



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

EL PAPEL DEL GEN *ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX (ATX1)* EN  
EL DESARROLLO DEL SISTEMA RADICAL.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M.C. Selene Napsucialy Mendivil

Director de Tesis

Dr. Joseph Dubrovsky

[Instituto de Biotecnología](#)

Comité Tutor

Dra. Martha Vázquez Laslop.

[Instituto de Biotecnología](#)

Dra. Berenice García Ponce de León.

[Instituto de Ecología](#)

Cuernavaca, Morelos, Agosto del 2018.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

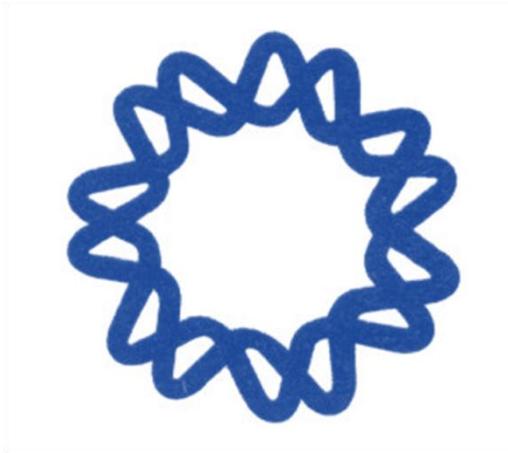


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**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.



Esta tesis se realizó en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología/UNAM, bajo la asesoría del Dr. Joseph Dubrovsky. El proyecto fue parcialmente financiado por los donativos de CONACyT (127957, 237430) y de la UNAM-DGAPA-PAPIIT (IN204312, IN205315, IN200818) otorgados al Dr. Joseph Dubrovsky y de CONACyT (240055) y de la UNAM-DGAPA-PAPIIT (IN201318) otorgados a la Dra. Svetlana Shishkova.

A Selene Napsucialy Mendivil se le otorgó una beca para una estancia en la Universidad de Córdoba, Argentina por el CONACyT FOINS Bilateral 219522 otorgado a la Dra. Svetlana Shishkova y un apoyo para asistir al XXXI Congreso Nacional de Bioquímica 2016 (SMB) a través del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP-UNAM).

## Agradecimientos

Al Dr. Joseph Dubrovsky, por su apoyo incondicional, por su apertura para la discusión y por ser un tutor dedicado.

A la Dra. Svetlana Shishkova, por ser la *sensei* del laboratorio en cuestiones de genética, biología molecular y por tener siempre la mejor disposición de ayudar en todo.

A los integrantes del Comité Tutorial: Dra. Martha Vázquez Laslop y Dra. Berenice García Ponce de León y Dra. Svetlana Shishkova (invitada), por todas las aportaciones durante el desarrollo del proyecto que surgieron de sus comentarios, sugerencias y discusiones.

A los integrantes del Jurado de examen: Dra. Gladys Iliana Cassab López, Dr. Enrique Salas Vidal, Dra. Verónica Nárvaez Padilla, Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez y Dra. Elizabeth Córdoba Martínez, por sus valiosos comentarios al escrito de tesis.

Al M. en B. Juan Elías Olivares Grajales, por su ayuda con la técnica de Western blot.

A la I.B.I. Marcela Ramírez Yarza, por su ayuda con el trabajo en el laboratorio.

Al M. en C. Héctor Hugo Torres Martínez, por las discusiones de resultados y la ayuda con la microscopía confocal.

Al M. en C. Gustavo Rodríguez Alonso, por su ayuda con el software CLC Genomics Workbench.

Al Dr. Pedro E. Lázaro Mixteco, por su ayuda en los experimentos de qPCRs.

Al personal del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada-UNAM, en especial al M. en C. Andrés Saralegui Amaro, al Dr. Arturo Pimentel Cabrera y a la Q.F.B. Xóchilt Alvarado Affantranger.

Al personal de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA IBT-UNAM.

Al personal de la Unidad de Cómputo, en especial a Juan Manuel Hurtado Ramírez, Arturo Ocadiz Ramírez y Shirley Ainsworth.

A la Dra. Natalia Doktor, por su ayuda en la edición de las imágenes del artículo publicado.

# INDICE

<b>1. Resumen.</b>	1
<b>2. Introducción.</b>	4
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.	4
2.2 El meristemo apical de la raíz.	6
2.3 La auxina y la transcripción de genes de respuesta.	10
2.4 Desarrollo de las raíces laterales en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	12
2.5 La remodelación de la cromatina, la modificación postraduccional de histonas y algunos factores epigenéticos involucrados en el desarrollo de la raíz.	15
2.6 Las proteínas Trithorax en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	17
<b>3. Antecedentes.</b>	19
<b>4. Hipótesis.</b>	21
<b>5. Objetivo general.</b>	21
<b>6. Objetivos particulares.</b>	21
<b>7. Materiales y Métodos.</b>	22
7.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.	22
7.2 Técnicas de Microscopía.	22
7.3 Análisis de varios parámetros del crecimiento de la raíz.	23
7.4 Tiempo de formación de raíces laterales.	23
7.5 Análisis de la simetría del primordio de raíz lateral.	24
7.6 Análisis de la expresión por “RNA-seq” y RT-qPCR.	24
<b>8. Resultados Publicados y Discusión.</b>	25
8.1 <i>ATX1</i> es importante para el crecimiento de la raíz primaria y para la producción celular en el meristemo apical de la raíz.	25
8.2 <i>ATX1</i> es necesario para la organización y la formación del patrón del meristemo apical de la raíz primaria.	27
8.3 <i>ATX1</i> es importante para la emergencia de la raíz lateral porque controla el tiempo de formación de la RL y la proliferación celular.	30
8.4 La función de <i>ATX1</i> es fundamental para la correcta morfogénesis del primordio de raíz lateral.	32
<b>9. Resultados No Publicados y Discusión.</b>	35
9.1 El fenotipo de la raíz en la mutante <i>atx1-1<sup>setm</sup></i> es más fuerte que el de la mutante <i>atx1-1</i> .	35
9.2 Análisis del transcriptoma de la mutante <i>atx1-1<sup>setm</sup></i> .	39
<b>10. Conclusiones de los resultados publicados.</b>	46
<b>11. Conclusiones de los resultados no publicados.</b>	47

