



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES IZTACALA**

**Análisis celular de la raíz del mutante
medium-size root (mer) de *Arabidopsis
thaliana***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

JORGE URIEL DIMAS TORRES

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de
México. 2018**





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.

Agradecimientos académicos

A los integrantes del jurado por sus pertinentes observaciones que permitieron enriquecer este trabajo:

- Dr. Ignacio Peñalosa Castro
- Al Dr. Víctor Manuel Salazar Rojas
- Al Dr. Ulises Yunuen Rosas López
- Al Dr. Oswaldo Valdés López
- A la Dra. Berenice García Ponce de León

A la Dra. Yamel Ugartechea Chirino, por su enseñanza en el manejo del microscopio para la técnica de contraste diferencial de fases (DIC) y en la preparación de reactivos y muestras para microscopía.

A Stella Alejandra Quiróz Pérez por realizar el cruce del marcador de microfilamentos de actina (ABD:GFP) por el mutante *mer*, y proporcionarme las semillas para el presente trabajo.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas; Departamento de Ecología Funcional del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Berenice García Ponce de León.

La investigación realizada fue financiada por los proyectos PAPIIT de la DGAPA (UNAM): IN205517; IN203814 e IN211516 y de CONACyT: 240180 a cargo de las Doctoras Berenice García Ponce de León, Elena Alvarez-Buylla, María de la Paz Sánchez Jiménez y Adriana Garay Arroyo a quienes les agradecemos su apoyo.

Agradecimientos personales

A mis padres, quienes han estado conmigo en cada momento y que a la vez son responsables de las virtudes en mi personalidad.

A mis hermanos que siempre han procurado dar un buen ejemplo y consejo, cuando ha sido necesario.

A todos y cada uno de mis familiares y amigos que me han acompañado durante toda mi formación académica y profesional.

A todos ustedes, gracias por su incalculable apoyo.

Dedicatoria

El esfuerzo de este trabajo me gustaría dedicarlo al indefinido y poco recurrente grupo de científicos desconocidos. A todos los que también fueron exploradores y tuvieron que abandonar su pasión antes de ver los resultados de su trabajo y las respuestas a su curiosidad. Principalmente a todos aquellos que no fueron, no han sido o no serán reconocidos como grandes pensadores, a pesar de sus grandes esfuerzos. A todo ustedes, siéntanse satisfechos por haber contribuido en cualquier medida al conocimiento que hoy nos rodea. Porque sin importar la imponente presencia de la incertidumbre, han caminado con ella para iluminar un azulejo más en el camino del conocimiento.

Índice

Abreviaturas	III
Resumen.....	1
Introducción	3
La raíz de Arabidopsis thaliana	3
Desarrollo de la raíz en Arabidopsis.....	3
Estructura de la raíz y patrón de zonación longitudinal.....	4
Meristemo apical de la raíz	7
Expansión celular	9
Participación de las fitohormonas en el crecimiento de la raíz	11
El citoesqueleto en el crecimiento celular	14
Microtúbulos	15
Microfilamentos.....	20
Movimientos durante el crecimiento radical	24
Antecedentes	28
Hipótesis	30
Objetivo general.....	30
Objetivos particulares	30
Materiales y Métodos.....	31
Crecimiento de las plantas.....	31
Obtención del doble mutante superwavy a partir de mer y act2-5	31
Fijación y aclaramiento de las raíces	32
Microscopía óptica	32
Cuantificaciones celulares de la raíz	32
Microscopía confocal	34
Resultados.....	35
Recuperación del doble mutante superwavy mediante la cruce de mer por act2-5.....	35
Comparación del crecimiento de la raíz del mutante mer con las plantas silvestres	36
Cuantificación celular para determinar el proceso afectado en el desarrollo de la raíz de mer	39
Efecto de la mutación mer en el crecimiento de los hipocotilos.....	43
Análisis de los microfilamentos de actina en la raíz de mer	45
Discusión	47

El desarrollo de la raíz de mer está afectado en la elongación celular	47
Posible efecto de la mutación de mer en la elongación diferencial de los órganos de las plantas.....	49
Posibles genes responsables del fenotipo de mer.....	50
Posible interconexión entre mer y act2-5	54
Conclusiones.....	56
Perspectivas.....	56
Literatura citada	58

Abreviaturas

ABP	Actin-binding protein
ABP57	AUXIN BINDING PROTEIN 57
Actina-F	Actina filamentosa
Actina-G	Actina globular
ADF	Actin depolymerization factor
ARP	Actin related proteins
CEI	Iniciales de cortex y endodermis
CI	Iniciales de la cofia
CP	Capping proteins
DZ	Zona de diferenciación
Epi	Iniciales de la epidermis
EZ	Zona de elongación
GFP	Proteína verde fluorescente
LRC	Cofia lateral de la raíz
LZP	Patrón de zonación longitudinal
MAPS	Proteínas asociadas a microtúbulos
MFs	Microfilamentos de actina
MTs	Microtúbulos
PD	Dominio de proliferación
QC	Centro quiescente
SCN	Nicho de células troncales
TD	Dominio de transición

Resumen

El desarrollo es el resultado de la homeostasis entre el crecimiento (proliferación y expansión celular) y la diferenciación celular. Además, la raíz de *Arabidopsis thaliana* es un sistema modelo para el estudio del desarrollo en plantas, debido a que es un órgano traslúcido y con una estructura relativamente simple que permite identificar diferentes zonas de proliferación y diferenciación celular en un eje ápico-basal (Pacheco-Escobedo et al., 2016). Es decir, las células se originan en el meristemo apical de la raíz (RAM), y consecuentemente se expanden hasta adquirir su estado final de diferenciación celular (Scheres et al., 2002). Estos programas de desarrollo se logran por el trabajo conjunto de múltiples componentes y de manera interesante el citoesqueleto (microtúbulos y microfilamentos de actina) se ha implicado en estos procesos (Szymanski, 2009; Liu et al., 2011; Keijzer et al., 2014). Existen diversos trabajos en donde se han caracterizado mutantes de proteínas que conforman al citoesqueleto y se han observado fenotipos anómalos en el desarrollo de la raíz y de los pelos radicales (Gilliland et al., 2002; Nishimura et al., 2003). Sin embargo, todavía no conocemos la manera en la que el citoesqueleto puede actuar como integrador de las funciones celulares.

Previo a este trabajo, se realizó un estudio en el que se demostró que el mutante de actina; *act2-5*, presenta un fenotipo de crecimiento radicular ondulatorio con órganos aéreos rizados y además con un citoesqueleto de actina sumamente dinámico en el que se observan filamentos cortos (Lanza et al., 2012). Aunado a esto con la finalidad de conocer otros genes que pudieran involucrarse de forma conjunta o independiente a la ACT2 en el crecimiento ondulatorio de la raíz, se

realizó una segunda mutagénesis sobre *act2-5* y fue seleccionado un fenotipo de ondulación potenciada con respecto al parental al que llamamos *superwavy* (Abad-Vivero, 2009). Este mutante, fue retrocruzado con la planta silvestre y segregaron dos fenotipos mutantes: por una parte, el mutante *act2-5* (como era de esperarse), y un mutante cuya longitud de raíz es intermedia entre *act2-5* y *superwavy* al que llamamos *medium-size root (mer)*.

En el presente trabajo confirmamos que el fenotipo *superwavy* es el resultado conjunto del mutante *act2-5* y *mer*. Además, llevamos a cabo la caracterización a nivel celular del desarrollo de la raíz del mutante *mer* y observamos que su fenotipo de raíz corta se debe a una tasa de crecimiento reducida como consecuencia directa de un proceso incompleto de expansión celular y no a afectaciones en la proliferación celular del RAM. Además, confirmamos la falta de elongación de *mer* en un sistema modelo; hipocotilos etiolados. Finalmente, el análisis cualitativo del citoesqueleto de actina no demostró diferencias robustas de *mer* en contraste con el silvestre.

Introducción

La raíz de *Arabidopsis thaliana*

Las raíces de las plantas están implicadas en la obtención de agua, nutrientes, anclaje al suelo e interacción con microorganismos (Taiz y Zeiger, 2010). Particularmente, la raíz de *Arabidopsis thaliana* (de aquí en adelante *Arabidopsis*) se considera un sistema modelo en estudios de crecimiento donde se puede analizar la homeostasis entre proliferación y diferenciación celular (Ivanov y Dubrovsky, 1997). Su estructura relativamente simple y traslúcida, permite la identificación de los diferentes tejidos que la componen. Aunado a esto, las raíces de *Arabidopsis* también han sido utilizadas como modelo para estudiar los efectos de la contaminación y procesos de remediación de suelos, reciclaje de nutrientes y estudios genéticos (Lux y Rost, 2012).

Desarrollo de la raíz en *Arabidopsis*

El desarrollo de las plantas se puede clasificar en tres etapas diferentes: embriogénesis, crecimiento vegetal y desarrollo reproductivo. En el caso de *Arabidopsis*, durante la embriogénesis el cigoto se polariza y se alarga antes de que ocurra la primera división, después, esta origina dos células, una apical y una basal. La célula apical se dividirá en un grupo de ocho células seccionadas en dos planos horizontales denominados: dominio apical, que dará origen al meristemo aéreo, así como a los cotiledones y el dominio central que originará el hipocotilo, la raíz y la mayor parte del meristemo apical radicular, como se muestra más adelante (Fig. 1). Por otra parte, la célula basal más cercana al embrión conocida como hipófisis

formará el resto del meristemo apical de raíz, incluyendo el centro quiescente (QC; por sus siglas en inglés: Quiescent centre) y la cofia (Taiz y Zeiger, 2010).

Estructura de la raíz y patrón de zonación longitudinal

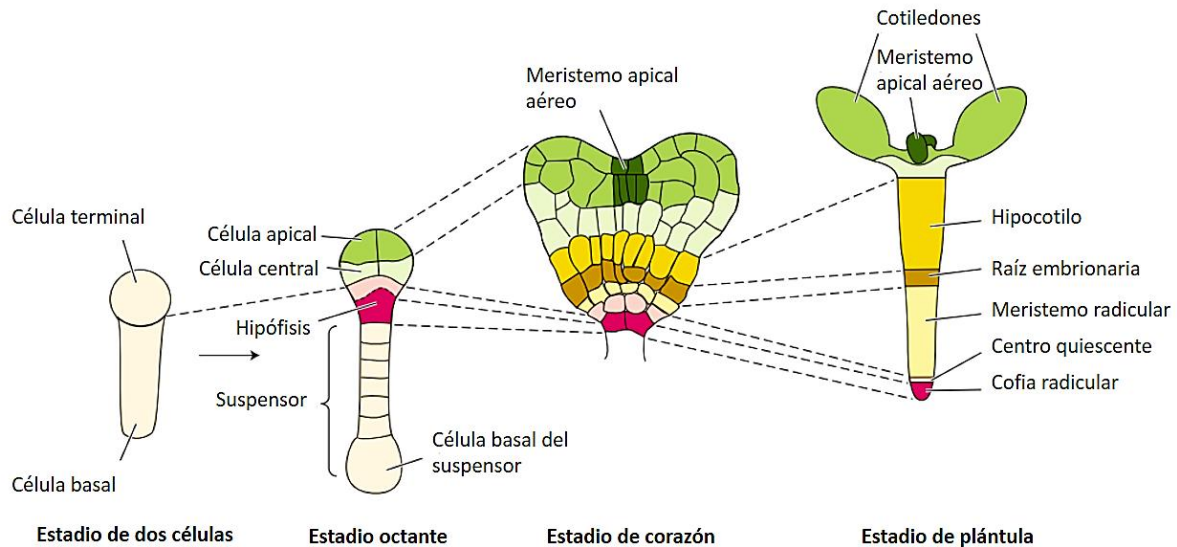


Figura 1. Origen y organización ápico-basal de tejidos vegetales y órganos establecidos durante la embriogénesis temprana (Imagen tomada de Taiz y Zeiger, 2010).

La raíz de *Arabidopsis* tiene una organización celular relativamente simple la cual puede ser descrita de forma apico-basal y radial. En cuanto a la organización apico-basal, Ivanov y Dubrovsky (2013) propusieron un patrón de zonación longitudinal que se muestra en la figura 2, el cual permite identificar las diferentes zonas de desarrollo de la misma. Así, la raíz de *Arabidopsis* se organiza en tres zonas con características de proliferación y diferenciación celular específicas: la zona de proliferación que corresponde al meristemo apical de la raíz (RAM; por sus siglas en inglés: Root Apical Meristem), la zona de elongación (EZ; Elongation Zone) y la zona de diferenciación (DZ; Differentiation Zone). A su vez, el RAM se divide en dos regiones: el dominio de proliferación (PD; Proliferation Domain) en el cual existe alta

probabilidad de que las células se encuentren en mitosis y el dominio de transición (TD; Transition Domain) que es la porción donde disminuye la probabilidad de división celular y donde las células comienzan a crecer lentamente. El dominio de transición principalmente está definido por un conjunto de células que tienen la misma tasa de crecimiento relativo que las células del dominio de proliferación, pero una menor tasa de división celular (Ivanov y Dubrovsky, 2013). Por arriba del RAM, hacia la parte basal de la raíz, se encuentra la zona de elongación caracterizada por un rápido alargamiento de las células y finalmente las células adquieren su tamaño y estado final de diferenciación en la DZ. Por ejemplo, dependiendo del programa morfológico las células del xilema adquieren la pared secundaria y en la epidermis se desarrollan los pelos radicales en la DZ (Baskin, 2000; Bennett y Scheres, 2010).

Por otra parte, en el plano transversal de la raíz del centro hacia la periferia se puede observar el sistema vascular diarco, que consta de dos hileras de xilema y dos de

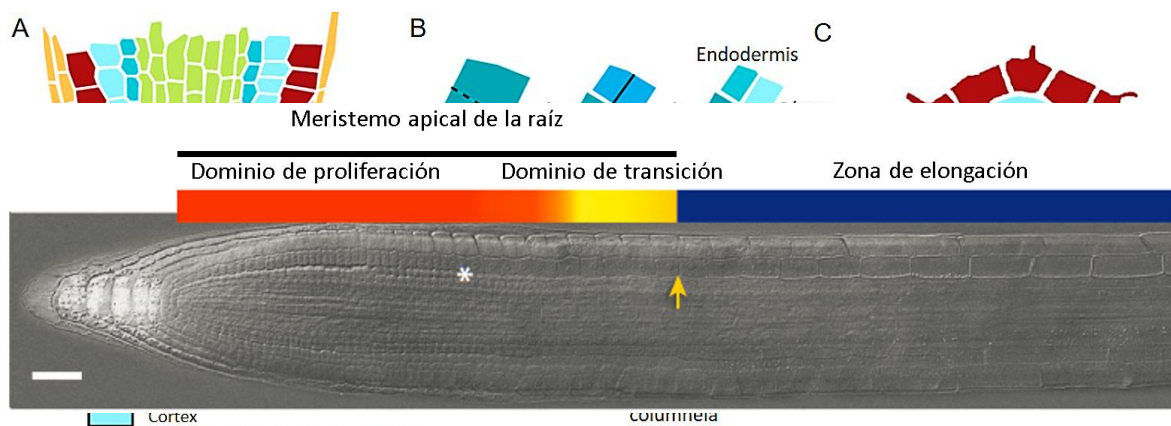


Figura 2. Raíz de *Arabidopsis thaliana*. Patrón de zonación longitudinal. La flecha indica el inicio de la zona de elongación y el asterisco el borde entre el dominio de proliferación y dominio de transición (Imagen tomada de Ivanov y Dubrovsky, 2013)

diferentes capas celulares, las líneas punteadas muestran las divisiones anticlinales y las líneas sólidas las divisiones periclinales (Imágenes modificadas de: De Smet et al, 2015; Fisher y Sozzani, 2016).

floema. Dichos tejidos conductores están rodeados por una capa de células denominadas periciclo, a partir de la cual se formarán los primordios de las raíces laterales. A continuación, se encuentra la endodermis, que constituye una barrera selectiva de iones, azúcares, entre otras moléculas; el córtex, que provee protección mecánica y la epidermis, que rodea a todos los otros tejidos. Además, también contiene el linaje celular de tricoblastos que dan origen a los pelos radicales (Fig. 3; De Smet et al., 2015).

Meristemo apical de la raíz

Durante la morfogénesis, el desarrollo depende de la regulación en la dinámica espaciotemporal tanto de proliferación como de diferenciación celular. En la raíz, un grupo de células en el dominio de proliferación denominado nicho de células troncales (SCN; por sus siglas en inglés: Stem-Cell Niche) genera todos los tipos celulares a partir de divisiones paralelas (periclinales) o perpendiculares (anticlinales), seguidas de la expansión y diferenciación celular (Fig 3B; Scheres et al., 2002). El SCN incluye células iniciales de la cofia (CI ;Cap Initials), cofia lateral (LRC; Lateral Root Cap), epidermis (Epi; Epidermis), córtex/endodermis (Cortex-Endodermis Initial), así como las iniciales del tejido vascular. En medio del nicho de células troncales se encuentra el QC el cual está involucrado en producir y mantener a las células iniciales indiferenciadas (Fig. 3A, Fisher y Sozzani, 2016). Las células del SCN pueden identificarse por la orientación de su plano de división. Por ejemplo: las células iniciales de la cofia sólo se dividen anticlinalmente, sin embargo, las iniciales de córtex/endodermis primero tienen una división anticlinal y luego una periclinal. Por otra parte, la célula inicial de la cofia lateral/epidermis primero se divide periclinalmente y da origen a dos células hijas: una externa que formará a la cofia lateral, y una interna que se dividirá anticlinalmente para mantener a la célula inicial y producir las células hijas de la epidermis (Fig. 3B; Fisher y Sozzani, 2016). Las células iniciales del tejido vascular comprenden células indiferenciadas que vienen del procambium, como son: las células iniciales del periciclo; que solamente se dividen anticlinalmente, las células iniciales del xilema; que se dividen anticlinalmente con una o dos divisiones periclinales subsecuentes, y las células iniciales del parénquima vascular que se dividen primero de manera periclinal y

posteriormente anticlinal (Baum et al, 2002).

La regulación del crecimiento radicular es un proceso complejo que está controlado a distintos niveles por la acción conjunta de redes genéticas y fisiológicas reguladas por hormonas vegetales (De Smet et al, 2015). Sólo por mencionar un ejemplo, la especificación del destino celular está fuertemente regulada por factores de transcripción clave como SHORTROOT (SHR) y SCARECROW (SCR) de la familia de factores de transcripción GRAS, cuyos mutantes presentan raíz corta. Además, son necesarios para formar y mantener la identidad de la endodermis durante la embriogénesis y el desarrollo posterior (Slovak et al., 2016; Bennett y Scheres, 2010). De manera interesante SCR es necesario para mantener la expresión de *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5 (WOX5)*, el cual también es un factor de transcripción clave en el desarrollo radical involucrado en conservar la identidad del QC y cuyos mutantes inducidos son incapaces de mantener el estado indiferenciado de las células iniciales de la cofia, aunado a que presentan un QC desarreglado. Asimismo, en las células de la cofia se secreta CLAVATA3 / EMBRYO SURROUNDING REGION40 (CLE40), el cual regula positivamente a ARABIDOPSIS CRINKLY4 (ACR4), que a su vez limita el movimiento de WOX5 evitando que éste se exprese fuera de las células del QC (Francis, 2015; Fisher y Sozzani, 2016; Slovak et al., 2016).

