de células troncales (García-Cruz *et al.*, 2016), fenotipo similar a los mutantes de pérdida de función de *RBR* (Wildwater *et al.*, 2005; Cruz- Ramírez, *et al.*, 2012; Cruz- Ramírez, *et al.*, 2013). En conjunto esto demuestra que *XAL1* está involucrado en el control de la proliferación celular, la transición a la endoreduplicación y la diferenciación celular.

También se ha demostrado que la expresión de *XAL1* es inducida por auxinas que es una hormona involucrada en el control del desarrollo de la planta, específicamente promueve la elongación celular, la proliferación y la diferenciación celular (Tapia-López *et al.*, 2008). Además, en experimentos de doble híbrido llevados a cabo en nuestro laboratorio, se vió que *XAL1* interactúa con una HDAC tipo II (HDAC15) (Dra. Ana Paola Rojas Meza trabajo de posdoctorado) al igual que lo hace *MEF2C* (Canté-Barrett *et al.*, 2014). Por otro lado. en maíz (*Zea mays*) existe un HDAC tipo I capaz de interactuar con la proteína de *RBR*, aunque no a través del dominio LXCXE (Rossi *et al.*, 2003).

Finalmente, los antecedentes en animales han demostrado que el papel que juega *Rb* con *MEF2C* en desarrollo de músculo, lo hace a través del FT tipo bHLH: *MyoD*, por lo que sería interesante estudiar la posible participación de un FT tipo bHLH en plantas, que participe junto con *XAL1* y *RBR*.

Debido a los papeles que juegan *RBR* y *XAL1* en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis* y a los antecedentes que se tienen de la relación de pRb con un FT MADS-box tipo II en animales (*MEF2*), se propone que *RBR* y *XAL1* de plantas tienen un papel en conjunto muy similar al de animales y están involucrados en una red multiestable que coordina las decisiones entre proliferación y diferenciación celular.

HIPÓTESIS

XAANTALI junto con *RBR*, son parte de la red multiestable que, durante el ciclo celular, participa en las decisiones entre proliferación y diferenciación en la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de *XALI* en conjunto con *RBR* durante la proliferación celular y la diferenciación celular en la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Estudiar, por medio de qRT-PCR, si *XALI* regula la expresión de *RBR* y si *RBR* regula la expresión de *XALI* de acuerdo a como lo hace en la diferenciación celular en mamíferos y con los datos de coexpresión de microarreglos.
- 2) Determinar la participación de los genes *XALI* y *RBR* en las diferentes zonas de desarrollo de la raíz primaria (nicho de células troncales, meristemo, zona de elongación y zona de diferenciación) analizando el fenotipo de las cruces de las plantas mutantes a lo largo de la raíz.
- 3) Analizar la expresión de *RBR* y *XALI* a lo largo del eje apico-basal de la raíz de *Arabidopsis thaliana* para ver si su participación está involucrada de manera conjunta en el control de la proliferación y la diferenciación celular.
- 4) Buscar algún factor conocido en plantas que tenga un mecanismo parecido al de MyoD en animales, que se encuentre involucrado entre la regulación de *RBR* y *XALI* como ocurre en animales entre pRb y MEF2C.

METODOLOGÍA

Material vegetal

Se usaron la línea de pérdida de función de *XAL1* (*xal1-2*), las cuales no son de expresión nula, pero contienen una inserción de T-DNA en el segundo intrón que hace que los niveles de transcrito sean muy bajos (Tapia-López *et al.*, 2008) y de sobreexpresión (35S::*AGL12*) (García-Cruz *et al.*, 2016) (Tabla 1) cuyas semillas fueron proporcionadas por integrantes del Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas. También se utilizó la línea de pérdida de función por silenciamiento a través de un micro RNA 35SamiGO RBR (artificial microRNA for Gene-silencing Overcome) (Tabla 1; Cruz-Ramírez *et al.*, 2013) y proporcionada por el mismo laboratorio. Las líneas reporteras utilizadas de *AGL12-GUS* fueron las utilizadas en Tapia-López *et al.*, (2008) y las reporteras para RBR (pRBR::gRBR-GFP) utilizadas y proporcionadas por Magyar y colaboradores (2012) (Tabla 1). Todas estas líneas se encuentran en el ecotipo Columbia.

Línea	Características	Fenotipo	Origen/Referencia
<i>xal1-2</i>	Inserción de T-DNA en segundo intrón.	Raíces cortas	Tapia-López <i>et al.</i> , 2008
35S:: <i>AGL12</i>	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor fusionado a promotor de <i>XAL1/AGL12</i> . Ecotipo Columbia.	Desarreglo NCT. Raíces igual que las silvestres.	García-Cruz <i>et al.</i> , 2016
35SamiGO RBR	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor fusionado a un micro RNA contra mRNA de <i>RBR</i> . Ecotipo Columbia.	Alta proliferación en NCT. Meristemo de raíz en ocasiones más grandes que plantas silvestres.	Cruz-Ramírez <i>et al.</i> , 2013

<i>AGL12-GUS</i>	Promotor de <i>XAL1/AGL12</i> fusionado a gen reportero de β -glucoronidasa (GUS) (transcripcional). Ecotipo Columbia.	Tinción azul en cilindro vascular.	Tapia-López <i>et al.</i> , 2008
<i>pRBR::gRBR-GFP</i>	Promotor y gen de <i>RBR</i> fusionado al gen de la proteína verde fluorescente (traduccional). Ecotipo Columbia.	Emisión de color verde en núcleos celulares.	Magyar, <i>et al.</i> , 2012
<i>xal1-2/35SamiGO RBR</i>	Cruza de mutantes de baja expresión de <i>XAL1</i> y <i>RBR</i> . Ecotipo Columbia.	Raíces de longitud intermedia entre las parentales y más cortas que las silvestres. Desarreglos en NCT.	Este trabajo
<i>xal1-2/ pRBR::gRBR-GFP</i>	Cruza de mutante de <i>XAL1</i> con reportero traduccional de <i>RBR</i> . Ecotipo Columbia.	Raíces cortas con emisión de color verde en núcleos celulares.	Este trabajo
<i>AGL12-GUS/ 35SamiGO RBR</i>	Cruza de mutante de <i>RBR</i> con reportero transcripcional de <i>XAL1</i> . Ecotipo Columbia.	Desarreglo en NCT y tinción azul en cilindro vascular.	Este trabajo

Tabla 1. Lista de plantas utilizadas en este trabajo y sus características.

Condiciones de crecimiento y esterilización

Para esterilizar y estratificar a las semillas se siguió el siguiente protocolo: resuspenderlas y agitarlas en etanol al 100% por 5 minutos, decantar y pasar las semillas a una solución de SDS al 1% con cloro al 5% por 13 minutos (en agitación) y finalmente, dar 4 lavados de agua estéril. Posteriormente, las semillas se estratificaron en agua estéril a 4°C por un mínimo de 48 horas (Munir *et al.*, 2001). Todas las semillas se sembraron en cajas Petri cuadradas con medio MS 0.2X (MS Gibco BRL, Murashige y Skoog, 1962), 1% de sacarosa y 1% de agar. Las semillas se sembraron en una orilla de las cajas y éstas se colocaron de manera vertical en cuartos de crecimiento con fotoperiodo de DL (Día Largo) de 16 horas de luz (iluminación $110 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) y 8 horas de oscuridad a una temperatura constante de 22°C (Tapia-López, *et al.*, 2008 y comunicación personal con Dra. Adriana Garay Arroyo).

Para las pruebas posteriores acerca de la participación de jasmonato se usó medio con inhibidor de jasmonato, donde se preparó una solución 1mM de ácido salicil hidroxámico (SHAM Sigma Aldrich) diluido en DMSO, a partir del cual se tomó la concentración necesaria para preparar medios con 0.5, 1, 2, 5, 10, 50, 100 y 250 μM y se añadió a medio MS 0.2X antes de solidificar. Como control se preparó medio con la máxima cantidad de DMSO añadida a los otros medios, pero sin SHAM.

Para la obtención de las semillas y del tejido vegetal, las plantas se transplantaron a una mezcla de sustrato comercial (SunGRO Metro-mix 200, Scotts Inc.) y agrolita (1:1) y se mantuvieron en cuartos con ambiente controlado con las condiciones de temperatura, intensidad luminosa y fotoperiodo descrito anteriormente.

Generación de cruza

Para poder llevar a cabo cualquier cruza se tienen que utilizar plantas homocigotas y decidir cuál de las plantas es la que va a donar el polen de las flores y funcionar como la parte masculina y cuál va a funcionar como la parte femenina y ser aceptor del polen aplicado sobre el estigma de los carpelos. Para poder llevar a cabo una cruza se tienen que retirar manualmente los sépalos, pétalos y estambres y utilizar botones florales en estadios tempranos del desarrollo para que no haya posibilidades de una previa autofecundación. Las plantas con carpelos polinizados fueron colocadas en las condiciones de crecimiento

mencionadas anteriormente y marcadas para que los frutos ya secos y dehiscentes fueran colectados individualmente. Algunas semillas (de 4 a 8) de esta generación F1 fueron germinadas y las plántulas cultivadas en medio MS 0.2X sólido, como se describió anteriormente. Aproximadamente a los 10 días posteriores a la siembra (dps), las plantas fueron trasplantadas al sustrato para que se autopolinizaran una vez siendo adultas. Todo el proceso se repitió para las siguientes generaciones usando alrededor de 16 semillas. Aproximadamente 20dps las plantas fueron genotipificadas y se seleccionaron aquellas que fueron homocigotas para los alelos de interés.

Cruza	Femenina	Masculina	Ecotipo
<i>xal1-2/35SamiGO RBR</i>	<i>xal1-1</i>	<i>35SamiGO RBR</i>	Columbia
<i>xal1-2/pRBR:gRBR-GFP</i>	<i>xal1-2</i>	<i>pRBR:gRBR-GFP</i>	Columbia
<i>AGL12-GUS/35SamiGO RBR</i>	<i>AGL12-GUS</i>	<i>35SamiGO RBR</i>	Columbia

Tabla 2. Cruzas realizadas con las diversas líneas mutantes y reporteras.

Genotipificación

Para verificar que las plantas con las que estábamos trabajando tuvieran las diferentes construcciones de sobreexpresión, se llevó a cabo la extracción de DNA de las diferentes líneas. Para este proceso se utilizó un protocolo rápido que consiste en utilizar un buffer de extracción (Tris-HCl pH8 200mM, NaCl 250mM, EDTA 25mM, SDS 0.5%); en tejido previamente colectado, congelado y triturado, al sobrenadante se le agrega isopropanol para la precipitación del DNA. Posteriormente con el DNA, se hizo una PCR (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction de la reacción en cadena de la polimerasa) con oligonucleótidos específicos de cada una de las construcciones.

Para la genotipificación con líneas reporteras se utilizaron los métodos de tinción (GUS) y observación al microscopio (GFP) descritas más adelante (ver Microscopía y cuantificación celular).

Cinéticas de crecimiento y análisis de velocidad

Las cinéticas de crecimiento se hicieron sembrando las raíces en medio MS o MS con inhibidor de Jasmonato (SHAM), descritas anteriormente. Se esperó tres días a que las plantas germinaran y se midieron las raíces de cada una de las líneas celulares diario, hasta que las raíces alcanzaran el tamaño de las cajas Petri cuadradas, se promediaron los resultados de cada línea celular y se realizaron los respectivos análisis estadísticos, mencionado más adelante.

Para calcular la velocidad de crecimiento se calculó en relación a los tamaños obtenidos diariamente de las cinéticas de crecimiento utilizando la fórmula $X_n - (X_{n-1})$; siendo X= tamaño por cada día pos-siembra (dpg).

PCR Tiempo real (cuantitativa)

Se extrajo RNA de raíces de 8 días post siembra de tres réplicas biológicas de cada fondo mutante (*xal1-2*, *35S::XAL1*, *35S::amigo RBR*), incluyendo su respectiva WT como control. Se utilizó el kit Quick-RNA™ MiniPrep Kit (Zymo Research) para la extracción de RNA; una vez obtenido el mismo, se midió la cantidad de RNA en un espectrofotómetro y se verificó su integridad en un gel. Para la síntesis de cDNA se usó la enzima transcriptasa reversa de Invitrogen (Superscript II) con 2µg de RNA de cada muestra para hacer dos réplicas técnicas de síntesis. Para hacer la reacción de PCR se utilizó Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher) y se siguieron las sugerencias del fabricante (5 µl) Master Mix, oligonucleótido hacia adelante (0.3µM), oligonucleótido reverso (0.3µM) (Tabla 3), agua libre de RNAasa (2.7µl) y cDNA 2µl (se hicieron 3 réplicas técnicas por cada cDNA).

Para la reacción de amplificación se utilizó el equipo STEP ONE REAL TIME SYSTEM (Applied Biosystems) y se usaron como genes normalizadores PDF2, UPL7 y RNAH (Czechowski *et al.*, 2005) confirmando su estabilidad con geNORM (Vandepoele *et al.*, 2002). Las eficiencias fueron analizadas por el programa Real Time PCR Miner (Zhao y Fernald, 2005) y la expresión relativa se calculó usando el método DDCT con el software

qBase+ (Biogazelle). Todos los oligonucleótidos, cuyas secuencias se encuentran en la Tabla 3, fueron analizados previamente con cDNA silvestre para un ensayo de eficiencia a una concentración de cDNA final de 10ng, y 1ng; cada eficiencia oscila entre los rangos 1.8 y 2.

Los análisis estadísticos se realizaron usando pruebas no paramétricas (Mann-Whitney) comparando WT contra cada una de las líneas transgénicas.

NOMBR E DEL GEN	LOCUS ATG	NOMBRE DEL OLIGONUCLEÓ TIDO	SECUENCIA 5' - 3'
<i>PDF2</i>	AT1G1332 0	PDF2-F1_TR_RC	TAACGTGGCCAAAATGATGC
<i>PDF2</i>	AT1G1332 0	PDF2-R1_TR_RC	GTTCTCCACAACCGCTTGGT
<i>RNAH</i>	AT1G5805 0	RNAH_Y_qF	CCATTCTACTTTTTGGCGGCT
<i>RNAH</i>	AT1G5805 0	RNAH_Y_qR	TCAATGGTAACTGATCCACTC TGATG
<i>UPL7</i>	AT3G5309 0	UPL7-F1_TR_RC	TTCAAATACTTGCAGCCAACC TT
<i>UPL7</i>	AT3G5309 0	UPL7-R1_TR_RC	CCCAAAGAGAGGTATCACAA GAGACT
<i>AGL12</i>	AT1G7169 2	MP-AGL12_qF	CATTGAGGAACAAGGAAGGA GT
<i>AGL12</i>	AT1G7169 2	MP-AGL12_qR	GGCATTGTTAGCGGATAGGA
<i>AGL14</i>	AT4G1188 0	XAL2-Q-F2	GATAATTCACAGCAATCGAA GG
<i>AGL14</i>	AT4G1188 0	XAL2-Q-R2	GGTTCTCCAATTGTTGTAAC T C
<i>AGL19</i>	AT4G2295 0	AGL19_AGR_qF	CCAAGAAGTACCAATTACTCC GTG
<i>AGL19</i>	AT4G2295 0	AGL19_AGR_qR	CCCATTCCAAGCCACTTCTC
<i>AGL17</i>	AT2G2263 0	AGL17_F_TR_MA PE	AGTTTATGAATCCCATGCACA G
<i>AGL17</i>	AT2G2263 0	AGL17_R_TR_MA PE	GCTCTCCGACATGATTACAC
<i>AGL22</i>	AT2G2254 0	AGL22_F1_TR_R C	CGACTAAGGCAAATGAGAGG A
<i>AGL22</i>	AT2G2254 0	AGL22_R1_TR_R C	TTGTTTCAATCACACGCGTC
<i>SOC1</i>	AT2G4566 0	SOC1-Real time F	AGC TGC AGA AAA CGA GAA GCT CTC G

	<i>SOC1</i>	AT2G4566 0	SOC1-Real time R	GGG CTA CTC TCT TCA TCA CCT CTT CC
	<i>RBR</i>	AT3G1228 0.1	RBR_EZ_qF	GTCGCCGTCAAGGGAGAATA GGG
	<i>RBR</i>	AT3G1228 0.1	RBR_EZ_qR	CAGGACCTAGCTCCACCAGC AG
	<i>E2Fa</i>	AT2G3601 0.2	E2Fa_EZ_qF	CAGATGAAGCGGCTGACCAC CC
	<i>E2Fa</i>	AT2G3601 0.2	E2Fa_EZ_qR	CACCACTCCCATTTGTGTCTT CG
	<i>AT4G29100</i>	AT4G2910 0	AT4G29100_EZ_q FW	CGATCCTCTGAGTGTAACAGC TT
	<i>AT4G29100</i>	AT4G2910 0	AT4G29100_EZ_q RV	GTTTCTCCTTTCTCACCTTGAG G
	<i>SPT</i>	AT4G3693 0	SPT_EZ_qFW	AGCTCCCTCTTCCAAGTCAGG TC
	<i>SPT</i>	AT4G3693 0	SPT_EZ_qRV	CTTCTCCTCCTCTTCTCAGAG AG
	<i>EGL3</i>	AT1G6365 0	EGL3_EZ_qFW	CAACATCGGTGAAGGAATCC CCG
	<i>EGL3</i>	AT1G6365 0	EGL3_EZ_qRV	AGTGAAGACTTTGCTATCGGC GG
	<i>ICE2</i>	AT1G1286 0	ICE2_EZ_qFW	ACTCCACAAACGCTGTCTTAC CG
	<i>ICE2</i>	AT1G1286 0	ICE2_EZ_qRV	AACCTCAACTCTTGGTTGTTG GC
	<i>JAM3</i>	AT4G1643 0	JAM3_EZ_qFW	CCAGCAAATGGAAGAGAAGA GGC
	<i>JAM3</i>	AT4G1643 0	JAM3_EZ_qRV	AGATGTTAGGCACCACCGCTC TC
	<i>BIM1</i>	AT5G0813 0	BIM1_EZ_qFW	GTGGGATGAATCTGCTTCTGG GA
	<i>BIM1</i>	AT5G0813 0	BIM1_EZ_qRV	GCTGCAACATCAGCTCTCATG TT
PCR	<i>AGL12</i>	AT1G7169 2		
	<i>AGL12</i>	AT1G7169 2		
	<i>TUB2</i>	AT5G6269 0	TUB2-F for real time	GTT GAG AAT GCT GAT GAG TG
	<i>TUB2</i>	AT5G6269 0	TUB2-R for real time	AGT AGC AGA AAT CAA GTG GT

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la realización de PCRs. Nombre de genes, Locus ATG, nombre de los oligonucleótidos y secuencia de oligonucleótidos en sentido 5'-3'.

Microscopía y cuantificación celular

Para observar las raíces WT, xal1-2, 35SamiGO RBR, y las cruzas xal1-2/35SamiGO RBR (líneas homocigotas: 2.8.4.1.1; 3.2.10 y líneas heterocigotas 2.8.4 y) se usó el protocolo de la tinción de Pseudo Shiff, donde las plantas se fijaron con una solución de alcohol absoluto 50% y ácido acético 10% a 4°C por 24 horas, posteriormente se incubaron con ácido periódico al 1% a 37°C por una hora y se realizó la tinción de las raíces con reactivo de Pseudo Shiff (metabisulfito de sodio 100mM y HCl 0.15N) usando 0.075mg/ml de yoduro de propidio durante 1 hora. A continuación, las plantas se rehidratan con DMSO 2% y glicerol 30% por 48 horas para finalmente montar las raíces en una solución aclarante de yoduro de sodio (NaI 5.6M, Na₂S₂O₃ 8mM, glicerol 65% y DMSO 2%).

Para las plantas con marcador de GUS las raíces fueron fijadas con acetona fría a -20°C por 20 minutos y se les realizaron dos prelavados, primero con una solución I (Buffer fosfatos-Na 50 mM pH 7.2, K₃Fe(CN)₆ 0.5 mM y K₄Fe(Cn)₆ 0.5 mM) a 4°C por 15 minutos y luego un segundo lavado con una solución II (Buffer fosfatos-Na 50 mM pH 7.2, K₃Fe(CN)₆ 0.5 mM, K₄Fe(Cn)₆ 0.5 mM y EDTA 2mM) a temperatura ambiente en vacío por 20min. Después las raíces se pasaron a la solución de GUS (Buffer fosfatos-Na 50 mM pH 7.2, K₃Fe(CN)₆ 0.5 mM, K₄Fe(Cn)₆ 0.5 mM, EDTA 2mM, Tritón x-100 0.5 % y X-Glucuronidasa 1 mM) de 1 a 3 horas a 34°C. Finalmente las plantas se rehidrataron con DMSO 2% y glicerol 30% por 24 horas para finalmente montar las raíces en una solución aclarante de yoduro de sodio (NaI 5.6M, Na₂S₂O₃ 8mM, glicerol 65% y DMSO 2%).

Las preparaciones se visualizaron en un microscopio óptico Olympus bX60 a un aumento de 40X y fueron fotografiadas con una cámara Evolution MP COLOR of Media Cybernetics camera. Éstas mismas raíces también se analizaron mediante microscopía confocal en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, CMN Siglo XXI, IMSS. Los perfiles del tamaño y número celular fueron obtenidos a partir de las micrografías midiendo con una línea recta del inicio de una célula a otra utilizando el programa ImageJ a lo largo del cortex comenzando con la primera célula visible adyacente al centro quiescente.

Las raíces observadas al confocal con marcadores de GFP, fueron montadas en vivo con Yoduro de propidio (1:20) en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, CMN Siglo XXI, IMSS.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron usando pruebas paramétricas (ANOVA) y no paramétricas (Kruskal-Wallis). Las comparaciones múltiples de las líneas celulares se realizaron con la prueba de Dunn o de Tukey. Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism versión 6.07 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sitios de regulación transcripcional por genes MADS y bHLH's (cajas CArG y cajas E)

Respecto a nuestro primer objetivo acerca de ver si *XALI* podría estar regulando la expresión de RBR y de otros componentes (*E2Fa* y *CYCD3;1*) de la red de animales conservados en plantas; y que a su vez que pueda estar siendo regulado por un bHLH, como lo hace MyoD con MEF2C en animales, lo primero que se realizó fue buscar sitios de unión de FT. La búsqueda se realizó a través de la página <http://www.athamap.de/>, la cual provee un mapa de los sitios potenciales de unión de FT y RNA's pequeños de todo el genoma de *Arabidopsis*. Los datos que utiliza el programa se basan en las secuencias de unión de FT publicados y disponibles, por ejemplo, a través de matrices de alineación o de datos que se han comprobado y determinado experimentalmente (Hehl y Bülow, 2014).

Se tomó a través del programa un rango de 1000 pb arriba del inicio de la transcripción de cada gen y 3000 abajo del inicio de la transcripción (que es el máximo que permite usar el programa), para incluir parte de los intrones. En la Figura 4 se pueden ver los sitios de unión de FT; la zona intergénica está marcada con negro, los exones en anaranjado, intrones en morado y en rojo UTR's.

Se buscaron cajas CArG en las secuencias de los genes de *RBR*, *CYCD3;1* y *E2Fa* para saber si existe la posibilidad de que algún FT MADS-box se encuentre regulando a estos genes del desarrollo. En la figura 4, en estos genes los cuadros pequeños olivo indican el sitio donde se encuentran las cajas CArG y el número de cuadros indica similitud de los potenciales sitios de unión para FT MADS-box conocidos. Como se puede ver los tres genes presentan posibles cajas CArG, por lo que sí podrían estar siendo regulados por FT tipo MADS-box.

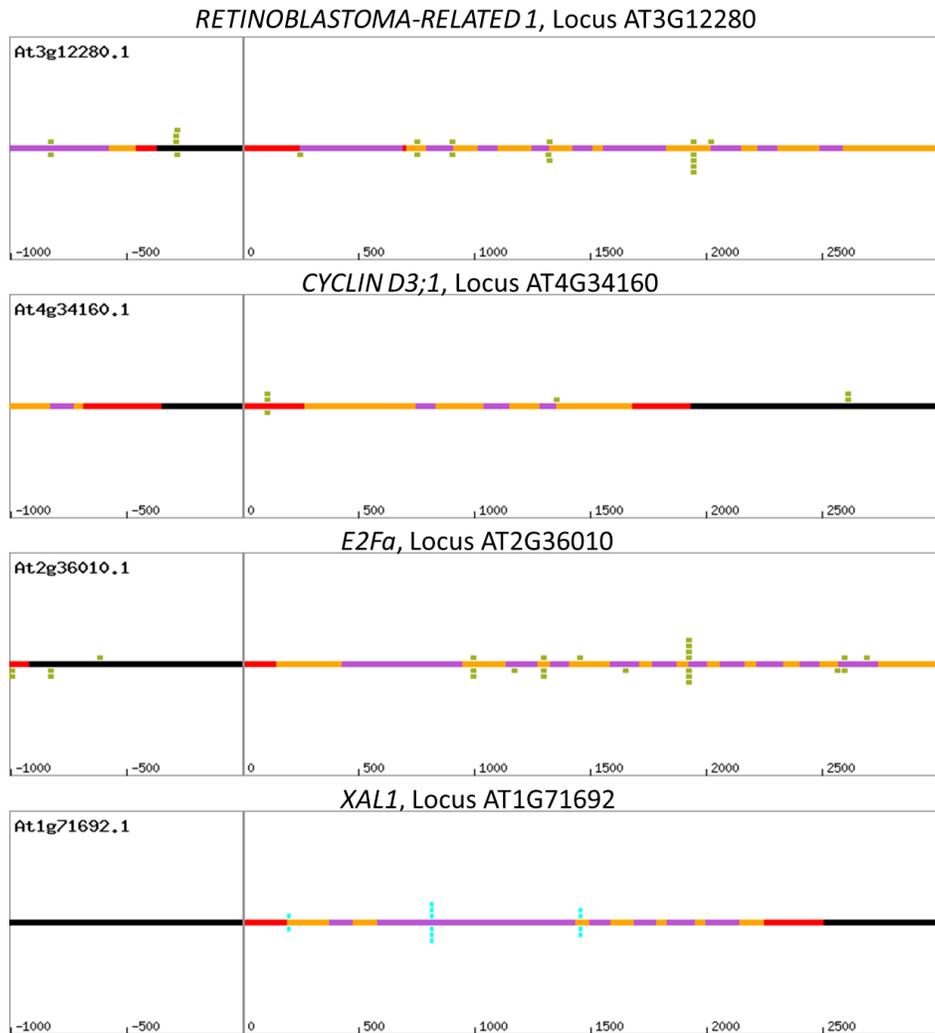


Figura 4: Sitios de unión de factores de transcripción. Representación de los genes *RETINOBLASTOMA-RELATED* (*RBR*), *CICLINA D3;1*, *E2Fa* y *XAL1*, 1000pb antes y 3000pb después del sitio de inicio de la transcripción de cada gen. En recuadros olivo se muestran los posibles sitios de unión de genes MADS-box, cuya secuencia de unión se conoce y los recuadros turquesa son posibles sitios de unión de genes tipo bHLH cuyas secuencias de unión se conocen. Zona intergénica=negro, exones= anaranjado, intrones= morado y UTR's=rojo; línea vertical=sitio de inicio de la transcripción. Resultados obtenidos de <http://www.athamap.de/>.