**12. Perspectivas.**

47

**13. Referencias.**

48

## 1. Resumen.

En las plantas el desarrollo del sistema radical así como de otros órganos se da principalmente en el periodo post-embrionario. El gen *ARABIDOPSIS HOMOLOG of TRITHORAX1 (ATX1/SDG27)* es un regulador conocido del desarrollo floral que codifica para una metiltransferasa de histona encargada de la trimetilación de la lisina4 en la histona3 (H3K4me3). Esta marca epigenética está asociada a genes transcripcionalmente activos. Este trabajo de tesis se enfocó en el análisis fenotípico de la raíz en la mutante nula *atx1-1* y en el análisis global de la expresión de genes en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* (en la cual la proteína ATX1 se encuentra catalíticamente inactiva). Este análisis permitió establecer por primera vez que el gen *ATX1* es importante para el crecimiento y desarrollo de la raíz primaria y de las raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*.

Los datos mostraron que ATX1 controla el crecimiento de la raíz ya que en la mutante, varios parámetros evaluados en el meristemo de la raíz primaria, como la duración del ciclo celular, la producción celular y la transición a elongación se aumentaron en comparación con el tipo silvestre. Notoriamente, el dominio de proliferación en la mutante fue más corto que en plantas de tipo silvestre. El análisis celular demostró que ATX1 es importante para mantener la organización y la formación del patrón del meristemo apical de la raíz primaria. Así como, para restringir la identidad de las células del centro quiescente que representa un dominio importante para mantener la actividad de las células troncales. En el análisis del desarrollo de las raíces laterales se observó que la forma del primordio de raíz lateral cambió drásticamente en la mutante. Se identificaron distintas anomalías en el desarrollo de los primordios, incluyendo primordios asimétricos o primordios con dos domos. El tiempo de desarrollo de los primordios y por lo tanto, la emergencia de las raíces laterales también se modificaron fuertemente. Este análisis demostró la importancia de ATX1 para el control de los diferentes procesos del desarrollo y crecimiento del sistema radical.

Por otro lado, el análisis del transcriptoma de la raíz de la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* mostró que 355 genes se expresan diferencialmente cuando se inactiva a ATX1. De estos genes, 195 disminuyen y 160 aumentan sus niveles de expresión. Con este análisis se lograron identificar genes potencialmente "blanco" de ATX1. Entre estos se encontraron genes que codifican para factores de transcripción específicos de plantas como son: *TEOSINTE BRANCHED/CYCLOIDEA/PROLIFERATING CELL FACTOR2*, *AGAMOUS LIKE14*, *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN29* y *HOMEODOMAIN PROTEIN21*, entre otros. La validación de los datos del "RNA-seq", se realizó mediante el análisis de la expresión de varios genes por RT-PCR cuantitativo.

De los genes identificados en el análisis transcriptómico se encontraron candidatos fuertes para ser regulados por ATX1 que probablemente tienen una función importante en el desarrollo del sistema radical en *Arabidopsis thaliana*.

## Abstract.

In plants, most organs, including roots, are formed during postembryonic development. The *ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX1* (*ATX1/SDG27*) is a known regulator of floral development which encodes a histone methyltransferase (H3K4me). *ATX1* is directly involved in the H3K4 trimethylation which is associated with maintenance of transcriptionally active chromatin state. To study the *ATX1* role in root development, we performed a detailed phenotypic analysis of *atx1-1* root development, and *atx1-1<sup>setm</sup>* root transcriptome profiling (using RNA-seq approach). The *atx1-1* is a null mutant and the *atx1-1<sup>setm</sup>* is a mutant that express in the *atx1-1* background the catalytically inactive form of the *ATX1* protein that maintains its structural integrity. This study allowed to establish for the first time that *ATX1* is important for root growth and development in *Arabidopsis thaliana*. The *atx1-1* mutant was impaired in primary root growth. The data showed that *ATX1* controls root growth by regulating cell cycle duration, cell production and the transition from cell proliferation in the root apical meristem (RAM) to cell elongation. Interestingly, the cell proliferation domain was shorter in the mutant than in the wild type. In *atx1-1*, the quiescent centre cells were irregular in shape and more expanded than those of the wild type. The analysis showed that *ATX1* is required for the maintenance of the cell patterning within the RAM and stem cell niche. Lateral root development was also affected in the mutant. Time from lateral root initiation to emergence was significantly extended in the *atx1-1* mutant and thus lateral root primordium formation was slower in the mutant than in Wt. Besides, the primordium morphogenesis was abnormal in the mutant resulting in asymmetric primordia and primordia with two domes. This analysis showed that *ATX1* is an important player in shaping the root system architecture.

The transcriptome profiling of the root in *atx1-1<sup>setm</sup>* mutant showed that 355 genes were differentially expressed when a catalitically inactive form of *ATX1* was present. Of these, 195 genes were downregulated and 160 were upregulated. The RNA-seq data were validated by measuring the relative expression of selected genes by RT-qPCR. With this analysis various putative targets of *ATX1* were identified. Some of them are the plant-specific transcription factors like: *TEOSINTE BRANCHED/ CYCLOIDEA/ PROLIFERATING CELL FACTOR2*, *AGAMOUS LIKE14*, *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN29* and *HOMEBOX PROTEIN21*. In this study candidate genes regulated by *ATX1* were identified which are predicted to have an important function in *Arabidopsis thaliana* root development.