Expansión celular

Cuando las células cesan de dividirse entran en un proceso de alargamiento, que en la mayoría de las células vegetales es denominado “crecimiento difuso” (Fig. 4A). Este proceso comienza en el dominio de transición, pero tiene su estado crítico en la EZ (Fig. 2). De acuerdo con la teoría ácida de crecimiento, la expansión celular ocurre cuando las auxinas en conjunto con AUXIN BINDING PROTEIN (ABP₅₇) y ATP activan una ATPasa de membrana que hidroliza a los nucleótidos y a su vez propicia el flujo de protones hacia la pared celular (Fig. 4B-C; Hager et al., 1971). Esto genera un incremento en la concentración de protones y disminuye el pH de la pared celular que a su vez se activa tres clases de proteínas involucradas en su reestructuración: expansinas, xiloglucano - endotransglucosidasas y 1,4-β-D-endoglucanasas (Fig. 4B; Nicol y Höfte, 1998). Usualmente el espacio intracelular tiene un potencial osmótico más elevado que la zona extracelular, así que esta diferencia de potenciales permite la entrada de agua hacia la célula, lo que trae como consecuencia un aumento en la presión de turgor; la cual funge como fuerza principal durante la expansión celular (Fig 4B; McQueen-Mason, 1997). Para que las células puedan alargarse también se requiere de un aumento en el tamaño de la vacuola, el cual está dado en parte por la acción de una acuaporina del tonoplasto, GAMMA TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN (GAMMA-TIP), que se expresa en las células que comienzan su rápida elongación y su pérdida de función evita ésta (Ludevid et al., 1992; Petricka et al., 2012). Así como por la acción de COBRA, una proteína de la familia glicosil-fofatidil-inositol, que se ancla a proteínas localizadas en la interface entre la membrana plasmática y la pared celular y regula la expansión polar de las células de la raíz (Schindelman et al, 2001).

La forma final que adquiere una célula es el resultado del equilibrio dinámico entre las regiones resistentes y las regiones propensas a expandirse que son determinadas en parte por la estructura del citoesqueleto (Martin et al., 2001). La orientación transversal de los microtúbulos corticales controla radialmente la expansión celular mediante la localización específica de la celulosa sintasa que produce la deposición de la celulosa en la pared celular (Petricka et al, 2012; Smyth,

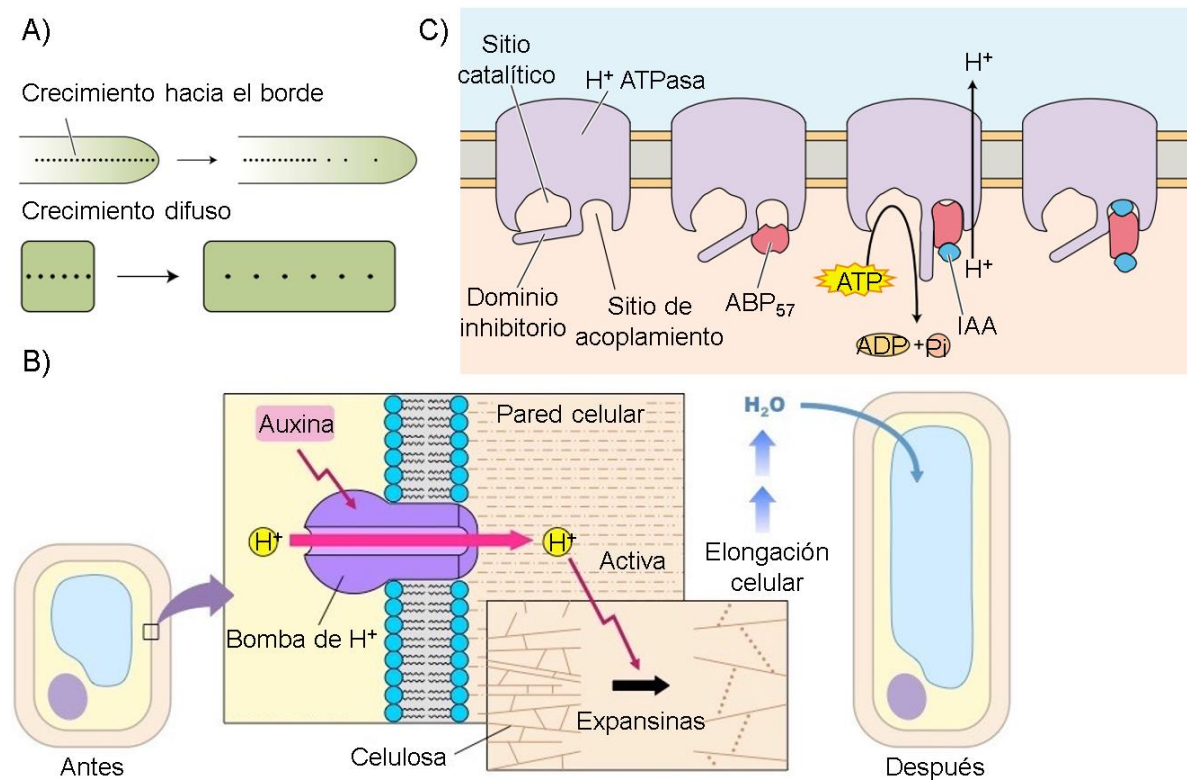


Figura 4. A) El crecimiento hacia un borde se observa solamente en tubos polínicos y pelos radiculares, esto ocurre por la deposición de precursores de síntesis de pared celular transportados por vesículas a través del citoesqueleto de actina. Por otra parte, el crecimiento difuso ocurre en el resto de las células vegetales **B-C)** La acidificación de la pared celular por auxinas estimula la actividad proteínica remodeladora de pared celular (Imágenes tomadas de Taiz y Zeiger, 2010)

2016). Esta idea es apoyada por mutantes como *botero1 (bot1)* y *fragile fiber (fra2)*, los cuales muestran defectos en la expansión celular asociados con la desorientación de microtúbulos corticales y las microfibrillas de celulosa (Bichet et

al., 2001; Burk et al., 2001).

Por otra parte, también se ha demostrado que el proceso de endorreplicación (replicación de DNA sin las fases G2 y M) es necesario para que las células dejen de proliferar y se expandan, pues mutantes que tienen un endociclo afectado como *root hairless (rhl2)* presentan raíces cortas con células pequeñas, lo que sugiere que el incremento de DNA en las células es necesario para la expansión celular (Sugimoto-Shirasu et al, 2002; Petricka et al., 2012).

Participación de las fitohormonas en el crecimiento de la raíz

Distintos procesos como el crecimiento y la morfogénesis dependen de la regulación y coordinación de distintas señales químicas como las fitohormonas (Taiz y Zeiger, 2010). Las auxinas son un tipo de hormonas vegetales que se sintetizan en todos los tejidos, pero principalmente en hojas jóvenes y cotiledones, estas se encuentran implicadas en procesos de división, elongación y diferenciación celular en toda la planta. Además, se sabe que las auxinas viajan hasta la raíz a través del floema, mediante un tipo de transporte a larga distancia conocido como transporte pasivo, el cual es importante para el desarrollo de raíces laterales (Garay-Arroyo et al, 2014). Una vez en la raíz, el transporte polar de las auxinas (PAT), también conocido como transporte de corta distancia, está dado por proteínas de membrana que controlan el influjo a la célula (AUX y LAX) y el eflujo (PIN; PIN-FORMED y ABCB; ATP-BINDING-CASSETTE B) de la hormona (De Smet et al, 2015).

A lo largo del RAM, el PAT mantiene un gradiente de concentración de auxinas con un pico máximo en el nicho de células troncales. Esta elevada concentración de las

auxinas en el nicho de células troncales induce a los genes *PLT* (*PLETHORA*) de la familia de factores de transcripción AP2, que están involucrados en mantener la identidad de las células troncales (Galinha et al, 2007). En el resto del meristemo se dan los niveles propicios de auxinas para que se lleve a cabo la división celular en el (PD) y se inhiba la elongación celular en regiones posteriores.

Las auxinas inducen a su vez a las giberelinas que también están implicadas en el control del tamaño del meristemo y el crecimiento de la raíz. Después de la germinación los altos niveles de giberelinas en el meristemo apical reprimen a *ARR1* y *ARR12* (*ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS*), factores transcripcionales de respuesta a citocininas. Estas últimas, están relacionadas con la diferenciación celular y reprimen la señalización de las auxinas al promover la expresión de *SHY2* (*SHORT HYPOCOTYL 2*) un represor de la señalización de las auxinas. Por lo tanto, es importante mantener a *SHY2* reprimido en el RAM para que se puedan expresar los transportadores PIN, lo que aumenta la concentración de auxinas en el meristemo. Cinco días después de la germinación se reducen los niveles de giberelinas, causando el incremento de la proteína DELLA (RGA) proteínas represoras de la señalización de giberelinas, lo que permite la activación de *ARR1* y *SHY2* por las citocininas en el TD. Así, se reprime la expresión de transportadores PIN en la DZ, restringiendo la distribución de auxinas y propiciando así la diferenciación celular (Fig. 5; Ubeda-Tomas y Bennett, 2010).

Así mismo, los brasinoesteroides (BR) también están involucrados en el control de crecimiento de la raíz. Se piensa que ayudan a mantener la organización e identidad del SCN regulando la expresión de reguladores como *SCR* y *WOX5* (Petricka et al, 2012) y también participan regulando la elongación celular, tanto por la activación de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular como las XETs (XYLOGLUCANO - ENDOTRANSGLICOSILASAS); así como promoviendo la expresión de la celulosa sintasa (*AtCESA*) que controla la extensión de ésta (De Smet et al, 2015).

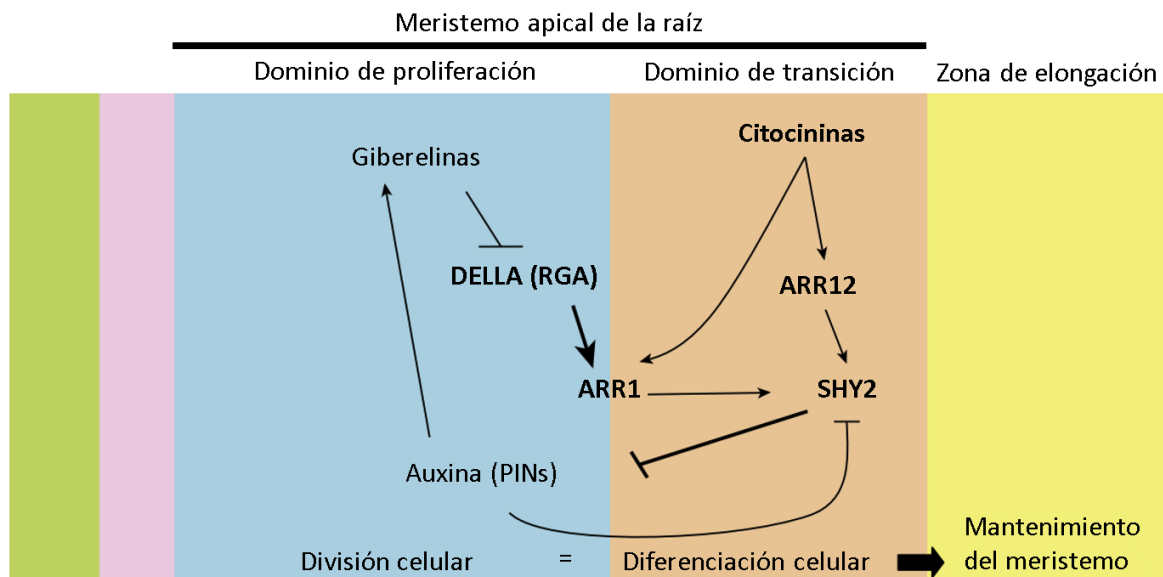


Figura 5. Señales hormonales en la proliferación–diferenciación celular en la raíz. Cinco días después de la germinación, los niveles de giberelinas disminuyen estabilizando a la proteína RGA e incrementando la expresión de ARR1. ARR1 y ARR12 inducen la expresión de *SHY2*, causando la represión de PIN y la biosíntesis de giberelinas.. Consecuentemente la división celular se reduce en la EZ a una tasa equivalente a la de la diferenciación manteniendo así el tamaño del meristemo (imagen modificada de Ubeda-Tomas y Bennett, 2010)

El citoesqueleto en el crecimiento celular

Las hormonas son importantes reguladores del crecimiento, ya sea por división celular o por procesos de expansión celular, por lo que es importante su participación como reguladoras del citoesqueleto en las células (Fu y Yang, 2011). El citoesqueleto vegetal está conformado por microtúbulos (MT) y microfilamentos de actina (MFs) y es regulado por las auxinas, los brasinoesteroides, las giberelinas y el etileno. Los brasinoesteroides promueven la formación de arreglos transversales de MTs en células de epicotilos y mutantes implicados en la biosíntesis de brasinoesteroides (*bul1-1*) presentan defectos en la organización de MTs y la organización se reestablece al añadir la hormona (Catterou et al, 2001). La adición del ácido giberélico (GA) incrementa la proporción de microtúbulos transversales y aumenta drásticamente la elongación celular en tallos (Ehrhardt y Shaw, 2006). Mutantes relacionados en la vía de GA como: *ga-1* y *gai*, presentan fenotipos enanos, mientras que el mutante de respuesta constitutiva a GA, *spy*, exhibe un fenotipo alargado en comparación con la planta silvestre (Fu y Yang, 2011). También se ha demostrado que las auxinas tienen un papel importante en la regulación de la estructura de la pared celular, a través de cambios inducidos en la dinámica de citoesqueleto (Lehman et al, 2017). Por ejemplo, en raíces e hipocotilos etiolados, el incremento endógeno o exógeno de los niveles de auxinas propicia que los microtúbulos se dispongan en arreglos longitudinales que a su vez inhiben el crecimiento (Chen et al, 2016). Asimismo, evidencia reciente demuestra que las auxinas pueden modular la expresión, organización y dinámica de la actina a través de las dos distintas vías de señalización: por el receptor nuclear AUX/IAA-SCF y por el receptor situado en la membrana AUXIN-BINDING PROTEIN (ABP1); mientras

que la interferencia en la organización de actina por agentes químicos o por mutaciones, tienen un impacto en el transporte activo de auxinas y afectaciones que varían según el tipo celular (Zhu y Geisler, 2015).

El citoesqueleto no solo participa en la expansión, sino que también participa en el crecimiento por división celular. Además, los MTs ayudan a organizar el huso mitótico y los MFs forman distintos arreglos durante el ciclo celular. Por ejemplo, los MFs del citoplasma forman una estructura parecida a una canasta que sostiene al núcleo celular y los MFs corticales disminuyen gradualmente la formación de cables de actina. Ambos eventos ocurren durante el transcurso de la interfase y se asocian a una probable función de andamiaje de la maquinaria celular implicada en el transporte de vesículas y a una función como herramienta auxiliar para que ocurra la división celular (Liu et al, 2011).

Microtúbulos

Los MTs son polímeros formados por heterodímeros de α - y β -tubulina, que exhiben una polaridad inherente debido a los distintos ciclos de polimerización y despolimerización, es decir, tiene dos extremos con distintas propiedades. El borde que presenta tasas elevadas de adición de heterodímeros con GTP (guanosina-5'-trifosfato) y bajas tasas de destitución es denominado, “extremo de crecimiento rápido” o positivo (+), mientras que el extremo con baja tasa de adición y una elevada tasa de despolimeración se denomina, “extremo de crecimiento lento” o negativo (-). Eventualmente el GTP unido a β -tubulina, es hidrolizado a GDP (guanosina-5'-difosfato) poco después de la polimerización, lo cual debilita la

afinidad de unión de la tubulina a moléculas adyacentes y favorece la despolimerización (Seagull, 2016). Asimismo, la nucleación de los MTs comienza con la participación de dos complejos protéicos: γ -tubulin Small Complex (γ -TuSC) y el γ -tubulin-Ring Complex (γ -TuRC) (Fig. 6A-B). El componente nuclear de la polimerización que determina la posición celular donde comienza el ensamblaje de los MTs es el γ -TuSC mientras que el γ -TuRC opera como molde para iniciar la nucleación de dímeros de α - β -tubulina y se localiza en el extremo de crecimiento lento (Fig. 6C; Sulimenko et al, 2017).

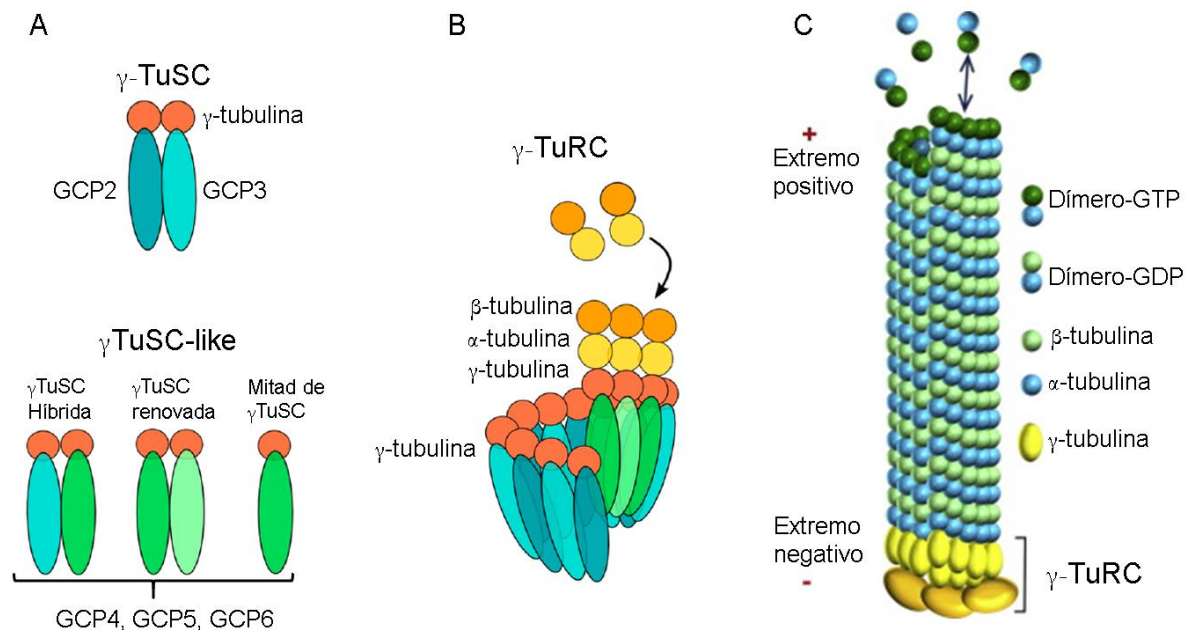


Figura 6. Formación de MTs **A)** Nucleación de los MT mediante la formación del complejo γ -TuSC que lo componen las proteínas GCP2, GCP3 (entre otras) y dos monómeros de γ -Tubulina **B)** Formación del complejo γ -TuRC **C)** Polimerización longitudinal de los microtúbulos.