Por otro lado, y debido a que en animales el FT tipo bHLH (*MyoD*) se encuentra regulando la transcripción del gen *MEF2c*, se buscaron sitios de unión de bHLH's (cajas E) en *XALI*. En la figura 4 los cuadros pequeños turquesa, en la secuencia de *XALI*, indican el sitio donde se encuentran las cajas E. En la secuencia de *XALI* se encontraron tres posibles sitios de unión a FT tipo bHLH's en exones e intrones. Estos resultados no quieren decir que *XALI* esté regulando a estos genes o que sea regulado por algún bHLH pero, debido a que las plantas de pérdida de función de Retinoblastoma (*35SamiGO RBR*) y de SE de *XALI* (*35S::AGLI2*) tienen fenotipos muy parecidos y, a que *XALI* está involucrado en el control del ciclo celular (Tapia-López *et al.*, 2008; García-Cruz *et al.*, 2016) cabe la posibilidad de que desempeñe una función como en animales y participen juntos en una red de regulación genética.

Regulación transcripcional de *RBR* y *XALI*

De acuerdo a la presencia de cajas CArG en la secuencia de *RBR*, y su posible regulación por genes MADS-box, y en relación a los antecedentes que se conocen de animales, donde se ha visto en microarreglos de humanos que Retinoblastoma se coexpresa de manera similar a *MEF2* (Comunicación directa del Dr. Enrique Hernández Lemus), podría ser que su expresión estuviera siendo regulada por *XALI*. Además, y debido a la necesidad de la presencia de pRb en animales en la regulación de la expresión de *MEF2C*, aunque no se trate exactamente de un FT (De Falco *et al.*, 2006) se hizo un análisis por medio de PCR tiempo real (qRT-PCR), donde se vio la expresión de ambos genes en mutantes de pérdida de función tanto de *XALI* como de *RBR*. Debido a que *E2Fa* y *CYCD3;1* también tienen cajas CArG dentro de sus secuencias y son factores del ciclo celular relacionados a *RBR*, también se analizó su expresión en las plantas mutantes y de sobreexpresión de *XALI*.

Como normalizadores de la reacción de qRT-PCR se utilizó a *UPL7* (*UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE 7*), *PDF2* (*PREFOLDIN 2*) y *RNAH* (tRNAHis guanylyltransferase), los cuales son genes con niveles de expresión constitutiva muy estables (Czechowski *et al.*, 2005); y, como control de las mutantes de pérdida de función, la expresión de *RBR* y *XALI*, en su respectivo fondo.

Primero se analizó la expresión de *XALI* en plantas WT y en plantas de una línea de pérdida de función de *RBR* (*35SamiGO RBR*), que no se trata de una línea de expresión nula, ya que es una construcción de RNA de interferencia que baja los niveles de transcrito de *RBR* en un 64% con respecto a las plantas WT (Figura 5D). Los genes normalizadores tuvieron niveles constantes de expresión en ambos genotipos (Figura 5A, B, C). Se observó que *RBR* es un regulador negativo de *XALI* (Figura 5E) ya que en la mutante de *RBR* sube la expresión de este gen de manera estadísticamente significativa en un 11%.

Esto se encuentra relacionado con lo que se han llegado a observar en los fenotipos del tamaño de las raíces de *RBR* y *XALI*; cuando hay menos *RBR*, hay una mayor proliferación celular, generalmente con un meristemo más grande y una raíz más larga que la WT (a veces significativamente y otras no) (Perilli *et al.*, 2013; Cruz-Ramírez *et al.*, 2013) y estos mismos fenotipos de meristemo y raíz larga se observan al sobre expresar *XALI* (García-Cruz, *et al.*, 2016). Esto sugiere que, un pequeño aumento en la cantidad de transcrito de *XALI*, es suficiente para alterar el desarrollo de la raíz, pero no quiere decir que los niveles de expresión de *XALI* en fondo *35SamiGO RBR* sean tan altos como los que se presentan las plantas de sobreexpresión.

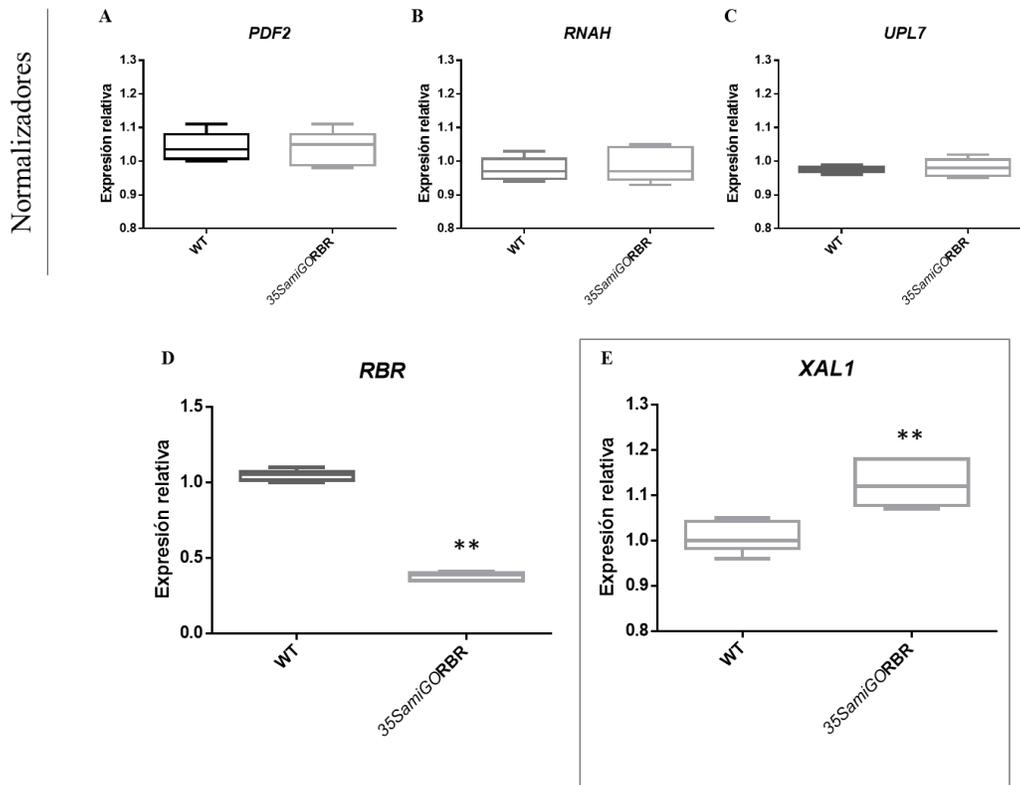


Figura 5. Expresión de *XAL1* en plantas mutantes de pérdida de función de RBR.

Comparación de expresión relativa de plantas WT y plantas en fondo de pérdida de función de RBR (*35SamiGO RBR*) por medio de qRT-PCR. Se puede ver la expresión relativa de los tres normalizadores (A) *PDF2*, (B) *RNAH* y (C) *UPL7*, el control de la expresión de *RBR* (D) y la expresión de *XAL1* (E) en el fondo *35SamiGO RBR*. n=6, **p<0.01; los análisis estadísticos se realizaron usando pruebas no paramétricas (Mann-Whitney) comparando WT contra cada una de las líneas transgénicas.

En animales no se ha visto ninguna relación directa de pRb sobre *MEF2C*, ya que no se trata de un FT, lo que se ha observado es que es necesaria su presencia para la expresión de *MEF2C* y la regulación directa que se conoce la lleva a cabo a través de un sinergismo con *MyoD*, que sí es un regulador transcripcional positivo de *MEF2C* (Sartorelli y Caretti, 2005; De Falco *et al.*, 2006); nosotros observamos lo contrario en la regulación de la expresión de *XAL1* ya que RBR es un regulador negativo, necesita estar presente para que no aumenten sus niveles de expresión (Figura 5E). Esto se puede deber a que muchas de las interacciones que ocurren en animales para regular la función de las proteínas y de los FT claves para el

desarrollo, están mediados por la interacción con otras proteínas y/o a que esta regulación depende de la combinatoria de los diferentes componentes de la red de regulación genética. Se ha reportado que MEF2C lleva a cabo diferentes papeles que afectan la regulación de la proliferación y la diferenciación celular en diferentes tejidos; por ejemplo, en músculo y hueso su papel es importante para que ocurra la diferenciación, por ejemplo, en hueso la mutante provoca que el hueso no se logre diferenciar adecuadamente (Potthoff y Olson, 2007). Por otro lado, en endotelio parece tener un papel inverso ya que, en la mutante de este gen, el tejido se diferencia más rápido, sin tener una adecuada proliferación ya que se ha visto que en este tejido MEF2C está involucrado en la supervivencia celular y proliferación (Potthoff y Olson, 2007). A lo largo del eje longitudinal de la raíz, en donde están representadas las diferentes zonas del crecimiento, el papel de regulación de *RBR* sobre *XALI* también podría ser distinto.

Debido a que hay otros genes MADS-box que participan en el desarrollo de la raíz, aunque no sea afectando la duración del ciclo celular como lo hace *XALI*, se hicieron análisis de expresión de estos genes en el mismo fondo de pérdida de función de *RBR* (Figura 6).

Los genes MADS box que se seleccionaron fueron los siguientes: *XAL2* ya que es un promotor del crecimiento de la raíz, pero, en contraste con *XALI*, no afecta la duración del ciclo celular sino el transporte de auxinas (Garay-Arroyo, *et al.*, 2013). También, se escogieron los genes *AGL17* y *AGL19* que se expresan en raíz (Alvarez-Buylla, *et al.*, 2000; Burgerff *et al.*, 2002) cuyas mutantes no presentan fenotipos de raíces más cortas pero que, en ciertas condiciones de crecimiento, parecen tener raíces ligeramente más largas que las WT (datos no publicados de nuestro laboratorio). Finalmente, se escogieron los genes *SOC1* y *AGL22* que han sido muy estudiados por su participación en el desarrollo de la parte aérea y que se ha visto que interactúan con *XAL2* tanto en la parte aérea (Pérez-Ruíz, *et al.*, 2015) como en la raíz y parecería que *SOC1* también está involucrado en el desarrollo de este órgano (Garay-Arroyo *et al.*, sin publicar).

Se analizó la expresión de los genes mencionados en los mismos fondos donde se analizó la expresión de *XALI* (plantas WT y plantas de pérdida de función de *RBR*: *35SamiGO RBR*). Los genes normalizadores tuvieron niveles constantes de expresión en ambos genotipos

(Figura 6A). Se observó que *RBR* es un regulador positivo de *AGL19*, *SOC1* y *XAL2*, ya que en el genotipo 35SamiGO RBR los niveles de transcrito son menores en un 35%, 43% y 18% respectivamente (Figura 6C, E y F), mientras que la expresión de los genes *AG17* y *AGL22* no varían en este genotipo (Figura 6A y D).

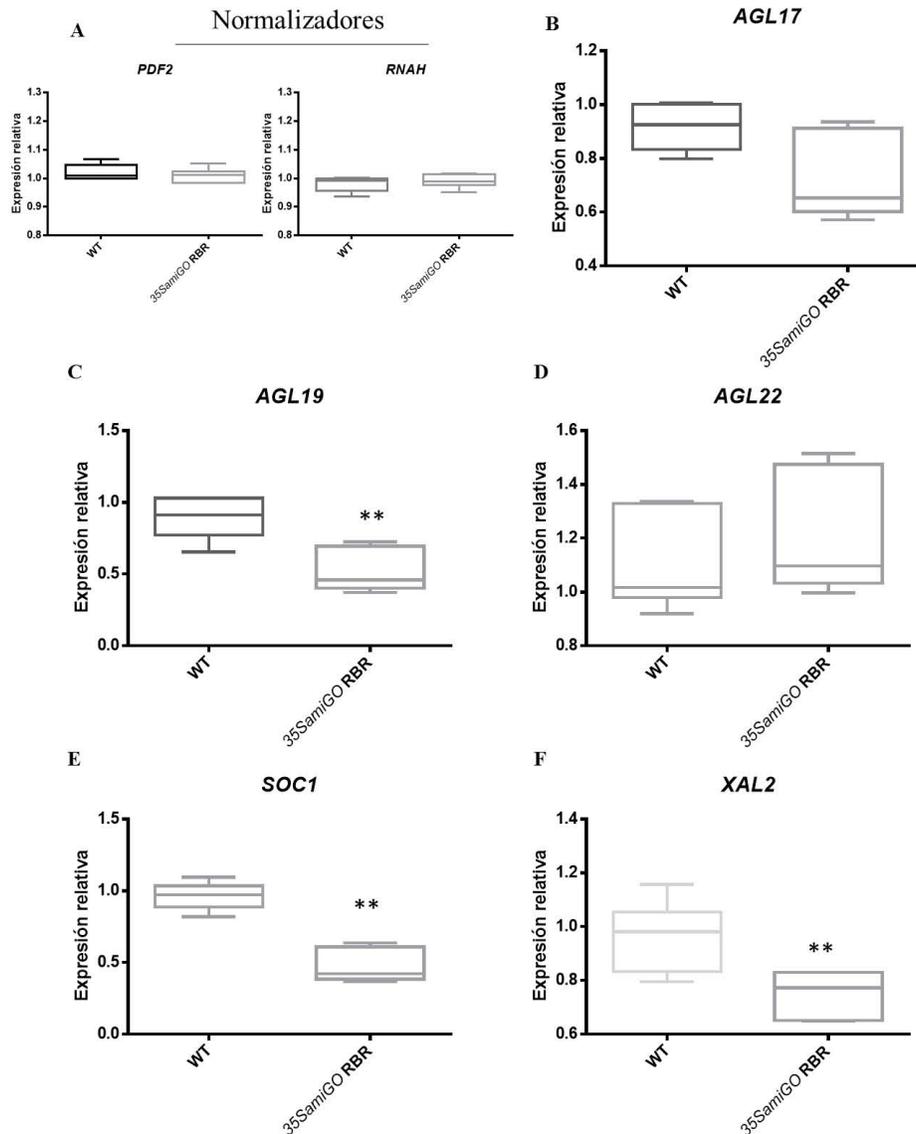


Figura 6. Expresión relativa de diversos genes MADS box tipo II en plantas WT y plantas en fondo de pérdida de función de RBR (35SamiGO RBR). Se usó como controles la expresión relativa de dos normalizadores (A) *PDF2* y *RNAH*. Podemos ver la expresión de los diferentes genes MADS-box (B) *AGL17*, (C) *AGL19*, (D) *AGL22*, (E)

SOCI y (F) *XAL2*, en los diferentes fondos en la raíz. n=6 **p<0.01; los análisis estadísticos se realizaron usando pruebas no paramétricas (Mann-Whitney) comparando WT contra cada una de las líneas transgénicas.

Podemos ver que RBR regula diferencialmente a los diversos genes MADS-box seleccionados, siendo *XALI* el único que es regulado de manera negativa (Figura 5E). De manera interesante observamos que *AGL19* y *SOCI* son regulados de manera positiva por RBR, al igual que *XAL2* (Figura 6C, E y F) y a diferencia de *XALI*, a pesar de que los mutantes de ambos genes MADS-box dan raíces cortas (Tapia-López *et al.*, 2008, Garay-Arroyo, *et al.*, 2013). Esto resulta muy interesante ya que, aunque RBR no es un FT, en el fondo de pérdida de función de este gen claramente se regulan de manera diferencial algunos genes MADS box involucrados en el desarrollo de raíz.

Dentro de los estudios de expresión de genes, se analizó la expresión de RBR y de otros componentes involucrados en el control del ciclo celular relacionados con RBR, como *CYCD3;1* y *E2Fa* en fondo de pérdida de función y sobreexpresión de *XALI* (*xal1-2* y *35S::AGL12* respectivamente), para ver si este gen MADS-box podría estar regulando la expresión de los mismos.

Los genes normalizadores tuvieron niveles constantes de expresión en los distintos genotipos (Figura 7A). Como se mencionó, se usaron plantas de una línea de pérdida de función de *XALI* (*xal1-2*), que no se trata de una línea de expresión nula, ya que tiene un T-DNA en un intrón, pero que baja los niveles de expresión de *XALI* casi en su totalidad con respecto a las plantas WT y plantas de sobreexpresión de *XALI* (*35S::AGL12*) que aumentan los niveles de transcrito 380% más (Figura 7B). Se observó que *XALI* es un regulador positivo de RBR y *CYCD3;1*, ya que en el genotipo *xal1-2* los niveles de transcrito son menores en un 20% y 35% respectivamente (Figura 7C y E). El nivel de expresión de estos genes también baja en las plantas de sobreexpresión de *XAL1* un 17% para RBR y 53% para *CYCD3;1* (Figura 7C y E). Los niveles de expresión de *E2Fa* no varían en ninguno de los genotipos (Figura 6D).

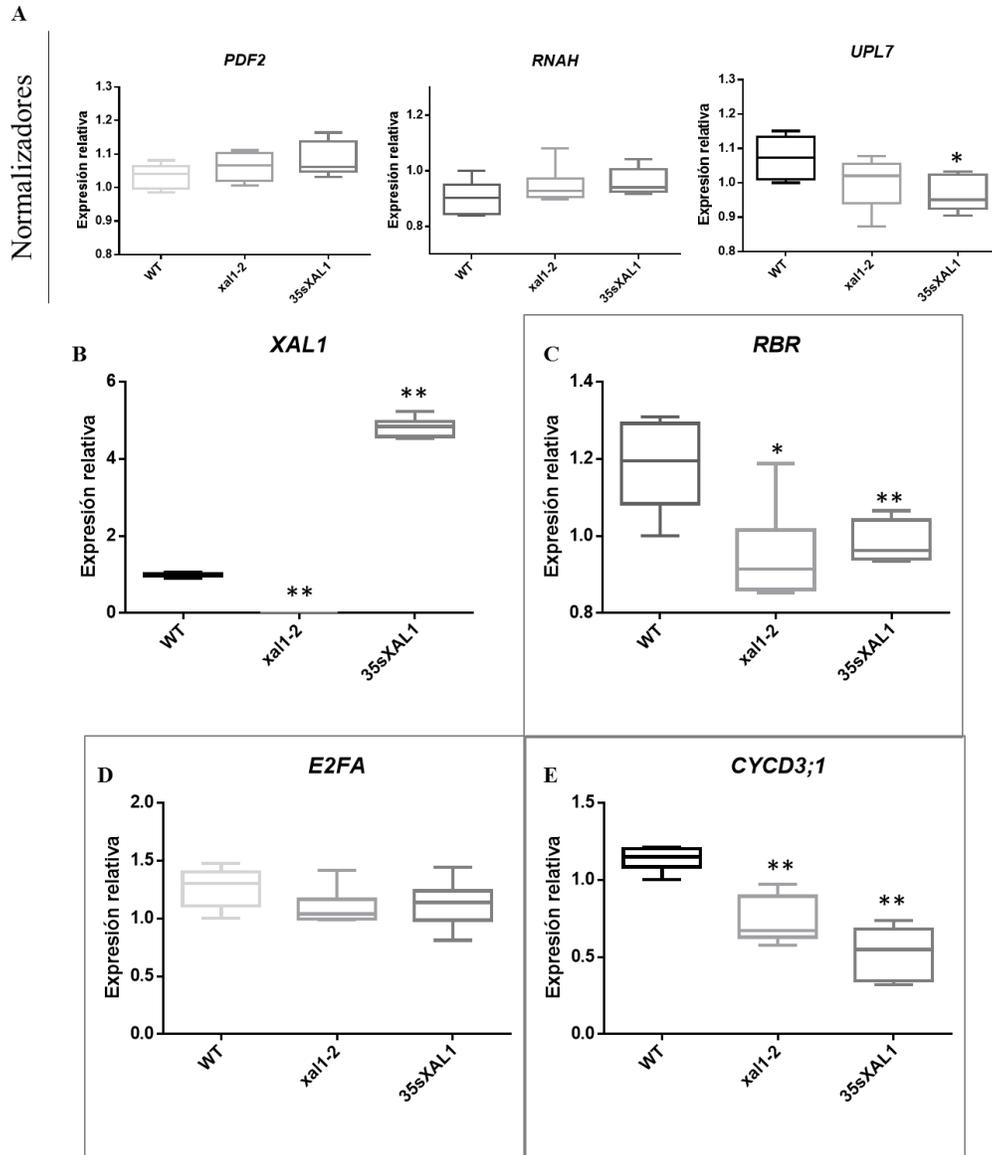


Figura 7. Expresión de *RBR*, *E2Fa* y *CYCD3;1* en fondo mutante y de sobreexpresión de *XAL1*. Se puede ver la expresión relativa de tres normalizadores (A) *PDF2*, *RNAH* y *UPL7*, el control de la expresión de (B) *XAL1*; por último, podemos ver la expresión de (C) *RBR*, (D) *E2Fa* y (E) *CYCD3;1* en los diferentes fondos. n=6 *p<0.05 y **p<0.01; los análisis estadísticos se realizaron usando pruebas no paramétricas (Mann-Whitney) comparando WT contra cada una de las líneas transgénicas.

En la Figura 7 podemos observar que *XAL1* es un regulador positivo de *RBR* debido a que en su mutante baja la expresión de este gen, aunque no es una regulación lineal ya que en la

línea de sobreexpresión los niveles de expresión no aumentan con respecto a la WT como se esperaría, sino que los niveles de expresión bajan. El hecho de que *XAL1* regule la expresión de *RBR* concuerda con lo reportado en el trabajo de Baca-López *et al.*, 2012 y lo obtenido en un análisis de co-expresión usando microarreglos de cáncer de mama (Dr. Enrique Hernández Lemus, comunicación directa) en donde se ve que un gen MADS box (*MEF2C*) se coexpresa con de *RB*.

Por otro lado, ya sabíamos que *XAL1* es un regulador positivo de *CYCD3;1* (García-Cruz *et al.*, 2016) por lo que lo usamos de control positivo en este experimento. Esta regulación podría ser parecida a la regulación que tiene *MEF2C* sobre componentes del ciclo celular a través de la regulación que presenta este gen MADS sobre *c-jun* (McKinsey *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha visto por análisis de microarreglos, la alteración de la regulación de otros componentes del ciclo celular en la mutante de *MEF2* (Estella *et al.*, 2015). En la figura 7 también podemos observar que *XAL1* no regula la expresión del FT *E2Fa*, el cual es regulado por *RBR* en la fase G1/S y se requiere para mantener la proliferación celular en la raíz (Magyar *et al.*, 2012), por lo que la regulación del ciclo celular por parte de *XAL1* no ocurre a nivel de la regulación de *E2Fa* sino, probablemente a través de *CYCD3;1*, *RBR* y/o otros componentes del ciclo celular anteriormente estudiados, que están por arriba de este gen (García-Cruz *et al.*, 2016).

Estos resultados, donde *RBR* es un regulador negativo de *XAL1* y éste es un regulador positivo de *RBR*, sugieren que ambos genes están en una red de regulación por lo menos cercana, ya que todavía no sabemos si lo hacen de manera directa.

Vía de regulación del desarrollo

Para analizar las interacciones genéticas y su participación en el desarrollo de la raíz primaria entre *XAL1* y *RBR*, se hicieron cruzas de las plantas de pérdida de función de *XAL1* (*xal1-2*) con las plantas de pérdida de función de *RBR* (*35SamiGO RBR*). Se obtuvieron dos líneas producto de dos cruzas diferentes (línea 2 y 3) y de ambas líneas se obtuvieron hijas homocigotas tanto para *xal1-2* y para *35SamiGO RBR* e hijas homocigotas para *xal1-2* y heterocigotas para *35SamiGO RBR*, para así analizar si había un efecto dosis dependiente por parte de *RBR* que pudiera afectar los fenotipos estudiados.

Para encontrar la doble homocigota de la crucea *xal1-2/35SamiGO RBR*, se seleccionaron las plantas de la progenie F2 que presentaban fluorescencia de GFP, debido a la construcción que tenían. De las plantas con la construcción con GFP se hicieron PCR's para determinar el genotipo, buscando aquellas que amplificaran el inserto de T-DNA, de la construcción de esa línea de plantas y no el genómico para *XAL1*. Se obtuvieron las plantas doble homocigotas *xal1/xal1;rbr/rbr*: 3.2.10 (F3) y 2.8.4.1.1 (F5) y las heterocigotas para RBR, *xal1/xal1;rbr/RBR*: 2.8.4 (F3) y 3.2.16 (F3).

Cinéticas de crecimiento y tamaño de raíz

Debido a que los tamaños de raíz en la mutante de pérdida de función de *XAL1* tiene raíces más cortas (Tapia-López *et al.*, 2008) y las raíces de pérdida de función de *RBR* en ocasiones pueden llegar a ser más largas de las raíces de plantas WT (Perilli *et al.*, 2013), nos preguntamos si alguno de estos fenotipos era dominante sobre el otro en cuanto al tamaño de la raíz principal, debido a la ausencia de ambos genes, para eso se sembraron las líneas de homocigotas y heterocigotas generadas, junto con las mutantes de pérdida de función sencillas (*xal1-2* y *35SamiGO RBR*) y las plantas WT; y se midieron cada 24 horas para poder analizar cómo la raíz principal iba creciendo a través del tiempo, hasta que alcanzaron el tamaño final de la caja donde fueron sembradas.

Se hizo una primera cinética de crecimiento de la raíz primaria de dos plantas con la construcción *xal1-2* y *35S::amiGORBR* (línea 3.2.10-homocigota [*xal1/xal1;rbr/rbr*] y 2.8.4-heterocigota [*xal1/xal1;rbr/RBR*]) y, como se puede observar en la Figura 8, ambas líneas tienen un fenotipo único de crecimiento de raíz primaria que no se parece a ninguno de los dos parentales por lo que parecería que actúan de manera independiente. Además, la línea 2.8.4 que se encuentra heterocigota para la construcción *35SamiGO RBR* (*xal1/xal1;rbr/RBR*) no presenta diferencias significativas con la planta 3.2.10 que se encuentra homocigota para *35SamiGORBR* (*xal1/xal1;rbr/rbr*) lo cual en un principio sugiere que no hay diferencia dependiente de concentración de RBR.