## **2. Introducción.**

El desarrollo de organismos multicelulares requiere de la producción de muchos tipos celulares especializados y de mecanismos sofisticados de coordinación entre ellos (Sozzani e Iyer-Pascuzzi, 2014). El proceso de desarrollo de nuevos órganos a partir de células indiferenciadas se conoce como organogénesis (Lavenus *et al.*, 2013). Las plantas a diferencia de los animales poseen la característica única de desarrollar continuamente nuevos órganos durante todo su ciclo de vida (Terpstra y Heidstra, 2009). Durante la embriogénesis en plantas, se establece el plan del cuerpo básico del organismo y se forman el meristemo apical del brote (SAM, por sus siglas en inglés) y el meristemo apical de la raíz (RAM, por sus siglas en inglés) (Terpstra y Heidstra, 2009; Lavenus *et al.*, 2013). De manera importante todo el desarrollo postembrionario de las plantas recae en la función de estos dos meristemos (Sozzani y Iyer-Pascuzzi, 2014). A partir del SAM se desarrolla la parte aérea y a partir del RAM se desarrollan todas las raíces, a excepción de las raíces adventicias. Al conjunto de raíces se le ha denominado 'sistema radical'. Las funciones primarias del sistema radical son el soporte, la absorción y el transporte de agua y solutos, así como la síntesis de algunos metabolitos que permiten el crecimiento de la planta (Taiz y Zeiger, 1998; Casson y Lindsey, 2003). El sistema radical es altamente flexible y es modulado por estímulos ambientales que incluyen disponibilidad de agua, estatus nutrimental del suelo, temperatura, estrés salino, etc., (Taiz y Zeiger, 1998; Malamy, 2005).

### **2.1 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio.**

La especie *Arabidopsis thaliana* (de aquí en adelante *Arabidopsis*) es una herbácea anual de tamaño pequeño que pertenece a la familia *Brassicaceae* y a pesar de no tener importancia agronómica posee características importantes que la vuelven una planta modelo por excelencia para la investigación en biología del desarrollo ([www.nsf.gov/pubs/2002/bio0202/model.htm](http://www.nsf.gov/pubs/2002/bio0202/model.htm)). Estas características incluyen, un genoma pequeño (~125 megabases) y secuenciado (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000), un ciclo de vida corto (6-8 semanas), alta producción de semillas y cultivo fácil en espacios reducidos, la existencia de colecciones amplias de mutantes ([www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp](http://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp)) y sobretodo (para fines de este trabajo) que la raíz tiene una organización radial relativamente simple con tejidos semitransparentes (Dolan *et al.*, 1993). El sistema radical está compuesto por la raíz primaria que se desarrolla a partir de la radícula, la cual emerge del embrión durante la germinación, por las raíces adventicias que por definición, son las raíces que se forman a partir de un órgano distinto de la raíz y por las raíces laterales que se

forman siempre a partir de una raíz parental (Figura 1A; Taiz y Zeiger, 1998; Casson y Lindsey, 2003). El desarrollo de todo este sistema radical ocurre después de la germinación. En *Arabidopsis*, la raíz está organizada del exterior al interior por capas únicas de los siguientes tipos celulares: la epidermis, el córtex y la endodermis. La endodermis es el tejido que cubre al cilindro central de la raíz. El cilindro central es un conjunto de tejidos de los cuales el periciclo es el más externo que rodea al xilema, al floema y al parénquima vascular (Figura 1B; Benfey y Scheres, 2000). Las raíces laterales se originan a partir de las células del periciclo, enfrente de los polos del xilema, a las cuales se les ha llamado células fundadoras (Dubrovsky *et al.*, 2000; 2008). Longitudinalmente, la raíz se puede dividir en tres zonas funcionales. La primera es la zona meristemática, caracterizada por una alta tasa de proliferación celular (a excepción del nicho de células troncales), comparada con las otras zonas. La segunda es la zona de elongación, donde las células alcanzan su máxima longitud y la tercera la zona de diferenciación, donde todas las células se han diferenciado en los distintos tipos celulares con características morfológicas y funcionales específicas. Esta zona se reconoce fácilmente por la presencia de los pelos radicales desarrollados a partir de las células epidérmicas (Figura 1C; Scheres *et al.*, 2002; Verstraeten y De Smet, 2017). También se ha dividido a la zona meristemática en los dominios de proliferación (PD) y de transición (TD) esta último es la zona del meristemo apical de la raíz en dirección al brote, donde la probabilidad de que ocurran divisiones celulares es más baja (Figura 1C; Ivanov y Dubrovsky, 2013). Las células de la columela y la cofia lateral protegen al meristemo apical de la raíz durante el crecimiento. En las plantas la información posicional y el intercambio de señales entre células son las indicaciones para iniciar la diferenciación, contrario a lo que ocurre en embriones animales, donde la migración celular es más comúnmente la instrucción para iniciar el desarrollo (Verstraeten y De Smet, 2017).