De manera interesante los microtúbulos se estructuran en cuatro tipos de arreglos: tres de ellos participan en la banda preprofásica (PPB), huso mitótico y el fragmoplasto, mientras que los microtúbulos corticales se encargan de la expansión

celular (Fig. 7; Keijzer et al, 2014). Además, existen diversas proteínas que pueden interactuar con los MTs pero sólo aquellas que intervienen en la dinámica de los MTS de forma directa son consideradas proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). Estas proteínas pueden clasificarse en dos grupos: proteínas motoras (kinesinas) y proteínas reguladoras que se caracterizan por intervenir en la organización, polimerización o despolimerización de MTs (Tabla 1; Hamada, 2014; Krtkova et al, 2016; Seagull, 2016).

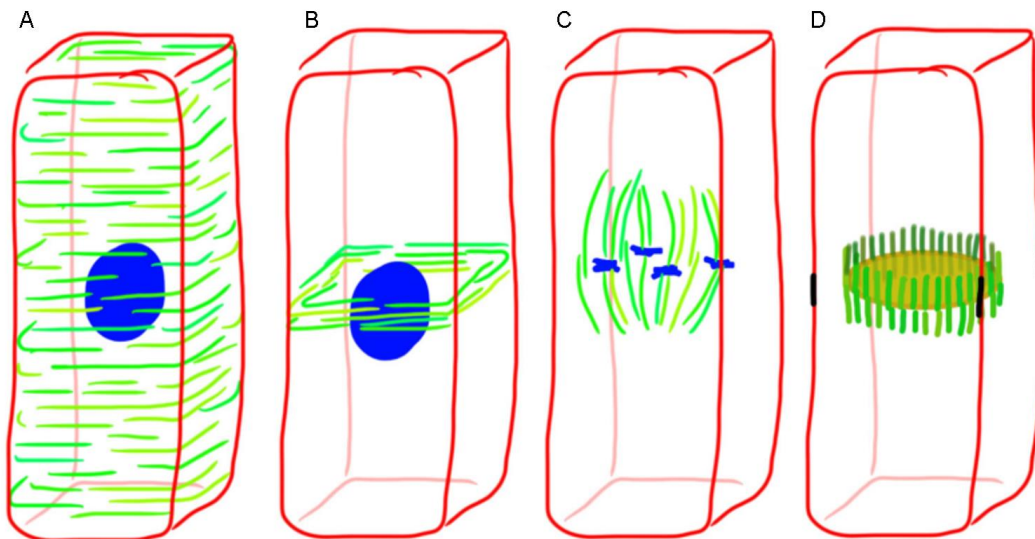


Figura 7. Distribución espacial de los microtúbulos en células vegetales. **A)** Microtúbulos en arreglos corticales. **B)** Banda pre-profásica cuya localización coincide con la posición del núcleo celular. **C)** Huso mitótico durante la segregación de cromátidas hermanas. **D)** Fragmaoplasto, que se forma fuera del remanente del huso y se expande radialmente hacia la localización de la banda pre-profásica (líneas negras) dejando una placa celular (amarillo). (Imagen tomada de Keijzer et al, 2014)

Tabla 1. Proteínas asociadas a microtúbulos identificadas en plantas (tomada de Seagull, 2016)

Función general de las MAPS	Nombre	Función específica
Proteínas motoras	Kinesina	Transporte de organelos, deslizamiento de MTs antiparalelos
Nucleación de MTs	g-tubulina	Parte del complejo γ -TuRC
	GCPs	Parte del complejo γ -TuRC
	Augmina	Limita al γ -TuRC a sitios celulares específicos
	NEDD1	Ensamblaje del huso mitótico/meiótico
	TPX2	Desensamble de la envoltura nuclear y promueve el ensamble de los husos
	PPA2	Promueve la nucleación ramificada
	GIP2	Une al γ -TuRC a MTs existentes
Dinámica de MTs	MOR1 (familia MAP215)	Promueve el crecimiento de MT en todos los tipos de arreglos microtubulares
	EB1 (familia +TIPs)	Inhibe la nucleación de MTs
	CLASP	Promueve el equilibrio entre polimerización y despolimerización de MTs
	Augmina	Promueve la reorganización o reorientación de MTs
	Katanina	Propicia el corte de MTs
	SPR2	Promueve el intercambio mejorando la polimerización y despolimerización de MTs
	TPX2	Retrasa la despolimerización de MTs
	Kinesina	Kinesina 13 despolimeriza MTs, kinesina 7 despolimeriza MTs en fragmoplastos
Organización de MTs	P161/P90	Propicia la separación de MTs recién formados por γ -TuRC y estabiliza MTs
	WLD3	Empaquetamiento de MTs en CMTs
	MAP65	Posiblemente implicada en empaquetamiento de MTs
	Kinesina	Kinesina 5 y 12 dividen entrecruzadamente los MTs en el huso y en el fragmoplasto
	TON	Regula la nucleación y organización en CMTs y PPB
Función desconocida	MAP70	Se encuentra en todos los órganos
	AIR9	Asociada a CMTs, huso mitótico/meiótico, fragmoplasto y CDS

Mutantes en tubulina o en proteínas relacionadas con esta muestran fenotipos con afectaciones en la expansión celular anisotrópica y por consecuencia en los patrones de crecimiento. *lefty1* y *lefty2*; son mutantes de α -tubulina 6 y 4 respectivamente, estos presentan patrones helicoidales orientados hacia la izquierda tanto en hipocotilos como en las raíces (Fig. 8C; Thitamadee et al, 2002). *spiral1* y *spiral2* (Fig. 8B y D), son otros mutantes cuyos genes pertenecen a la familia de MAPs específicas de plantas y sus fenotipos también muestran patrones helicoidales en la epidermis, sin embargo, en estos casos las células están orientadas hacia la derecha al igual que el mutante *spiral3* que codifica para GCP2, una proteína que forma parte del complejo γ -TuRC (Furutani et al., 2000; Nakamura

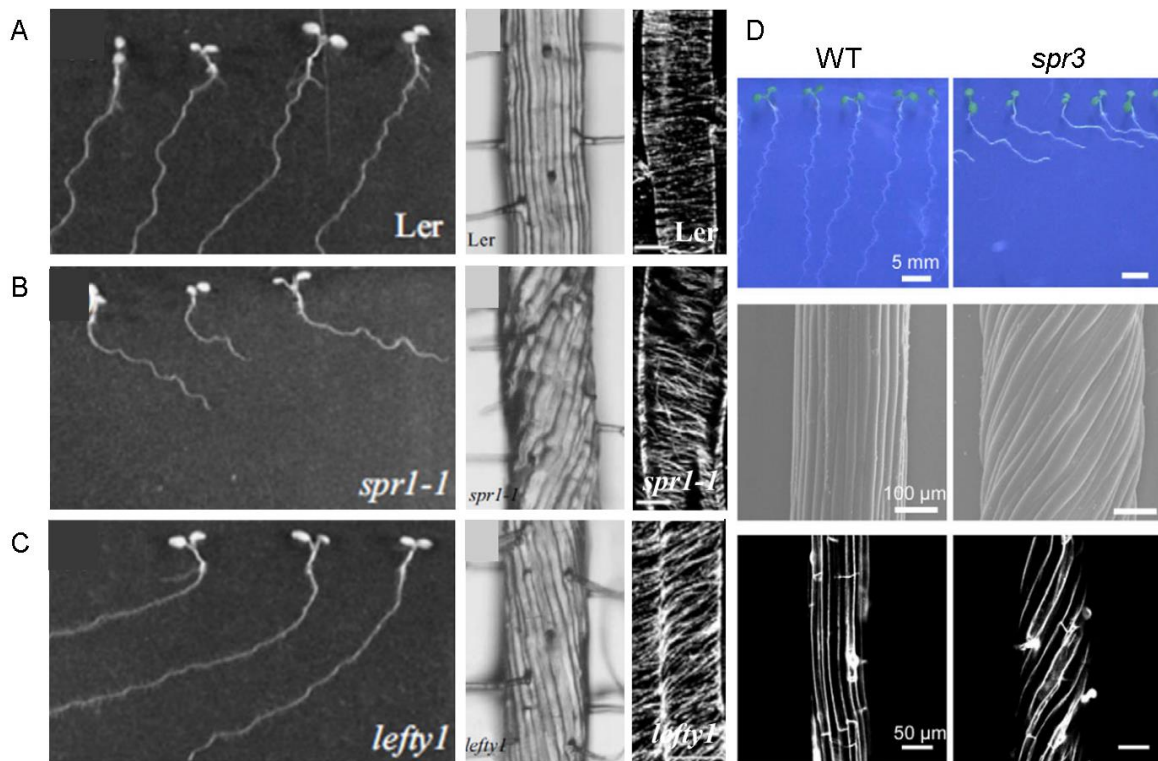


Figura 8. Fenotipos de mutantes relacionados con MTs **A-C)** De izquierda a derecha se muestra el fenotipo radicular, las hileras celulares de la epidermis y la disposición de los microtúbulos en *spir1-1* y *lefty1* en comparación con la planta silvestre Ler. **D)** Se observa el fenotipo y la inclinación de las células epidérmicas del mutante *spir3* en comparación con la planta WT (Nakamura y Hashimoto, 2009; Smyth, 2016). Estos fenotipos también están relacionados con la deposición

de microfibrillas de celulosa pues se sabe que el complejo protéico que se encarga de sintetizar la celulosa, se posiciona sobre la red de MTs y si estos últimos se encuentran desarreglados la deposición de microfibrillas también se ve afectada (Smyth, 2016).

Microfilamentos

A diferencia de las células animales que utilizan a los MTs como vía principal de transporte, las células vegetales usan cables hechos de microfilamentos de actina (MFs) (Li et al., 2014). Los MFs acarrear proteínas en vesículas secretoras hacia la membrana plasmática y están implicadas, entre otras cosas, en el buen funcionamiento de la maquinaria que lleva a cabo la síntesis de la pared celular, así como de la recuperación por endocitosis de membranas y de proteínas de membrana (Li et al., 2015). Los cables de actina también impulsan el movimiento de organelos y posicionan compartimentos adyacentes a las diferentes membranas.

La actina monomérica o globular (actina-G) es una proteína de ~42 kDa que al asociarse con ATP puede formar un dímero. Este dímero actúa como nucleador al que se le pueden ir añadiendo más monómeros (unidos a ATP) en el extremo positivo (+) del filamento, de forma similar a los microtúbulos. Conforme se hidroliza el ATP a ADP se constituye el extremo negativo (-) del filamento del cual los monómeros con ADP son removidos (Staiger y Blanchoin, 2006). Se sabe que para que un dímero se incorpore al microfilamento en crecimiento se requiere de la profilina, mientras que para que se despolimerice, requiere del homólogo de cofilina/ADF en plantas (Dominguez y Holmes, 2011). Los microfilamentos pueden

originarse *de novo* en el citoplasma o bien, pueden crecer lateralmente como ramificaciones de un filamento preexistente (Henty-Ridilla et al., 2013). Dos microfilamentos se asocian en antisentido para constituir un cable o hebra con un giro helicoidal (Staiger y Blanchoin, 2006). Aunado a esto, los microfilamentos pueden formar estructuras supramoleculares con la ayuda de proteínas de unión a actina (ABPs; Tabla 2). Se ha demostrado *in vitro* que la dinámica de actina está regida por un comportamiento estocástico que implica dos componentes: la rápida unión de un conjunto de actinas polimerizables y la despolimerización por la remoción de viejos monómeros en el filamento (Fig. 9; Staiger et al., 2009). Sin embargo, *in vivo*, las ABPs regulan de manera robusta este proceso.

Tabla 2. Proteínas de unión a actina (Actin Binding Proteins) y sus funciones conocidas (Seagull, 2016; Meagher et al., 2011).

ABD	Función
ADF/cofilina	Despolimeriza MFs en el borde de crecimiento lento
ARP2/3	Forma un complejo que promueve la polimerización de actina
CAP	Promueve el intercambio de ATP a ADP en monómeros de actina y promueve el corte de MFs en cooperación con ADF/cofilina
CP	Se añaden al borde positivo del MF para prevenir la adición de monómeros
Fimbrina	Reticula microfilamentos, generando un empaquetamiento estrecho entre ellos
Formina	Promueve la nucleación <i>de novo</i> de actina
Gelsolina	Corta filamentos de actina y funge como proteína cap
Miosina VIII	Implicada en conectar células vecinas a través de plasmodesmos
Miosina XI	Implicada en el movimiento de organelos como la mitocondria o el aparato de Golgi
Profilina	Implicada en el mantenimiento del conjunto de actinas monoméricas sin polimerizar
Vilina	Une y reticula o empaquetan MFs adyacentes

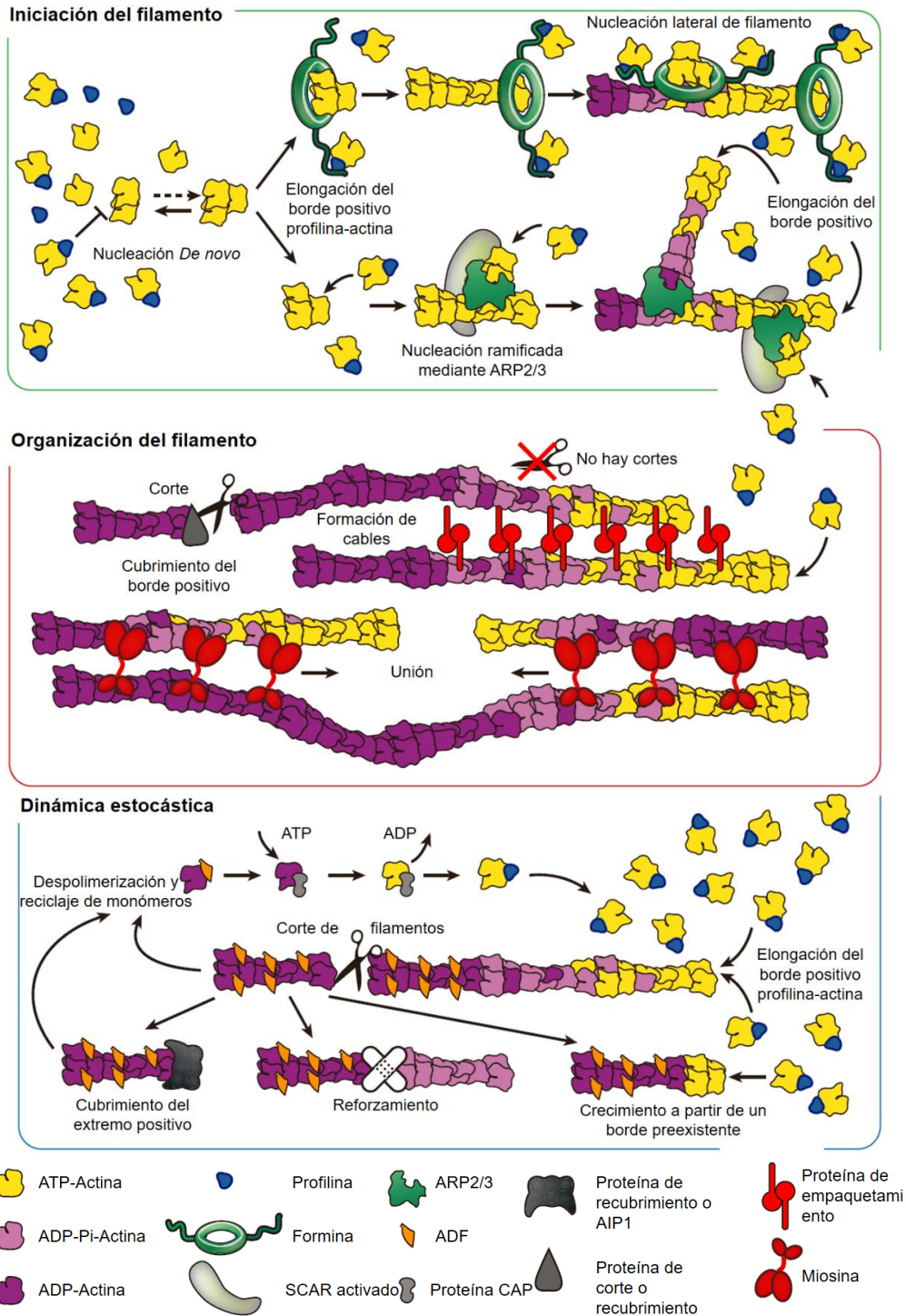


Figura 9. Ilustración que representa las características principales y las moléculas clave que regulan la iniciación, ensamblaje, desensamblaje y organización de los filamentos de actina en células vegetales (Imagen modificada de Li et al., 2015).

En *Arabidopsis* existen 10 genes que codifican para la actina y que se expresan de forma diferencial en los órganos de la planta. A nivel protéico, se ha visto que algunas actinas se expresan mayoritariamente en tejidos vegetativos como la ACT2, ACT7 y ACT8, mientras que la ACT1, ACT3, ACT4 y ACT11 se expresan principalmente en tejidos reproductivos como el polen maduro, óvulos y saco embrionario (Meagher et al., 2011)

Diferentes mutantes en ACT2 tienen afectado el desarrollo de pelos radicales: *deformed root hairs der1-1*, *der1-2* y *der1-3*, presentan sustituciones de ALA₁₈₃-VAL₁₈₃, ARG₉₇-HIS₉₇ y ARG₉₇-CYS₉₇, respectivamente. Curiosamente el alelo *der1-1* sólo muestra el acortamiento de pelos radicales en la primera mitad de la raíz mientras que el fenotipo de los otros dos alelos se presenta en toda la raíz, demostrando que ACT2 no sólo es importante en el crecimiento de los pelos radicales sino también en el posicionamiento del primordio (Ringli et al., 2002). De manera similar, el alelo mutante semidominante *act2-2D* tiene una sustitución de ARG₁₄₉ por CYS₁₄₉. Esta mutación en plantas homocigotas genera raíces cortas, onduladas e inhibe el desarrollo de órganos aéreos, además las plantas mueren antes de florecer y en su forma heterocigota las plantas son ligeramente más pequeñas y desarrollaron menos pelos radicales y más cortos (Nishimura et al, 2003). Aunado a esto, otro alelo mutante denominado *act2-5*, tiene la sustitución de ARG₁₇₉-CYS₁₇₉. Este mutante tiene un fenotipo de crecimiento radicular ondulatorio y respuesta constitutiva a brasinoesteroides, con un citoesqueleto altamente dinámico, es decir la tasa de polimerización/despolimerización es mayor que en las plantas silvestres y los microfilamentos son cortos y difícilmente se asocian en

cables (Lanza et al., 2012). Curiosamente la mayoría de los alelos mutantes en *ACT2* presentan raíces y pelos radicales con un patrón de crecimiento ondulatorio (Fig. 10).