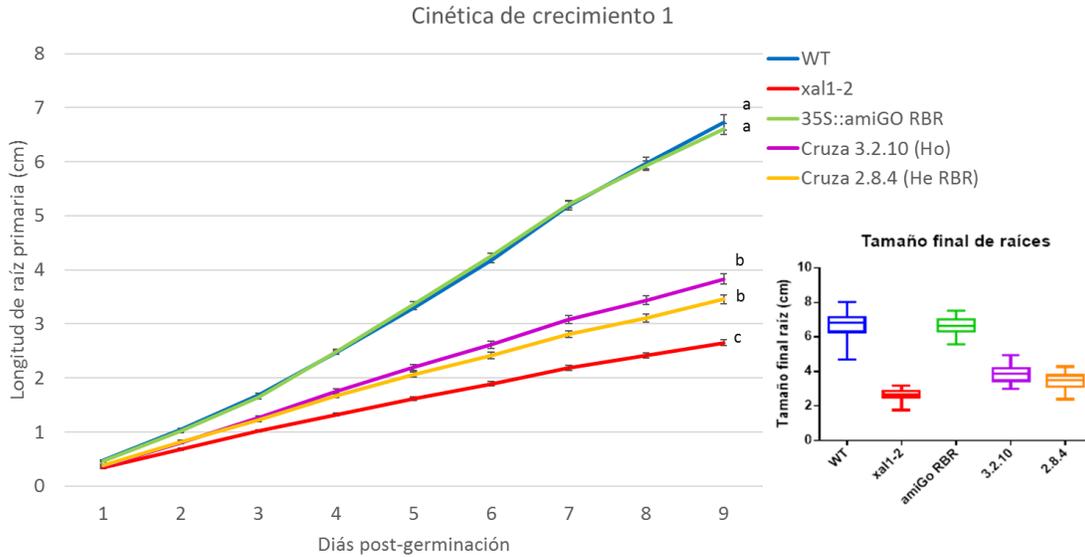


Figura 8. Cinética de crecimiento de plantas y tamaño final de la raíz primaria.

Tamaño de la raíz de 27 plantas durante 9 días post-germinación de las diferentes líneas: WT, *35SamiGO RBR*, *xal1-2*, *xal1-2/35SamiGO RBR* (líneas 3.2.10 y 2.8.4). Diferencias significativas se muestran con diferente letra ($P < 0.05$; se analizó mediante una prueba estadística paramétrica ANOVA y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

Tanto en la Figura 8 como en la Figura A1 del anexo, se ve que las líneas de la doble mutante *xal1-2/35SamiGO RBR* tienen un fenotipo intermedio, aunque con una tendencia a ser más cortas y, por lo tanto, a parecerse un poco más al fenotipo de raíz corta de *xal1-2*.

Debido a que en la cinética 1 (Figura 8) las plantas homo y heterocigotas para *35SamiGO RBR* no provenían de la misma línea genética, se llevaron a cabo dos nuevas cinéticas de crecimiento en donde se incluyeron todas las líneas celulares homocigotas y heterocigotas para *RBR* y *xal1-2* (Figura 9, A2 y A3). De manera interesante se puede observar que las cruza vuelven a presentar una raíz corta, pero no del mismo tamaño que la de la mutante simple *xal1-2* (Figura 9, A2 y A3). Podemos observar en la figura 9 y A2 a *xal1-2* como la línea con la raíz significativamente más corta, las dos líneas heterocigotas *xal1/xal1;rbr/RBR* (2.8.4 y 3.2.16) tienen fenotipos iguales con raíces cortas, las siguen las líneas homocigotas *xal1/xal1;rbr/rbr* 2.8.4.1.1 y 3.2.10 con fenotipos iguales y significativamente más largas que las líneas heterocigotas, después *35SamiGO RBR* tiene un fenotipo de raíz significativamente

más larga que las líneas anteriormente mencionadas y más cercana al tamaño de raíz de las plantas WT cuyas raíces fueron estadísticamente las más largas. Esto sugiere que sí hay una dependencia de dosis de *RBR* que altera diferencialmente el desarrollo de la raíz primaria.

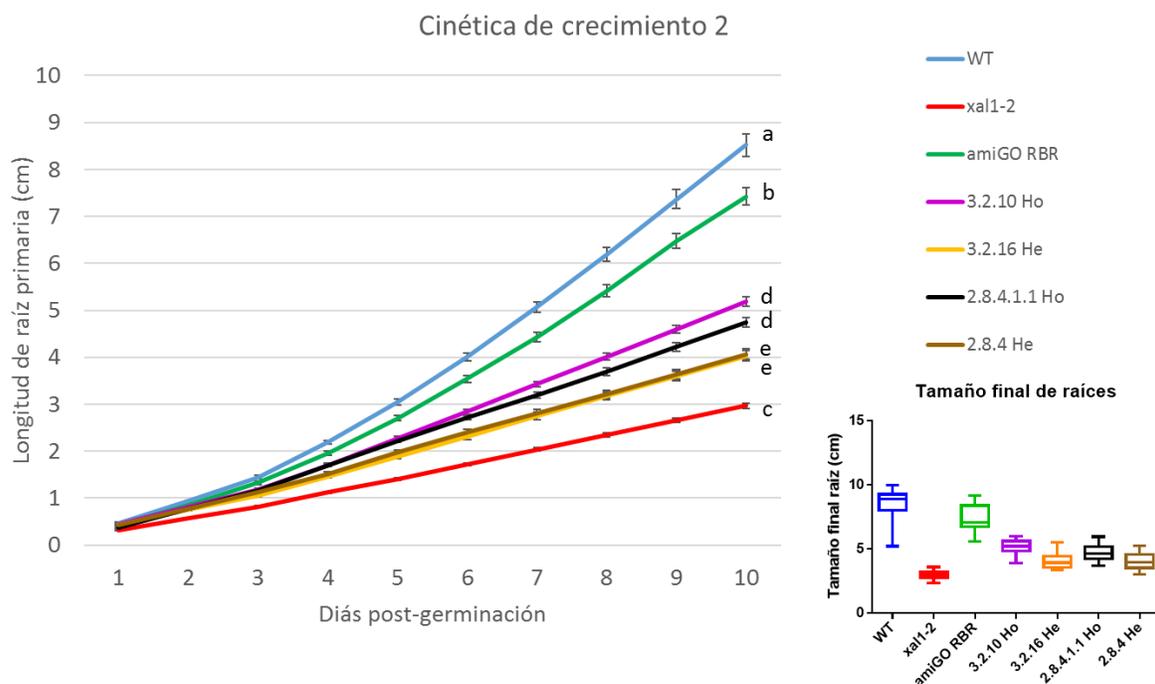


Figura 9. Segunda cinética de crecimiento de las diferentes líneas de plantas. Tamaño de la raíz de alrededor de 30 plantas durante 10 días pos-germinación de las diferentes líneas: WT (n=30), *35SamiGO RBR* (n=31), *xal1-2* (n=34), *xal1-2/35SamiGO RBR*. Líneas homocigotas: 3.2.10 (n= 29) y 2.8.4.1.1 (n=28) y líneas He 3.2.16 (n=22) y 2.8.4 (n=29). Diferencias significativas se muestran con diferente letra (P<0.05; se analizó mediante una prueba estadística paramétrica ANOVA y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

En ésta segunda y tercera cinética de crecimiento (Figura 9 y A3 del anexo), a diferencia de la primera cinética (Figura 8), podemos observar que las plantas *35S::amiGO RBR* son más cortas que las plantas WT y que las cruza si tienen un fenotipo intermedio entre las parentales, sin los mismos números absolutos que habíamos visto pero si con la misma tendencia de ser un poco más cortas y mas cerca del fenotipo de *xal1-2* (Figura 9 y Figura A2 del anexo). Esta discrepancia, donde las plantas de *35SamiGO RBR* varían mucho entre

experimentos, se podría deber a que éstas plantas son más susceptibles a cambios muy ligeros en el ambiente de las cámaras de crecimiento sobre los cuales no tenemos control.

A partir de la cinética dos, se calculó la velocidad de crecimiento de la raíz primaria de cada día y, como se puede ver en la Figura 10, restando el tamaño de la raíz en un día menos el tamaño de la raíz un día anterior ($X_n - (X_{n-1})$; X = tamaño por cada dpG); la velocidad obtenida de cada línea correlaciona con el tamaño de la raíz primaria. Las plantas WT presentan la raíz más larga y la velocidad más alta mientras que las cruzas tienen un comportamiento parecido a las plantas *xal1-2*, ya que, a pesar de que tienen una mayor velocidad de crecimiento, que se origina de que las raíces crecen un poco más los primeros días, conforme pasan los días la velocidad es más estable y no aumenta.

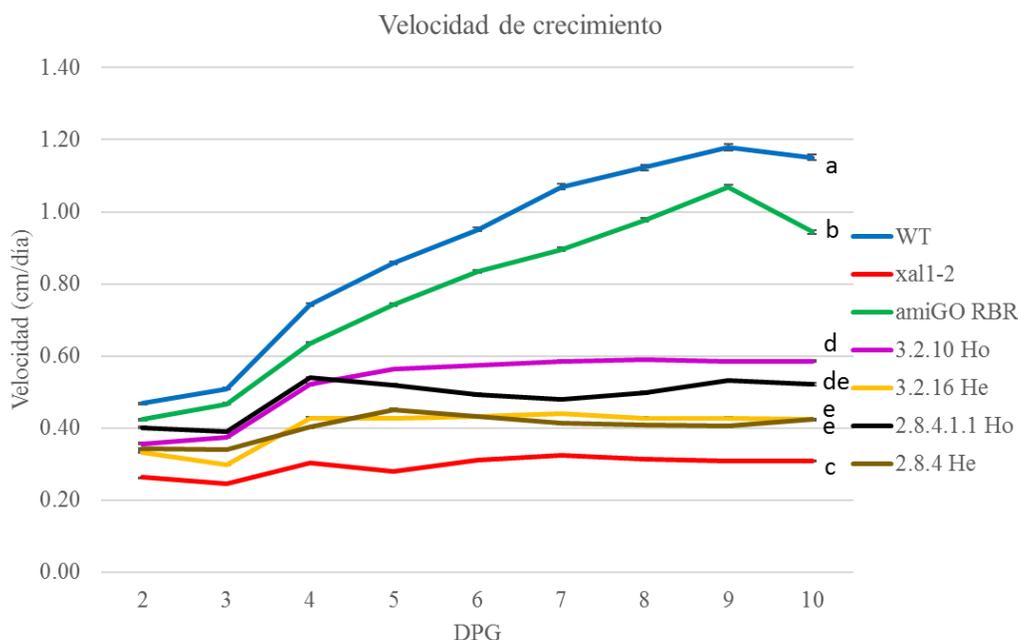


Figura 10. Velocidad de crecimiento de las diferentes líneas a lo largo de 10dp O dpG.

Velocidad dada en centímetros por día a partir de las diferencias de longitudes de raíz durante 24 horas de la cinética de crecimiento que se puede ver en la Figura 9 ($X_n - (X_{n-1})$; X = tamaño por cada dpG). Se observa que las plantas WT y *35S::amiGO RBR* crecen a mayos velocidad conforme pasan los días, mientras que las cruzas homocigotas y heterocigotas, comienzan con un tamaño diferente de crecimiento que las plantas *xal1-2* aunque, a partir del día 4 la velocidad se vuelve constante y con la misma tendencia que la

que tiene la línea *xal1-2*. Barras de error estándar. ANOVA y prueba de Tukey para comparaciones múltiples, $P < 0.01$.

La velocidad está dada tanto por el número de células como por el tamaño de las células completamente alargadas, éstas últimas son muy importantes para el tamaño total y final de la raíz ya que son más grandes, por lo que podrían estar mayormente involucradas en la velocidad. Debido a lo anterior se hicieron pruebas de correlación del tamaño de las células completamente alargadas, obtenidas de los análisis celulares que se muestran más adelante en lo análisis celulares con la velocidad de crecimiento y se encontró una correlación (ver anexo A4) que sugiere que *XALI* si podría estar involucrado en la diferenciación aún en ausencia de *RBR* y alterar la velocidad de crecimiento, de acuerdo a su participación en el tamaño de células completamente alargadas (ver más adelante, Figura 13). Por otro lado también se hicieron análisis de correlación de la velocidad de crecimiento con los datos obtenidos de las otras zonas de desarrollo de la raíz mostradas más adelante y también se encontró que existe una correlación con el tamaño del dominio de proliferación (anexo A5), pero no tanto como con el tamaño total del meristemo; deben de existir ligeros cambios en el dominio de transición que provocan que el tamaño final del meristemo no correlacione de la misma manera, por lo que la velocidad podría estar alterada por las células completamente alargadas y por la proliferación celular.

Debido a que la mutante de pérdida de función de *RBR* no es completamente nula, ya que se trata de un silenciamiento del transcrito a través de un RNA de interferencia (Cruz-Ramírez, *et al.*, 2013) con una aproximado de 60% de reducción de transcrito, estos análisis no se pueden considerar desde un punto de vista de interacciones epistáticas, lo cual significa que la expresión de uno o más genes dependen de la expresión de otro gen, por lo que no podemos decir estrictamente que se encuentren uno sobre otro en una misma vía de regulación o en diferentes vías. Lo que sí podemos decir es que se trata de componentes que se encuentran cercanos en una red de regulación genética (Azpeitia *et al.*, 2011). Además, en animales se sabe que las interacciones entre *RB*, *MyoD* y *MEF2C* no ocurren de manera directa.

Zonas de desarrollo de la raíz

Para profundizar en cómo afectan *XALI* y *RBR* los procesos de proliferación y diferenciación,

se hicieron análisis de las diferentes zonas de desarrollo de la raíz con las diferentes líneas de plantas: homocigota *xal1/xal1;rbr/rbr* 2.8.4.1.1 y de los respectivos controles (WT, *xal1-2* y *35SamiGO RBR*).

Se analizó, mediante microscopía, el tamaño de las células del córtex desde el CQ hasta 20 células arriba de la célula epidérmica que presenta el primer pelo lo cual nos permite analizar el número de células y la longitud de dos de las diferentes zonas de la raíz primaria, el RAM y la zona de elongación. Para determinar el tamaño de las células presentes en la zona de maduración se midieron aproximadamente 30 células completamente elongadas por arriba de las diez primeras células que forman parte de la zona de elongación. Para estos estudios se analizaron 10 plantas de cada línea celular.

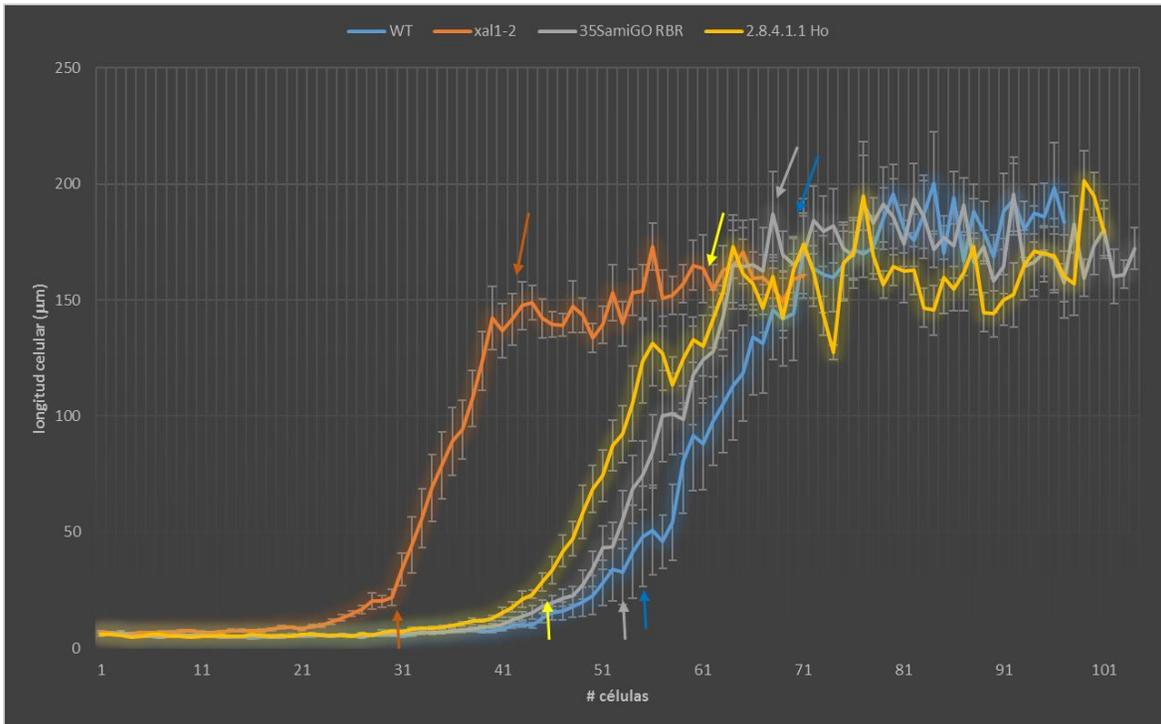


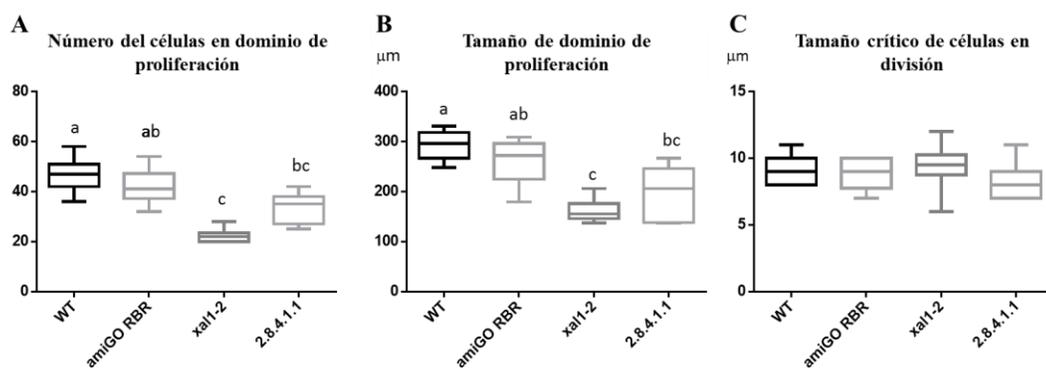
Figura 11. Gráfica del tamaño celular (μm) de células del córtex a lo largo de la raíz primaria. Se pueden ver las zonas de proliferación (RAM) marcada con una flecha abajo, elongación y diferenciación de plantas marcadas con una flecha arriba; WT (azul), *xal1-2* (naranja), *35SamiGO RBR* (gris) y *xal1-2/35SamiGO RBR* (Ho 2.8.4.1.1) (amarillo) de 7 dps. (n=10, barras de error estándar).

Primero se hizo el análisis del tamaño de las células del córtex a lo largo de la raíz primaria, hasta el primer primordio de raíz lateral de cada planta. Como se observa en la Figura 11, donde se encuentran las flechas abajo marcando el meristemo, *xal1-2* lo tiene más pequeño que el que tiene la planta WT, de acuerdo a los resultados de Tapia-López *et al.*, 2008, mientras que el de la línea homocigota *xal1-2/35SamiGO RBR* (2.8.4.1.1) es intermedio entre las plantas *xal1-2* y *35SamiGO RBR*, lo cual coincide con el fenotipo de la longitud de la raíz primaria observado en las cinéticas de crecimiento. De manera interesante, la línea 2.8.4.1.1 parece tener un tamaño de células con una tendencia a parecerse más a las plantas de *35SamiGO RBR* y WT que al tamaño de las células de *xal1-2*, inverso a lo que se observa en

las cinéticas de crecimiento; estas características se pueden ver más claramente a continuación.

A partir de éstos resultados se analizaron los diferentes dominios de las raíces (Figura 12), mediante el programa reportado en Pacheco-Escobedo *et al.*, 2016 (http://www.ibiologia.com.mx/MSC_analysis/) y se calculó, de manera independiente (Fig. 11), el tamaño de las células completamente alargadas.

En la Figura 12 podemos ver los datos de los análisis obtenidos del programa de Pacheco-Escobedo *et al.*, 2016, que son el número de células en proliferación, el tamaño del dominio de proliferación, el tamaño crítico de células en división, el número de células del meristemo de la raíz (RAM), el tamaño del RAM (el cual está conformado por el dominio de proliferación y el dominio de transición), el tamaño del dominio de transición, el tamaño crítico de transición a la elongación y el tamaño de la zona de elongación, para las diferentes líneas celulares analizadas. En estos análisis las plantas WT y las *35SamiGO RBR* no presentan diferencias significativas, mientras que las plantas *xal1-2* presentan menos células y tamaños más pequeños (Figura 13A, B, D, E, F, G, H), la línea homocigota presenta un fenotipo intermedio en todos los parámetros, con respecto a las parentales. El tamaño crítico de las células en división no se ve afectado en ninguna de las líneas celulares con respecto a la WT (Figura 13C).



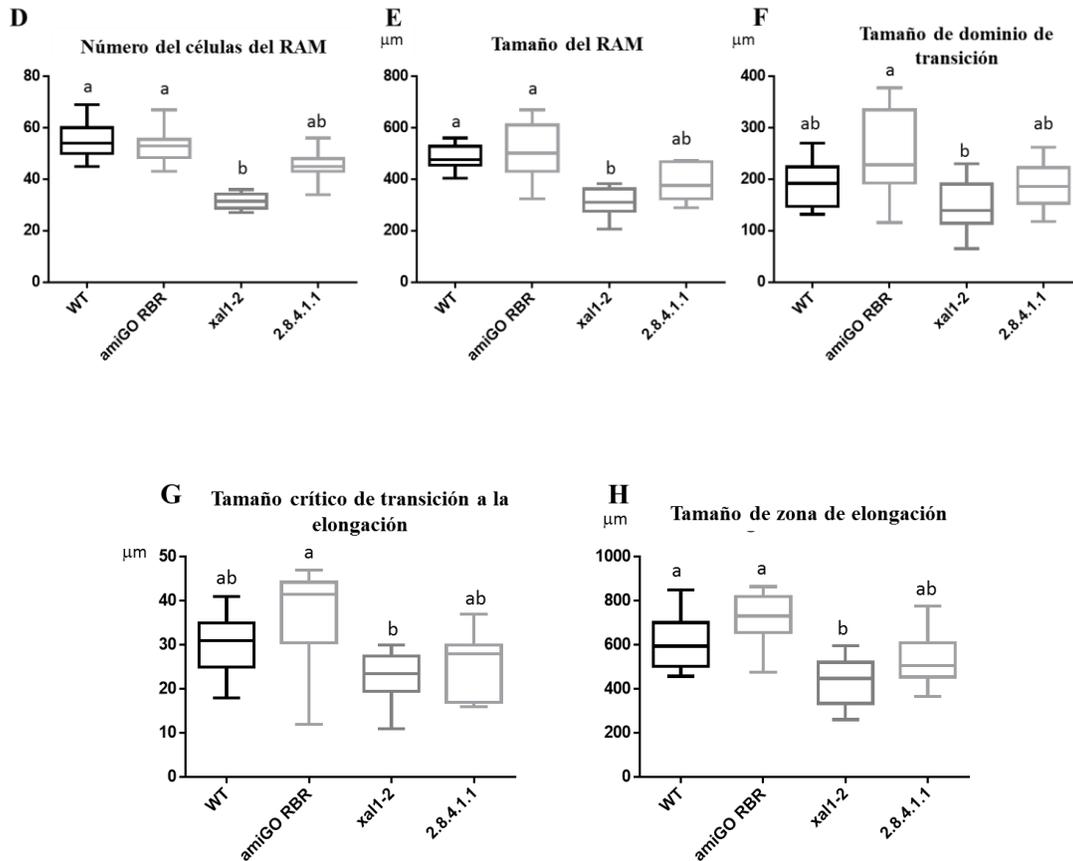


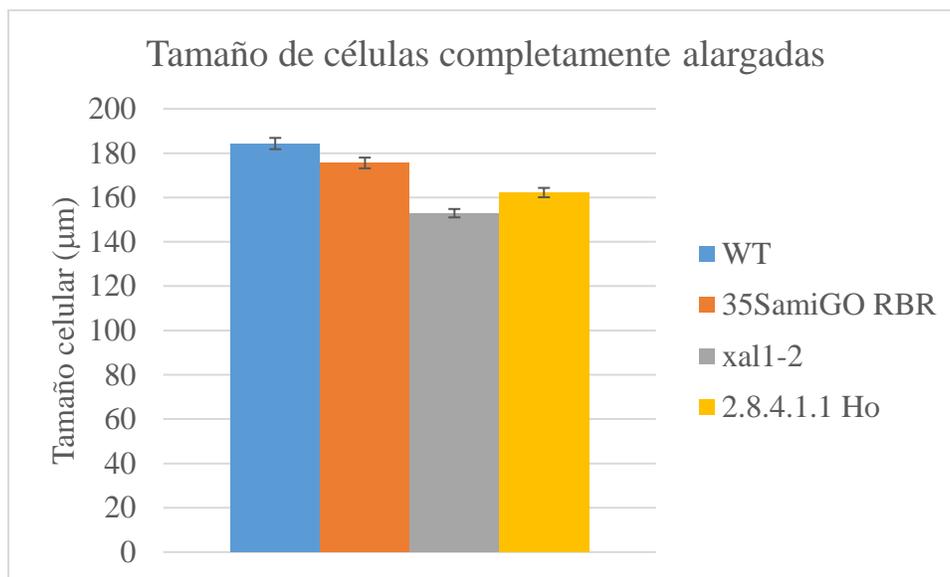
Figura 12. Número de células de cortex y tamaño celular de cada una de las zonas y dominios de la raíz primaria. Análisis de (A) número de células del dominio de proliferación, (B) tamaño del dominio de proliferación (μm), (C) Tamaño crítico de células en división, (D) número de células del meristemo de la raíz (RAM), (E) Tamaño del RAM, (F) tamaño del dominio de transición, (G) tamaño crítico de transición a la elongación y (H) tamaño de la zona de elongación; de raíces de 7dps de plantas WT (n=11), *xal1-2* (n=10), *35SamiGO RBR* (n=10) y *xal1-2/35SamiGO RBR* (2.8.4.1.1, n=11); se utilizó el programa http://www.ibiologia.com.mx/MSC_analysis/.

Es interesante notar que, en ambas Figuras (11 y 12) los fenotipos de la línea homocigota *xal1-2/35SamiGO RBR* (2.8.4.1.1) son intermedios de las progenitoras (*xal1-2*, *35SamiGO RBR*) en prácticamente todos los parámetros. Esto sugiere que los efectos de una proliferación más lenta de las mutantes de *xal1-2* se suman al aumento de proliferación de las plantas *35SamiGO RBR*, dándonos como resultado, un fenotipo intermedio. Sin embargo,

el fenotipo del tamaño de la raíz primaria en las cinéticas de crecimiento (Figuras 8 y 9), muestra que las dobles mutantes a veces tienden a tener un tamaño de raíz parecido al que presenta la mutante sencilla de *xal1-2* y esto no se explica con los datos analizados en la Figura 12.