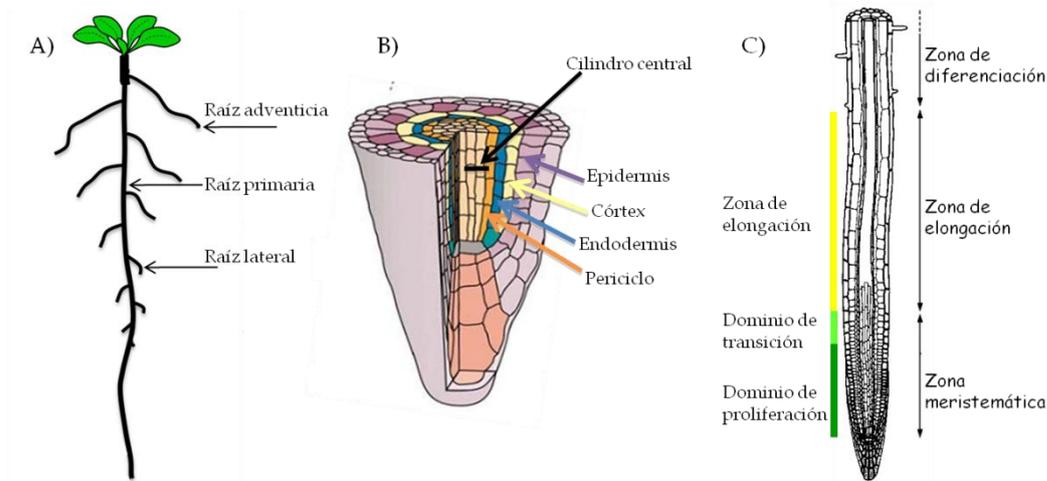


Figura 1. Esquemas del sistema radical, de los tipos celulares y las zonas de desarrollo de la raíz en *Arabidopsis thaliana*. A) Sistema radical (modificado de Ristova y Busch, 2014). B) Arreglo de los tejidos que conforman a la raíz (modificado de Scheres *et al.*, 2002). C) Zonas de desarrollo de la raíz primaria y dominios de la zona meristemática (modificado de Benfey *et al.*, 2010; Ivanov y Dubrovsky, 2013).

## 2.2 El meristemo apical de la raíz (RAM).

El crecimiento y desarrollo de la raíz primaria y de todas las raíces laterales que de ella emergen (independientemente del número de orden) es sostenido por el meristemo apical (Perilli, *et al.*, 2012). En angiospermas, el RAM consta de filas celulares que convergen en un pequeño grupo de células centrales localizadas justo por arriba de la cofia central o columela de la raíz (Jiang y Feldman, 2005). En este grupo de células está el centro quiescente (CQ), que actúa como el centro organizador del RAM, con una baja tasa de proliferación (Clowes, 1975; Jiang y Feldman, 2005) y las células iniciales de tejidos que se consideran como células troncales. Estas son, la célula inicial de la cofia lateral y de la epidermis, la inicial del córtex y de la endodermis, las iniciales de los tejidos vasculares y las iniciales de la columela (Dolan *et al.*, 1993; Verstraeten y De Smet, 2017) (Figura 2A, ver pie de figura). Las divisiones asimétricas de las células iniciales dan lugar a todos los tipos celulares de la raíz (Benfey y Scheres 2000). Como resultado de la división asimétrica, una célula hija se mantiene en contacto con el CQ y se regenera la célula inicial de tejido, mientras que, la otra célula hija pierde el contacto con el CQ y esto permite que adquiera una identidad distinta de la de célula inicial y posteriormente se diferencie (Benfey y Scheres 2000; Petricka y Benfey, 2008).

En particular, la célula inicial de la epidermis y de la cofia lateral sufre una división formativa periclinal llamada división de tipo T (Figura 2B), donde el mango de la T es la pared celular formada nuevamente (Rost, 2011). Cada evento de división tipo T, produce un nuevo módulo compuesto de dos paquetes celulares, un paquete es de la epidermis y el otro paquete es de la

cofia lateral (Figura 2B, ver pie de figura) (Wenzel y Rost, 2001). El paquete celular de la cofia lateral se diferencia a dos componentes, A y B (Figura 2B). Las células del componente A están adyacentes a la epidermis y las células del componente B están adyacentes a la célula inicial de cofia lateral y sus derivadas (Figura 2B, ver pie de figura). De esta manera en *Arabidopsis*, la epidermis y la cofia lateral se forman a través de series de divisiones celulares precisas, a partir de una célula inicial que forma módulos de 16 células epidérmicas y 16 células de cofia lateral en promedio (Wenzel y Rost, 2001; Rost, 2011).

El CQ y las células troncales que lo rodean forman el nicho de células troncales (Figura 2A, línea negra; Sabatini *et al.*, 2003; Aida *et al.*, 2004; Perilli *et al.*, 2012; Drisch y Stahl, 2015). El gen con dominio "homeo" *WOX5* (*WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5*) se expresa específicamente en las células del CQ, desde el desarrollo temprano del embrión y hasta la raíz completamente desarrollada (Haecker *et al.*, 2004). Se ha demostrado que *WOX5* es necesario para el mantenimiento de las células iniciales de columela, ya que, en la mutante *wox5*, las células en la posición de las iniciales de columela, presentan gránulos de almidón característico de las células de la columela diferenciadas (Sarkar *et al.*, 2007). El gen *WOX5* es uno de los jugadores clave que mantienen el nicho de las células troncales en la raíz y esto se ve reflejado en la participación de *WOX5* en las distintas vías de regulación, donde su expresión es afectada de manera positiva o negativa (Figura 2C; Drisch y Stahl, 2015).

La principal fitohormona involucrada en el desarrollo de la raíz es la auxina. En la punta de la raíz primaria se ha detectado un máximo nivel de auxina (Sabatini *et al.*, 1999; Grieneisen *et al.*, 2007). Esto se debe a la localización específica de los transportadores PIN en la membrana plasmática de los diferentes tipos celulares de la raíz (Friml *et al.*, 2002, 2003). La acumulación de la auxina en la punta es crucial para el mantenimiento del meristemo de la raíz (Grieneisen *et al.*, 2007; Petersson *et al.*, 2009).