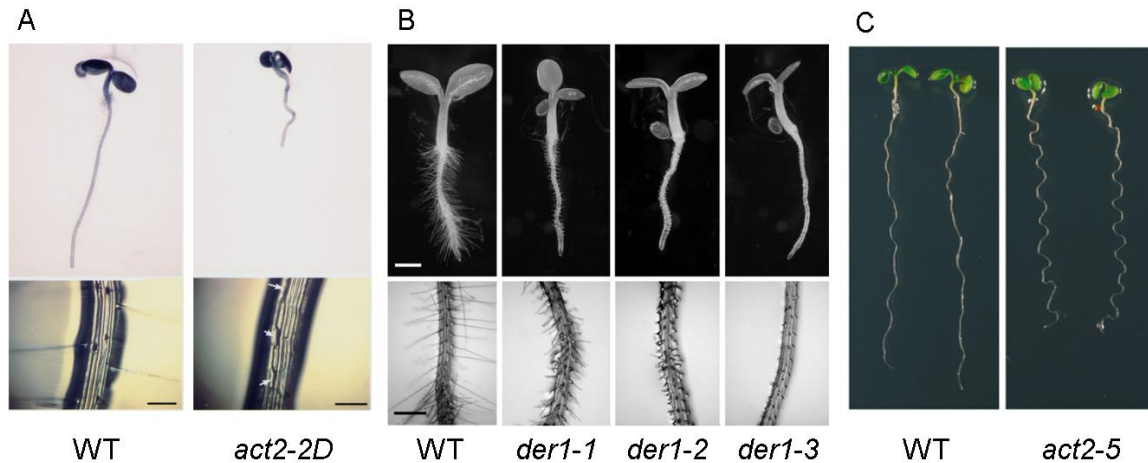


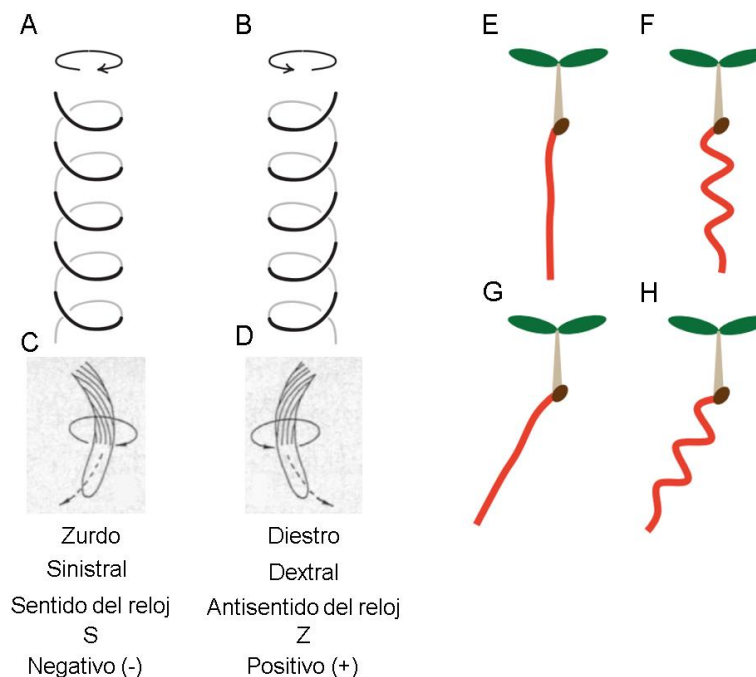
Figura 10. Fenotipos de distintos mutantes de *ACT2*. **A)** Mutante homocigoto, *act2-2D*. **B)** Alelos mutantes *der*. **C)** Mutante *act2-5*, con crecimiento ondulatorio. (Imágenes tomadas de Ringli et al., 2002; Nishimura et al., 2003 y Lanza et al., 2012).

Movimientos durante el crecimiento radical

Las raíces de las plantas terrestres desarrollan complejos patrones de crecimiento y movimientos durante su desarrollo, estos son regulados principalmente por la percepción de señales ambientales que se transmiten a través de hormonas, modificando la dinámica del citoesqueleto y la pared celular (Roy y Bassham, 2014). Los movimientos vegetales se clasifican en dos tipos: los tropismos y los movimientos násticos (Bastien y Meroz, 2016). Los primeros, direccionan el crecimiento de un órgano en respuesta a una señal ambiental, ya sea hacia el estímulo (de manera positiva) o evitándolo (de manera negativa) (Gilroy, 2008). Y aunque los movimientos násticos también ocurren en respuesta a un factor externo,

el crecimiento no es direccionado (Roy y Bassham, 2014). La nutación, frecuentemente llamada circumnutación es un tipo particular de movimiento nástico, en el cual un órgano vegetal gira alrededor de un eje imaginario, dando como resultado un aparente movimiento oscilatorio cuando se crece sobre una superficie (Fig.11 A-D; Bastien y Meroz, 2016). Por ejemplo, la raíz crece de forma helicoidal generando un movimiento de circumnutación (Okada y Shimura, 1990). Cuando las plantas de *Arabidopsis* se crecen sobre una superficie inclinada o dura (como el agar), este crecimiento helicoidal en tres dimensiones se limita a dos dimensiones dando como resultado un crecimiento ondulatorio denominado “waving” (Fig. 11F; Oliva y Dunand, 2007). Por otra parte, el “skewing” ocurre cuando la dirección de crecimiento de una raíz se desvía de la dirección del vector gravitatorio (Fig. 11G; Schultz et al., 2017). De manera interesante, diversos ecotipos de *Arabidopsis* presentan esta desviación de forma natural como Cape Verde Islands (Cvi) y Landsberg *erecta* (Ler) (Vaughn y Masson, 2011). A pesar de que estos movimientos han sido protagonistas de distintas investigaciones aún existe controversia entre los modelos que permitan explicar las causas de estos fenómenos. Un modelo propone que el *waving* y el *skewing* son resultado conjunto del tigmotropismo, la gravedad y la circumnutación. De tal forma, que el gravitropismo positivo induce a la raíz a crecer hacia abajo y en un medio de cultivo inclinado e impenetrable causa una respuesta tigmotrópica, que en conjunto con la circumnutación natural de la planta propicia la desviación del eje gravitatorio, ya sea porque alguno de los giros en la raíz es de mayor longitud que otro, o bien por la formación de patrones ondulatorios si los giros helicoidales son de frecuencias iguales (Migliaccio y Piconese, 2001). El segundo modelo postula que este tipo de

movimientos son resultado de la interacción física entre la punta de la raíz y el medio de crecimiento (Thompson y Holbrook, 2004; Roy y Bassham, 2014). Durante los últimos años, se han realizado análisis genéticos para encontrar los genes implicados en el desarrollo de la raíz y sus patrones de crecimiento. Mutantes con patrones alterados de “skewing” y “waving” en la raíz en diversos tamizados han sido estudiados (Oliva y Dund, 2007; Roy y Bassham, 2014). Schultz y colaboradores (2017) identificaron 11 genes candidatos que están potencialmente involucrados en el control del desplazamiento de la raíz del eje gravitatorio a partir de la comparación de dos perfiles de expresión génica entre dos ecotipos de *Arabidopsis*: Columbia-0 (Col-0) y Wassileskija (WS). Muchos de los genes



involucrados en el *skewing* están relacionados con el citoesqueleto de tubulina

Figura 11. **A-B)** Representación de los movimientos helicoidales en la raíz. **C-D)** distintos nombres que se le han asignado a los giros según la orientación de la punta de la raíz. **E)** Crecimiento radicular sobre placa vertical. **F)** Crecimiento ondulatorio (waving) al inclinar la placa. **G)** Crecimiento desviado del eje gravitatorio (skewing). **H)** Representación de waving y skewing. (Imágenes obtenidas de Okada y Shimura, 1990; Smyth, 2016; Schultz et al., 2017).

como *lefty1*, *lefty2* o *spiral2* (Furutani et al., 2000; Thitamadee et al., 2002), y mutantes en actina presentan un fenotipo de crecimiento ondulatorio, como mencioné en la sección anterior.

La articulación de estos patrones de desarrollo ocurre a nivel celular, donde una multitud de genes integrados en una red, regulan el desarrollo y lo ajustan en función de las condiciones ambientales (Slovak et al., 2016). Esta red de regulación genética, también se incorpora la complejidad de procesos hormonales. A pesar de que en los últimos años, diversos análisis han ido dilucidando las posibles funciones de distintos genes en el desarrollo radicular y en distintos casos la ausencia de algunos genera tal impacto en el organismo que propicia fenotipos como: la desorganización del nicho de células troncales, menor elongación celular, anulación de la formación de pelos radiculares, inhibición de crecimiento de raíces laterales, disminución de la longitud de meristemo, pérdida de la simetría en la división celular, retraso de la duración de ciclo celular o movimientos errantes durante el crecimiento (De Smet et al., 2015). Aún es necesario continuar con la búsqueda de nuevos componentes que nos permitan entender cómo funcionan estas redes de regulación durante el desarrollo radicular.

Antecedentes

En el laboratorio contamos con un mutante en actina 2 (*act2-5*), que tiene una sustitución de la ARG179 por una CYS. Este mutante presenta un fenotipo de crecimiento radicular ondulatorio con órganos aéreos rizados y enroscados. Además, presenta un citoesqueleto de actina sumamente dinámico con filamentos cortos, que afecta la polaridad de al menos un transportador de auxina (PIN2) en la membrana plasmática y una respuesta potenciada a la señalización de las hormonas brasinoesteroides (Lanza et al., 2012). Así que para conocer otros genes que podrían participar de forma conjunta o independiente a la *ACT2* en el crecimiento ondulatorio de la raíz, previo al presente trabajo se realizó una segunda mutagénesis sobre *act2-5* y fue seleccionado un mutante con un fenotipo de ondulación potenciada con respecto al parental al que llamamos *superwavy* (Abad-Vivero, 2009). Este mutante, fue retrocruzado con la planta silvestre y segregaron dos fenotipos mutantes: por una parte, el mutante *act2-5* (como era de esperarse) y, por otro lado, un mutante de raíz corta al que llamamos *medium-size root (mer)*. Adicionalmente *mer* se retrocruzó dos veces más para limpiar su genotipo de otras posibles mutaciones (Fig. 12). En este trabajo nos centramos en la caracterización del desarrollo de la raíz de *mer* R3 (retrocruzado 3 veces), a nivel celular para determinar si el fenotipo de raíz corta se debe a una afectación en la proliferación y/o en la elongación celular.

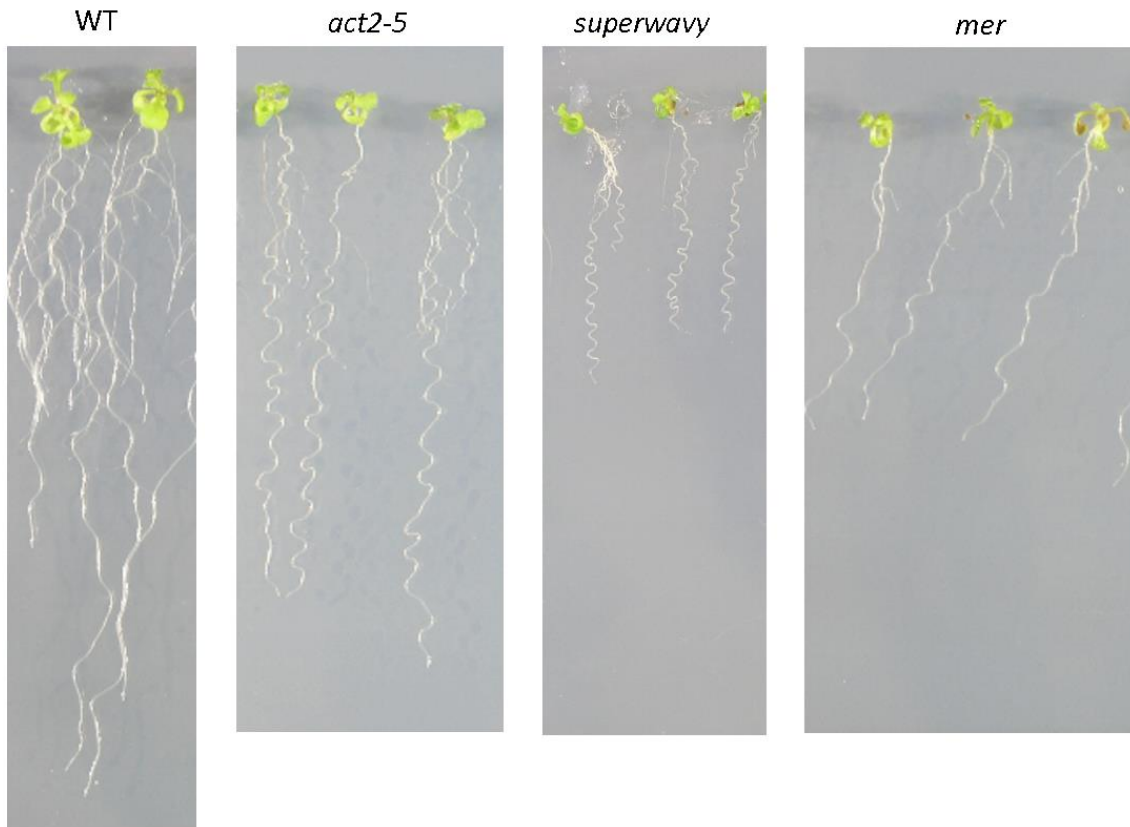


Figura 12. Fenotipos de plantas silvestres (WT), *act2-5*, *superwavy* y la tercera retrocruza de *mer*. Tomada por García-Ponce B.

Hipótesis

La proliferación celular en el mutante *medium-size root* está disminuida, lo que hace que la raíz crezca de forma más lenta que las plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*.

Objetivo general

Caracterizar a nivel celular el desarrollo de la raíz del mutante *medium-size root* (*mer*).

Objetivos particulares

- Recuperación del doble mutante *superwavy* mediante la cruce de *mer* por *act2-5*.
- Comparación del crecimiento de la raíz del mutante *mer* con las plantas silvestres en placas verticales e inclinadas.
- Cuantificación de diferentes parámetros celulares a lo largo del eje ápico-basal de la raíz principal.
- Análisis de los microfilamentos de actina mediante el marcador ABD::GFP introducido en *mer*.

Materiales y Métodos

Crecimiento de las plantas

Las semillas de plantas silvestres y mutantes se esterilizaron con una solución de 60% de hipoclorito de sodio y 0.005% de Tween20 durante 5 minutos en agitación, seguidos de 3 lavados con agua bidestilada estéril y estratificación a 4°C durante tres días. Posteriormente las semillas fueron sembradas en cajas con medio de cultivo MS 0.2X (Murashige y Skoog, 1962) con 1% de sacarosa y 1% de agar para las placas verticales, en las placas inclinadas se utilizó 1.5% de agar. Después se colocaron en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas oscuridad), temperatura de 22°C, una humedad relativa de 50% e intensidad lumínica de 93.5-139 $\mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$. De manera particular y para observar los hipocotilos etiolados se realizó un proceso similar, sin embargo, después de sembrar las semillas, estas se expusieron por 2 horas a la luz e inmediatamente se cubrieron con papel aluminio para evitar el paso de la luz, dejándolas crecer bajo las condiciones anteriormente mencionadas por 8 días.

Obtención del doble mutante *superwavy* a partir de *mer* y *act2-5*

Se emascularon las flores de *mer* y se fecundaron con el polen de *act2-5* y viceversa. Se comprobó que las plantas F1 presentaran un fenotipo silvestre, posteriormente se trasplantaron a tierra para obtener la F2 y finalmente se sembraron 90 semillas de esta generación para obtener el doble mutante *superwavy*.

Fijación y aclaramiento de las raíces

Las muestras se fijaron en una solución de etanol 50% y ácido acético 10%, durante 12 horas, posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada y se incubaron durante 40 minutos a 37°C con una solución de ácido peryódico al 1%. Se realizaron 3 lavados con agua destilada y las raíces se dejaron reposar durante 2 horas en reactivo de Schiff (metabisulfito de sodio [Na₂S₂O₃] 100 mM, HCl 0.15 N y yoduro de propidio 100 µg/mL). Finalmente se realizó un último lavado con agua destilada y las muestras se colocaron en portaobjetos con una solución aclaradora preparada en glicerol 65% (ac. v/v), DMSO 2% (v/v), NaI 4.2 M y Na₂S₂O₃ 8 mM (Dubrovsky et al. 2009).

Microscopía óptica

Las raíces de plantas de 6 días post germinación (dpg), fueron fijadas y aclaradas como se describió en la sección previa (Dubrovsky et al., 2009). Posteriormente se realizó un registro fotográfico desde el meristemo hasta la zona de diferenciación (el primer primordio de pelo de raíz), en un microscopio Olympus BX60, empleando la técnica de contraste diferencial de interferencia (DIC Nomarski).

Cuantificaciones celulares de la raíz

Las plantas fueron colectadas a los 6 dpg y tratadas con la técnica de pseudo-Schiff previamente descrita por Dubrovsky y col., (2009). Una vez preparadas las muestras para microscopía (con el método descrito previamente) se realizó una construcción fotográfica por el plano medio de la raíz siguiendo una sola hilera de células de córtex, desde la primera célula inicial hasta el primer primordio de pelo radicular. Se realizó la medición de manera sucesiva de cada célula correspondiente a la hilera

de córtex usando la barra de escala para el objetivo 40x en la misma resolución de captura de la imagen para obtener el equivalente de pixeles a micrómetros con el software ImageJ. Los conjuntos de mediciones se procesaron con el algoritmo de cambio estructural múltiple MSC (http://www.ibiologia.com.mx/MSA_analysis/; Pacheco-Escobedo, 2016), el cual realiza la estimación de la longitud del PD, TD y EZ, así como del número de células presentes en PD y en el TD. El número de células presentes en la EZ se obtuvo calculando la diferencia entre el número de células total desde la primera inicial hasta el primer pelo radical, menos el número de células del RAM obtenido por el programa. La cinética de crecimiento se realizó graficando los promedios del tamaño celular correspondiente a cada célula desde la primera inicial de córtex hasta la célula adyacente al primer primordio de pelo radicular.

Por otra parte, para calcular la tasa de crecimiento ($\mu\text{m}/\text{h}$) se marcaron los límites del tamaño de las raíces a los 5 dpg en la placa, después de 24 horas exactas se realizó nuevamente el marcaje, e inmediatamente se llevó a cabo un registro fotográfico de las raíces con su respectiva escala para su posterior medición con el software ImageJ. Se obtuvo la diferencia entre el tamaño de la raíz que tenía a los 6 dpg menos la de 5 dpg y ese tamaño se dividió entre 24 horas.