Ya que las células completamente alargadas contribuyen de manera importante al tamaño final de una raíz, decidimos medirlo en cada una de las líneas. Se analizaron diez plantas de cada línea celular, de donde se midieron 30 células completamente alargadas, por arriba de 10 células después del primer pelo, para asegurarnos de no tomar células que todavía pudieran estar en proceso de elongación (Figura 13).

A



B

Tukey's multiple comparisons test	Adjusted P Value	
WT vs. <i>xal1-2</i>	<0.0001	****
WT vs. <i>35SamiGO RBR</i>	0.0246	*
WT vs. <i>2.8.4.1.1</i>	<0.0001	****
<i>xal1-2</i> vs. <i>35SamiGO RBR</i>	<0.0001	****
<i>xal1-2</i> vs. <i>2.8.4.1.1</i>	0.023	*
<i>35SamiGO RBR</i> vs. <i>2.8.4.1.1</i>	0.001	***

Figura 13. Tamaño de las células completamente alargadas. (A) Promedio de tamaño (μm) de las células del córtex de plantas WT (n=28 células de 10 plantas), *xal1-2* (n=29 células de 10 plantas), *35SamiGO RBR* (n=29 células de 10 plantas) y *xal1-2/35SamiGO RBR* (2.8.4.1.1) (n=38 células de 10 plantas) de 7 dps. Se midió y promedió a partir de 10 células del cortex después del primer pelo. Barras de error estándar. (B) Tabla con las comparaciones múltiples entre plantas con la prueba estadística de Tukey, donde se observa que las únicas plantas que tienen una diferencia no tan significativa son las plantas WT con las *35SamiGO* y las plantas *xal1-2* con la cruz *Ho 2.8.4.1.1* (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$).

Como se puede ver en la Figura 13, las células completamente alargadas de la línea homocigota *xal1-2/35SamiGO RBR* (2.8.4.1.1) son significativamente más pequeñas que las que presentan las plantas WT y las *35SamiGO RBR* y son mucho más parecidas al tamaño de las células completamente alargadas que tienen las plantas mutantes para *XALI* lo cual nos explica el fenotipo observado en las cinéticas de crecimiento de raíces más cortas.

Esto sugiere la participación de *XALI* en los mecanismos de diferenciación ya que, a pesar de que se ha demostrado que *RBR* participa en la diferenciación de las células de la columela de tal manera que cuando está sobreexpresado se diferencian más rápido y en líneas de pérdida de función menos rápido (Wildwater *et al.*, 2005; Dinney y Benfey, 2005) el fenotipo de la pérdida de función de *RBR* con la mutante de *XALI* muestra un proceso de

diferenciación, hacia la zona de formación de pelos (zona de diferenciación), más rápido a pesar de que hay menos *RBR*.

Se repitieron los mismos análisis celulares con la otra línea homocigota (3.2.10) y con la heterocigota (3.2.16) para comprobar que los datos se debieran a estas dos mutaciones. En la Figura 14 podemos observar el análisis del tamaño de las células del córtex a lo largo de la raíz primaria, hasta el primer primordio de raíz lateral de cada planta.

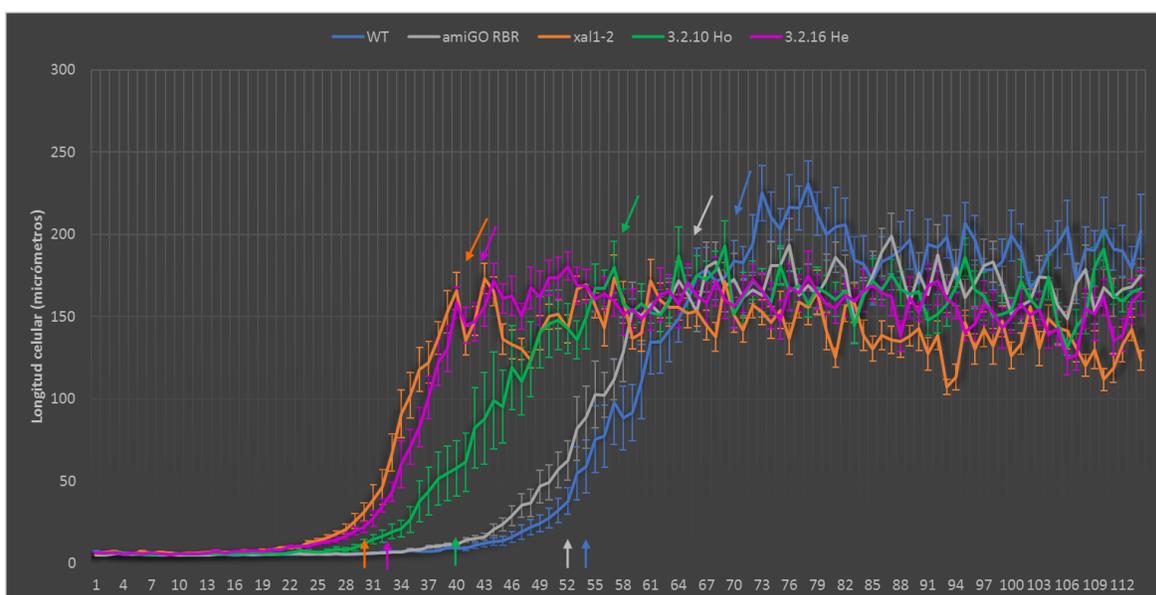


Figura 14. Gráfica del tamaño celular (μm) de células de córtex a lo largo de la raíz primaria. Se pueden ver las zonas de proliferación (RAM) marcada con una flecha abajo, elongación y diferenciación marcada con una flecha arriba. WT (azul), *xal1-2* (naranja), *35SamiGO RBR* (gris), *xal1-2/35SamiGO RBR* (Ho 3.2.10) (verde) y *xal1-2/35SamiGO RBR* (He 3.2.16) (morado) de 7 dps. (n=10, barras de error estándar).

Como se puede ver en la Figura 14, la doble homocigota 3.2.10 parece tener un fenotipo intermedio al que presentan las dos mutantes sencillas en cuanto al tamaño de las células del cortex. Por otro lado, la línea heterocigota 3.2.16 tiene un comportamiento muy parecido al de la mutante *xal1-2*, lo cual podría estar ocurriendo debido a que *RBR* no es suficiente para revertir el efecto de la ausencia de *XAL1* en el desarrollo de la raíz.

Finalmente, al ver la cinética de las diez plantas analizadas de la línea homocigota 3.2.10 (anexo Figura A6), podemos observar que cuatro de estas plantas tienen meristemas más pequeños que las otras seis y que, al quitar estas plantas de los análisis, las cuantificaciones de la línea 3.2.10 son muy parecidas a las de la línea 2.8.4.1.1. Esto sugiere que esta línea puede tener una expresión diferente de *RBR* que está afectando los fenotipos de raíz más corta.

Con estas líneas también se analizaron los diferentes dominios de la raíz (Figura 15), mediante el programa de Pacheco-Escobedo *et al.*, 2016 (http://www.ibiologia.com.mx/MSC_analysis/) y se calculó, de manera independiente (Fig. 16), el tamaño de las células completamente alargadas, al igual que se habían analizado anteriormente con la línea homocigota 2.8.4.1.1. En estos análisis las plantas WT y las *35SamiGO RBR* no presentan diferencias significativas en ninguna de las zonas de la raíz (Figura 15), mientras que las plantas *xal1-2* presentan menos células y tamaños más pequeños (Figura 15A, B, D, E, G, H). El tamaño crítico de las células en división no se ve afectado en ninguna de las líneas celulares con respecto a la WT (Figura 15C) y en este experimento tampoco hubo cambios significativos en el tamaño de dominio de transición (Figura 15F). La línea homocigota (3.2.10) presenta un fenotipo intermedio en todos los demás parámetros, con respecto a las parentales (Figura 15A, B, D, E, G, H); mientras que la línea heterocigota (3.2.16) presenta un fenotipo intermedio con respecto a las parentales en el tamaño del dominio de proliferación, tamaño del RAM, el tamaño crítico de transición a la elongación y tamaño de la zona de elongación (Figura 15B, E, G, H), pero en el número de células en el dominio de proliferación y el número de células en el RAM es menor, igual que la mutante sencilla *xal1-2* (Figura 15A y D), esta característica puede ser el factor que genera el fenotipo de raíces más cortas que se observa en las líneas heterocigotas en las cinéticas de crecimiento.

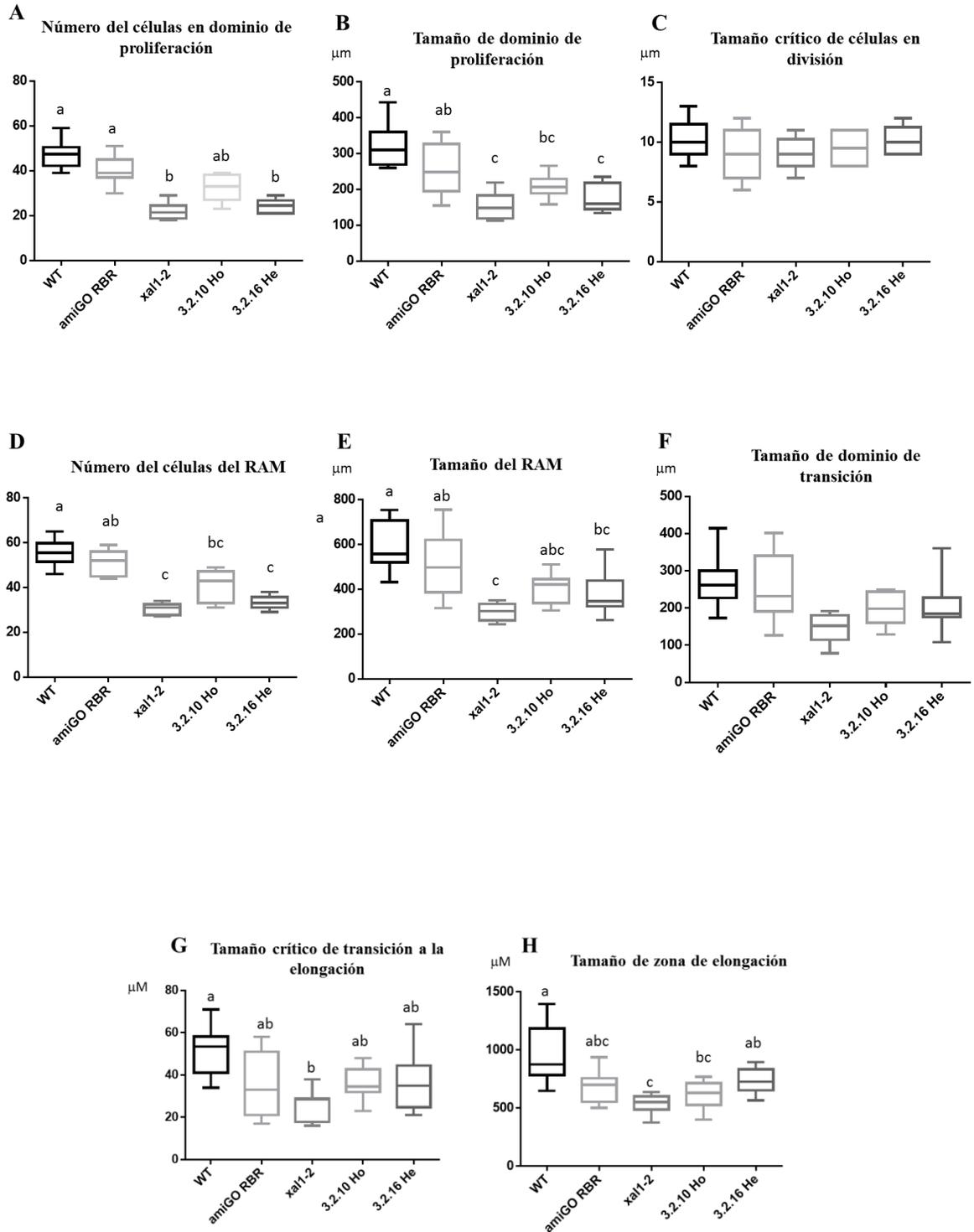
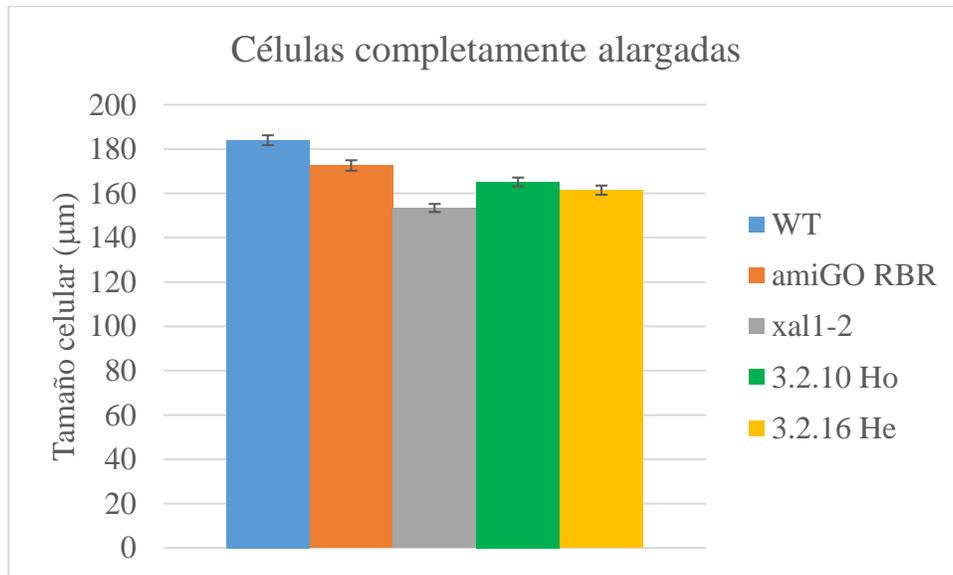


Figura 15. Número de células de cortex y tamaño celular de cada una de las zonas y dominios de la raíz primaria. Análisis de (A) número de células del dominio de

proliferación, (B) tamaño del dominio de proliferación (μm), (C) Tamaño crítico de células en división, (D) número de células del meristemo de la raíz (RAM), (E) Tamaño del RAM, (F) tamaño del dominio de transición, (G) tamaño crítico de transición a la elongación y (H) tamaño de la zona de elongación; 7dps de plantas WT (n=10), *xal1-2* (n=10), *35SamiGO RBR* (n=10) *xal1-2/35SamiGO RBR* (Ho 3.2.10, n=10) y *xal1-2/35SamiGO RBR* (He 3.2.16, n=10); se utilizó el programa http://www.ibiologia.com.mx/MSC_analysis/.

Es interesante notar que los fenotipos de la línea homocigota *xal1-2/35SamiGO RBR* (3.2.10) son intermedios de las progenitoras (*xal1-2*, *35SamiGO RBR*) al igual que la línea 2.8.4.1.1 (Figura 15). Esto sugiere que en ambas cruzas se podrían conservar los efectos de una proliferación más lenta como la que presentan las mutantes de *xal1-2* sumado al aumento de la proliferación que tienen las plantas *35SamiGO RBR*, dándonos como resultado un fenotipo intermedio; esta hipótesis se sustenta ya que las plantas heterocigotas tienden a ser más parecidas a la mutante *xal1-2*.

A



B

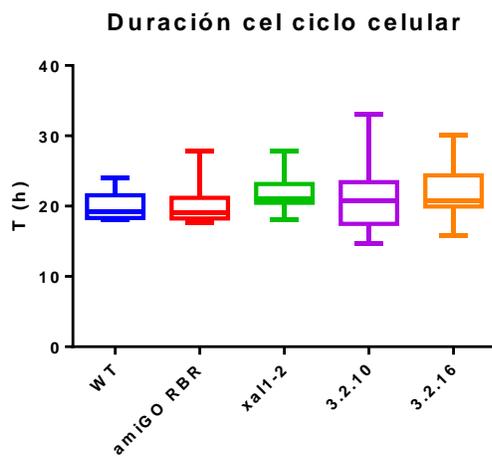
Tukey's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value
WT vs. amiGO RBR	***	0.0001
WT vs. <i>xal1-2</i>	****	< 0.0001
WT vs. 3.2.10 Ho	****	< 0.0001
WT vs. 3.2.16 He	****	< 0.0001
amiGO RBR vs. <i>xal1-2</i>	****	< 0.0001
amiGO RBR vs. 3.2.10 Ho	ns	0.0786
amiGO RBR vs. 3.2.16 He	**	0.0011
<i>xal1-2</i> vs. 3.2.10 Ho	***	0.0009
<i>xal1-2</i> vs. 3.2.16 He	ns	0.071
3.2.10 Ho vs. 3.2.16 He	ns	0.6823

Figura 16. Tamaño de las células completamente alargadas. (A) Promedio del tamaño de las células del córtex de plantas WT, *xal1-2*, *35SamiGO RBR*, *xal1-2/35SamiGO RBR* (Ho 3.2.10) y *xal1-2/35SamiGO RBR* (He 3.2.16) (n=30 células por 10 plantas por línea) de 7 dps. Se midieron 30 células y promedió a partir de 10 células del cortex después del primer pelo. (B) Tabla con las comparaciones múltiples entre plantas con la prueba estadística de Tukey, donde se observa que las únicas plantas que tienen una diferencia no significativa son las plantas *xal1-2* con la línea heterocigota 3.2.16 (**P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001).

Se realizaron los análisis de la zona de diferenciación, al igual que los que se habían realizado en la línea 2.1.8.1.1 y en la Figura 16 podemos observar que el tamaño de las células completamente alargadas no es igual entre las dos líneas dobles mutantes 3.2.10 y 2.8.4.1.1 al comparar con la Figura 13. No se puede determinar si la línea homocigota 3.2.10 es más parecida a la mutante *xal1-2* como lo era la línea 2.8.4.1.1 ya que hay mucha diferencia en el tamaño de las células completamente alargadas probablemente debido a que en ésta línea las concentraciones de RBR podrían estar variando o que las condiciones de la cámara fueron diferentes; además de que entre ambos experimentos, la zona que se ve afectada entre la WT y la mutante de *RBR*, además de las células completamente alargadas, es también el tamaño de la zona de elongación; sería necesario repetir el experimento creciendo todas las líneas al mismo tiempo.

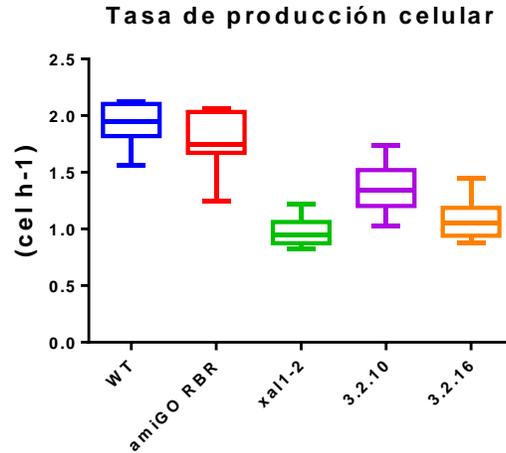
A partir de los análisis del tamaño de las células del cortex a lo largo de la raíz se realizó la

determinación de la duración del ciclo celular y la tasa de producción celular (Figura 17) de acuerdo a los cálculos realizados por Ivanov y Dubrovsky (1997).



A

Prueba de comparaciones múltiples de Dunn		Valor P
WT vs. amiGO RBR	ns	> 0.9999
WT vs. xal1-2	ns	> 0.9999
WT vs. 3.2.10	ns	> 0.9999
WT vs. 3.2.16	ns	> 0.9999
amiGO RBR vs. xal1-2	ns	0.8497
amiGO RBR vs. 3.2.10	ns	> 0.9999
amiGO RBR vs. 3.2.16	ns	> 0.9999
xal1-2 vs. 3.2.10	ns	> 0.9999
xal1-2 vs. 3.2.16	ns	> 0.9999
3.2.10 vs. 3.2.16	ns	> 0.9999



B

Prueba de comparaciones múltiples de Dunn		Valor P
WT vs. amiGO RBR	ns	> 0.9999
WT vs. xal1-2	****	< 0.0001
WT vs. 3.2.10	ns	0.068
WT vs. 3.2.16	***	0.0002
amiGO RBR vs. xal1-2	***	0.0001
amiGO RBR vs. 3.2.10	ns	0.393
amiGO RBR vs. 3.2.16	**	0.002
xal1-2 vs. 3.2.10	ns	0.2141
xal1-2 vs. 3.2.16	ns	> 0.9999
3.2.10 vs. 3.2.16	ns	> 0.9999

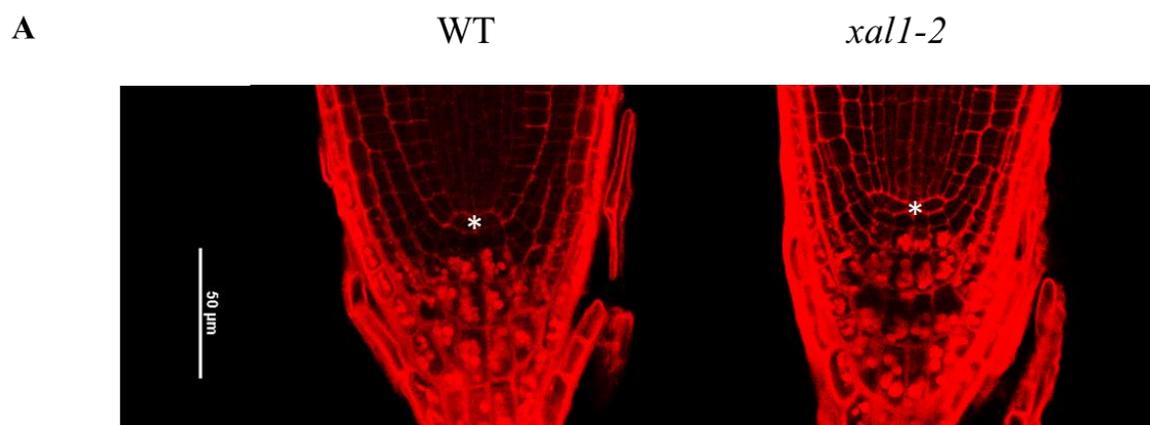
Figura 17. Duración del ciclo celular y tasa de producción celular. (A) Duración del ciclo celular (T) de las plantas WT, *35SamiGO RBR*, *xal1-2*, cruce homocigota 3.2.10 y cruce heterocigota 3.2.16 ($n=10$) calculado con la ecuación $T=(\ln 2 N_m l_e)V^{-1}$ (N_m = número de células meristemáticas, l_e = tamaño de células completamente alargadas, V =tasa de crecimiento calculado con los $\mu\text{m h}^{-1}$ entre el día 6 y 7 pos-siembra). No hubo diferencia significativa usando la prueba de comparaciones múltiples de Dunn entre la duración de las diferentes líneas. B. Tasa de producción celular calculada con V/l_e , donde si hay diferencias significativas entre las líneas utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (Tapia-López *et al.*, 2008).

Contrario a lo reportado por Tapia-López *et al.*, (2008) no encontramos diferencias significativas en la duración del ciclo celular en la mutante *xal1-2* ni en ninguna de las otras líneas de plantas con las que trabajamos. Sin embargo, *xal1-2* tiene una tasa más baja de

producción celular que concuerda con lo reportado previamente, por lo que si hay una alteración (Tápia-López *et al.*, 2008) y la cruza homocigota 3.2.10 y la heterocigota 3.2.16 presentan una tasa intermedia de producción celular que esta entre la que presentan las líneas parentales. Esto concuerda con los datos anteriores obtenidos de tamaño y número de células del dominio de proliferación; es decir, que la ausencia de *RBR* permite que haya una mayor tasa de producción celular aun en fondo *xall-2*, aunque no es suficiente para recuperarla completamente.

Organización del Nicho de Células Troncales

Se analizó la organización del nicho de células troncales (NCT), ya que tanto la mutante de *RBR* como la de *xall-2* presentan desarreglos en el mismo; se ha documentado que las plantas mutantes de *RBR* (*35SamiGO RBR*) dan origen a un NCT desarreglado, a un aumento y desarreglo en el número de células iniciales de columela y a alteraciones en la división celular asimétrica (Wildwater *et al.*, 2005; Cruz- Ramírez, *et al.*, 2012; Cruz- Ramírez, *et al.*, 2013; Desvoves *et al.*, 2013; Figura18B). Por otro lado, la mutante *xall-2* presenta también alteraciones en un 30% de las plantas en la organización del centro quiescente y en las células de la columela (Tápia-López *et al.*, 2008), en el otro 70% de las plantas el NCT se encuentra muy organizado, como se observa en la Figura 18A.