La auxina tiene un papel preponderante en el desarrollo de la raíz, pero la interacción y comunicación con otras fitohormonas como citocinina, giberelinas, brasinosteroides, etileno, y ácido absísico son también muy importantes para el mantenimiento del RAM (Figura 2C). Un ejemplo, es la interacción entre auxina y citocinina en el control de la actividad del meristemo. El factor de transcripción de respuesta a citocinina *ARR1* (*ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 1*), activa al gen *SHY2* (*SHORT HYPOCOTYL 2*) que codifica para un represor de la señalización de auxina. Este represor (*SHY2*) regula negativamente a los genes facilitadores del transporte de auxina PIN, por lo que, la citocinina causa una redistribución de la auxina, promoviendo la diferenciación celular (Dello Ioio *et al.*, 2008). Por otro lado, la auxina media la

degradación de SHY2, sosteniendo así la actividad de las proteínas PIN y la división celular (Dello Ioio *et al.*, 2008). Se propuso que con este circuito regulatorio se establece un balance entre la división y la diferenciación celular que es necesaria para controlar el tamaño del meristemo y el crecimiento de la raíz (Dello Ioio *et al.*, 2008; Verstraeten y De Smet, 2017). Es así como la comunicación entre las diferentes hormonas impacta a nivel de la regulación de genes que son importantes para el mantenimiento del RAM (Drisch y Stahl, 2015) (Figura 2C).

Los cofactores de transcripción SCR (SCARECROW) y SHR (SHORT ROOT) de la familia GRAS (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Hirano *et al.*, 2017) participan en otra vía de regulación genética que también es muy importante para el mantenimiento del RAM. Se ha demostrado que estos cofactores son necesarios para definir la organización radial de la raíz (Helariutta *et al.*, 2000; Hirano *et al.*, 2017). SHR se mueve del cilindro central hacia todas las células adyacentes (donde se incluye a las células del centro quiescente, a la célula inicial de córtex y endodermis e hijas y a las células de la endodermis). En estas células, SHR activa la expresión de SCR, cuyo producto se transporta al núcleo (Nakajima *et al.*, 2001). La presencia de SCR en el núcleo resulta en la regulación de múltiples genes y la especificación del tejido de la endodermis (Helariutta *et al.*, 2000, Heidstra *et al.*, 2004, Sparks *et al.*, 2016). Es importante mencionar que en las mutantes *scr-1* y *shr* el RAM llega a agotarse y la raíz deja de crecer después de algunos días (Benfey *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 1995; Di Laurenzio *et al.*, 1996). Por otro lado, *CYCD6;1* (*CYCLINA D6;1*) es blanco del circuito regulatorio *SHR/SCR* y esto une directamente la división celular asimétrica de la célula inicial de endodermis/córtex con la activación de genes del ciclo celular (Sozzani *et al.*, 2010).

Otra vía de regulación para el mantenimiento del RAM, implica a los genes *PLT* (*PLETHORA*) (Figura 2C) de la familia de factores de transcripción AP2/EREBP (APETALA2/ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN). La expresión de los genes *PLT1*, *PLT2*, *PLT3* y *PL4/BBM* (*BABY BOOM*) en el RAM está regulada de manera muy importante por la fitohormona auxina (Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007; Mähönen *et al.*, 2014). En el RAM, se establece un gradiente de las proteínas PLETHORA, con una máxima acumulación de estas proteínas en el nicho de células troncales y una menor acumulación en las células de la zona de elongación (Galinha *et al.*, 2007). Recientemente se ha demostrado que este gradiente de las proteínas PLETHORA puede regular el estado de la célula de acuerdo a su posición específica dentro del RAM, induciendo genes de proliferación celular y reprimiendo la diferenciación (Santuari *et al.*, 2016). Notoriamente, en la doble

mutante *plt1plt2* el RAM tampoco se mantiene como en las mutantes *scr-1* y *shr* y la raíz también deja de crecer después de algunos días (Aida *et al.*, 2004).

También es muy importante para el mantenimiento del RAM la vía de *CLE40* (*CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION 40*), *ACR4* (*ARABIDOPSIS CRINKLY4*) y *WOX5*. El gen *CLE40* codifica para un péptido pequeño e induce la transcripción de *ACR4* que a su vez codifica para un receptor tipo cinasa que restringe la expresión del gen con dominio “homeobox”, *WOX5* en las células del centro quiescente (Figura 2C; Stahl *et al.*, 2009).

Otro gen importante es *ROW1* (*REPRESSOR OF WUSCHEL1*). Este gen confina la expresión de *WOX5* a las células del CQ (Zhang *et al.*, 2015). *ROW1* se une a la marca H3K4me3 en el promotor de *WOX5*, a través de su dominio PHD (“plant homeodomain”). Esta interacción impide la transcripción de *WOX5* en las células adyacentes al CQ (Zhang *et al.*, 2015; Drisch y Stahl, 2015).

Por otro lado, *WOX5* es necesario para reprimir la expresión de *CYCD3;3* (*CYCLINA D3;3*) y evitar las divisiones celulares en el CQ (Figura 2C). Esto es importante porque contribuye a establecer la quiescencia en la raíz embrionaria que se mantiene en la raíz madura (Forzani *et al.*, 2014). Otro gen involucrado en la quiescencia del CQ, es *BRAVO* (*BRASSINOSTEROIDS AT VASCULAR AND ORGANIZING CENTER*), que codifica para un factor de transcripción de la familia MYB y actúa como un represor de las divisiones del CQ (Vilarrasa-Blasi *et al.*, 2014). Resulta interesante que el factor de transcripción regulado por brasinosteroides, *BES1* (*BRI1-EMS SUPPRESSOR1*) reprime directamente e interacciona físicamente con *BRAVO*, creando un “switch” que modula las divisiones del CQ y es regulado por brasinosteroides (Vilarrasa-Blasi *et al.*, 2014).