Finalmente, la cinética de crecimiento de células diferenciadas se realizó desde la aparición del primer primordio de pelo radicular hasta la célula número 10 y después contando a partir de la célula número 6 a la célula 15.

Microscopía confocal

Las raíces de plantas de 3 dpg se procesaron con la técnica de pseudo-Schiff previamente descrita y los meristemas se fotografiaron con un microscopio confocal Olympus FLUOVIEW1000 con un objetivo de inmersión de 60x en el plano medio. La visualización del citoesqueleto de actina, también se realizó mediante microscopía confocal con ayuda del marcador ABD:GFP. En raíces sin fijar y a la altura de la zona de diferenciación, se hicieron cortes ópticos longitudinales cada 5 μm desde afuera hacia adentro de la raíz (hasta el plano medio), incluyendo: epidermis, endodermis y exceptuando el cilindro vascular.; el número de cortes realizados osciló entre 9 y 14 en ambas líneas. Finalmente se unieron los cortes en una sola imagen para observar el citoesqueleto de actina.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados en el software SigmaPlot 11, el cuál primeramente emplea una prueba de normalidad de datos (Kolmogorov-Smirnov). Posteriormente, para los datos que presentaron un comportamiento normal se realizaron pruebas de *t*-Student de dos colas. En el caso de los datos que no pasaron la prueba de normalidad se empleó el análisis de Mann-Whitney.

Resultados

Recuperación del doble mutante *superwavy* mediante la cruce de *mer* por *act2-5*.

Con la finalidad de comprobar que el fenotipo del mutante *mer* en conjunto con *act2-5* genera el fenotipo *superwavy* (*swav*), se realizó el cruce: *mer* x *act2-5* y *act2-5* x *mer* (Fig. 13). Posteriormente se obtuvo la F2 de cada cruce y se observó el fenotipo *swav* en ambos cruces, lo cual confirma que dicho fenotipo es el resultado conjunto de ambos mutantes. Además, en la F2 se obtuvieron las frecuencias de segregación (Tabla 3) para investigar si existía un efecto materno en el fenotipo. Aunque se observa variación entre los fenotipos esperados y los observados, de los cruces *act2-5* x *mer* y el recíproco *mer* x *act2-5* (donde el primer mutante es la madre), esta

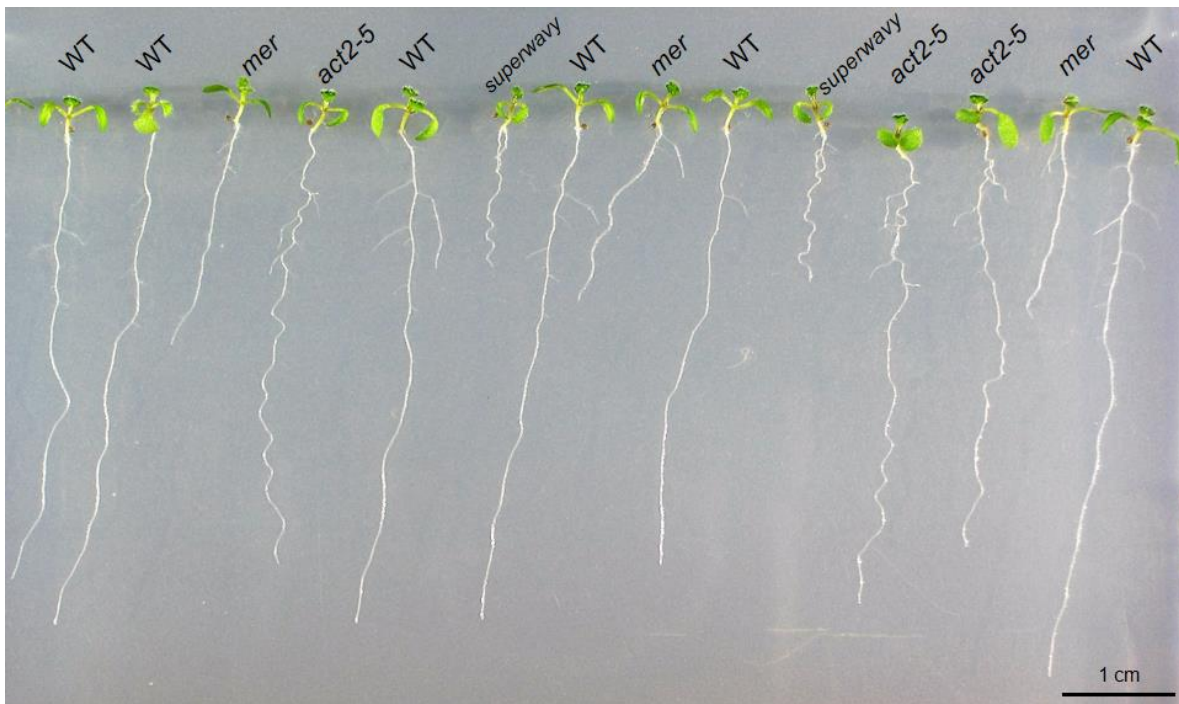


Figura 13. Fenotipos las plantas segregantes en la segunda generación (F2) del cruce entre los mutantes *mer* y *act2-5*.

no es mayor al 10% y 5% de la población, respectivamente. Por lo cual la segregación de los fenotipos no está sujeta a un efecto materno.

Tabla 3. Proporciones de fenotipos esperados (esp) y observados (obs), calculadas para cada población con base en el cuadro de Punnett (cruza dihíbrida) de los cruces *act2-5* x *mer* y el recíproco.

Fenotipo	Cruce							
	<i>act2-5</i> x <i>mer</i>				<i>mer</i> x <i>act2-5</i>			
	Cruce 1 Clave 3F2 (n=90)		Cruce 2 Clave 4F2 (n=90)		Cruce 1 Clave 1F2 (n=89)		Cruce 2 Clave 6F2 (n=88)	
	Esp	Obs	Esp	Obs	Esp	Obs	Esp	Obs
WT	50	50	50	56	50	48	50	52
<i>act2-5</i>	17	13	17	19	17	17	16	13
<i>mer</i>	17	23	17	11	17	16	16	17
<i>swav</i>	6	4	6	4	5	8	6	5

Comparación del crecimiento de la raíz del mutante *mer* con las plantas silvestres

Para caracterizar el fenotipo de crecimiento de la raíz de *mer*, se observaron las plantas a una edad temprana de 6 días post-germinación (dpg) y posteriormente a una edad de 9 dpg (Fig. 14A y B). En ambos casos se aprecia que la longitud de la raíz de *mer* es cercana a la mitad de la raíz silvestre (Fig. 14C). Obtuvimos la tasa de crecimiento ($\mu\text{m/h}$) entre los 5 y 6 dpg y efectivamente, *mer* crece menos que las plantas silvestres (Fig. 14D).

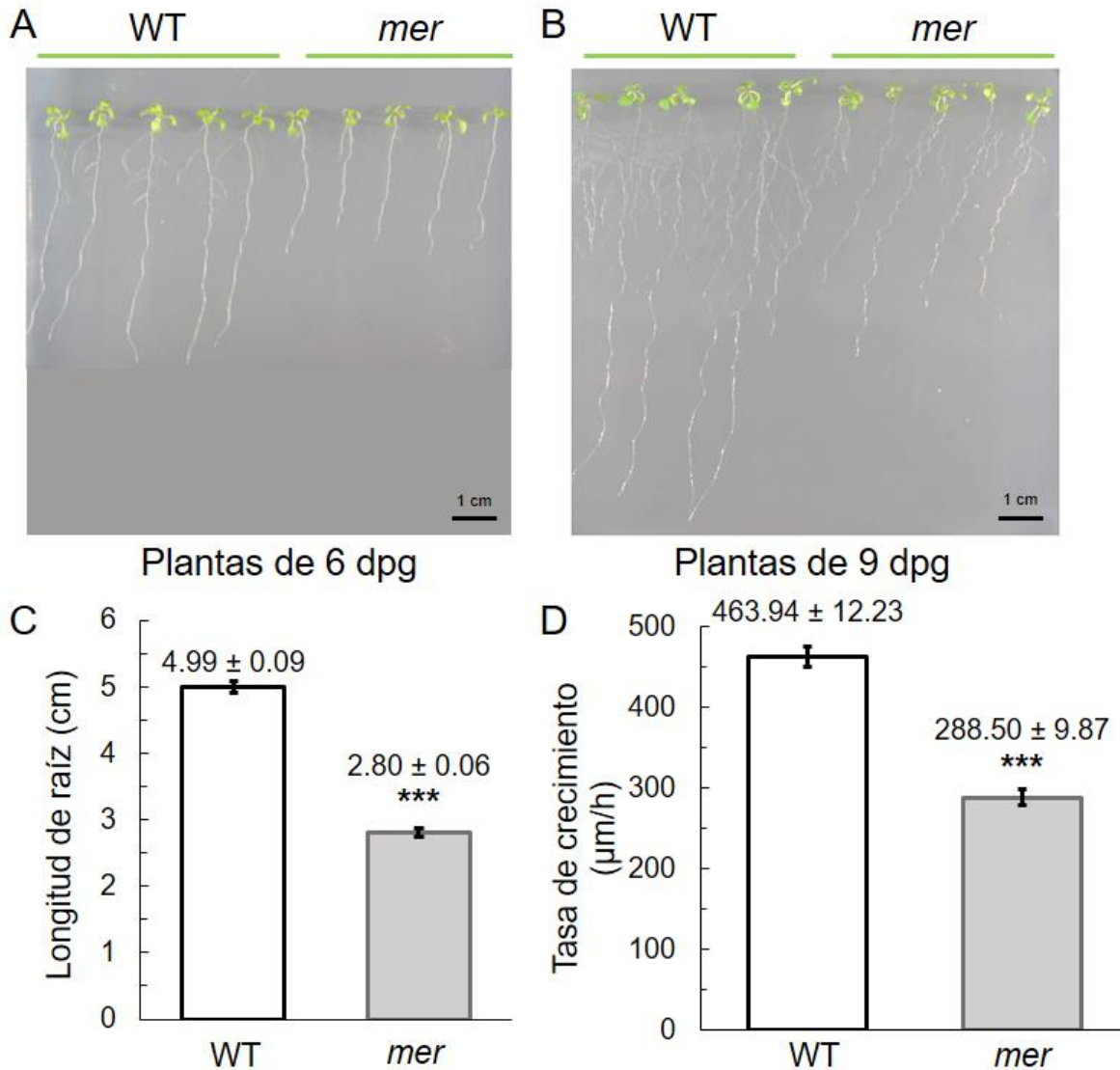


Figura 14. El mutante *mer* tiene una raíz más corta que las plantas silvestres. **A** y **B**) plantas WT y *mer* de 6 y 9 dpg, respectivamente. **C**) Tamaño de la raíz de *mer* a los 6 dpg en comparación con la raíz silvestre. **D**) tasa de crecimiento en plantas de 5-6 dpg, Las barras indican el error estándar y las diferencias significativas se obtuvieron para **C**) con la prueba de Mann-Whitney y para **D**) *t*-Student, para ambos casos $P < 0.001$ ($n=24-29$).

Como originalmente se había observado que la raíz de *mer* ondulaba y su crecimiento se desviaba del eje gravitatorio (Fig. 12), decidimos crecer a *mer* R3 (retrocruzada 3 veces con las plantas silvestres) en placas verticales e inclinadas, para ver si este fenotipo se presentaba en respuesta al tigmotropismo. La inclinación de las placas redujo el crecimiento de las plantas silvestres, así como del mutante *mer*, manteniéndose las proporciones observadas a 90°. Ambas líneas responden al tigmotropismo de forma similar (Fig. 15), por lo que la mutación en *mer* no parece estar afectando la ondulación o la desviación del eje gravitatorio como originalmente se había observado (Fig. 12). Es decir que los otros fenotipos observados anteriormente, se debían a posibles otras mutaciones en el genoma que segregaron conforme se fue retrocruzando y limpiando el genoma.

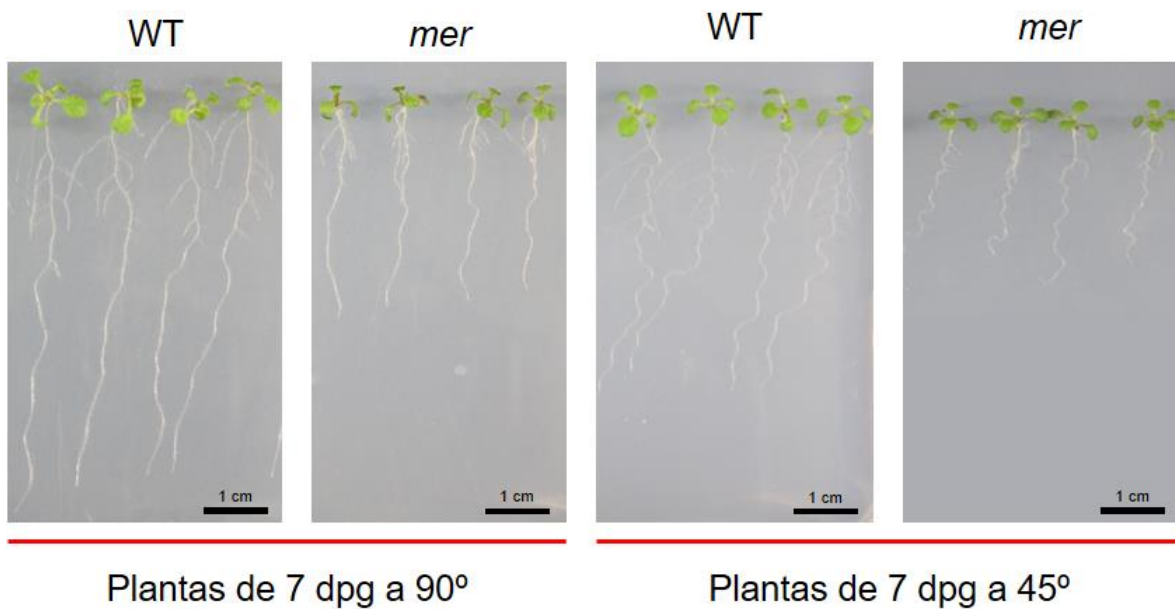


Figura 15. Plantas WT y *mer* crecidas **A)** verticalmente a 90° y **B)** en una inclinación de 45°, en donde se aprecia un menor tamaño en la raíz primaria y ondulaciones en ambos genotipos, con respecto a las placas verticales.

Cuantificación celular para determinar el proceso afectado en el desarrollo de la raíz de *mer*

Se analizó el meristemo apical de la raíz de *mer* para ver si presentaba alguna anomalía en su organización que pudiera afectar el desarrollo de la raíz. El resultado cualitativo de las imágenes en microscopio confocal, no mostró diferencias en el patrón celular de los meristemos ni del SCN en *mer* con respecto a las plantas silvestres (Fig. 16A). Así que para investigar si el proceso de proliferación podría afectar el tamaño del meristemo, se realizaron cuantificaciones celulares en el meristemo apical de la raíz y se encontró que la longitud, así como el número de células presentes en el RAM son estadísticamente similares entre las plantas silvestres y el mutante (Fig. 16B y C). Indicando que la proliferación celular no está afectada en el mutante.

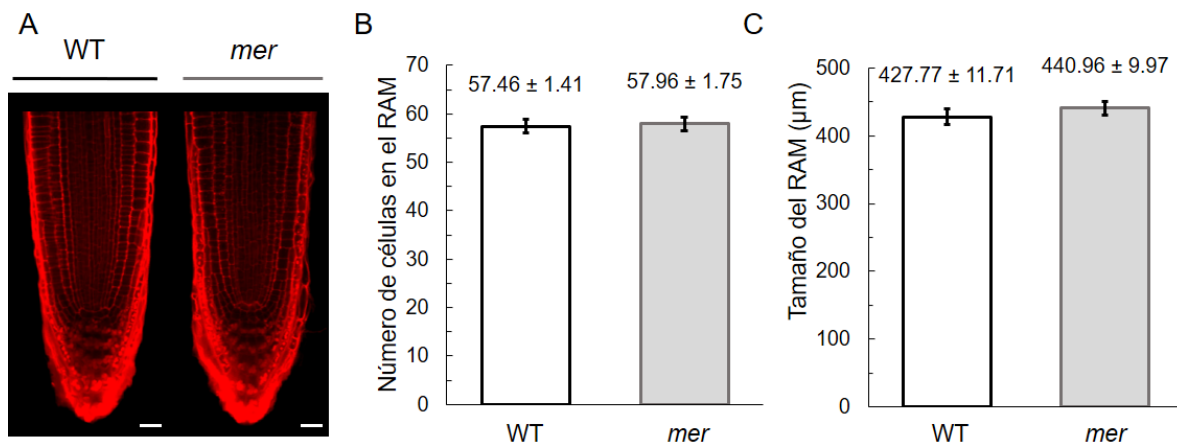


Figura 16. La proliferación celular en *mer* no está afectada. **A)** Los meristemos de plantas silvestres (WT) y mutantes son estructuralmente similares en plantas de 3 dpv (escala 20 µm). **B-C)** El meristemo de *mer* no presenta diferencias significativas en el tamaño y número de células, en comparación con las plantas WT en plantas de 6 dpv. Se utilizó la prueba estadística *t*-Student y las barras indican el error estándar en ambos casos (n=24-29).

Si la proliferación no está afectada, es lógico pensar que el proceso afectado en el mutante es la elongación celular, puesto que la raíz es más corta que la raíz silvestre. Así que para tener una visión más general a partir de qué momento las células dejan de alargarse como las células de las raíces silvestres, se realizaron las curvas de crecimiento con el promedio de tamaños celulares desde la primera célula inicial de córtex hasta la primera célula adyacente al primer primordio de pelo de raíz. El resultado muestra que las curvas de crecimiento celular tienen un comportamiento inicial similar, sin embargo, conforme avanza la curva de crecimiento de *mer* se observa una disminución gradual de la expansión celular y por consiguiente un menor tamaño celular promedio (Fig. 17).