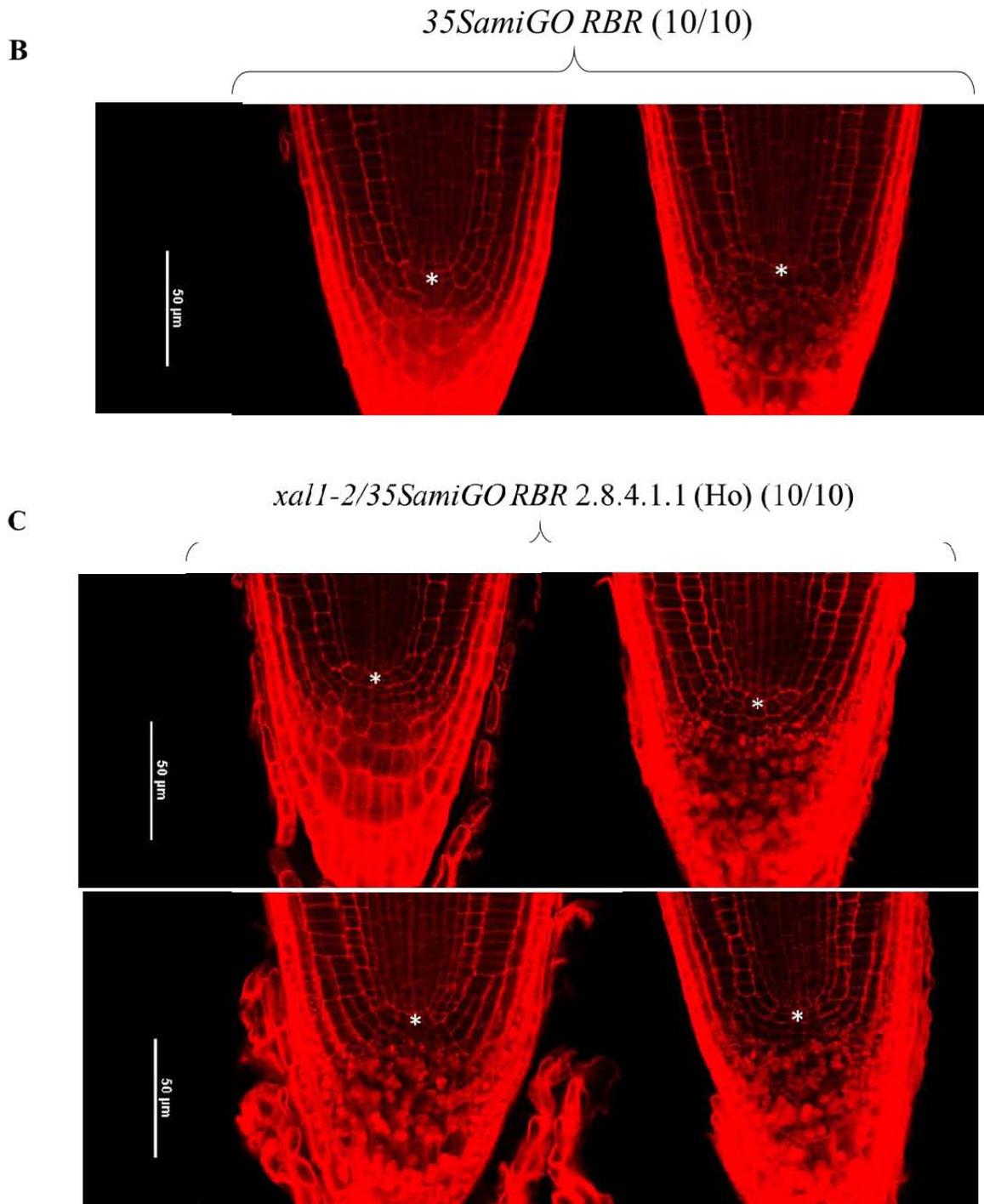


Figura 18. Microscopía confocal del nicho de células troncales. Organización de NCT de (A) plantas WT y *xal1-2*, (B) *35SamiGO RBR* y (C) cruce *xal1-2/35SamiGO RBR* (2.8.4.1.1) de 7dps. Las plantas están teñidas con Yoduro de propidio para poder observar la organización del nicho de células troncales; el centro quiescente se encuentra marcado

con un asterisco blanco. Escala 50µm, n=10.

Podemos observar en la Figura 18 los NCT de las diferentes líneas y el muy notorio fenotipo de desorganización de la línea *35SamiGO RBR* (Figura 18B), especialmente en las células de la columela. Este fenotipo se conserva en la línea de *xal1-2/35SamiGO RBR* (2.8.4.1.1) (Figura 18C), por lo cual el efecto de la ausencia parcial de Retinoblastoma es más fuerte que el efecto de la ausencia de *XALI*, a pesar de que en las otras zonas de la raíz encontramos un fenotipo intermedio.

En animales se ha determinado a pRb como un componente que también está involucrado en el NCT de diferentes células madres como son las células madre mesenquimales, hematopoyéticas, neurales, intestinales, etc., (Sage, 2012); esta participación con células madre podría ser una función conservada también en el NCT de plantas. Este resultado nos sugiere que *RBR* tiene un efecto dominante en el control de la división de las células iniciales y de las células del centro quiescente mientras que *XALI* lo tiene en el proceso de diferenciación de la raíz primaria de Arabidopsis, de acuerdo a los resultados anteriormente mencionados de la zona de diferenciación.

Se analizó la organización del NCT tanto para la línea homocigota 3.2.10 como para las líneas heterocigotas 2.4.1 y 3.2.16 (ver anexo Figura A7) y encontramos que el desarreglo del NCT que presentan las plantas *35SamiGO RBR*, se encuentra conservado en las plantas heterocigotas (2.4.1 y 3.2.16). Esto sugiere que la disminución de la concentración de *RBR* en las heterocigotas es suficiente para que haya un desarreglo y que *RBR* es muy importante para mantener la organización del NCT. Por otro lado, la línea homocigota 3.2.10 presenta diversos fenotipos, 50% de las plantas no tiene el fenotipo del desarreglo tan marcado (Figura A7), y no sabemos bien a que se pueda deber, sería necesario realizar una tercera cruce, pero a pesar de esta diferencia entre ambas líneas homocigotas en esta característica, los fenotipos de tamaños celulares y de la raíz primaria son resultados que repiten en ambas líneas.

A partir de todos los análisis de cinéticas de crecimiento y cuantificaciones de las zonas de desarrollo que se hicieron con las diferentes líneas con las que hemos trabajado: WT, *xal1-2*, *35SamiGO RBR* y las cruces 2.8.4.1.1 y 3.2.10 podemos concluir varias cosas. Todas las

líneas que presentan el sistema de silenciamiento de RBR (*35SamiGO RBR*, cruza homocigotas y heterocigotas) tienen el NCT desordenado, lo que indica que Retinoblastoma tiene un papel importante en la red que regula la arquitectura de este nicho. La mutante sencilla de *RBR* (*35SamiGO RBR; rbr/rbr*) se comporta igual que la planta WT en el tamaño del RAM, el número de células en el dominio de proliferación y en la tasa de producción celular. Lo anterior sugiere que su papel en la arquitectura de la red de la proliferación celular, específicamente en el dominio de proliferación, no se altera, lo cual coincide con algunos datos donde reportan que las mutantes poseen algunos fenotipos igual a la WT (Wildwater et al., 2005). En contraste observamos que es suficiente con abatir la expresión de *XAL1* para alterar la tasa de producción celular y los resultados de la doble mutante (*xal1-2/35SamiGORBR*) los cuales son intermedios a las parentales, indican que la ausencia de *RBR* no es capaz de recuperar esta tasa. Es decir, que la ausencia de *XAL1* es determinante en la arquitectura de la red que controla el dominio de proliferación.

Respecto a las observaciones y análisis, en la zona de diferenciación (al medir las células completamente alargadas) también se puede observar que las plantas *35SamiGO RBR* en ocasiones presentan raíces más cortas a lo ya reportado: raíces más largas en Perilli et al., 2013 e iguales a la WT (Wildwater et al., 2005). Las células completamente alargadas de las plantas *35SamiGO RBR* pueden ser más cortas, iguales o más largas que las de las plantas WT lo cual afecta el tamaño final de las raíces. Esta discrepancia en el tamaño final de las células completamente alargadas se puede deber a cambios ambientales que no controlamos dentro de las cámaras de crecimiento. Con estos datos se puede concluir que la zona de diferenciación es menos robusta que la zona de proliferación.

Análisis de expresión a lo largo de la raíz

Para analizar la interacción entre *XAL1* y *RBR* y si hay algún cambio en la zona de expresión o de localización de la proteína, se hicieron cruza de plantas que contienen al promotor de *XAL1* fusionado al gen reportero de GUS con mutantes de pérdida de función de *RBR* (*35SamiGO RBR*). Por otro lado, se cruzaron plantas de la mutante de pérdida de función de *XAL1* (*xal1-2*) con una línea que contiene el promotor y la secuencia codificadora de *RBR* fusionado a la proteína fluorescente de GFP (*pRBRgRBR-GFP*) (Magyar et al., 2012).

Como se puede ver en la Figura 19, no hay diferencias en la expresión de GFP entre la planta reportera de RBR (*pRBRgRBR-GFP*) en fondo WT y las plantas *xal-2*; además no se observaron cambios en las diferentes zonas de la raíz, como en la zona de diferenciación. Aún cuando los núcleos parecen verse más grandes en el fondo *xal1-2* y más condensados en el fondo WT (Figura 19), esto podría deberse a que las plantas *xal1-2* tienen un ciclo celular más corto, por lo tanto, la cromatina no se encuentra tan condensada, como en aquellas células que se están dividiendo menos frecuentemente. Tampoco se observa a simple vista una diferencia en la intensidad del GFP, la cual esperábamos fuera menor, ya que en las cuantificaciones por tiempo real la expresión de *RBR* baja en la mutante de *xal1-2* (ver Figura 7).

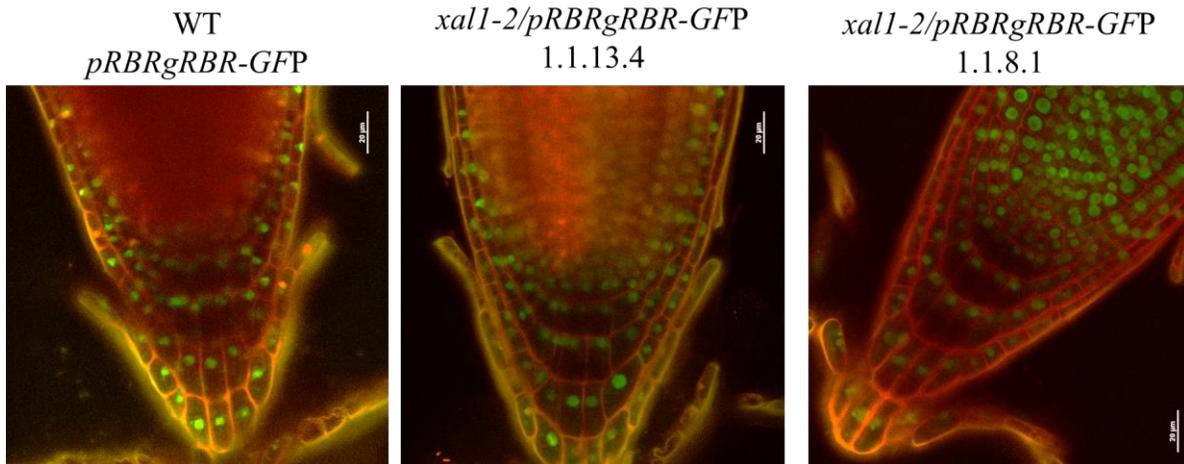


Figura 19. Localización de la proteína de RBR. Zona de meristemas donde se encuentra NCT y columela de plantas con el marcador de *pRBRgRBR-GFP* en fondo WT y fondo *xal1-2* (1.1.13.4 y 1.1.8.1 homocigotas) observadas en microscopio confocal a 7dps con objetivo 10X más un aumento 3.46X, teñidas con Yoduro de propidio. Escala 20µm; n=3.

También se hicieron análisis de plantas, producto de las cruces de plantas mutantes de pérdida de función de *RBR* con el marcador transcripcional de *XAL1* (*AGL12-GUS/35S::amiGO RBR*) (Figuras 20 y A8). Tampoco se observa a simple vista una diferencia en la intensidad de la tinción de GUS entre ambos fondos genéticos. Sin embargo, estos resultados se tienen que repetir ya que observamos diferentes intensidades de tinción tanto en las líneas de las cruces como en el control (Figura A8).

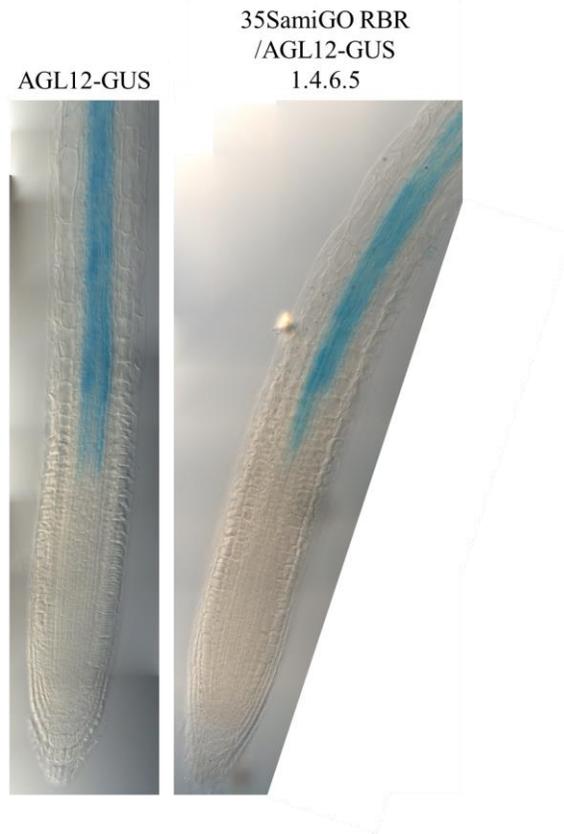


Figura 20, Expresión de *XAL1* en fondo mutante de *RBR*. Raíces teñidas de 7dps con la construcción transcripcional del promotor de *AGL12* (*XAL1*) fusionado a β -glucuronidase (GUS) en fondo WT (izquierda) y en fondo de pérdida de función de *RBR* (*35SamiGO RBR*) (derecha).

Participación de un bHLH tipo MyoD

Se analizaron diferentes bases de datos y algoritmos para buscar a un bHLH que pudiera ser candidato para tener la función de *MyoD* en plantas. Lo primero que se hizo fue hacer una lista de los bHLH's de Arabidopsis encontrados en TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) para ver la correlación de expresión de estos genes con *XAL1* usando tres diferentes programas:

1) Se utilizó el programa ATCOECIS (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/ATCOECIS/>), que predice cuales son los genes que se expresan de manera similar a otro gen, lo cual muchas veces quiere decir que comparten funciones o que uno está siendo regulado por el otro. Este análisis de datos de coexpresión de genes de un compendio de microarreglos (Vanderpoele *et al.*, 2009) incluye la expresión de genes tanto de parte aérea como de raíz por lo que muchos de los bHLH's encontrados con este programa no coincidían con los de otras bases de datos que se mencionarán más adelante (anexo Figura A9) y, por lo tanto, no se tomaron en consideración.

2) También se analizó la red de inferencia creada por el algoritmo de ARACNe que permite identificar la probabilidad de que un gen se regule de manera parecida a otro gen; en este caso, también se utilizaron los datos de los experimentos de microarreglos incluyendo los de *XAL1* en raíz (Chavez-Montes *et al.*, 2014). Para acotar los genes que pueden estar funcionando como MyoD en plantas, se utilizó una lista de genes que, de manera experimental, se expresen en raíz (mediante qRT-PCR, proteómica, RNA seq, Plant Ontology 2012).

3) El último análisis de coexpresión con *XAL1* en raíz se realizó por el Dr. José Davila Velderrain a partir de datos de RNAseq (Huang y Schiefelbein, 2015) con todos los bHLH's de Arabidopsis encontrados en TAIR. Ésta base de datos nos da las diferentes correlaciones de bHLH's de manera positiva y negativa y su nivel de significancia ($P < 0.05$ y $P < 0.01$) (ver anexo Figura A10).

4) Por otro lado, se hizo un BLAST de la secuencia de amino ácidos de *MyoD* de humanos contra la base de datos de Arabidopsis y se encontraron algunos bHLH's que se alinearon de manera aleatoria, no se observaron dominios específicos.

5) Finalmente, se revisó un microarreglo experimental de *xal1-2* generado anteriormente en el laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas y analizado por la Dra. Yamel Ugartechea Chirino. Con estos datos se encontró un bHLH (*AT1G05710*) que tiene una expresión significativamente diferente entre WT y en *xal1-2*; sin embargo, solo se sabe de este gen que se encuentra involucrado en la vía de respuesta a etileno y no se encontró en ninguno de los otros análisis.

Usando los datos obtenidos con los diferentes métodos de análisis (datos experimentales, ARACNe, RNA seq de raíz y el microarreglo de *XAL1*) se buscaron los bHLH's que se compartieran en dos o más de los análisis que se llevaron a cabo (Fig. 21 y A9)

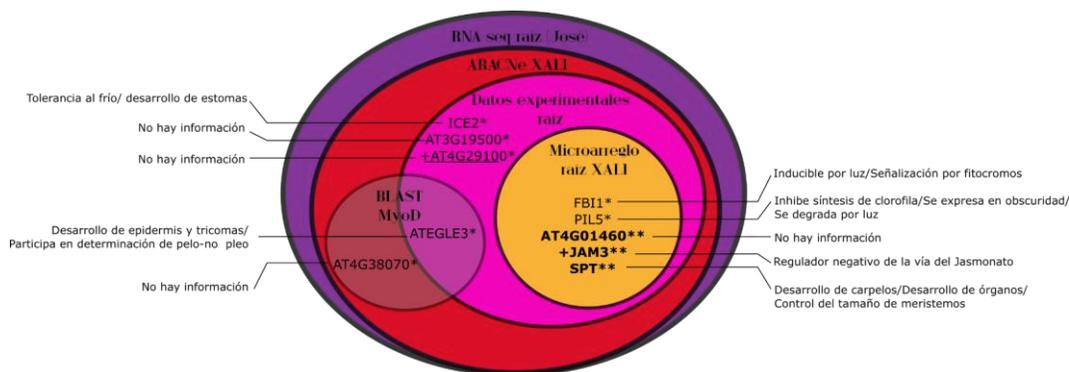


Fig. 21. Genes compartidos entre las diferentes bases de datos y con el análisis de BLAST para encontrar un bHLH. En morado está representada la base de datos de RNA seq de raíz de *Arabidopsis*, en rojo la base de datos ARACNe de *XAL1*, en rosa datos experimentales de raíz y en amarillo los datos de microarreglo de *XAL1* en raíz de *Arabidopsis*. Los genes marcados con un signo (+) significa que se encuentran correlacionados de manera positiva y *= $P < 0.05$ y **= $P < 0.01$ en la red de RNAseq.

Para delimitar cuáles pueden ser los candidatos bHLH que pudieran tener la misma función de *MyoD* en plantas, se buscó en la literatura cuáles son los papeles en los que participa cada uno de los genes encontrados en la mayoría de las bases de datos. Como se puede ver en la Figura 21, uno de los principales candidatos es *JAM3*, ya que se encuentra en datos experimentales de raíz, en el microarreglo de *XAL1* y se encuentra correlacionado en las redes de ARACNe y RNAseq con una probabilidad muy alta ($P < 0.01$). Además, tiene un asa de regulación positiva con *XAL1* y esto es muy importante ya que *MyoD* la tiene con *MEF2C*, donde *MyoD* es un regulador transcripcional positivo de *MEF2C* y viceversa (Wang *et al.*, 2001). Finalmente, se sabe que *JAM3* es un regulador negativo de factores de transcripción que participan en la vía de señalización del jasmonato (Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2013). Nos parece interesante haber encontrado a *JAM3* ya que se sabe que el jasmonato participa en el desarrollo de la raíz primaria reduciendo el tamaño del meristemo y el de la raíz primaria cuando es aplicado al medio (Chen *et al.*, 2011) parecido a lo que ocurre en la mutante de *XAL1*.

Hay otros dos genes, *AT4G011460* y *SPATULA (SPT)*, que se encuentran en las mismas bases de datos con una $P < 0.01$ pero que no tienen una correlación positiva con *XAL1*. Aunque no se sabe nada de la función del gen *AT4G011460* si está reportado que *SPT* participa en el desarrollo del carpelo y también que está involucrado en restringir la zona meristemática de los primordios de hoja y cotiledones. Por otro lado, se ha demostrado en raíz que *SPT* es un regulador del tamaño del centro quiescente y del meristemo, aunque todavía no se sabe la manera exacta en que regula esto (Makkena y Lamb, 2013).

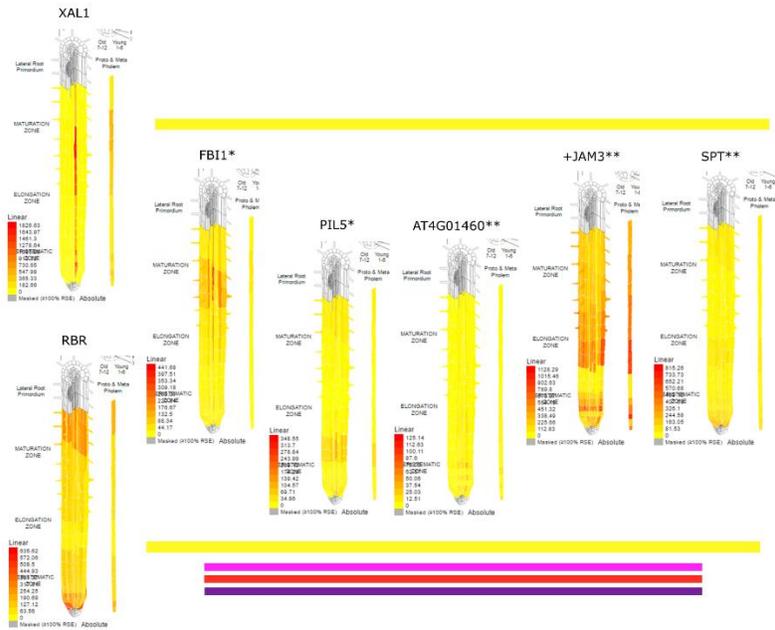
Otros genes que se encuentran en las mismas bases de datos que los genes anteriormente mencionados, pero con una $P < 0.05$ son *FBII (LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED)* y *PIL5 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 5)*. Las proteínas codificadas por estos genes participan en procesos de desarrollo del fotoperíodo, siendo uno inducido y otro degradado por luz respectivamente (Fankhauser y Chory, 2000; Oh *et al.*, 2003).

Además, se encontraron tres genes presentes en raíz de manera experimental y en los análisis de ARACNe y de RNAseq con una $P < 0.05$ (*ICE2/SCREAM2*, *AT3G19500*, *AT4G2900*). Uno de ellos (*AT4G29100*) se correlaciona de manera positiva con *XAL1* y en ARACNe la

correlación es muy cercana. De *AT3G19500* no hay información y del gen *ICE2 (NDUCER OF CBF EXPRESSION2)* se sabe que es un FT involucrado en la tolerancia al frío, pero principalmente se conoce su papel para determinar el proceso sucesivo de iniciación, proliferación y diferenciación terminal de los estomas (Kanaoka *et al.*, 2008). Este gen tiene una función en estomas parecida a la que tienen algunos bHLH's de tipo MRF en los diferentes pasos de la diferenciación de la miogénesis de animales (Putarjunan y Torii, 2016). Finalmente, cuando se realizó el BLAST de *MyoD* de humanos para ver bHLH's cercanos de plantas, se encontraron dos, uno cuya función no se conoce y que se halló en los análisis de ARACNe y de RNAseq (*AT4G38070*) y otro que se encontraba en ARACNe, RNAseq y datos experimentales (*ATEGLE3; ENHANCER OF GLABRA3*) que tiene un papel en el desarrollo de la epidermis como regulador del desarrollo de tricomas y de pelos de forma redundante con su homólogo GL3 (*GLABRA 3*) (Grebe, 2012; Schellmann y Hülskamp M, 2005)

Debido a las funciones que tienen algunos de los candidatos de bHLH's en el desarrollo y a su correlación con la expresión de *XAL1*, se seleccionaron cinco para su posterior análisis: *JAM3*, *SPT*, *ICE2*, *AT4G29100* y *ATEGLE3*. También se realizó un análisis de la expresión de estos factores de transcripción a lo largo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* con el programa ePLANT de The Bio-Analytic Resource for Plant Biology (<https://bar.utoronto.ca/>), y se compararon visualmente con la expresión espacial a lo largo de las diferentes zonas en raíz de *XAL1* y *RBR* (Figura 22).

A



C

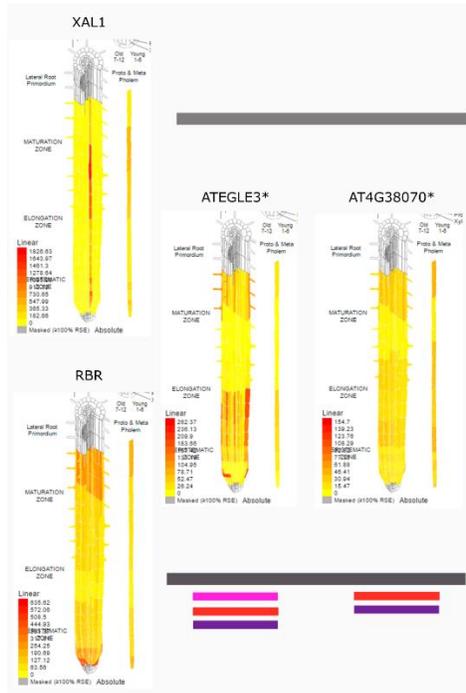


Figura 22. Patrón de expresión de *XAL1*, *RBR* y los diferentes genes de las diferentes bases de datos. Patrón de *RBR* y *XAL1* y (A) *FB1*, *PIL5*, *AT4G011460*, *JAM3* y *SPT*, (B) *ICE2*, *AT3G19500* y *AT4G29100* y (C) *ATEGL3* y *AT4G38070*. Las Bases de datos en las que se encontraron se encuentran determinada por colores: amarillo=microarreglo; rosa=datos experimentales; rojo=ARACNe; morado=RNAseq, gris=BASTA. Las raíces que se encuentran en medio de *XAL1* y *RBR* quiere decir que tienen un patrón de expresión que no se parece al que presentan estos dos genes mientras que las que tienen una orientación hacia arriba o hacia abajo quiere decir que tienen un patrón relativamente parecido a *XAL1* y *RBR*, respectivamente.

Se puede ver en la Figura 22, de los diez genes seleccionados, seis no tienen un patrón de expresión parecido con *XAL1* y *RBR*. De los otros cuatro, tres (*PIL5*, *AT4G01460* y *AT3G19500*) se parecen a la expresión que presenta el gen *RBR* mientras que *AT4G29100* tiene un patrón de expresión parecido al de *XAL1* por lo que podría ser un candidato para

llevar a cabo las funciones de MyoD en plantas, aunque se desconozcan sus funciones en *Arabidopsis*.

Por otro lado, se analizó el árbol filogenético de los FT bHLHs realizado en Stevens, *et al.*, (2008) y se encontró únicamente un bHLH de plantas dentro del subclado donde se encuentran los MRFs. Este bHLH se llama *BES1-INTERACTING MYC-LIKE 1 (BIM1)* y únicamente se ha estudiado su función en la vía de transducción de señales de Brasinoesteroides, donde se encuentra involucrado (Yin *et al.*, 2005; Chandler *et al.*, 2009; Xing *et al.*, 2013). Dentro del clado C, mostrado en este mismo análisis, donde se encuentra el subclado de los MRFs, también se encuentran otros bHLHs de plantas que se encontraron en las bases de datos analizados, éstos fueron: *ICE2*, *FBI* y *PIL5*. Mientras que de los demás bHLHs escogidos *JAM3* y *ATEGL3* se encuentran en el clado B y *AT4G29100* en el clado E. No hay ningún gen candidato en el clado F, que es único de bHLHs específicos de plantas; todos los bHLHs seleccionados se encuentran dentro de clados compartidos con bHLHs de otros organismos (Stevens *et al.*, 2008).