También recientemente se ha demostrado que *WOX5* se mueve de las células del CQ a las células iniciales de columela, para mantener el estado indiferenciado de estas células a través de represión mediada por cromatina asociada a *CDF4* (*CYCLING DOF FACTOR4*) (Figura 2C; Pi *et al.*, 2015). *WOX5* reprime la transcripción de *CDF4* por reclutar a los correpresores *TPL/TPR* (*TOPLESS/TOPLESS-RELATED*) y a la deacetilasa de histona *HDA19*, la cual induce la deacetilación de la histona en la región regulatoria de *CDF4* (Pi *et al.*, 2015).

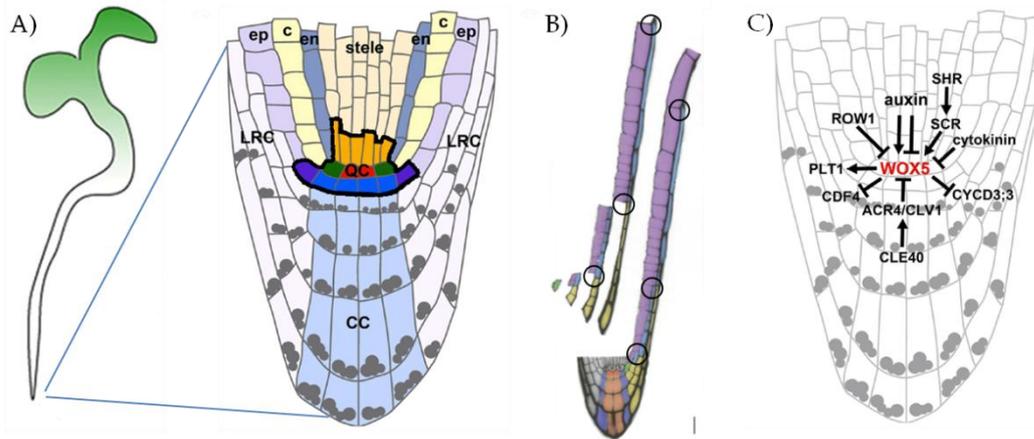


Figura 2. A) Esquema del meristemo apical de la raíz en *Arabidopsis*. El nicho de las células troncales está señalado con la línea negra y contiene a las células del centro quiescente (en rojo), la célula inicial de la endodermis y del córtex (en verde), las células iniciales de los tejidos vasculares (en anaranjado), la célula inicial de la epidermis y de la cofia lateral (en morado) y las células iniciales de la columela (en azul). ep, epidermis; c, córtex; en, endodermis; LRC, cofia lateral; CC, columela. Los puntos grises indican gránulos de almidón. B) Corte medio longitudinal de una raíz de 7 días de edad, las divisiones de tipo T se muestran en círculos. A la izquierda, se muestra el linaje celular que se genera a partir de la célula inicial de la epidermis y de la cofia lateral marcada en color verde; el paquete celular de la epidermis se muestra en color morado y el paquete celular de cofia lateral en color azul (componente A) y amarillo (componente B) (modificado de Wenzel y Rost, 2001). C) Distintas vías de regulación implicadas en el mantenimiento del nicho de células troncales. (Esquemas en A y C, modificadas de Drisch y Stahl, 2015).

Se ha demostrado la existencia de múltiples genes y circuitos regulatorios involucrados en mantener el balance de la división y la diferenciación celular en el RAM y esto se relaciona directamente con la plasticidad del crecimiento de la raíz que permite a las plantas, de naturaleza sésil, contender con los diferentes tipos de estrés ambiental (Malamy, 2005; Petricka y Benfey, 2008; Verstraeten y De Smet, 2017).

### 2.3 La auxina y la transcripción de genes de respuesta.

En general, el crecimiento y la diferenciación en plantas ha sido ligado de manera compleja a las fitohormonas y dentro de éstas, la auxina es quizás la más investigada ya que está virtualmente involucrada en cada aspecto del crecimiento y desarrollo de las plantas, como, la embriogénesis, la organogénesis, la formación del patrón de tejidos, los tropismos, entre otros (Saini *et al.*, 2013; Leyser, 2018).

El mecanismo más importante por el cual los cambios en los niveles de auxina se convierten en respuestas celulares es a través de cambios en la transcripción de genes. En respuesta a la auxina exógena, la expresión de cientos de genes cambia rápidamente (Paponov *et al.*, 2008). La auxina regula la transcripción de genes, a través de una vía de transducción de señales que involucra a muchos factores (Figura 3). En condiciones de bajos niveles de auxina (Figura 3), miembros de la familia de represores transcripcionales

Aux/IAA (Tan *et al.*, 2007), se unen a los factores de transcripción ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR) (Ulmasov *et al.*, 1999), lo que reprime la expresión de genes de respuesta a auxina. Estos represores Aux/IAA contienen un dominio conservado EAR, a través del cual pueden reclutar correpresores de la familia TPL a los promotores (Tiwari *et al.*, 2004; Szemenyei *et al.*, 2008). La auxina actúa como pegamento molecular y se une por un lado a las proteínas con caja-F de la familia TIR1/AFB (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX) y por otro lado a los Aux/IAA (Figura 3). Las proteínas con caja F, realizan la selección del sustrato para el complejo ubiquitina ligasa tipo SCF, llamado así por sus subunidades: Skp1, Cullina y una proteína con caja-F (Smalle y Vierstra, 2004). La caja F es un motivo en el extremo N-terminal de las proteínas así llamadas, a través del cual interaccionan con Skp1, la cual también interacciona con un dímero de Cullina y RBX. Este dímero transfiere la ubiquitina de la enzima conjugadora de ubiquitina a la proteína blanco (Tan *et al.*, 2007). Las proteínas Aux/IAA marcadas con ubiquitina se degradan en el proteasoma 26S (Gray *et al.*, 2001; Maraschin *et al.*, 2009). Cuando esto ocurre, los factores de transcripción ARF se liberan, entonces se unen a los elementos de respuesta a auxina, TGTCTC, presentes en las regiones promotoras de los genes que responden a auxina, activando su transcripción (Abel y Theologis, 1996; Mironova *et al.*, 2014).