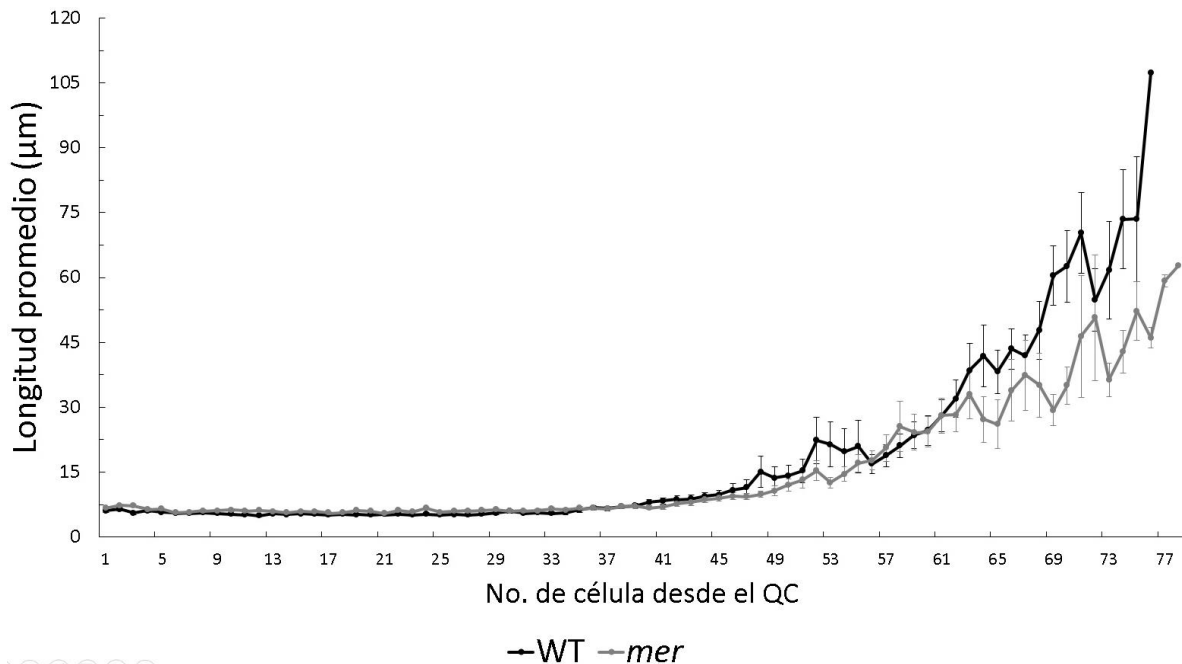


Figura 17. Longitud promedio de las células de córtex, desde el QC hasta la primera célula adyacente al primer primordio de pelo radical; plantas silvestres (negro) y *mer* (gris). Se observa una disminución en la elongación celular de *mer*, lo que propicia un tamaño celular promedio, menor que en las células silvestres. Las barras indican el error estándar con respecto a la media. n=24-26 para las células 1-48, de las células 49 en adelante la n disminuye gradualmente debido a que el punto donde se alcanza primer primordio de pelo radical suele variar.

Consecuentemente y con la finalidad de investigar el punto en el que la expansión celular comienza a afectarse, se realizaron cuantificaciones celulares de cada uno de los dominios del meristemo por separado y se encontró que tanto el dominio de proliferación, como el dominio de transición no presentan diferencias significativas en su longitud ni en el número de células entre las raíces silvestres y de *mer* (Fig.18 A-B y D-E), mientras que el tamaño de la EZ es significativamente menor con respecto a la raíz silvestre (Fig. 18C), sin embargo el número de células en la EZ no cambia (Fig. 18F). Lo cual nos indica que el número de células que transitan desde el PD hasta la EZ es el mismo, aunque en las células en la zona de elongación del mutante *mer* no pueden crecer de igual manera que las células silvestres. Paralelo a esto y a pesar de que no se observan diferencias significativas en el número de

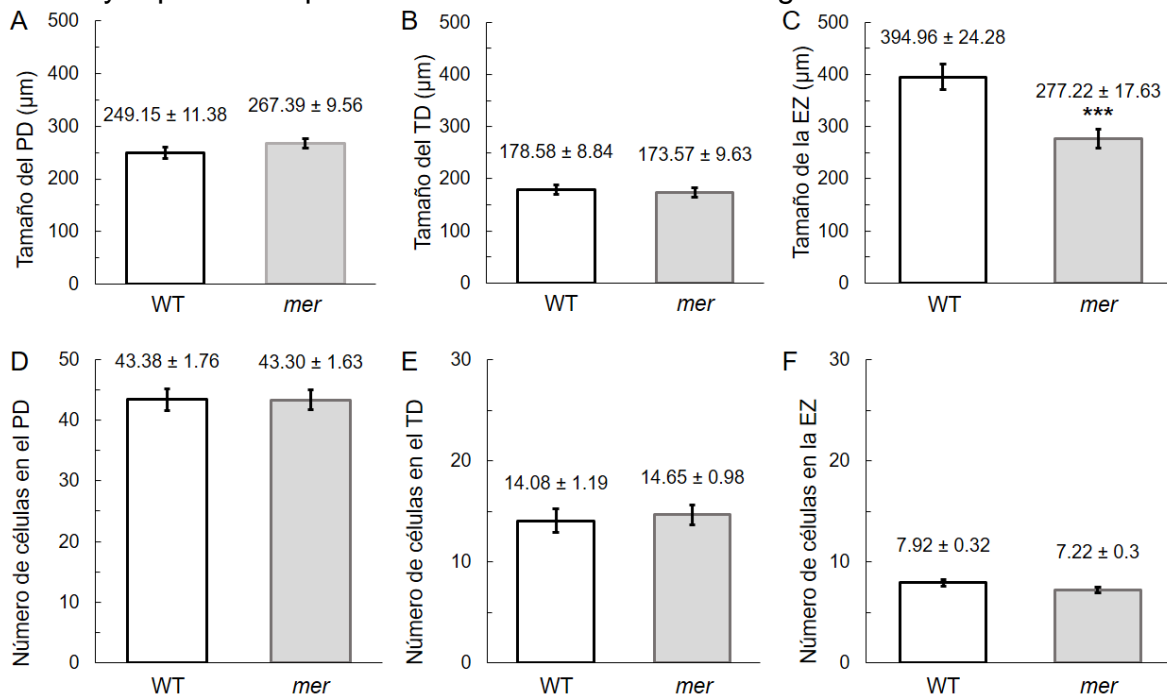


Figura 18. Tamaño y número de las células en los dominios del meristemo y en la zona de elongación. El tamaño de ambos dominios (A-B) y el número de células (D-E) no presentan cambios significativos entre los genotipos. C y F) El tamaño de la zona de elongación (EZ) es más pequeño en *mer*, aunque el número de células es similar entre las plantas mutantes y silvestres. Las barras indican el error estándar y se realizaron pruebas *t*-Student para todos los casos (en el caso de C), $P < 0.001$), excepto para E) donde se realizó prueba de Mann-Whitney ($n=24-29$, para todos los casos).

células, la diferencia en los tamaños celulares nos hizo pensar que probablemente las células de *mer* no logran alcanzar la longitud del silvestre. Así que, para probar esta hipótesis y tomando en cuenta que en la zona de diferenciación las células alcanzan su tamaño final (característica utilizada como referencia para establecer el inicio de esta zona en la raíz; Baskin, 2000; Bennett y Scheres, 2010). Decidimos medir el tamaño final de las células, registramos los tamaños de las primeras 10 células del córtex a partir del primer primordio de pelo radical, pero encontramos que las primeras células de las raíces silvestres seguían expandiéndose (Fig. 19A).

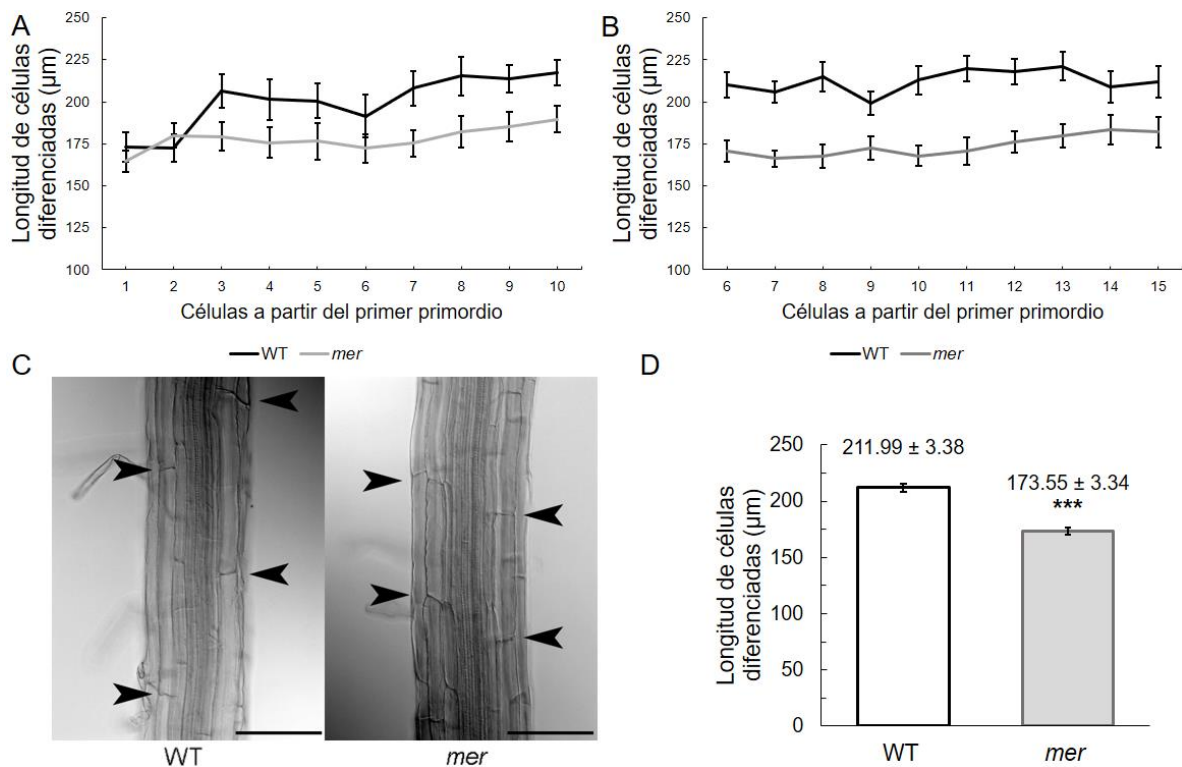


Figura 19. Las células totalmente diferenciadas del mutante *mer* son significativamente más pequeñas que las células de las raíces silvestres. **A)** Las 10 células a partir del primer primordio de pelo radical muestran un ligero, pero constante crecimiento por lo menos en las primeras 5 células ($n = 16-18$). **B)** Las células de la 6-15 han alcanzado el máximo alargamiento. **C)** Las fotos muestran (con cabezas de flecha) la diferencia en el tamaño de las células del córtex, en ambos lados del tejido vascular en plantas de 6 dpv, silvestres y *mer*. **D)** Las células diferenciadas, son significativamente más pequeñas en *mer* con respecto al WT, en plantas de 6 dpv. Las barras indican el error estándar y las diferencias significativas se obtuvieron con la prueba de *t*-Student $P < 0.001$. **B y D)** $n=24-29$.

Por lo que se decidió realizar la medición de diez células del córtex a partir de la célula 6 después del primer primordio de pelo radical, donde las células están totalmente alargadas (Fig. 19B). Así demostramos que las células diferenciadas de *mer* son significativamente más cortas que las células de las raíces silvestres.

Efecto de la mutación *mer* en el crecimiento de los hipocotilos

La elongación de hipocotilos etiolados ha sido un modelo recurrente en el estudio de la elongación celular (Collett et al., 2000). Como observamos que el mutante tiene problemas en la elongación en las células de la raíz, decidimos analizar el tamaño de los hipocotilos etiolados del mutante *mer* comparado con las plantas silvestres a los 6 dpv (Fig. 20A). Encontramos que los hipocotilos de *mer* son ligeros, pero significativamente más cortos que los de las plantas silvestres (Fig. 20B). Por el contrario, es de llamar la atención que los peciolos de los cotiledones en *mer* son significativamente más largos que en las plantas silvestres (Fig. 20A y C). Asimismo, observamos que en la oscuridad no existe diferencia en el tamaño de las raíces entre plantas silvestres y mutantes (Fig. 20D). Los resultados indican que existe una regulación diferencial en la expansión celular en los diferentes órganos de la planta y que el gen mutado en *mer* está participando en este proceso.

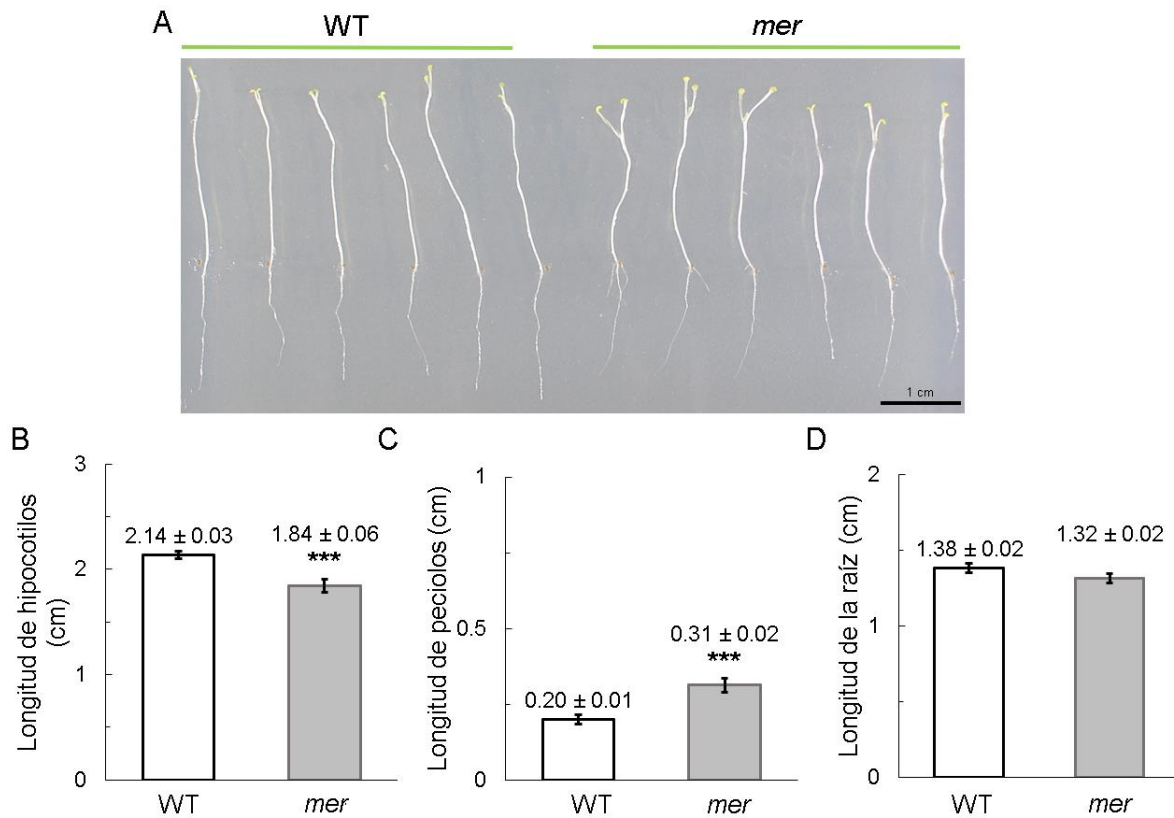


Figura 20. La mutación de *mer* afecta diferencialmente la elongación en hipocotilos. **A)** Plantas de 6 dpv crecidas en obscuridad (barra de escala, 1 cm). **B)** Existe una diferencia pequeña pero significativa que indica que los hipocotilos de *mer* son más cortos. **C)** Los peciolo de *mer* son significativamente más largos que el WT. **D)** En obscuridad, las raíces tienen tamaños similares. Las barras indican el error estándar. Se empleó prueba de Mann-Whitney en todos los casos (n=18 para cada genotipo).

Análisis de los microfilamentos de actina en la raíz de *mer*

Puesto que al cruzar *act2-5* por *mer* se obtiene un doble mutante con ondulación potenciada con respecto a *act2-5* y este último tiene un citoesqueleto de actina más dinámico que el de las plantas silvestres, es posible que *mer* también tuviera afectado el citoesqueleto de actina. Además, el citoesqueleto está implicado en el transporte de vesículas para la síntesis de pared celular durante la elongación celular (Li et al., 2014), por lo que la alteración en su dinámica podría explicar el fenotipo de *mer*. Se utilizó un reportero de microfilamentos de actina (ABD:GFP) introducido en *mer* y se observaron los microfilamentos de las células de epidermis y córtex por microscopía confocal. El análisis indica que el citoesqueleto de actina en el mutante *mer* se comporta de manera similar al de la planta silvestre (Fig. 21). Asimismo, se logra apreciar que la elongación y la densidad de los microfilamentos es similar en ambos genotipos, aunque para confirmar estos resultados sería apropiado emplear métodos cuantitativos que permitan analizar la dinámica de citoesqueleto de actina, con ayuda del reportero GFP-fABD2, así como inhibidores de polimerización y despolimerización de MF's, y mediante la visualización *in vivo* con microscopía epifluorescente de ángulo variable (VAEM; por sus siglas en inglés: Variable Angle Epifluorescence Microscopy) durante cortos periodos para confirmar estos resultados.