Para ver si alguno de los bHLHs candidatos (*BIM1*, *SPT*, *ICE2*, *JAM3*, *ATEGL3*, *AT4G29100*) podría estar siendo regulado por *XAL1* al igual que *MEF2C* regula a *MyoD*, se evaluaron los niveles de transcrito de estos genes mediante qRT-PCR comparando plantas WT con plantas de pérdida de función de *XAL1* (*xal1-2*) (Figura 23).

Los genes normalizadores tuvieron niveles constantes de expresión en los distintos genotipos (Figura 23A). Se usaron las plantas de la línea de pérdida de función de *XAL1* (*xal1-2*). Se observó que *XAL1* es un regulador positivo de manera significativa de los siguientes FT tipo bHLH: *BIM1* ya que en el genotipo *xal1-2* los niveles de transcrito son menores en un 18% (Figura 23B); *AT4G29100* cuyos transcritos son menores en un 42% (Figura 23C); *ATEGL3* cuyos transcritos son menores en un 35% (Figura 23D); y *JAM3* cuyos transcritos bajan un 13% (Figura 23F). Los niveles de expresión de *ICE2* y *SPT* no varían en ninguno de los genotipos (Figura 23E y G).

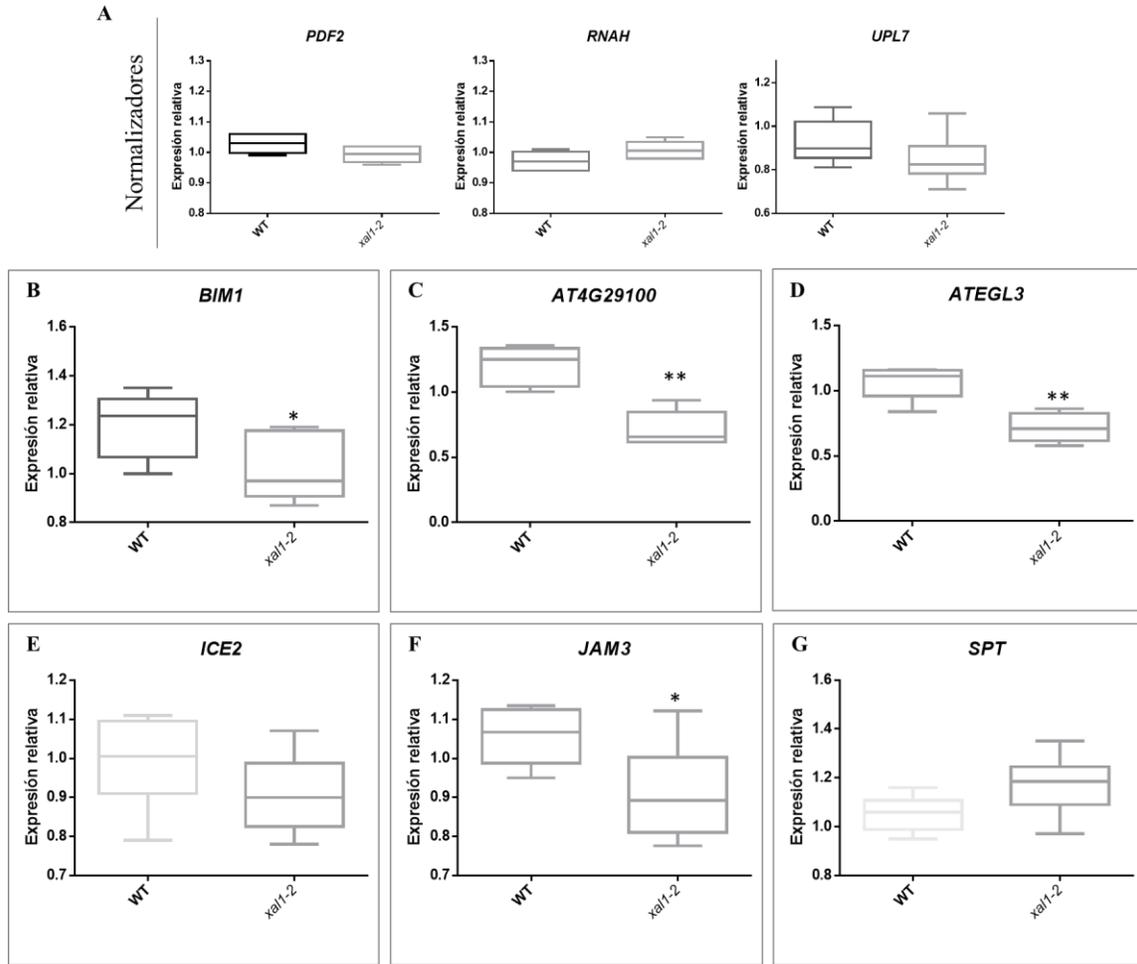


Figura 23. Expresión de bHLHs en fondo mutante de *XAL1*. Expresión relativa de tres normalizadores (A) *PDF2*, *RNAH*, *UPL7* y de varios bHLHs: (B) *BIM1*, (C) *AT4G29100*, (D) *EGL3*, (E) *ICE2*, (F) *JAM3* y (G) *SPT* en los fondos WT y *xal1-2*. n=6, *p<0.05 y **p<0.01. Los análisis estadísticos se realizaron usando pruebas no paramétricas (Mann-Whitney) comparando WT contra la mutante de *xal1-2* en cada caso.

De acuerdo a los resultados de la Figura 23, se puede ver que *XAL1* es un regulador positivo de varios bHLHs, incluyendo a *JAM3*. Esto abre la posibilidad de que este bHLH se encuentre en la misma red de regulación del tamaño del meristemo junto con *XAL1* y que haya un entrecruzamiento entre las vías de las auxinas y el jasmonato (por estar regulando a estos dos genes respectivamente), o que *XAL1* se encuentre regulando de manera directa algún punto de la vía del jasmonato y que la mutante tenga más jasmonato y, por lo tanto, raíces más cortas. Otra característica que hace que *JAM3* sea un buen candidato es que se expresa en

toda la raíz, como puede observar en la Figura 22.

Por otro lado, resulta interesante que *BIMI*, el bHLH que se encuentra dentro del subclado junto con los MRFs de animales, también es regulado de manera positiva por *XALI*, aunque la diferencia no fue tan significativa como con otros bHLHs. Otro gen regulado positivamente por *XALI* es *ATEGL3*, el cual se encuentra dentro de la red de regulación que determina que las células de la epidermis generen o no un pelo, y que a su vez se ha visto que algunos componentes para el desarrollo de tricomas, como los FT *GLI* (*GLABRA 1*) y *GL3* podrían regular la expresión de *RBR* (Morohashi y Grotewold, 2009), por lo que lo hace un buen candidato a tener la función de MyoD en plantas y sería interesante ver si en las mutantes de *xal1-2* existen algunas alteraciones en la organización de los pelos. Finalmente, el último candidato que también se regula de manera positiva por *XALI* es *AT4G29100*, es interesante que tiene un patrón de expresión muy parecido al de *XALI*; sin embargo, este es un gen que no ha sido estudiado y del cual se desconocen sus funciones.

Para poder seguir seleccionando cuál de estos cuatro candidatos *BIMI*, *JAM3*, *ATEGL3* y *AT4G29100* pudiera llevar a cabo las funciones de MyoD de los animales, se hicieron análisis de expresión, por medio de qRT-PCR, en fondo de pérdida de función de *RBR*, ya que se ha visto en animales que pRb es importante para la activación de *MyoD* (De Falco *et al.*, 2006) y podría ser posible que también para su expresión lo cual aún no se sabe en animales.

En estos qRT-PCRs, los genes normalizadores tuvieron niveles constantes de expresión en los distintos genotipos (Figura 24A). Se usaron las plantas de la línea de pérdida de función de *RBR* (*35SamiGO RBR*). Se observó que *RBR* es un regulador negativo de manera significativa de los dos siguientes FT tipo bHLH: *AT4G29100*, ya que en el genotipo *35SamiGO RBR* los niveles de transcrito son mayores en un 23% (Figura 24B); y *JAM3* cuyos transcritos son mayores en un 11% (Figura 24E). Los niveles de expresión de *BIM1* y *ATEGL3* no varían en ninguno de los genotipos (Figura 24C y D).

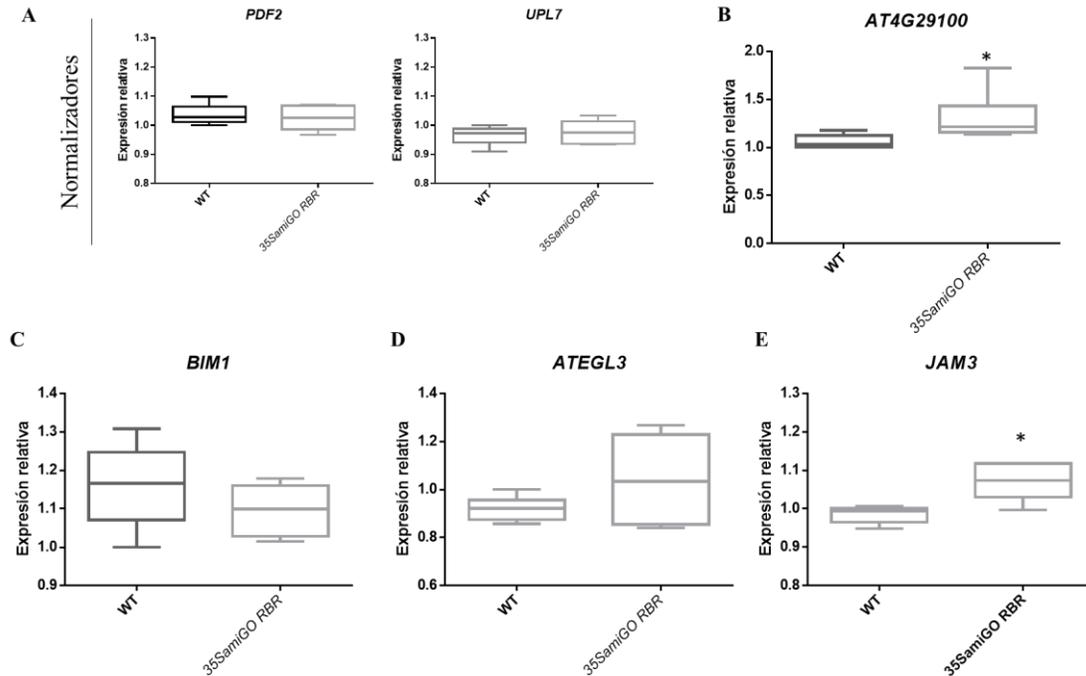


Figura 24. Expresión de *bHLHs* en fondo mutante de *RBR*. Expresión relativa de dos normalizadores (A) *PDF2* y *UPL7*; y de varios *bHLHs*: (B) *AT4G29100*, (C) *BIM1*, (D) *ATEGL3*, (E) *JAM3* en los fondos WT y *35S::amiGO RBR*. n=6, *p<0.05. Los análisis estadísticos se realizaron usando pruebas no paramétricas (Mann-Whitney) comparando WT contra la mutante *35S::amiGO RBR* en cada caso.

El papel de regulador negativo de RBR sobre de *JAM3* y *AT4G29100* (Figura 24B y E), se puede explicar ya que *RBR* es un regulador negativo de *XAL1* el cual es, a su vez, un regulador positivo de estos genes (ver Figura 23).

Gracias a estos todos estos datos tenemos ya dos candidatos que podrían tener en plantas la función de MyoD en conjunto con RBR y el MADS-box, *XAL1*, uno involucrado en la vía del jasmonato, la cual está relacionada con el control de la proliferación (*JAM3*) y otro con una expresión similar a la de *XAL1* en el cilindro vascular (*AT4G29100*).

Recientemente Zhao *et al.*, (2017) analizaron la participación de *RBR* en la diferenciación del sistema vascular, específicamente del xilema, mediante la interacción con el regulador negativo de la diferenciación del xilema: *XYLEM NAC DOMAIN1 (XND1)*. Debido a que

AT4G29100 tiene una alta expresión en el sistema vascular, sería interesante ver si este gen participa en procesos de proliferación y diferenciación del sistema vascular y, a más largo plazo, tratar de demostrar si este bHLH podría fungir el papel de *MyoD* en animales.

Debido a que, se ha visto que *MyoD* activa la expresión de *RB*, aunque no se sabe si es de manera directa (De Santa *et al.*, 2007), y que, teóricamente por análisis de datos de ENCODE (Encyclopedia Of DNA Elements), *MyoD* se podría unir al promotor y a los enhancers intrónicos del gen de *RB* (Singh y Dilworth, 2013), en el futuro se podría ver si en el fondo mutante de ambos bHLHs (*JAM3* y *AT4G29100*) se altera la expresión de *RBR*.

Participación del jasmonato en la vía de *XAL1* y *RBR*.

Es interesante que uno de los genes involucrados con *XAL1* y *RBR*, es un regulador negativo de la vía del Jasmonato que, como se mencionó anteriormente, es una hormona que influye de manera negativa en el desarrollo de la raíz primaria (Chen *et al.*, 2011). Por eso decidimos hacer un experimento del crecimiento de la raíz primaria con las diferentes líneas utilizando un inhibidor (ácido salicil hidroxámico; SHAM) de la vía del Jasmonato. SHAM es una molécula que inhibe a la lipooxigenasa que participa en la biosíntesis del jasmonato y que se ha usado para revertir los efectos que tiene esta hormona. Por ejemplo, el jasmonato inhibe la formación de pelos y este fenotipo se puede revertir usando 50 μM de SHAM (Zhu *et al.*, 2006). También se ha observado en raíces de girasol que la raíz primaria puede ser más larga que la WT a 250 μM de SHAM (Corti-Monzón *et al.*, 2012).

A partir de estos datos se crecieron las raíces de las diferentes líneas en medio con el inhibidor a diferentes concentraciones para hacer cinéticas de crecimiento y se obtuvieron los porcentajes de similitud con respecto a las WT a 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM y 250 μM de SHAM (Figura 25) y luego a 0.5 μM , 1 μM , 2 μM y 5 μM de SHAM (Figura 26). Nuestra hipótesis de trabajo es que si el fenotipo de raíz corta de *xal1-2* es debido a una mayor producción de jasmonato este efecto se va a alterar al inhibir la síntesis de jasmonato y veríamos raíces más largas.

En la Figura 25 se puede observar un diagrama de cajas que demuestra el tamaño de la raíz primaria en las diferentes concentraciones de SHAM (10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM y

250 μM), de las diferentes líneas celulares: WT, *35SamiGO RBR*, *xal1-2*, y las líneas homocigotas *xal1/xal1;rbr/rbr* (2.8.4.1.1 y 3.2.10). Como controles se crecieron las plantas en medio MS y en medio MS con DMSO, ya que el inhibidor de SHAM se encontraba disuelto en DMSO. Se hicieron además análisis de del porcentaje de similitud con respecto a las plantas WT en medio MS (Figura anexo A12). Se puede observar en ambos análisis que todas las líneas celulares tienen la misma tendencia de raíces más cortas a mayor concentración de SHAM, siendo la concentración de 250 μM la que más afecta el desarrollo de la raíz.

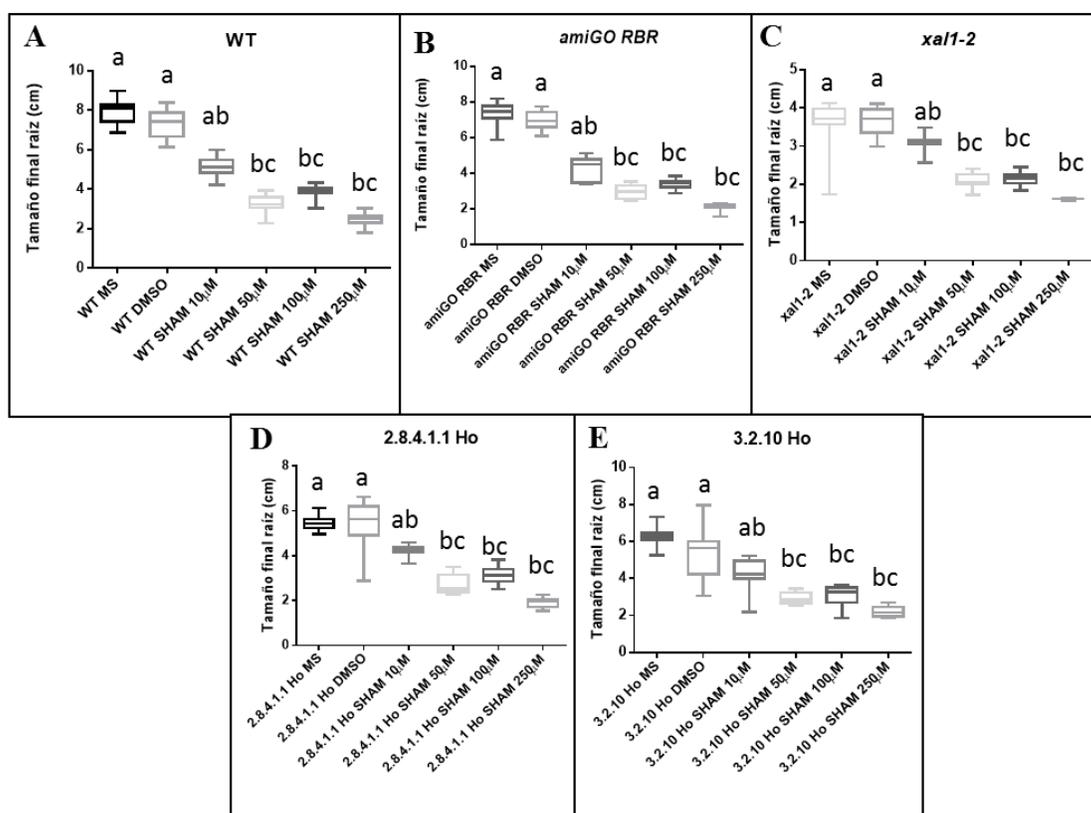


Figura 25. Efecto del inhibidor de SHAM (10, 50, 100 y 250 μM). A) Box Plots del tamaño final de la raíz primaria de una cinética de crecimiento de 8 dps, de plantas (A) WT, (B) *xal1-2*, (C) *35S::amiGO RBR*, y las cruces homocigotas (D) 2.8.4.1.1 y (E) 3.2.10 (n=11) en las diferentes concentraciones del inhibidor SHAM y un control de DMSO equivalente a la dosis más alta de SHAM 250 μM . P<0.05; prueba de comparación múltiple de Dunn.

Debido a que esperábamos observar raíces más largas al utilizar el inhibidor de jasmonato, decidimos utilizar concentraciones más bajas. En la Figura 26 se puede observar un diagrama de cajas que demuestra el tamaño de la raíz primaria en las diferentes concentraciones de SHAM (0.5 μ M, 1 μ M y 5 μ M), de las diferentes líneas celulares: WT, *35SamiGO RBR*, *xal1-2*, y las líneas homocigotas *xal1/xal1;rbr/rbr* (2.8.4.1.1 y 3.2.10). También como controles se crecieron las plantas en medio MS y en medio MS con DMSO. Se hicieron además análisis de del porcentaje de similitud con respecto a las plantas WT en medio MS, donde en las raíces de *xal1-2* a 0.5 μ M de SHAM las raíces fueron 20% más largas con respecto a las raíces de *xal1-2* en medio MS (Figura anexo A12). Se puede observar en ambos análisis que la única línea que presenta variaciones con respecto a las plantas WT en la línea homocigota *xal1/xal1;rbr/rbr* (2.8.4.1.1), donde las raíces crecidas a una concentración de 0.5 μ M de SHAM son significativamente más largas que las raíces que crecieron a una concentración de 5 μ M.

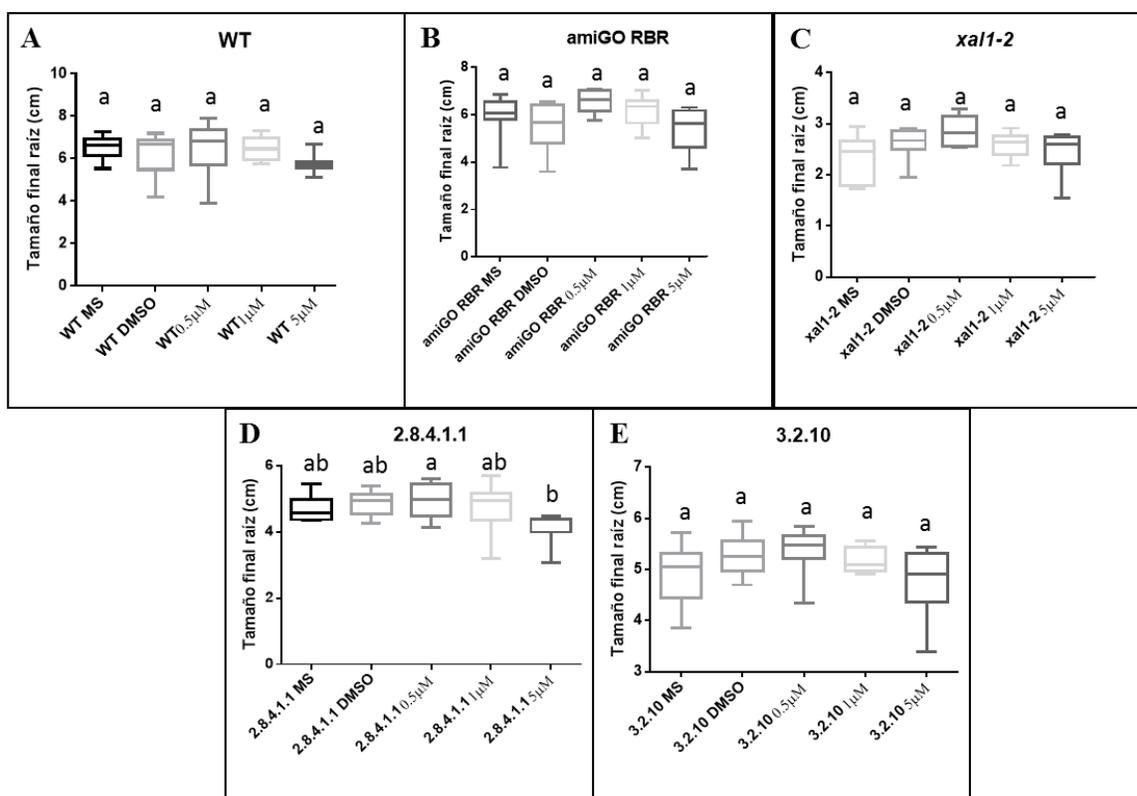


Figura 26. Efecto del inhibidor de SHAM (0.5, 1, y 5 μ M). Box Plots del tamaño final de la raíz primaria de una cinética de crecimiento de 8 dps de plantas (A) WT, (B) *xal1-2*, (C) *35S::amiGO RBR*, y las cruzas homocigotas (D) 2.8.4.1.1 y (E) 3.2.10 (n= 10) en las diferentes concentraciones del inhibidor SHAM y un control de DMSO equivalente a la dosis más alta de SHAM 5 μ M. P<0.05; prueba de comparación múltiple de Dunn.

En la Figura 25 se puede ver que, a concentraciones altas del inhibidor SHAM, hay una inhibición del crecimiento, contrario a lo que se esperaría, mientras que a concentraciones más bajas la diferencia entre la WT y las diferentes líneas celulares no es muy evidente (Figura 26 A, B, C, E), a excepción de la línea homocigota 2.8.4.1.1 (Figura 26D). A su vez visualmente parecería que a 0.5 μ M de SHAM también las raíces de *amiGO RBR* y *xal1-2* son más largas, aunque el SHAM se disuelve en DMSO y las plantas crecidas en este compuesto también presentan raíces un poco más largas.

Se deberán hacer experimentos con las concentraciones de DMSO que se usan para cada dilución de SHAM y en concentraciones de SHAM más bajas para ver si el efecto del jasmonato está relacionado a el desarrollo de la raíz a través de *XALI*.

CONCLUSIONES

XAL1 y *RBR* se encuentran juntos en una red multiestable de regulación del desarrollo donde *RBR* regula de manera negativa a *XAL1* y éste a su vez regula a *RBR* de manera positiva; ambos genes están involucrados en las decisiones de proliferación y diferenciación celular, donde *RBR* es un componente importante para mantener la organización del nicho de células troncales. *XAL1* es suficiente para cambiar el tamaño del meristemo de la raíz y en cuyas mutantes se ve el papel represor de *RBR*. Además de que existen dos candidatos de bHLH's que podrían tener un papel en la red, al igual que *MyoD* conformando una red similar a la de animales.

En este trabajo obtuvimos, tanto por análisis de expresión, como por algunos datos reportados en la literatura, una red de regulación muy similar a la que encontramos en animales (Figura 27) en donde están los componentes conservados: Retinoblastoma, genes MADS-box, FT bHLH, remodeladores de la cromatina y componentes del ciclo celular. Sugerimos que la red de regulación que subyace las decisiones entre proliferación y diferenciación celular podría estar conservada entre plantas y animales y conserva algunos componentes que tienen diferentes papeles de acuerdo a las posibles interacciones con otros elementos que delimitan las diferentes zonas de desarrollo.

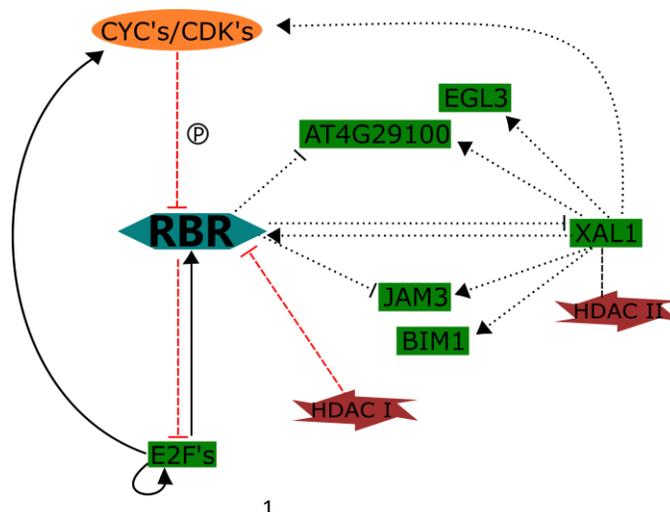


Figura 27. Red de regulación en plantas. Las líneas negras representan regulación transcripcional, las líneas puntuadas indican que no se ha demostrado si la regulación es directa, las líneas rojas representan interacción proteína-proteína. 1) Rossi *et al.*, 2003.