De esta forma los cambios en los niveles de auxina se reflejan en cambios en los niveles de las proteínas Aux/IAA y esto impacta la transcripción de genes de respuesta a auxina (Leyser, 2018). Se ha utilizado este conocimiento para generar herramientas que permiten visualizar la respuesta a auxina *in vivo*, en particular el marcador de respuesta a auxina *DR5rev::GFP* (Figura 4B; Friml *et al.*, 2003) ha sido utilizado ampliamente no sólo en *Arabidopsis* (Kirschner *et al.*, 2018).

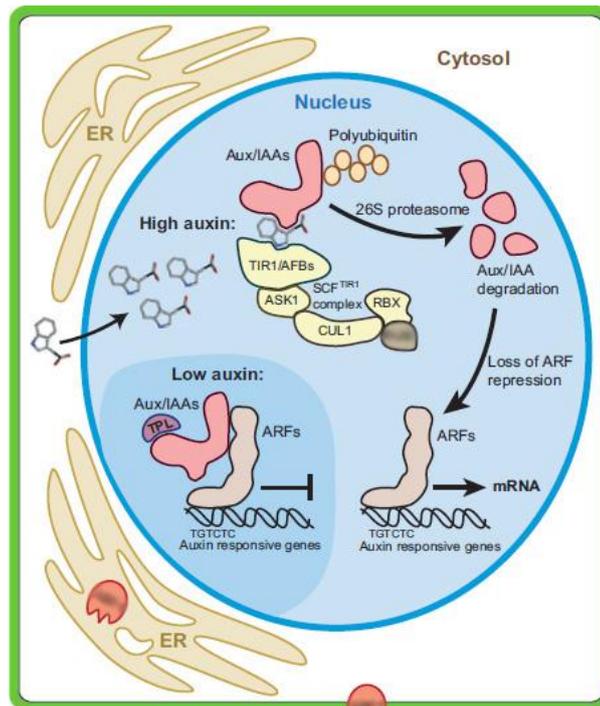


Figura 3. Vía de regulación de la transcripción de genes de respuesta a auxina. Cuando los niveles de auxina son bajos (fondo azul más fuerte) las proteínas Aux/IAA forman heterodímeros con las proteínas ARF para reprimir la transcripción de genes. La proteína TPL funciona como un correpresor transcripcional para las Aux/IAA. Sin embargo, cuando los niveles de auxina son altos, ésta se une a las Aux/IAA y a TIR1/AFB del complejo SCF que lleva a los represores Aux/IAA a su degradación por el proteosoma 26S, esto libera la represión de las proteínas ARF para permitir la transcripción de genes de respuesta a auxina (modificado de Ljung, 2013).

#### 2.4 El desarrollo de las raíces laterales en *Arabidopsis*.

Las raíces laterales para el caso particular de *Arabidopsis*, se desarrollan a partir de las células del periciclo, localizadas enfrente de los polos del xilema (Laskowski *et al.*, 1995). Estas células mantienen su capacidad para dividirse después de que han dejado el RAM, lo que no pueden hacer las células del periciclo enfrente del floema (Dubrovsky *et al.*, 2000; Beeckman *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la acumulación local de auxina en estas células dispara el proceso de especificación de identidad de célula fundadora, a partir de la cual se desarrollan los primordios (Figura 4; Dubrovsky *et al.*, 2008). Sin embargo, también se ha propuesto que el evento más temprano en la formación de la raíz lateral ocurre en el meristemo de la raíz primaria y se ha llamado “priming” (De Smet *et al.*, 2007; Moreno-Risueno *et al.*, 2010). Este término se refiere al proceso de señalización periódica que se sabe involucra cambios en los niveles de respuesta a auxina y de expresión de genes que dan lugar a la especificación de células competentes para la formación futura de la raíz lateral (Moreno-Risueno *et al.*, 2010; De Rybel *et al.*, 2010).

Más recientemente, se ha observado que la actividad meristemática del periciclo está restringida por la interacción con la endodermis adyacente

(Marhavý *et al.*, 2016). Se ha planteado un modelo donde la auxina presente en la endodermis libera a ésta de la restricción impuesta por la interacción célula a célula (endodermis-periciclo), que compromete la actividad meristemática del periciclo, mientras que la auxina en el periciclo, define la orientación del plano de división celular para la iniciación del primordio de raíz lateral (Marhavý, *et al.*, 2016). Un primordio se puede desarrollar a partir de una iniciación longitudinal unicelular o a partir de una iniciación longitudinal bicelular, lo que implica que una o dos células en plano longitudinal, den origen al primordio (Dubrovsky *et al.*, 2001). Se ha propuesto que tres células del periciclo en plano transversal, son el mínimo necesario para formar un primordio (Dubrovsky *et al.*, 2001). Recientemente con el uso de tecnologías avanzadas de microscopía, se ha determinado que de 8-15 células fundadoras (11 en promedio), arregladas en un parche de cinco a ocho filas paralelas del periciclo en el polo del xilema, están involucradas en la formación del primordio (von Wangenheim *et al.*, 2016). Después de que se ha especificado una célula fundadora ocurren las primeras divisiones anticlinales, que marcan al primordio en estadio I (Figura 4). Durante los siguientes estadios se suceden una serie de divisiones periclinales y anticlinales que de manera muy coordinada, van dando forma al domo del primordio de raíz lateral (Malamy y Benfey, 1997). El desarrollo de los primordios culmina en el estadio VII (Figura 4) cuando el primordio está a punto de emerger de la raíz parental y se visualiza el patrón celular 8-8-8, que se refiere al número de células de la capa externa a cada lado del primordio y en la zona central en un plano medio (Malamy y Benfey, 1997).