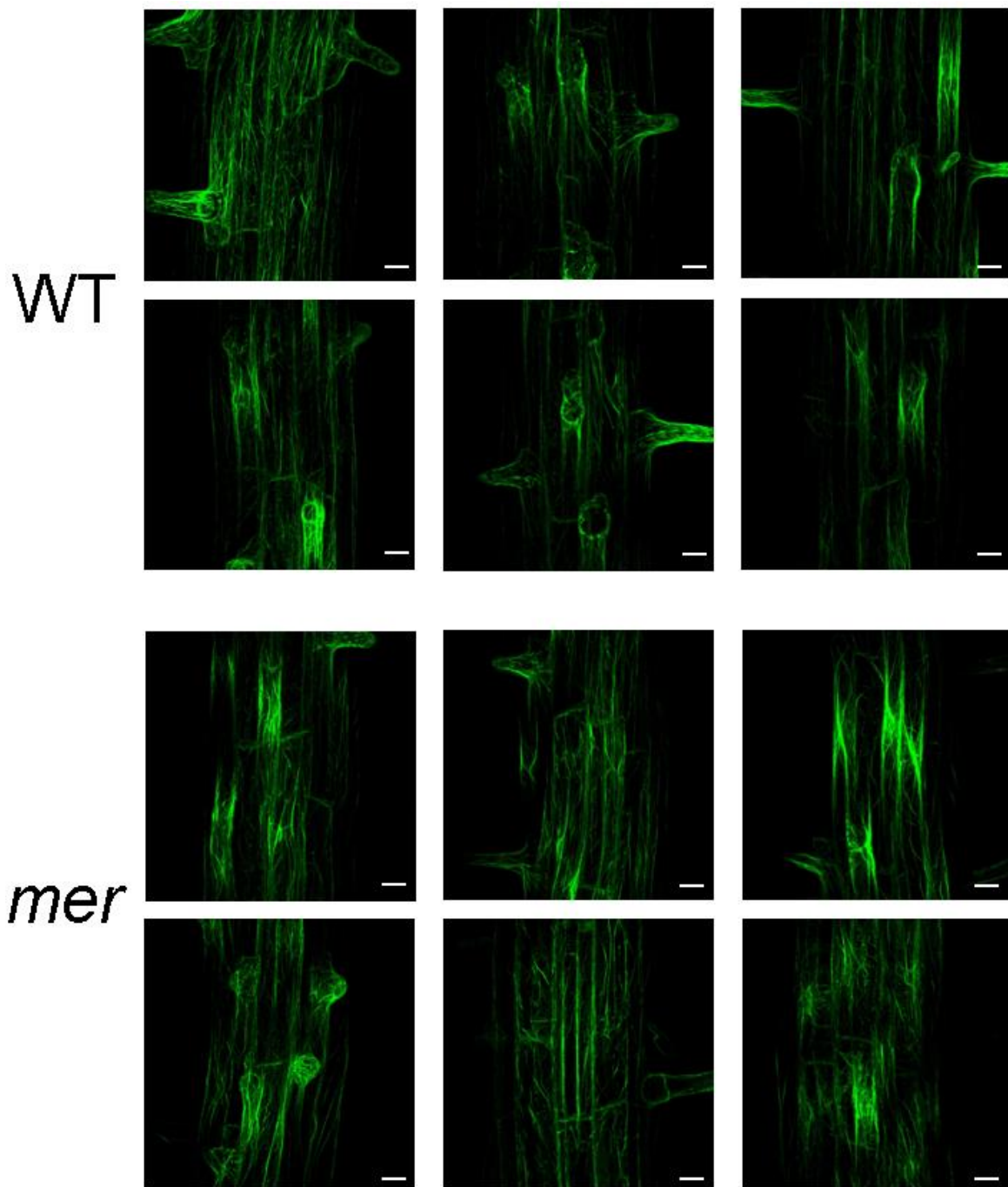


Figura 21. El citoesqueleto de actina presenta un comportamiento similar en el mutante *mer* y las plantas silvestres. Barras de escala: 20 μ m en cada imagen (n=15-18)

Discusión

El desarrollo de la raíz de *mer* está afectado en la elongación celular

El crecimiento de la raíz depende de la proliferación y la elongación celular (Pacheco-Escobedo et al., 2016). Existen muchos mutantes con fenotipo de raíz corta, entre los cuales están: *ccs52a2* (Vanstraelenet al., 2009), *mms21/hpy2* (*high ploidy2*; Huang et al., 2009), *brx* (*brevis radix*; Mouchel et al., 2004), *atx1* (*trithorax1*; Napsucially-Mendivil et al., 2014), *xal1/agl12* (*xaantal1*; Tapia-López et al., 2008) y *xal2/agl14* (*xantal2*; Garay-Arroyo et al., 2013). Sin embargo, todos ellos presentan un meristemo con un menor número de células con respecto a las plantas silvestres. En el presente trabajo describimos el fenotipo de un mutante de raíz corta, el cual es diferente a los mencionados, debido a que no presenta diferencias en el número de células o en la longitud del dominio de proliferación. Incluso, la organización del SCN permanece similar con respecto a la observada en plantas silvestres, por lo que podemos concluir que la proliferación no está afectada en este mutante. Sin embargo, las células no logran alargarse lo suficiente en la zona de elongación y consecuentemente las células no alcanzan un tamaño silvestre en la zona de diferenciación, aunque el número de células en el TD y en la EZ es el mismo entre plantas silvestres y mutantes. Por lo que estos resultados sugieren que el número de células que transitan desde el PD hasta la ZE es el mismo.

En los mutantes de raíz corta como son: *atx1* y *xal1*, la menor producción de células puede atribuirse a un aumento en la duración del ciclo celular. Sin embargo, como

el mutante *mer* permanece invariable el número de células del RAM, el fenotipo del mutante no puede atribuirse a problemas en el ciclo celular.

Los resultados indican que *mer* está afectado específicamente en la elongación celular de las células de la raíz y hasta donde sabemos no existe otro mutante con estas características. Sólo se han reportado dos mutantes hypomórficos en la raíz de *Brachypodium distachyon*; *Bdtar2^{hypo}* (*tryptophan aminotransferase of arabidopsis1-related2-like*) y *Bdein21^{hypo}* (*ethylene insensitive2-like1*). Estos no presentan afectaciones en la actividad y tamaño del meristemo, pero si presentan un exceso de elongación celular debido a altos niveles de IAA en la EZ. Además, en el caso del alelo *Bdtar2^{hypo}*, se puede mimetizar su fenotipo en plantas silvestres con la adición de un inhibidor de TAA1/TAR (TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1/TAA1-RELATED) como la L-kinerunina que afecta la síntesis de auxinas (Pacheco-Villalobos et al., 2013; Pacheco-Villalobos et al., 2016). Por lo cual sería interesante realizar un ensayo similar en el mutante *mer*.

A pesar de todo lo anterior, el mutante *mer* no muestra en la parte aérea enanismo, por lo que lo hace un mutante muy interesante para estudiar los procesos implicados en la elongación celular.

Posible efecto de la mutación de *mer* en la elongación diferencial de los órganos de las plantas

Existen mutantes afectados en la elongación celular, en los que se ha caracterizado el tamaño de los hipocotilos etiolados. *eto1-1* y *eto2-1*, (*ethylene overproducer*) son mutantes que sobreexpresan etileno y presentan hipocotilos cortos y gruesos (Yuen et al., 2005; Yu et al., 2013), sin embargo, en *mer* la diferencia de tamaños en hipocotilos etiolados, es poca y no muestran un engrosamiento. Asimismo, en *eto1-1* y *eto2-1*, el exceso en la producción de etileno induce una acumulación de auxinas propiciando la inhibición el crecimiento de la raíz (De-Smet et al., 2015). Las células en el mutante *mer*, no se expanden de igual forma que las células de las raíces silvestres, pero la raíz no deja de crecer. Así que, como las auxinas promueven o inhiben la elongación celular en los distintos tejidos vegetales de acuerdo a su concentración (Harmer y Brooks, 2018), sería interesante ver si la adición de estas hormonas puede restituir la elongación en la raíz en una concentración que propicie la elongación (IAA a 10^{-11} M), como lo reportan Evans y col (1994). Además, las auxinas también controlan el desarrollo de la raíz mediante la inducción de las giberelinas (Fu y Harberd, 2003).

Por otra parte, el crecimiento celular en las plantas también se logra por un fino cross-talk entre la pared celular, el citoesqueleto y la membrana celular (Guerriero et al., 2014). Por ejemplo: aunque los microtúbulos no tienen un efecto directo en el crecimiento celular, se encargan de guiar la deposición de microfibrillas de celulosa mediante el alineamiento de celulosa sintasas y una mutación en la proteína necesaria para el movimiento de la misma a lo largo de los MTs; *POM/CSI1*

(*CELLULOSE SYNTHASE INTERACTING1*), es suficiente para afectar la elongación celular (Bringmann et al., 2012; Guerriero et al., 2014).

Otra manera en la que se ha abordado el estudio de la elongación celular es mediante perfiles de expresión genética en regiones con elevadas tasas de crecimiento (Hall y Ellis., 2013). Pacheco-Villalobos y col. (2016), descubrieron mediante transcriptómica que la mayoría de los genes que cambian sus niveles de expresión durante la elongación celular en la EZ de la raíz de *Brachypodium distachyon*, están implicados en la remodelación de la pared celular, principalmente expansinas.

Posibles genes responsables del fenotipo de *mer*

En el laboratorio contamos con un mutante en *ACTINA 2* (*act2-5*), que presenta un fenotipo de crecimiento radicular ondulatorio el cual, previamente a este trabajo fue mutagenizado y se seleccionó un mutante con fenotipo de ondulación potenciada con respecto al parental al que llamamos *superwavy* (Abad-Vivero, 2009). Este mutante, fue retrocruzado con plantas silvestres y segregó un mutante de raíz corta al que llamamos *medium-size root* (*mer*) (García-Ponce, comunicación personal). Posteriormente, para conocer la identidad del gen responsable del fenotipo de *mer*, las plantas se cruzaron con el ecotipo Landsberg *erecta* para generar una población polimórfica y se seleccionaron nuevamente plantas con el fenotipo de *mer*, de las cuales se extrajo su DNA genómico, el cual se caracterizó con secuenciación masiva. La mutación se encuentra en el

cromosoma 5 de Arabidopsis (García-Ponce, comunicación personal). Bajo los supuestos de que: la mutación sea un cambio no sinónimo y se encuentre en una región codificante, se lograron identificar cinco posibles genes (Tabla 4).

Tabla 4. Se enlistan 5 genes candidatos, con sus respectivos cambios en implicaciones funcionales en Arabidopsis. * Simboliza un codón de paro en la secuencia.

Gen	Base en el genoma de referencia	SNP en la población mapeada	Cambio de aminoácido	Nota
PSY AT5G17230	G	A	A → V	Codifica para la fitoeno sintasa, enzima que limitanta la tasa de biosíntesis de carotenoides.
AT5G17270	G	A	W → *	Proteína de la familia preniltransferasa
LHP1 AT5G17690	C	T	A → T	Remodelador de cromatina y homólogo de HP1
CAX7 AT5G17860	G	A	S → F	Participa en la senescencia foliar.
DSC2 AT5G18370	G	A	T → I	Proteína de la familia TIR-NBS-LRR.

De los genes candidatos sabemos que Arabidopsis sólo tiene un gen que codifica para *PSY* (*PHYTOENE SYNTHASE*), mismo que se expresa de manera preferente en la raíz y a pesar de que se reconoce su importancia en la síntesis de fitoeno (precursor en la biosíntesis de carotenoides y de ABA), no se ha demostrado que los cambios de expresión de *PSY* influyeran los niveles de ABA en la raíz (Ruiz-Sola et al., 2013; Hui et al., 2014). Solamente se ha demostrado que el estrés salino, induce la biosíntesis de ABA y también activa la vía de síntesis de carotenoides

(Ruiz-Sola et al., 2013). Sería interesante analizar el efecto del fitoeno en la elongación celular de la raíz.

Por otra parte, AT5G17270 pertenece a una familia de proteínas denominadas prenilttransferasas que están involucradas en la regulación del ciclo celular y transporte de vesículas (Yalovsky et al., 2000). Asimismo, se ha observado que bajos niveles de prenilación propician defectos en el desarrollo de meristemos aéreos y potencian las respuestas reguladas por ABA (Cutler et al., 1996). De manera análoga también se ha reportado que la adición de ABA a la raíz primaria reduce su elongación (Leung et al., 1997). Por lo que probablemente, la mutación en AT5G17270 pueda incrementar la sensibilidad a ABA, reduciendo la elongación celular en el mutante *mer* y explicando su fenotipo. En este caso se podría probar un inhibidor de la síntesis de ABA u obtener un doble mutante con *mer abi1* (ABA insensitive), un mutante insensible a la señalización de ABA, para ver si se logra complementar el fenotipo de la raíz de *mer*.

El gen AT5G17860 (*CAX7*) codifica para una proteína perteneciente a una familia de transportadores de Ca^{2+} y otros iones. En un estudio realizado por Li y colaboradores (2016) observaron que el transcrito de *CAX7* (anteriormente denominado *CCX1*) es más abundante en la raíz en comparación con otros órganos. A pesar de esto, en ese estudio se enfocaron en la parte aérea y concluyeron que el alelo mutante *ccx1-1* no presenta diferencias fenotípicas en comparación con el silvestre. De manera interesante los iones de Ca^{2+} tiene un papel importante en el transporte de auxinas, las cuales activan bombas de protones que acidifican la

pared y facilitan la elongación celular (Sergey et al., 1997). De tal manera que una baja concentración de calcio es necesaria para mantener el crecimiento celular, pero si se incrementa la concentración externa de Ca^{2+} se inhibe el crecimiento de la raíz (Hasenstein y Evans, 1988). El mutante *mer* presenta una afectación en la elongación celular que muestra cierta especificidad de la raíz, a su vez esto podría relacionarse con el perfil de expresión de *CAX7*.

La caracterización radicular del mutante en *LHP1* no está reportada, sin embargo, se conoce que el fenotipo aéreo del mutante inducido por T-DNA genera: hojas caulinares enroscadas, hojas de roseta de la mitad de tamaño, menor cantidad de hojas de roseta y floración temprana sin importar el fotoperíodo (Gaudin et al., 2001), estos fenotipos no se han observado en *mer*, pero no podemos descartarlo a priori ya que la mutación puntual de *mer* no tiene que dar el mismo fenotipo que el mutante reportado.

En plantas se han reportado fenotipos mutantes que presentan muerte celular o lesiones sintomáticas asociadas a enfermedades en ausencia de patógenos como *camta3* (*calmodulin binding transcription activator 3*) (Galon et al., 2008). Muchos de ellos se han relacionado con inmunidad vegetal y se han descrito como reguladores negativos de la misma (Rodríguez et al., 2016). Tal es el caso de *DSC2* (*DOMINANT SUPPRESSOR OF CAMTA3 NUMBER 2*), del cual se ha demostrado que evita la autoinmunidad recuperando el fenotipo de plantas mutantes como *camta3* (Lolle et al., 2016). En el mismo trabajo sólo muestran la roseta del mutante *dsc2*, por lo cual no es posible comparar la raíz con el mutante *mer*, además, hasta

donde sabemos no se ha reportado que alguna proteína de la familia TIR-NBS-LRR esté implicada directamente en el crecimiento de la raíz. Por lo anterior resultaría interesante secuenciar los presuntos genes y analizar alelos nulos para identificar si el fenotipo es característico de una mutación puntual o de un alelo nulo.

Posible interconexión entre *mer* y *act2-5*

Actualmente se piensa que la ondulación observada en la raíz es el resultado de la interacción que existe entre el gravitropismo positivo y un tigmotropismo negativo en una superficie (agar) impenetrable (Roy y Bassham, 2014). Es decir, la expansión anisotrópica y coordinada de las células en la zona de elongación ejercen una fuerza mecánica que empuja a la punta de la raíz hacia el eje de crecimiento gravitrópico y a su vez la expansión diferencial hace rotar la punta de meristemo generando un patrón de crecimiento sinusoidal (Okada y Shimura, 1990; Thompson y Holbrook, 2004). Ahora sabemos que la falta de elongación celular demostrada en *mer* induce que en conjunto con el crecimiento ondulatorio de *act2-5*, se acentúen las ondulaciones en *swav* y además genera una raíz más pequeña (Abad, 2009). Será interesante conocer en el futuro de qué forma se relaciona la afectación en elongación celular de *mer* con la ondulación de *act2-5*.

Se sabe que el citoesqueleto de actina controla la composición y contribuye a la expansión de la pared celular mediante el transporte polar de polisacáridos diferentes a la celulosa (Li et al., 2014). Sin embargo, nosotros no observamos cambios en la densidad y formación de MFs en el mutante *mer* y por lo tanto, es posible que el transporte de materiales para la deposición de la pared celular no

esté afectado. Sin embargo, no podemos descartar que la dinámica del citoesqueleto de actina esté alterada en el mutante. Por ejemplo, si la mutación se encuentra en el gen CAX7, sería interesante analizar el citoesqueleto de actina en la zona de elongación en una película, ya que la dinámica de formación y desensamble de microfilamentos implica complejos protéicos (profilina-Ca²⁺-ATP-actina) cargados con calcio (Staiger y Blanchoin, 2006).

Conclusiones

- El fenotipo de raíz corta de *mer*, se debe a una tasa de crecimiento reducida consecuencia de que las células no logran alargarse como las células de las plantas silvestres.
- La mutación en *mer* muestra un efecto contrario en el fenotipo de la raíz y en los peciolos de la plántula.
- La proliferación celular y la organización del meristemo no están afectadas en el mutante *mer*.
- Los cruces de *mer* x *act2-5* demostraron que el fenotipo observado en *superwavy* es resultado de este doble mutante, e indica que la menor elongación de *mer* contribuye a una mayor ondulación de la raíz junto con *act2-5*.
- La mutación en *mer* no muestra una diferencia estructural robusta en el citoesqueleto de actina en células de la raíz.

Perspectivas

- Realizar la cruce de *mer* por el reportero de auxinas DR5::GUS con la finalidad de observar posibles anomalías en la distribución de auxinas.
- Adicionar IAA o giberelinas para ver si se restaura la elongación de las células de la raíz en *mer*.
- Obtener el doble mutante *mer abi1* y analizar la elongación celular.
- Realizar la secuenciación por el método de Sanger de los 5 genes candidatos para obtener el responsable del fenotipo de *mer*.
- Comparar el fenotipo de *mer* con algunos alelos nulos y llevar a cabo el análisis de complementación del gen mutado.

- Realizar la construcción del gen responsable del fenotipo de *mer* con el reportero de β -glucoronidasa (GUS) para analizar su patrón de expresión.

Literatura citada

- Abad-Vivero U. C. (2009). Identificación de mutaciones supresoras y potenciadoras de un mutante de citoesqueleto con respuesta trópica alterada. Tesis de licenciatura Facultad de Ciencias, UNAM. 69p.
- Baskin T. I. (2000). On the constancy of cell division rate in the root meristem. *Plant Molecular Biology*, 43, 545-554.
- Bastien R. Y Meroz Y. (2016). The Kinematics of Plant Nutation Reveals a Simple Relation between Curvature and the Orientation of Differential Growth. *Plos Comput Biol*, 12, 1-20.
- Baum S. F., J. G. Dubrovsky y T. L. Rost. (2002). Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) roots. *American Journal of Botany*, 89(6), 908-920.
- Bennett T. Y B. Scheres. (2010). Root Development-Two Meristems for the Price of One? En *Current Topics in Developmental Biology*, Volume 91(67-102). Países Bajos: Elsevier.
- Bichet A., T. Desnos, S. Turner, O. Grandjean y H. Höfte (2001) BOTERO1 is required for normal orientation of cortical micro- tubules and anisotropic cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant J.* 25: 137– 148.
- Bringmann M., Li E., Sampathkumar A., Kocabek T., Hauser M. T., Persson S. (2012). POM-POM2/CELLULOSE SYNTHASE INTERACTING1 Is Essential for the Functional Association of Cellulose Synthase and Microtubules in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24, 163-177.