REFERENCIAS

1. Álvarez-Buylla, E.R., Pelaz, S., Liljegren, S.J., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., De Pouplana, L.R., Martínez-Castilla, L., Yanofsky, M.F. (2000a) An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5328–5333.
2. Álvarez-Buylla, E.R., Liljegren, S.J., Pelaz, S., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Vergara-Silva, F., Yanofsky, M.F. (2000b) MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J.* 24:457-466.
3. Baca-López, K., Mayorga, M., Hidalgo-Miranda, A., Gutiérrez-Nájera, N., Hernández-Lemus, E. (2012) The Role of Master Regulators in the Metabolic/Transcriptional Coupling in Breast Carcinomas. *PLoS One.* 7: e42678.
4. Badodi, S., Baruffaldi, F., Ganassi, M., Battini, R, Molinari, S. (2015) Phosphorylation-dependent degradation of MEF2C contributes to regulate G2/M transition. *Cell Cycle* 14:10, 1517-1528
5. Barrada, A., Montané, M. H., Robaglia, C., Menand, B. (2015) Spatial regulation of root growth: planning the plant TOR pathway in a developmental perspective. *Int. J. Mol. Sci.*, 16: 19671-19697
6. Benfey, P. N. y Scheres, B. (2000) Root development., *Curr. Biol.*, 10: R813-R815
7. Black, B. L., Molkentin, J. D., Olson, E. N., (1998) Multiple roles for the MyoD basic region in transmission of transcriptional activation signals and interaction with MEF2. *Mol Cell Biol.*, 18: 69–77
8. Borghi, L., Gutzat, R., Futterer, J., Laizet, Y., Hennig, L., Grisse, W. (2010) *Arabidopsis* RETINOBLASTOMA-RELATED is required for stem cell maintenance, cell differentiation, and lateral organ production. *Plant Cell* 22, 1792–1811.
9. Budirahardja, Y. y Gönczy, P. (2009) Coupling the cell cycle to development. *Develop.* 136: 28161-2872.
10. Burgeff, C., Liljegren, S.J., Tapia-López, R., Yanofsky, M.F., Álvarez-Buylla, E.R. (2002) MADS-box gene expression in lateral primordial, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* 214: 365-372.

11. Caldon, C.E. y Musgrove, E.A. (2010) Distinct and redundant functions of cyclin E1 and cyclin E2 in development and cancer. *Cell Div.* 17:2.
12. Canté-Barrett, K., Pieters, R., Meijerink, J.P.P. (2014) Myocyte enhancer factor 2C in hematopoiesis and leukemia. *Oncogene* 33, 403-410.
13. Chandler, J.W., Cole, M., Flier, A., Werr, W. (2009) BIM1, a bHLH protein involved in brassinosteroid signalling, controls *Arabidopsis* embryonic patterning via interaction with DORNROSCHEN and DORNROSCHEN-LIKE. *Plant Mol Biol.* 69:57-68.
14. Chávez-Montes, R.A., Coello, G., González-Aguilera, K.L., Marsch-Martínez, N., de Folter, S., Alvarez-Buylla, E.R. (2014) ARACNe-based inference, using curated microarray data, of *Arabidopsis thaliana* root transcriptional regulatory networks. *BMC Plant Biol.* 14. doi: 10.1186/1471-2229-14-97.
15. Chen, Q., Sun, J., Zhai, Q., Zhou, W., Qi, L., Xu, L., Wang, B., Chen, R., Jiang, H., Qi, J., Li, X., Palme, K., Li, C. (2011) The basic helix-loop-helix transcription factor MYC2 directly represses PLETHORA expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 23:3335-3352.
16. Chemes, L.B., Noval, M.G., Sánchez, I.E., de Prat-Gay, G. (2013) Folding of a cyclin box: linking multitarget binding to marginal stability, oligomerization, and aggregation of the retinoblastoma tumor suppressor AB pocket domain. *J Biol Chem.* 288:18923-18938.
17. Chevalier, C., Bourdon, M., Pirrello, J., Cheniclet, C., Gévaudant, Fb, Frangne, N. (2014) Endoreduplication and fruit growth in tomato: Evidence in favour of the karyoplasmic ratio theory. *J. Exp. Bot.*, 65:2731–2746
18. Chinnam, M., y Goodrich, D. W. (2011) RB1, Development, and Cancer. *Curr. Top. In Develop. Bio.*, 94: 129-169
19. Claudio, P.P., Tonini, T., Giordano, A. (2002) The retinoblastoma family: twins or distant cousins? *Genome Biol.*, 3: 3012.
20. Corti-Monzón, G.C., Pinedo M., Lamattina L., de la Canal, L. (2012) Sunflower root growth regulation: the role of jasmonic acid and its relation with auxins. *Plant Growth Regul* 66:129–136.
21. Cruz-Ramírez, A., Díaz-Triviño, S., Blilou, I., Grieneisen, V.A., Sozzani, R.,

- Zamioudis, C., Miskolczi, P., Nieuwland, J., Benjamins, R., Dhonukshe, P., Caballero-Pérez, J., Horvath, B., Long, Y., Mähönen, A.P., Zhang, H., Xu, J., Murray, J.A., Benfey, P.N., Bako, L., Marée, A.F., Scheres, B. (2012) A bistable circuit involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA integrates cues to inform asymmetric stem cell division. *Cell*. 150:1002-1015.
22. Cruz-Ramírez, A., Díaz-Triviño, S., Wachsman, G., Du, Y., Arteága-Vázquez, M., Zhang, H., Benjamins, R., Blilou, I., Neef, A. B., Chandler, V., Scheres, B. (2013) A SCARECROW-RETINOBLASTOMA protein network controls protective quiescence in the Arabidopsis root stem cell organizer. *PLoS Biol.*, 11: e1001724
23. Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., Scheible, W.R. (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139: 5–17.
24. De Falco, G., Comes, F., Simone, C. (2006) pRb:master of differentiation. Coupling irreversible cell cycle withdraw with induction of muscle-specific transcription. *Nature*, 25: 5244-5249
25. de Folter, S., y Angenent, G.C. (2006) trans meets cis in MADS science. *Trends Plant Sci.* 11:224-231.
26. Desvoyes, B., Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Chua, N. H., Gutierrez C. (2006) Cell Type-Specific Role of the Retinoblastoma/E2F Pathway during Arabidopsis Leaf Development. *Plant Physiol.*, 140: 67–80
27. Desvoyes, B., de Mendoza, A., Ruiz-Trillo, I., Gutierrez, C. (2013) Novel roles of plant RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) protein in cell proliferation and asymmetric cell division. *J Exp Bot.*, 65:2657-2666.
28. Dewitte, W., Riou-Khamlichi, C., Scofield, S., Healy, J.M.S., Jacquard, A., Kilby, N.J., and Murray, J.A.H. (2003). Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in Arabidopsis caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* 15: 79–92.
29. Dick, F. A. (2007) Structure-function analysis of the retinoblastoma tumor suppressor protein- is the whole a sum of its parts? *Cell Div.* 2:26
30. Dick, F. A. y Rubin, S. M. (2013) Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature*, 14: 297-306

31. Dinneny, J. R. y Benfey, P. N. (2005) Stem Cell Research Goes Underground: TheRETINOBLASTOMA-RELATED Gene in Root Development. *Cell* 123: 1180-1182.
32. Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., Scheres, B. (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*. 119:71-84
33. Ebel, C., Mariconti, L., Gruissem, W. (2004) Plant retinoblastoma homologues control nuclear proliferation in the female gametophyte. *Nature*, 429: 776-780
34. Egloff, A.M., Vella, L.A., Finn, O.J. (2006) Cyclin B1 and other cyclins as tumor antigens in immunosurveillance and immunotherapy of cancer. *Cancer Res.* 66:6-9.
35. Estrella, N.L., Desjardins, C.A., Nocco, S.E., Clark, A.L., Maksimenko, Y., Naya, F.J. (2014) MEF2 transcription factors regulate distinct gene programs in mammalian skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem* 290:1256-1268.
36. Fankhauser, C., Chory, J. (2000) RSF1, an *Arabidopsis* locus implicated in phytochrome A signaling. *Plant Physiol.* 124:39-45.
37. Francis, D. (2007) The plant cell cycle--15 years on. *New Phytol.* 174:261-278.
38. Gan, Y., Filleur, S., Rahman, A., Gotensparre, S., Forde, B.G. (2005) Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 222:730-742.
39. Garay-Arroyo, A., Ortiz-Moreno, E., de la Paz Sánchez, M., Murphy, A.S., García-Ponce, B., Marsch-Martínez, N., de Folter, S., Corvera-Poiré, A., Jaimes-Miranda, F., Pacheco-Escobedo, M.A., Dubrovsky, J.G., Pelaz, S., Álvarez-Buylla, E.R. (2013) The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during *Arabidopsis* root development by regulating PIN expression. *EMBO J.*, 32:2884-2895
40. García-Cruz, K.V., García-Ponce, B., Garay-Arroyo, A., Sanchez, M.P., Ugartechea-Chirino, Y., Desvoves, B., Pacheco-Escobedo, M.A., Tapia-López, R., Ransom-Rodríguez, I., Gutierrez, C., Alvarez-Buylla, E.R. (2016) The MADS-box XAANTAL1 increases proliferation at the *Arabidopsis* root stem-cell niche and participates in transition to differentiation by regulating cell-cycle components. *Ann Bot.* 29: mcw126.

41. Gramzow, L., Ritz, M. S., Theißen, G. (2010) On the origin of MADS-domain transcription factors. *Trends in Genetics*, 26: 149-153
42. Gramzow, L. y Theissen, G. (2010) A hitchhiker's guide to the MADS world of plants. *Genome Biology*, 11:214.
43. Grebe, M.,(2012) The patterning of epidermal hairs in *Arabidopsis*-updated. *Curr Opin Plant Biol.* 15:31-37.
44. Gutierrez, C. (2005) Coupling cell proliferation and development in plants. *Nat Cell Biol.* 7:535-541.
45. Haberland, M., Arnold, M.A., McAnally, J., Phan, D., Kim, Y., Olson, E.N. (2007) Regulation of HDAC9 gene expression by MEF2 establishes a negative-feedback loop in the transcriptional circuitry of muscle differentiation. *Mol Cell Biol.* 27:518-525.
46. Harashima, H., Dissmeyer, N., Schnittger, A. (2013) Cell cycle control across the eukaryotic Kingdom. *Trends Cell Biol.* 23: 345-355.
47. Hehl, R. y Bülow, L. (2014). Athamap web tools for the analysis of transcriptional and posttranscriptional regulation of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Mol. Biol.*, 1158:139-156.
48. Hobert, O. (2008) Gene Regulation by Transcription Factors and MicroRNAs. *Science*, 319; 1785-1786.
49. Huang, L., Schiefelbein, J. (2015) Conserved Gene Expression Programs in Developing Roots from Diverse Plants. *Plant Cell.*27:2119-2132.
50. Inagaki S1, Umeda M. (2011) Cell-cycle control and plant development. *Int Rev Cell Mol Biol.* 291:227-261.
51. Ivanov V.B .y Dubrovsky J.G. (1997) Estimation of the cell-cycle duration in the root apicalmeristem: a model of linkage between cell-cycle duration, rate of cell production, and rate root growth. *Int J Plant Sci* 158: 757–763.
52. Kanaoka, M.M., Pillitteri, L.J., Fujii, H., Yoshida, Y., Bogenschutz, N.L., Takabayashi, J., Zhu, J.K., Torii, K.U. (2008) SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to *Arabidopsis* stomatal differentiation. *Plant Cell.* 20:1775-1785.

53. Kim, Y.S., Lee, M., Lee, J.H., Lee, H.J., Park, C.M. (2015) The unified ICE-CBF pathway provides a transcriptional feedback control of freezing tolerance during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* 89:187-201.
54. Kitzmann, M. y Fernandez, A. (2001) Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 58: 571–579.
55. Koornneef, M., y Meinke, D. (2010) The development of *Arabidopsis* as a model plant. *Plant J.*, 61: 909–921.
56. L'Honore, A., Rana, V., Arsic, N., Franckhauser, C., Lamb, N. J., Fernandez, A. (2007) Identification of a New Hybrid Serum Response Factor and Myocyte Enhancer Factor 2-binding Element in MyoD Enhancer Required for MyoD Expression during Myogenesis. *Mol Biol Cell.* 18: 1992–2001.
57. Ledent, V. y Vervoort, M. (2001) The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res.* 11: 754-770.
58. Lee, H.O. Davidson, J.M., Duronio, R.J. (2009) Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev.* 23: 2461–2477.
59. Magenta, A., Cenciarelli, C., De Santa, F., Fuschi, P., Martelli, F., Caruso, M., Felsani, A. (2003) MyoD stimulates RB promoter activity via the CREB/p300 nuclear transduction pathway. *Mol Cell Biol.* 23:2893-2906.
60. Magyar, Z., Horváth, B., Khan, S., Mohammed, B., Henriques, R., De Veylder, L., Bakó, L., Scheres, B., Bögre, L. (2012) *Arabidopsis* E2FA stimulates proliferation and endocycle separately through RBR-bound and RBR-free complexes. *EMBO J.* 31:1480-1493.
61. Makkena, S. y Lamb, R.S. (2013) The bHLH transcription factor SPATULA regulates root growth by controlling the size of the root meristem. *BMC Plant Biol.* 13:1. doi: 10.1186/1471-2229-13-1.
62. Mariconti, L., Pellegrini, B., Cantoni, R., Stevens, R., Bergounioux, C., Cella, R., Albani, D. (2002) The E2F Family of Transcription Factors from *Arabidopsis thaliana*: Novel and Conserved Components of the Retinoblastoma/E2F Pathway in Plants. *J. Biol. Chem.* 277:9911-9919.
63. McKinsey, T.A., Zhang, C.L., Olson, E.N. (2002) MEF2: a calcium-dependent

- regulator of cell division, differentiation and death. Trends Biochem Sci. 27:40-47.
64. Meyerowitz, E. M. (1999) Plants, animals and the logic of development. Trends Cell Biol., 9: M65-M68.
65. Meyerowitz, E. M. (2002) Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. Science, 295: 1482-1485.
66. Morohashi, K. y Grotewold, E. (2009) A systems approach reveals regulatory circuitry for Arabidopsis trichome initiation by the GL3 and GL1 selectors. PLoS Genet. 5:e1000396.
67. Munir J., Dorn, L.A., Donohue, K., Schmitt, J. (2001) The effect of maternal photoperiod on seasonal dormancy in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). American J. of Bot. 88:1240-1249.
68. Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum, 15: 473–497.
69. Novitch, B.G., Spicer, D.B., Kim, P.S., Cheung, W.L., Lassar, A.B. (1999) pRb is required for MEF2-dependent gene expression as well as cell-cycle arrest during skeletal muscle differentiation. Curr Biol., 9:449-459.
70. Oh, E., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Bae, G., Chung, W.I., Choi, G. (2003) Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabidopsis. Plant J. 47:124-139.
71. Orr-Weaver, T.L. (2015) When bigger is better: the role of polyploidy in organogenesis. Trends Genet., 31:307-315.
72. Park, J.A., Ahn, J.W., Kim, Y.K., Kim, S.J., Kim, J.K., Kim, W.T., Pai, H.S. (2005) Retinoblastoma protein regulates cell proliferation, differentiation, and endoreduplication in plants. The Plant Journal 42: 153–163.
73. Pacheco-Escobedo, M.A., Ivanov, V.B., Ransom-Rodríguez, I., Arriaga-Mejía, G., Ávila, H., Baklanov, I.A., Pimentel, A., Corkidi, G., Doerner, P., Dubrovsky, J.G., Álvarez-Buylla, E.R., Garay-Arroyo, A. (2016). Longitudinal zonation pattern in Arabidopsis root tip defined by a multiple structural change algorithm. Annals of Bot. pii: mcw101.
74. Parker, M.H., von Maltzahn, J., Bakkar, N., Al-Joubori, B., Ishibashi, J., Guttridge, D., Rudnicki, M.A., (2012) MyoD-dependent regulation of NF-kappaB activity

- couples cell-cycle withdrawal to myogenic differentiation. *Skelet Muscle*, 2: 6, doi:10.1186/2044-5040-2-6.
75. Pérez-Ruiz, R.V., García-Ponce, B., Marsch-Martínez, N., Ugartechea-Chirino, Y., Villajuana-Bonequi, M., de Folter, S., Azpeitia, E., Dávila-Velderrain, J., Cruz-Sánchez, D., Garay-Arroyo, A., Sánchez, M. de L., Estévez-Palmas, J.M., Álvarez-Buylla, E.R. (2015) XAANTAL2 (AGL14) Is an Important Component of the Complex Gene Regulatory Network that Underlies Arabidopsis Shoot Apical Meristem Transitions. *Mol Plant*. 8:796-813.
 76. Perilli, S., Perez-Perez, J. M., Di Mambro, R., Peris, C. L., Díaz-Triviño, S., Del Bianco, M., Pierdonati, E., Moubayidin, L., Cruz-Ramírez, A., Costantino, P., Scheres, B., Sabatinia, S. (2013) RETINOBLASTOMA-RELATED Protein Stimulates Cell Differentiation in the Arabidopsis Root Meristem by Interacting with Cytokinin Signaling. *The Plant Cell*, 25: 4469–4478.
 77. Potthoof, M. J. y Olson, E. N. (2007) MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development*. 134: 4131-4140.
 78. Puri, P. L., Jezzi, S., Stiegler, P., Chen, T.T., Schiltz, R. L., Muscat, G.E.O., Giordano, A., Kedes, L., Wang, J.Y.J., Sartorelli, V. (2001) Class I Histone Deacetylases Sequentially Interact with MyoD and pRb during Skeletal Myogenesis. *Molecular Cell*, Vol. 8, 885–897.
 79. Putarjunan, A., Torii, K.U. (2016) Stomagenesis versus myogenesis: Parallels in intrinsic and extrinsic regulation of transcription factor mediated specialized cell-type differentiation in plants and animals. *Dev Growth Differ*. doi: 10.1111/dgd.12282.
 80. Rajabi, H.N., Takahashi, C., Ewen, M. E. (2014) Retinoblastoma protein and MyoD function together to effect the repression of Fra-1 and in turn cyclin D1 Turing terminal cell cycle arrest associated with biogenesis. *J. Biol. Chem.*, 289:23417-23427.
 81. Ramanujan, A. y Tiwari, S. (2016) APC/C and Retinoblastoma interaction: Cross-talk of Retinoblastoma protein with the Ubiquitin Proteasome Pathway. *Biosci Rep*. pii: BSR20160152.
 82. Rescan, P.Y. (2001) Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1301-12.

83. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414:105-111.
84. Reymond, M.C., Brunoud, G., Chauvet, A., Martínez-García, J.F., Martin-Magniette, M.L., Monéger, F., Scutt, C.P. (2012) A light-regulated genetic module was recruited to carpel development in *Arabidopsis* following a structural change to SPATULA. *Plant Cell*. 24:2812-2825.
85. Rossi, V., Locatelli, S., Lanzanova, C., Boniotti, M.B., Varotto, S., Pipal, A., Goralik-Schramel, M., Lusser, A., Gatz, C., Gutierrez, C., Motto, M. (2003) A maize histone deacetylase and retinoblastoma-related protein physically interact and cooperate in repressing gene transcription. *Plant Mol Biol*. 51:401-413.
86. Sablowski, R. (2004) Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? *Trends Cell Biol*. 14:605-611.
87. Sablowski, R. (2011) Plant stem cell niches: from signalling to execution. *Curr. Op. in plant Bio*. 14: 4-9.
88. Sablowski, R. y Carnier Dornelas, M. (2013) Interplay between cell growth and cell cycle in plants. *J. Exp. Bot*. 11.
89. Sage, J. (2012) The retinoblastoma tumor suppressor and stem cell biology. *GenesDev*, 26:1409-1420.
90. Sailsbery, J.K. y Dean, R.A. (2012) Accurate discrimination of bHLH domains in plants, animals, and fungi using biologically meaningful sites. *BMC Evol Biol*. 12:154. doi: 10.1186/1471-2148-12-154.
91. Sartorelli, V. y Caretti, G. (2005) Mechanisms underlying the transcriptional regulation of skeletal Biogénesis. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 15: 528–535.
92. Sasaki-Sekimoto, Y., Jikumaru, Y., Obayashi, T., Saito, H., Masuda, S., Kamiya, Y., Ohta, H., Shirasu, K. (2013) Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 163:291-304.
93. Schellmann, S. y Hülkamp, M. (2005) Epidermal differentiation: trichomes in *Arabidopsis* as a model system. *Int J Dev Biol*. 49:579-584.
94. Schnittger, A., Schöbinger, U., Stierhof, Y.D., Hülkamp, M. (2002) Ectopic B-type

- cyclin expression induces mitotic cycles in endoreduplicating *Arabidopsis* trichomes. *Curr Biol.* 12:415-420.
95. Scofield, S., Jones, A., Murray, J.A. (2014) The plant cell cycle in context. *J Exp Bot.* 65:2557-2562.
 96. Shore, P. y Sharrocks, A.D. (1995) The MADS-box family of transcription factors, *Eur. J. Biochem*, 229: 1-13.
 97. Siddiqui, H., Fox, S.R., Gunawardena, R.W., Knudsen, E.S. (2007) Loss of RB compromises specific heterochromatin modifications and modulates HP1alpha dynamics. *J Cell Physiol.* 211:131-137.
 98. Sincennes, M.C., Brun, C.E., Rudnicki, M.A. (2016) Concise Review: Epigenetic Regulation of Myogenesis in Health and Disease. *Stem Cells Transl Med.* 5:282-290.
 99. Singh, K. y Dilworth, F.J. (2013) Regulation of transcription and chromatin structure by pRB: Here, there and everywhere. 11: 3189-3198.
 100. Skinner, M. K., Rawls, A., Wilson-Rawls, J., Roalson, E. H. (2010) Basic helix-loop-helix transcription factor gene family phylogenetics and nomenclature. *Differentiation.* 80: 1-8.
 101. Smialowski, P., Singh, M., Mikolajka, A., Majumdar, S., Joy, J.K., Nalabothula, N., Krajewski, M., Degenkolbe, R., Bernard, H.U., Holak, T.A. (2005) NMR and mass spectrometry studies of putative interactions of cell cycle proteins pRb and CDK6 with cell differentiation proteins MyoD and ID-2. *Biochim Biophys Acta.* 1750:48-60.
 102. Stevens, J.D., Roalson, E.H., Skinner, M.K. (2008) Phylogenetic and expression analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor gene family: genomic approach to cellular differentiation. *Differentiation.* 76:1006-1022.
 103. Schwabe, R.F., Bradham, C.A., Uehara, T., Hatano, E., Bennett, B.L., Schoonhoven, R., Brenner, D.A. (2003) c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology.* 37:824-832.
 104. Talluri, S. y Dick, F.A. (2012) Regulation of transcription and chromatin structure by pRB: Here, there and everywhere. *Cell Cycle*, 11:17, 3189-3198.
 105. Tapia-López, R., García-Ponce, B., Dubrovsky, J.G., Garay-Arroyo, A., Pérez-Ruíz, R.V., Kim, S., Acevedo, F., Pelaz, S., Alvarez-Buylla, E.R. (2008) An AGAMOUS-

- Related MADS-Box Gene, XAL1 (AGL12), Regulates Root Meristem Cell Proliferation and Flowering Transition in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 146: 1182–1192.
106. Van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P., Scheres, B. (1995) Cell fate in the Arabidopsis root meristem determined by directional signalling. *Nature.* 378:62-65.
107. Van den Berg, C., Willmsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., Scheres, B. (1997) Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* 390: 287-289.
108. Vandepoele, K., Quimbaya, M., Casneuf, T., De Veylder L. and Van de Peer, Y. (2009) Unraveling transcriptional control in Arabidopsis using cis-regulatory elements and coexpression networks. *Plant Physiol.* 150:535-546.
109. Wang, D.Z., Valdez1, M.R., McAnally, J., Richardson, J., Olson, E.N. (2001) The Mef2c gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development. *Development* 128, 4623-4633.
110. Wang, L.H. y Baker, N.E. (2015) E Proteins and ID Proteins: Helix-Loop-Helix Partners in Development and Disease. *Dev Cell.* 35:269-280.
111. Wei, X., Sun, W., Fan, R., Hahn, J., Joetham, A., Li, G., Webb, S., Garrington, T., Dakhama, A., Lucas, J., Johnson, G.L., Gelfand, E.W. (2003) MEF2C regulates c-Jun but not TNF-alpha gene expression in stimulated mast cells. *Eur. J. Immunol.* 33: 2903–2909.
112. Wildwater, M., Campilho, A., Perez-Perez, J.M., Heidstra, R., Blilou, I., Korthout, H., Chatterjee, J., Mariconti, L., Grissem, W., Scheres, B. (2005) The RETINOBLASTOMA-RELATED gene regulates stem cell maintenance in Arabidopsis roots. *Cell* 123: 1337–1349.
113. Wong, J.V., Dong, P., Nevins, J.R., Mathey-Prevot, B., You, L. (2011) Network calisthenics: Control of E2F dynamics in cell cycle entry. *Cell Cycle* 10: 3086-3094.
114. Wyrzykowska, J., Schorderet, M., Pien, S., Grissem, W., Fleming, A.J. (2006) Induction of differentiation in the shoot apical meristem by transient overexpression of a retinoblastoma-related protein. *Plant Physiol.* 141:1338-1348.
115. Xing S, Quodt V, Chandler J, Höhmann S, Berndtgen R, Huijser P. (2013) SPL8 Acts

- Together with the Brassinosteroid-Signaling Component BIM1 in Controlling *Arabidopsis thaliana* Male Fertility. *Plants* (Basel). 2:416-428.
116. Xu, X. M. y Moller, S. G. (2011) The value of *Arabidopsis* research in understanding human diseases states. *Curr. Opin. In Biotech.* 22: 300-307
117. Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J. (2005) A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell.* 120:249-259.
118. Zhang, C.L., McKinsey, T.A., Olson, E.N. (2002) Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation. *Mol Cell Biol.* 22:7302-7312.
119. Zhao, C., Lasses, T., Bako, L., Kong, D., Zhao, B., Chanda, B., Bombarely, A., Cruz-Ramírez, A., Scheres, B., Brunner, A.M., Beers, E.P. (2017) XYLEM NAC DOMAIN1, an angiosperm NAC transcription factor, inhibits xylem differentiation through conserved motifs that interact with RETINOBLASTOMA-RELATED. *New Phytol.* 25. doi: 10.1111/nph.14704.
120. Zhao, S., Fernald, R.D. (2005) Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J. Comput. Biol.* 12:1047–1064.
121. Zhao, X., Yu, Q., Huang, L., Liu, Q.X. (2014) Patterns of positive selection of the myogenic regulatory factor gene family in vertebrates. *PLoS One.*, 9: e92873. doi: 10.1371/journal.pone.0092873.
122. Zhu C., Gan L., Zhenguo Shen Z., Xia K. (2006) Interactions between jasmonates and ethylene in the regulation of root hair development in *Arabidopsis*. *J. of Exp. Bot.*, 57: 1299–1308

ANEXO

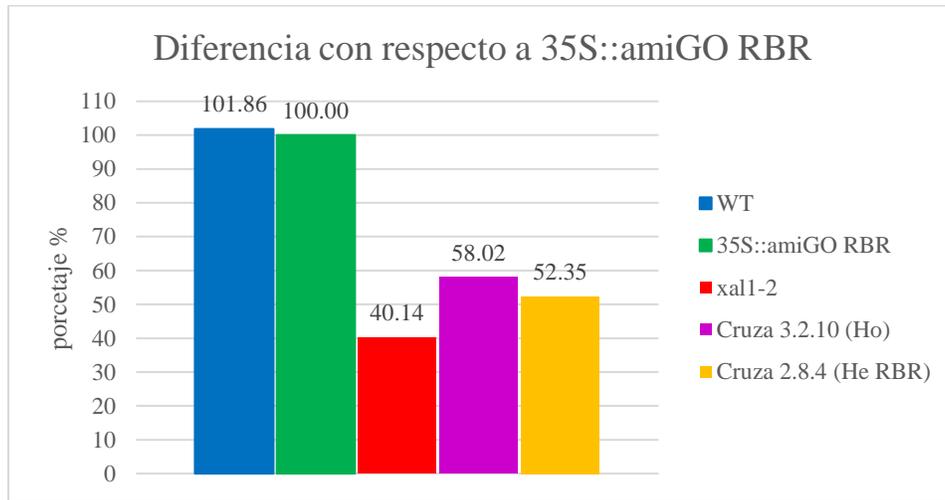


Figura A1. Porcentaje de diferencia del tamaño de la raíz principal de la cinética 1.

Porcentaje de diferencia del promedio del tamaño de las raíces principales de las líneas (WT, *xal1-2*, *xal1-2/35S::amigo RBR* 3.2.10 Ho, *xal1-2/35S::amigo RBR* 2.8.4 He) contra el tamaño de las raíces de *35S::amigo RBR*.



Figura A2. Porcentaje de diferencia del tamaño de la raíz principal de la cinética 2.

Porcentaje de diferencia del promedio del tamaño de las raíces principales de las líneas (WT, *xal1-2*, *xal1-2/35S::amigo RBR* 3.2.10 Ho, *xal1-2/35S::amigo RBR* 3.2.16 He, *xal1-2/35S::amigo RBR* 2.8.4.1.1 Ho y *xal1-2/35S::amigo RBR* 2.8.4 He) contra el tamaño de las

raíces de *35S::amigo RBR*.

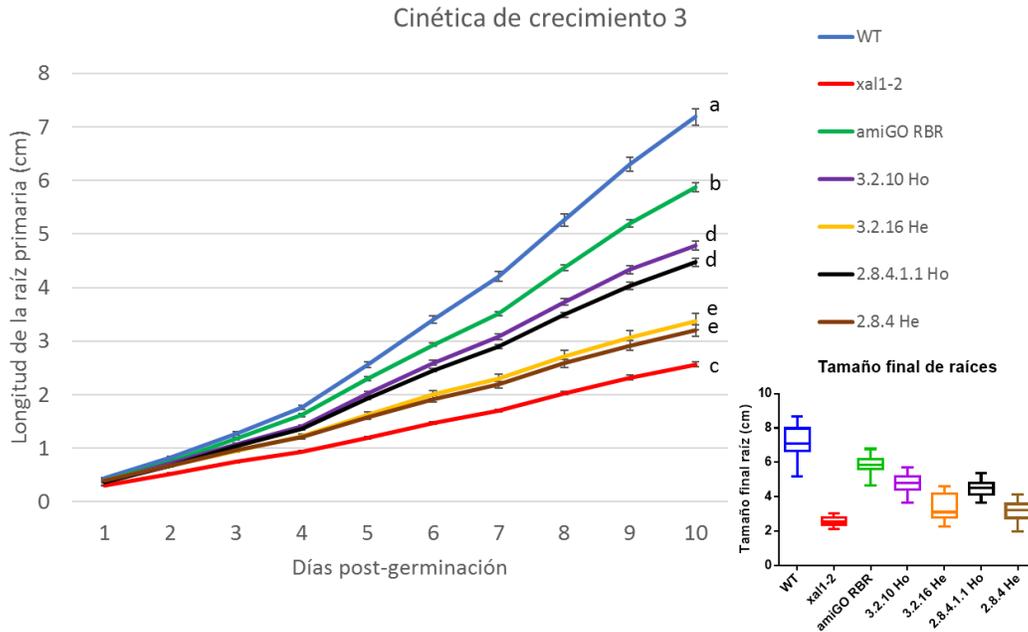


Figura A3. Tercera cinética de crecimiento de plantas. Tamaño de la raíz primaria de alrededor de 30 plantas durante 10 días pos-germinación de las diferentes líneas: WT (n=30), *35SamiGO RBR*, *xal1-2*, *xal1-2/35SamiGO RBR*. Líneas homocigotas: 3.2.10 (n=29) y 2.8.4.1.1 (n=28) y líneas He 3.2.16 (n=22) y 2.8.4 (n=29). Diferencias significativas se muestran con diferente letra ($P < 0.05$; se analizó mediante una prueba estadística paramétrica ANOVA y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

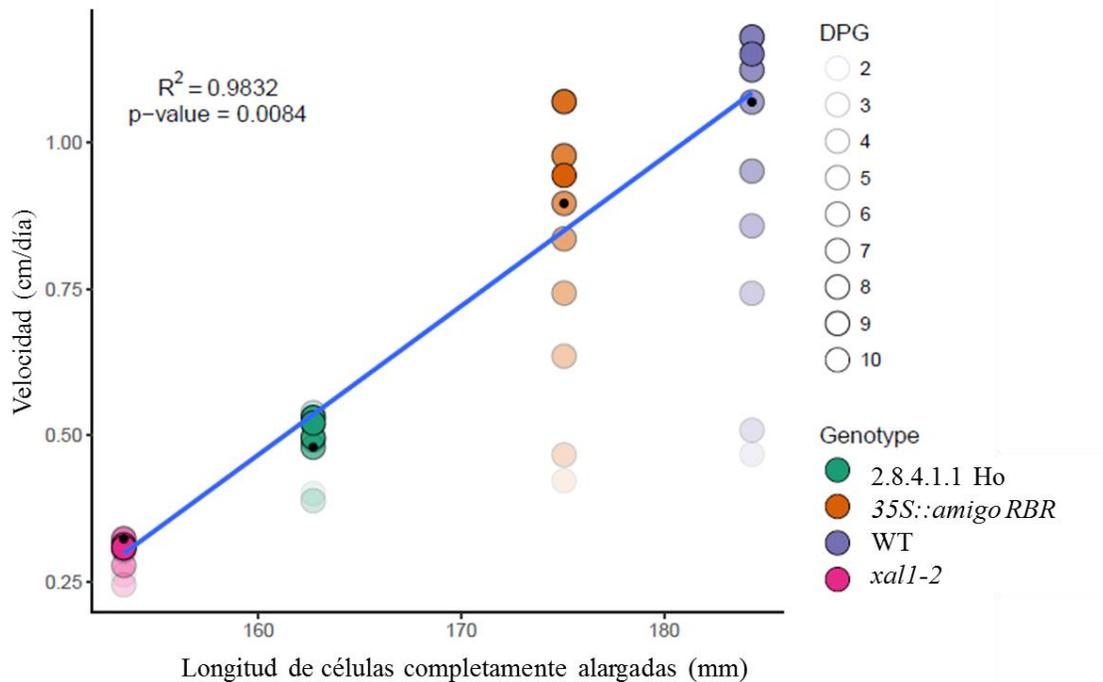


Figura A4. Correlación de velocidad con células completamente alargadas. Gráficas de velocidad a partir de la cinética 1 (Figura 8) durante los diferentes días de crecimiento post-germinación, contra la longitud de las células completamente alargadas a 7 días post germinación de plantas *35SamiGO RBR*, *xal1-2*, la doble cruz homocigota 2.8.4.1.1 y WT (Figura 13). La línea azul indica la regresión lineal, los puntos negros señalan la correlación de la velocidad al día 7 contra la longitud de las células completamente alargadas.

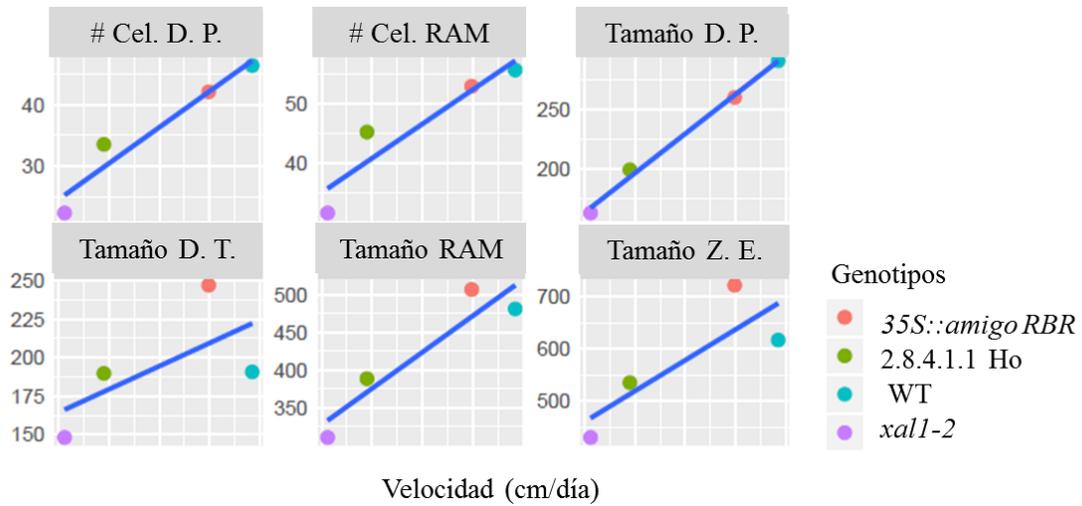


Figura A5. Correlación de velocidad con zonas de la raíz. Gráficas de velocidad a partir de la cinética 1 (Figura 8), contra las variables de las diferentes zonas de la raíz (número de células del dominio de proliferación, número de células del meristemo, tamaño del dominio de proliferación, tamaño del dominio de transición, tamaño del meristemo y tamaño de la zona de elongación), de plantas *35SamiGO RBR*, *xal1-2*, la doble cruz homocigota 2.8.4.1.1 y WT (Figura 12). La línea azul indica la regresión lineal.

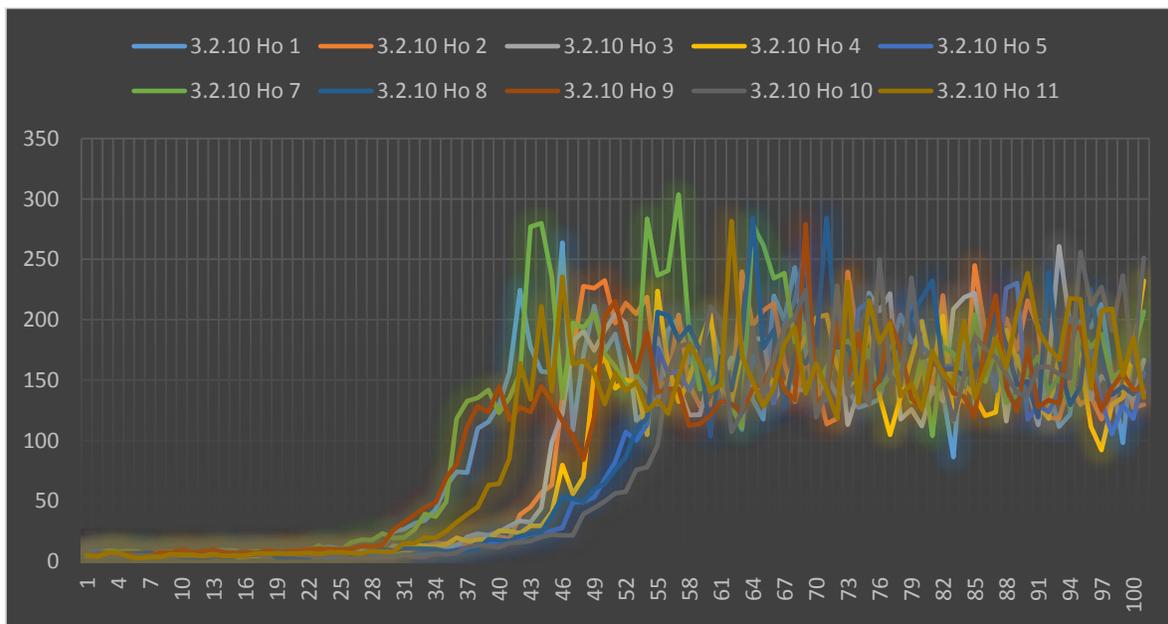


Figura A6. Gráfica del tamaño celular (µm) de células de córtex a lo largo de la raíz

primaria. En la figura se pueden ver las zonas de, elongación y diferenciación de 10 plantas *xal1-2/35SamiGO RBR* (He 3.2.16) de 7 dps Plantas 1, 7, 9, 11 tienen meristemos más pequeños (aproximadamente 34 μ M).

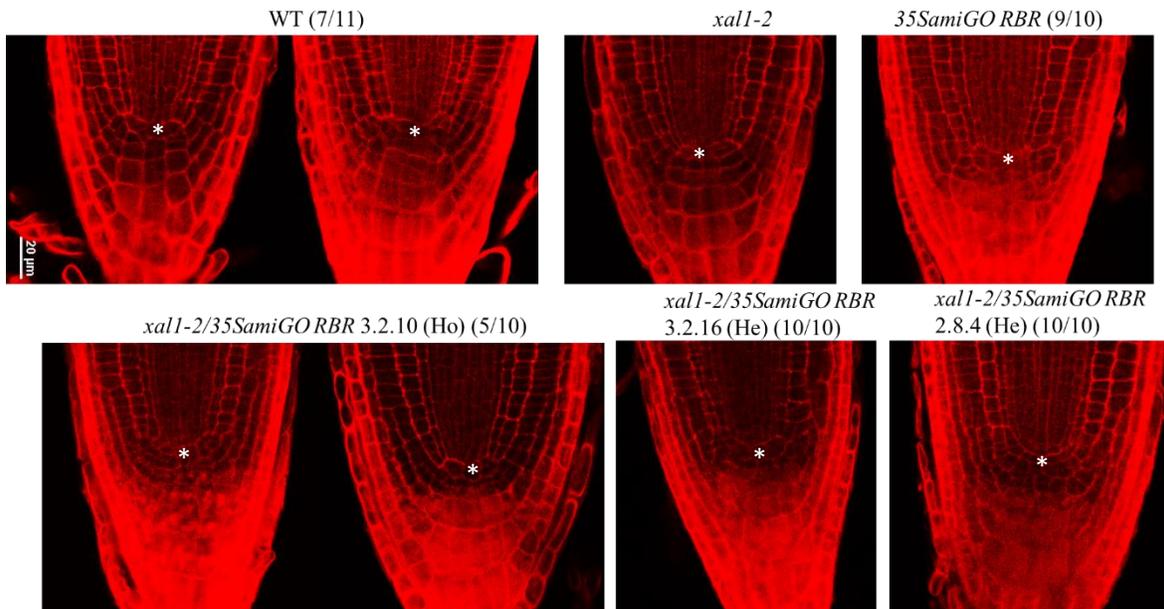
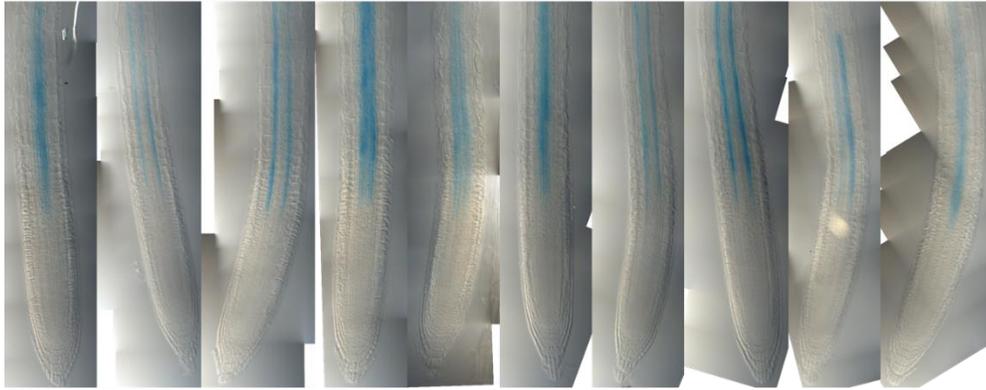


Figura A7. Fenotipo del nicho de células troncales. Plantas WT, *xal1-2*, *35SamiGO RBR*, craza homocigota *xal1-2/35SamiGO RBR* (3.2.10) y cruza heterocigotas para *35SamiGO RBR* (3.2.16 y 2.8.4) de 7dps, observadas con microscopio confocal. Las plantas están teñidas con Yoduro de propidio para poder observar la organización del nicho de células troncales y el desarreglo del nicho; el centro quiescente se encuentra marcado con un asterisco blanco. Escala 20 μ M, n=10.

AGL12-GUS 7dps



AGL12-GUS/35SamiGORBR (1.4.6.5) 7dps

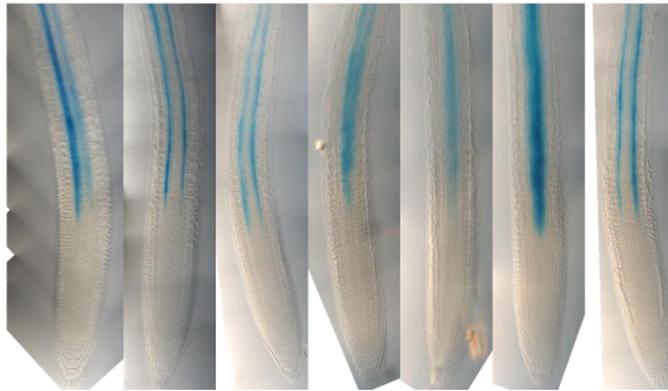
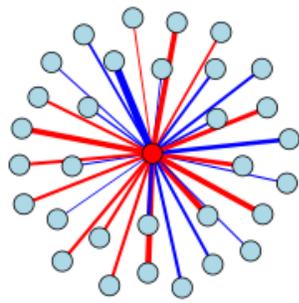


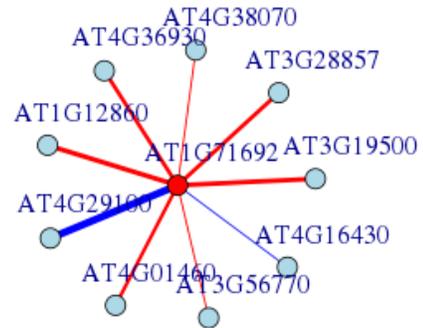
Figura A8. Expresión de *XAL1* en fondo mutante de *RBR*. Raíces teñidas de 7dps con la construcción transcripcional del promotor de *AGL12* (*XAL1*) fusionado a β -glucuronidase (GUS) (arriba) y la cruce del marcador con la mutante de *RBR* (*35S::amiGO RBR*) (abajo).

	ID's	Microarre	ATCOECIS	EXPRESIÓ	ARACNE (BLAST	RNA seq
FBI1	AT1G02340	1	0	1	1	0	1
	AT1G06170	0	0	1	1	0	1
	AT1G10610	0	0	1	1	0	1
ICE2/SCREAM2	AT1G12860	0	0	1	1	0	1
	AT1G51070	0	1	1	1	0	1
ATEGLE3	AT1G63650	0	0	1	1	1	1
PIL5	AT2G20180	1	0	1	1	0	1
	AT2G22750	0	0	1	1	0	1
	AT2G22760	0	0	1	1	0	1
	AT2G27230	0	0	0	1	0	1
	AT2G31210	0	0	1	1	0	1
	AT2G41130	0	0	0	0	0	1
	AT2G46970	0	0	0	0	0	1
	AT3G07340	0	0	1	1	0	1
-	AT3G19500	0	0	1	1	0	1
	AT3G20640	0	0	0	0	0	1
	AT3G22275	0	0	0	0	0	1
ICE1, SCREAM	AT3G26744	0	0	1	1	0	1
	AT3G28857	0	0	0	0	0	1
	AT3G56770	0	0	0	0	0	1
	AT3G61950	0	0	1	1	0	1
-	AT4G01460	1	0	1	1	0	1
JAM3	AT4G16430	1	0	1	1	0	1
-	AT4G29100	0	0	1	1	0	1
	AT4G30980	0	0	0	0	0	1
SPT	AT4G36930	1	0	1	1	0	1
-	AT4G38070	0	0	0	1	1	1
	AT5G01310	0	0	0	1	0	1
BHLH134, BNQ2	AT5G15160	1	0	1	1	0	1
	AT5G43650	0	0	0	0	0	1
	AT5G51780	0	0	0	0	0	1
	AT5G64340	0	0	0	1	0	1

Figura A9. bHLHs candidatos. Tabla de bHLH en las diferentes bases de datos analizadas (Microarreglo de *XAL1*, ATCOECIS, Expresión en raíz, ARACNE, Blast y RNAseq con $P < 0.05$ de morado claro y $P < 0.01$ de morado oscuro) a partir de la cual se seleccionaron algunos bHLHs.



A

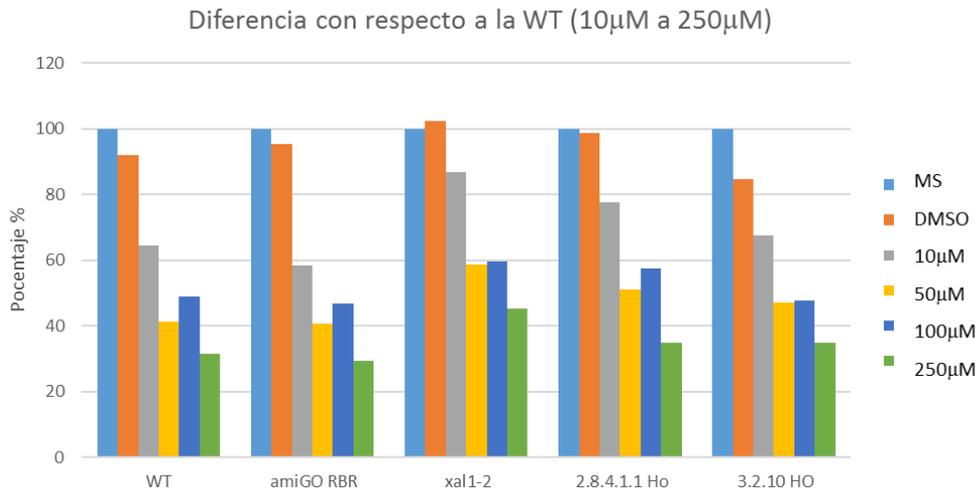


B

Figura A10. Correlación de co-expresión de genes bHLH's con *XALI* (círculo central).

Líneas azules correlación positiva, líneas rojas correlación negativa. A. Correlación $P < 0.05$; B. Correlación $P < 0.01$ (Dr. José Dávila Velderrain, Huang y Schiefelbein, 2015).

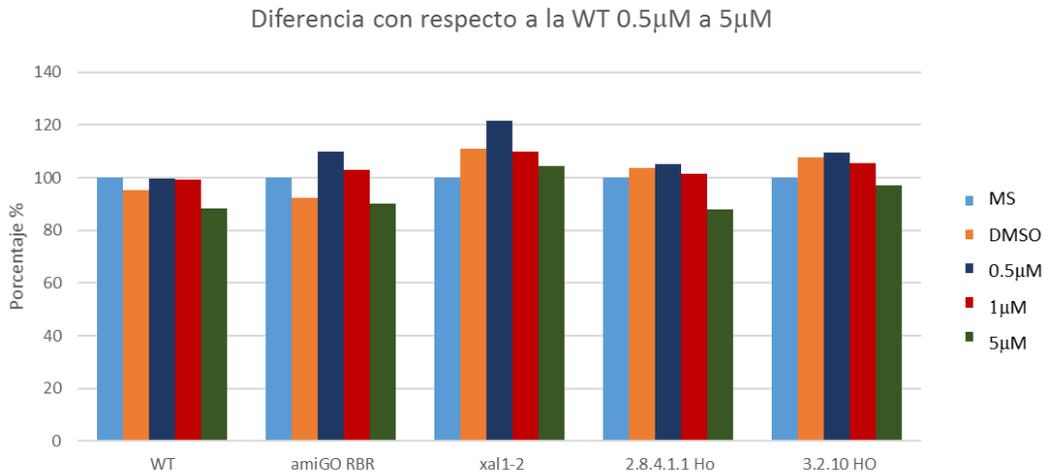
A



B

Porcentaje de similitud con respecto a la WT en MS					
	WT	amiGO RBR	xal1-2	2.8.4.1.1 Ho	3.2.10 Ho
MS	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
DMSO	92.0	95.3	102.4	98.6	84.6
SHAM 10μM	64.6	58.4	86.9	77.7	67.5
SHAM 50μM	41.2	40.6	58.7	50.9	47.2
SHAM 100μM	49.0	46.7	59.7	57.3	47.6
SHAM 250μM	31.4	29.2	45.2	35.0	35.0

Figura A11. Porcentaje de similitud de raíces primarias crecidas en inhibidor de jasmonato (SHAM). (A) Gráfica de las comparaciones de los porcentajes de similitud de 11 plantas de cada línea celular (WT, *35SamiGO RBR*, *xal1-2* y las líneas homocigotas 2.8.4.1.1 y 3.2.10) en diferentes concentraciones de SHAM: 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 250 μ M; y los controles de medio MS y medio MS con DMSO. (B) tabla de la similitud en porcentaje entre las diferentes líneas.



B

Porcentaje de similitud con respecto a la WT en MS					
	WT	amiGO RBR	xal1-2	2.8.4.1.1 Ho	3.2.10 Ho
MS	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
DMSO	95.3	92.2	111.1	103.7	107.6
SHAM 0.5 μ M	99.7	109.8	121.6	105.0	109.6
SHAM 1 μ M	99.2	102.9	110.0	101.5	105.6
SHAM 5 μ M	88.2	90.0	104.2	87.8	97.2

Figura A12. Porcentaje de similitud de raíces primarias crecidas en inhibidor de jasmonato (SHAM). (A) Gráfica de las comparaciones de los porcentajes de similitud de 11 plantas de cada línea celular (WT, *35SamiGO RBR*, *xal1-2* y las líneas homocigotas 2.8.4.1.1 y 3.2.10) en diferentes concentraciones de SHAM: 0.5 μ M, 1 μ M y 5 μ M; y los controles de medio MS y medio MS con DMSO. (B) tabla de la similitud en porcentaje entre las diferentes líneas.