- Burk D. H., Liu B., Zhong R. Q., Morrison W. H. Y Ye Z. H. (2001). A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell* 13, 807–827.
- Catterou M, Dubois F, Schaller H, Aubanelle L, Vilcot B, Sangwan-Norreel BS, Sangwan RS (2001) Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. II. Effects of brassinosteroids on microtubules and cell elongation in the bul1 mutant. *Planta* 212:673–683
- Chen N. Qu X., Wu Y., H. Shanjin. (2009). Regulation of actin dynamics in pollen tubes: Control of actin polymer level. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51, 740-750
- Chen X., S. Wu, Z. Liu, Y J. Friml. (2016). Environmental and Endogenous Control of Cortical Microtubule Orientation. *Trends in Cell Biology*, 26, 409-419.
- Collett C. E., N. P. Harberd y O. Leyser. (2000). Hormonal Interactions in the Control of *Arabidopsis* Hypocotyl Elongation. *Plant Physiology*, 124, 553-562.
- Cutler S., M. Ghassemaian, D. Bonetta, S. Cooney y P. Mccourt. (1996). A Protein Farnesyl Transferase Involved in Abscisic Acid Signal Transduction in *Arabidopsis*. *Science*, 273, 1239-1241.
- De-Smet S., A. Cuypers, J. Vangronsveld y T. Remans. (2015). Gene Networks Involved in Hormonal Control of Root Development in *Arabidopsis thaliana*: A Framework for Studying Its Disturbance by Metal Stress. *Int. J. Mol. Sci*, 16, 19195-19224
- Dominguez R. Y K. C. Holmes. (2011). Actin Structure and Function. *Annual review of biophysics*, 40, 169-186.

- Du P., M. Kumar, Y. Yao, Q. Xie, J. Wang, B. Zhang, S. Gan, Y. Wang y A. Wu. (2016). Genome-wide analysis of the TPX2 family proteins in *Eucalyptus grandis*. *BMC Genomics*, 17, 967.
- Dubrovsky J. G., A. Soukup, S. Napsucialy-Mendivil, Z. Jeknic y M. G. Ivanchenko. (2009). The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Annals of Botany*, 103, 807-817.
- Ehrhardt D. W. Y S. L. Shaw. (2006). Microtubule Dynamics and Organization in the Plant Cortical Array. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 859-875.
- Evans M. L., Ishikawa H., Estelle M. A. (1994). Responses of *Arabidopsis* Roots to Auxin Studied with High Temporal Resolution - Comparison of Wild-Type and Auxin-Response Mutants. *Planta*, 194, 215-222.
- Fisher A. P. Y R. Sozzani. (2016). Uncovering the networks involved in stem cell maintenance and asymmetric cell division in the *Arabidopsis* root. *Current Opinion in Plant Biology*, 29, 38–43.
- Francis, D. (2015) *Plant Cell Cycle*. En: els. John Wiley & Sons.
- Fu X. y Harberd N. P. (2003). Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature*, 421, 740-743.
- Fu Y. Y Z. Yang. (2011). Signaling to the Cytoskeleton in Diffuse Cell Growth. En *The Plant Cytoskeleton* (229-243). New York, NY: Springer.
- Furutani I., Y. Watanabe , R. Prieto, M. Masatoshi, S. Koya y N. Kuniko. (2000). The SPIRAL genes are required for directional control of cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 127, 4443-4453.

- Galinha C., H. Hofhuis, M. Luijten, V. Willemsen, I. Blilou, R. Heidstra & B. Scheres. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature*, 449, 1053-1057.
- Garay-Arroyo A., M. P. Sánchez, B. García-Ponce, E. R. Álvarez-Buylla y C. Gutiérrez. (2014). La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de Arabidopsis Thaliana. *Revista de educación bioquímica*, 33, 13-22.
- Garay-Arroyo A., E. Ortiz-Moreno, M. De la Paz Sánchez, A. S. Murphy, B. García-Ponce, N. Marsch-Martínez, S. De Folter, A. Corvera-Poiré, F. Jaimes-Miranda, M. A. Pacheco-Escobedo, J. G. Dubrovsky, S. Pelaz y E. R. Álvarez-Buylla. (2013). The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during Arabidopsis root development by regulating PIN expression. *The EMBO journal*, 32, 2884–2895
- Gaudin, V., Libault, M., Pouteau, S., et al. (2001) Mutations in like heterochromatin protein 1 affect flowering time and plant architecture in Arabidopsis. *Development* 128, 4847–4858
- Gilroy S. (2008). Plant tropisms. *Current Biology*, 18(7), 275-277.
- Guerriero G., Hausman J. F., Cai G. (2014). No stress! relax! mechanisms governing growth and shape in plant cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 5094-5114.
- Hager A., Menzel H. Y K. Annelore. (1971). Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. *Planta*, 100, 47-75.

- Hall H., Ellis B. (2013). Transcriptional programming during cell wall maturation in the expanding Arabidopsis stem. *BMC Plant Biol.*, 13, 14.
- Hamada T. (2014). Microtubule Organization and Microtubule-Associated Proteins in Plant Cells. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 312, 1-52.
- Harmer S. L., Brooks C. J. (2018). Growth-mediated plant movements: hidden in plain sight. *Current Opinion in Plant Biology*, 41, 89-94.
- Hasenstein K. H. Y Evans M. L. (1988). Effects of cations on hormone transport in primary roots of *Zea mays*. *Plant physiology*, 86, 890-894.
- Henty-Ridilla J. L., J. Li, L. Blanchoin y C. J Staiger. (2013). Actin dynamics in the cortical array of plant cells. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 678-687.
- Huang L., S. Yang, S. Zhang, M. Liu, J. Lai, Y. Qi, S. Shi, J. Wang, Y. Wang, Q. Xie y C. Yang. (2009). The Arabidopsis SUMO E3 ligase atmms21, a homologue of NSE2/MMS21, regulates cell proliferation in the root. *The Plant Journal*, 60, 666-678
- Inoué S. Y E. D. Salmon. (1995). Force Generation by Microtubule Assembly/Disassembly in Mitosis and Related Movements. *Molecular Biology of the Cell*, 6, 1619-1640.
- Ivanov V. B. Y J. G. Dubrovsky. (1997). Estimation of the cell-cycle duration in the root apical meristem: a model of linkage between cell-cycle duration, rate of cell production, and rate of root growth. *Int. J. Plant Sci.*, 158(6), 757-763.
- Ivanov V. B. Y J. G. Dubrovsky. (2013). Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends in plant science*, 18(5), 237-243.

- Keijzer J., B. M. Mulder M. E. Janson. (2014). Microtubule networks for plant cell division. *Systems and Synthetic Biology*, 8, 187-194.
- Kost, B., & Chua, N. H. (2002). The Plant Cytoskeleton: Vacuoles and Cell Walls Make the Difference. *Cell*, 108(1), 9–12.
- Krtková J., M. Benáková, y K. Schwarzerová. (2016). Multifunctional Microtubule-Associated Proteins in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1-13.
- Lanza M., García B., Castrillo G., Catarecha P., Sauer M., Rodriguez M., Páez A., Sánchez E., T. C. Mohan, Leo del puerto Y, Sandalio LM, Paz J. Y Leyva A. (2012). Role of Actin Cytoskeleton in Brassinosteroid Signaling and Its Integration with the Auxin Responses in Plants. *Dev. Cell*. 22:1275-1285.
- Lee U., I. Rioflorido, S. Hong, J. Larkindale, E. R. Waters y E. Vierling. (2006). The Arabidopsis clpb/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development. *The Plant Journal*, 49, 115-127.
- Lehman T. A., A. Smertenko y K. A. Sanguinet. (2017). Auxin, microtubules, and vesicle trafficking: conspirators behind the cell wall Thiel. *Journal of Experimental Botany*, 28, 930-948.
- Leung J., S. Merlot y J. Giraudat. (1997). The Arabidopsis ABSCISIC ACID-insensitive2 (AB12) and abif Genes Encode Homologous Protein Phosphatases 2C Involved in Abscisic Acid Signal Transduction. *The Plant cell*, 9, 759-771.
- Li Z., X. Wang, J. Chen, J. Gao, X. Zhou y B. Kuai. (2016). CCX1, a putative cation/Ca²⁺ exchanger, participates in regulation of reactive oxygen species homeostasis and leaf senescence. *Plant and Cell Physiology*, 57, 2611-2619.

- Li J., Arieti, R. Y Staiger, C. J. (2014). Actin Filament Dynamics and their Role in Plant Cell Expansion. En Plant Cell Wall Patterning and Cell Shape (127-162). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Li J., Blanchoin L., y Staiger C. J. (2015). Signaling to actin stochastic Dynamics. Annual Review of Plant Biology, 66(2), 415–440.
- Liu P., Qi M., Xue X., Ren H. (2011). Dynamics and functions of the actin cytoskeleton during the plant cell cycle. Chinese Science Bulletin, 56, 3504-3510.
- Ludevid D., Höfte H., Himmelblau E. Y Chrispeels M. J. (1992). The Expression Pattern of the Tonoplast Intrinsic Protein gamma-TIP in Arabidopsis thaliana Is Correlated with Cell Enlargement. Plant Physiol, 100, 1633-1639.
- Lux A. Y T. L. Rost. (2012). Plant root research: the past, the present and the future. Annals of Botany, 110, 201-204.
- Martin C., K. Bhatt y K. Baumann. (2001). Shaping in plant cells. Current Opinion in Plant Biology, 4, 540-549.
- Mathur J. (2006). Local interactions shape plant cells. Current Opinion in Cell Biology, 18, 40-46.
- Mazars C., C. Brie, S. Grat, C. Pichereaux, M. Rossignol, V. Pereda-Loth, B. Eche, E. Boucheron-Dubuisson, I. L. Disquet, F. J. Medina, A. Graziana, E. Carnero-Diaz. (2014). Microgravity Induces Changes in Microsome-Associated Proteins of Arabidopsis Seedlings Grown on Board the International Space Station. Plos ONE, 9, 1-18.
- Mcqueen-Mason S.. (1997). Plant cell walls and the control of growth. Biochemical Society Transactions, 25, 204-214.

- Meagher R. B., M. K. Kandasamy and L. King. (2011). Actin Functions in the Cytoplasmic and Nuclear Compartments. En *The Plant Cytoskeleton* (3-32). California, U.S.A.: Springer.
- Migliaccio F., S. Piconese. (2001). Spiralizations and tropisms in Arabidopsis roots. *Trends in Plant Science*, 6, 561-565.
- Mouchel C. F., G. C. Briggs y C. S. Hardtke. (2004). Natural genetic variation in Arabidopsis identifies BREVIS RADIX, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *GENES & DEVELOPMENT*, 18, 700-714.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. 15: 473-479
- Murata T. Y M. Hasebe. (2011). Microtubule Nucleation and Organization in Plant Cells. En *The plant cytoskeleton* (81-94). California, USA: Springer.
- Nakamura M. Y T. Hashimoto. (2009). A mutation in the Arabidopsis gamma-tubulin-containing complex causes helical growth and abnormal microtubule branching. *Journal of cell science*, 122, 2208-2217.
- Napsucialy-Mendivil S., Alvarez-Venegas R., Shishkova S. Y Dubrovsky J. G. (2014). Arabidopsis homolog of trithorax1 (ATX1) is required for cell production, patterning, and morphogenesis in root development. *Journal of Experimental Botany*, 65, 6373–6384.
- Nicol F. Y H. Höfte. (1998). Plant cell expansion: scaling the wall. *Current opinion in plant biology*, 1, 12-17.
- Nishimura T, Yokota E, Wada T, Shimmen T and Okada K (2003). An Arabidopsis ACT2 Dominant-Negative Mutation, which Disturbs F-actin

Polymerization, Reveals its Distinctive Function in Root Development. *Plant Cell Physiol.* 44: 1131–1140.

- Okada K. Y Shimura Y. (1990) Reversible root tip rotation in Arabidopsis seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* 250:274–276
- Oliva M y C. Dunand. (2007). Waving and skewing: how gravity and the surface of growth media affect root development in Arabidopsis. *New Phytologist*, 176, 37-43.
- Pacheco-Escobedo M. A., V. B. Ivanov, I. Ransom-Rodríguez, G. Arriaga-Mejía, H. Ávila, I. A. Baklanov, A. Pimentel, G. Corkidi, P. Doerner, J. G. Dubrovsky, E. R. Alvarez-Buylla, y A. Garay-Arroyo. (2016). Longitudinal zonation pattern in Arabidopsis root tip defined by a multiple structural change algorithm. *Annals of Botany*, 118, 237-243
- Pacheco-Villalobos D., Sankar M. Ljung K., Hardtke C. S. (2013). Disturbed Local Auxin Homeostasis Enhances Cellular Anisotropy and Reveals Alternative Wiring of Auxin-ethylene Crosstalk in *Brachypodium distachyon* Seminal Roots. *PLoS Genetics*, 9, 1-9.
- Pacheco-Villalobos D., Díaz-Moreno S. M., Van der Schuren A., Tamaki T., Kang Y. H., Gujas B., Novak O., Jaspert N., Li Z., Wolf S., Oecking C., Ljung K., Bulone V., Hardtke C. S. (2016). The Effects of High Steady State Auxin Levels on Root Cell Elongation in *Brachypodium*. *The Plant Cell*, 28, 1009-1024.
- Petricka J. J., C. M. Winter, y P. N. Benfey. (2012). Control of Arabidopsis Root Development. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 563-590.

- Porter K, Day B (2016) From filaments to function: The role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signaling and immunity. *J Integr Plant Biol* 58: 299–311
- Ringli C., N. Baumberger, A. Diet, B. Frey y B. Keller. (2002). ACTIN2 Is Essential for Bulge Site Selection and Tip Growth during Root Hair Development of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 129, 1464-1472.
- Roy R. Y D. C. Bassham. (2014). Root growth movements: Waving and skewing. *Plant Science*, 221-222, 42-47.
- Scheres B., P. Benfey y L. Dolan. (2002). Root development. En Arabidopsis book (1-18). American Society of Plant Biologists.
- Schindelman G., A. Morikami, J. Jung, T. I. Baskin, N. C. Carpita, P. Derbyshire, M. C. Mccann, y P. N. Benfey. (2001). COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in Arabidopsis. *GENES & DEVELOPMENT*, 15, 1115–1127.
- Schultz E. R., A. K. Zupanska, N. J. Sng, A. Paul y R. J. Ferl. (2017). Skewing in Arabidopsis roots involves disparate environmental signaling pathways. *BMC Plant Biology*, 17, 1-16.
- Schneeberger K, Ossowski S, Lanz C, Juul T, Petersen AH, Lehmann Nielsen K, Jørgensen JE, Weigel D and Andersen SU (2009). Shoremap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nature methods* 6: 550-551.
- Schwab B., Mathur J., Saedler R., Schwarz H., Frey B., Scheidegger C., Hülskamp M. (2003). Regulation of cell expansion by the DISTORTED genes in

Arabidopsis thaliana: Actin controls the spatial organization of microtubules. *Molecular Genetics and Genomics*, 269, 350-360.

- Seagull R. W. (2016). The Plant Cytoskeleton. En Reference Module in Food Sciences (1-22). NY, USA: Elsevier.
- Shabala S. N y I. A. Newman. (1997). Proton and calcium flux oscillations in the elongation region correlate with root nutation. *Physiologia plantarum*, 100, 917-26.
- Slovak R., T. Ogura, S. B. Satbhai, D. Ristova y W. Busch. (2016). Genetic control of root growth: from genes to networks. *Annals of Botany*, 117, 9–24.
- Smith L. G. (2003). Cytoskeletal control of plant cell shape: Getting the fine points. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 63-73.
- Smyth D. R. (2016). Helical growth in plant organs: mechanisms and significance. *The Company of Biologists*, 143, 3272-3282.
- Staiger C. J., M. B. Sheahan, P. Khurana, X. Wang, D. W. Mccurdy y L. Blanchoin. (2009). Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the *Arabidopsis* cortical array. *The Journal Of Cell Biology*, 184 No. 2, 269-280.
- Staiger C. J. Y L. Blanchoin. (2006). Actin dynamics: old friends with new stories. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 554–562.
- Sugimoto-Shirasu K., N. J. Stacey, J. Corsar, K. Roberts y M. C. Mccann. (2002). DNA Topoisomerase VI Is Essential for Endoreduplication in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 12, 1782–1786.

- Sulimenko V., Hájková Z., A. Klebanovych y P. Dráber. (2017). Regulation of microtubule nucleation mediated by γ -tubulin complexes. *Protoplasma*, 254, 1187–1199.
- Szymanski D. B. (2009). Plant cells taking shape: new insights into cytoplasmic control. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 735-744
- Taiz L. Y Zeiger E. (2002). Plant cells. En *Plant physiology*(19-21). Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Tapia-López R., B. García-Ponce, J. G. Dubrovsky, A. Garay-Arroyo, R. V. Pérez-Ruíz, S. Kim, F. Acevedo, S. Pelaz, y E. R. Alvarez-Buylla. (2008). An AGAMOUS-Related MADS-Box Gene, XAL1 (AGL12), Regulates Root Meristem Cell Proliferation and Flowering Transition in Arabidopsis. *Plant Phys.*, 146, 1182-1192.
- Thitamadee S., K. Tsuchihara y T. Hashimoto. (2002). Microtubule basis for left-handed helical growth in Arabidopsis. *Nature*, 417, 193-196.
- Thompson M. V. Y N. M. Holbrook. (2004). Root-Gel Interactions and the Root Waving Behavior of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 135, 1822-1837.
- Ubeda-Tomas S. Y M. J. Bennett. (2010). Plant Development: Size Matters, and It's All Down to Hormones. *Current Biology*, 20, 511-513.
- Uchida N, T. Sakamoto, T. Kurata y M. Tasaka. (2011). Identification of EMS-Induced Causal Mutations in a Non-Reference Arabidopsis thaliana Accession by Whole Genome Sequencing. *Plant Cell Physiol.*, 52, 716-722.
- Vanstraelen M., Balaban M., Da Ines O., Cultrone A., Lammens T., Boudolf V., Brown S. C., De Veylder L., Mergaert P., y Kondorosi E. (2009). APC/ C-CCS52A

complexes control meristem maintenance in the Arabidopsis root. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 11806–11811.

- Vaughn L. M. Y P. H. Masson. (2011). A QTL Study for Regions Contributing to Arabidopsis thaliana Root Skewing on Tilted Surfaces. Genes, Genomes, Genetics, 1, 105-115.
- Yalovsky S., A. Kulukian, M. Rodríguez-Concepción, C. A. Young y W. Grisse. (2000). Functional Requirement of Plant Farnesyltransferase during Development in Arabidopsis. The Plant Cell, 12, 1267-1278.
- Yu Y., Wang J., Zhang Z., Quan R., Zhang H., Deng X. W., Ma L. Y Huang R. (2013) Ethylene Promotes Hypocotyl Growth and HY5 Degradation by Enhancing the Movement of COP1 to the Nucleus in the Light. Plos Genet 9(12)
- Yuen C. Y., Sedbrook J. C., Perrin R. M., Carroll K. L., Masson P. H. (2005). Loss-of-function mutations of ROOT HAIR DEFECTIVE3 suppress root waving, skewing, and epidermal cell file rotation in Arabidopsis. Plant Physiology 138: 701–714
- Zhang Y., M. Iakovidis y S. Costa. (2016). Control of patterns of symmetric cell division in the epidermal and cortical tissues of the Arabidopsis root. Development, 143, 978-82.
- Zhu J. Y M. Geisler. (2015). Keeping it all together: auxin–actin crosstalk in plant development. Journal of Experimental Botany, 66, 4983-4998.