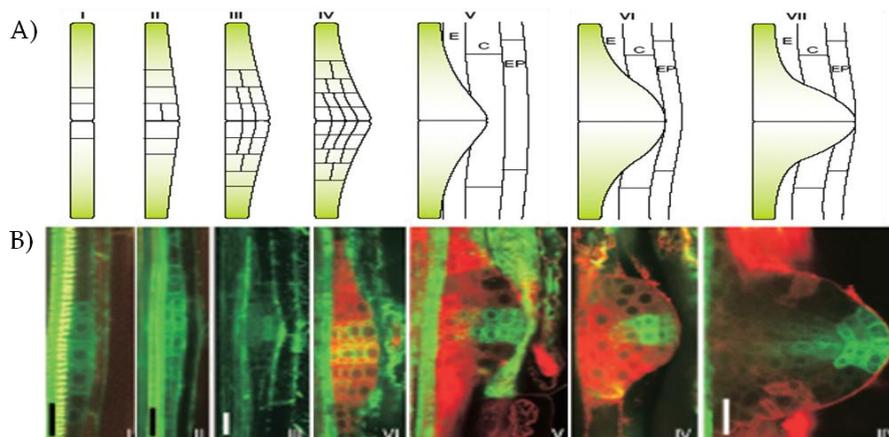


Figura 4. Desarrollo del primordio de raíz lateral en *Arabidopsis*. A) Esquema de los siete estadios de desarrollo (Malamy y Benfey, 1997; Casimiro *et al.*, 2003). B) Expresión del marcador de respuesta a auxina *DR5::GFP*, durante el desarrollo del primordio de raíz lateral (Dubrovsky *et al.*, 2008).

El desarrollo del primordio a través de los distintos estadios está acompañado de cambios continuos en su morfología. Las primeras divisiones anticlinales en el estadio I no cambian la geometría del primordio (Malamy y Benfey, 1997; Casimiro *et al.*, 2003), sin embargo, las primeras divisiones

periclinales que dan lugar a las siguientes capas celulares del primordio, están acompañadas por la formación de una pequeña protuberancia que se desarrolla en la parte central. Esto corresponde a los estadios II y III descritos por Malamy y Benfey (1997). En estadios posteriores este crecimiento curvo de la protuberancia llega a ser más pronunciado y se desarrolla un órgano pequeño con forma de domo (estadios IV-VII; Malamy y Benfey, 1997). Dependiendo del estadio de desarrollo del primordio, el domo es más o menos aplanado, pero en un plano longitudinal con vista lateral del primordio se observa una simetría de espejo con referencia a un eje central (Szymanowska-Pułka, 2013).

Como ya se mencionó, la auxina es fundamental para muchos procesos en las plantas, entre ellos el desarrollo de las raíces laterales. El transporte polar de auxina determina la dirección del flujo de auxina y sus niveles dentro de los tejidos de las plantas (Wisniewska *et al.*, 2006). Este transporte es mediado por las proteínas acarreadoras de eflujo de auxina llamadas PIN (PINFORMED) y por las proteínas acarreadoras de influjo de auxina llamadas AUX1 (AUXIN RESISTANT1) y LAX3 (LIKE-AUX1 3). PIN1 es miembro de la familia de transportadores de eflujo y se acumula a partir de las etapas más tempranas del desarrollo de los primordios mientras que, el transportador PIN2 se acumula después de la emergencia de los primordios (Benkova *et al.*, 2003). Por otro lado, AUX1 se acumula desde la etapa I del desarrollo de los primordios y hasta después de la emergencia (Marchant *et al.*, 2002).

Un interés central de este trabajo es el estudio del desarrollo de las raíces laterales y un enfoque ampliamente utilizado es la caracterización de mutantes afectadas en este proceso. A la fecha se conocen varios genes importantes para el desarrollo de las raíces laterales (Casimiro *et al.*, 2003; De Smet, 2012) y aquí se hace mención de algunos de ellos. El gen *ALF4* (*ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION 4*) codifica para una proteína nuclear novedosa conservada en plantas (Di Donato *et al.*, 2004) y en la mutante en este gen la iniciación de las RLs está severamente dañada, pero no completamente abolida (Celenza *et al.*, 1995; Di Donato *et al.*, 2004). Se ha sugerido que *ALF4* está involucrada en mantener al periciclo en un estado mitóticamente competente, necesario para la iniciación de las RLs (Di Donato *et al.*, 2004). Por otro lado, en la mutante *solitary root 1* (*slr1*), que es una mutante dominante negativa en el gen *SLR/IAA14*, la iniciación de las RLs está bloqueada y no se restaura por aplicación de auxina exógena. Por lo tanto, las RLs no se forman en esta mutante (Fukaki *et al.*, 2002; 2005; Vanneste *et al.*, 2005). La doble mutante *arf7arf19* fenocopia a *slr1* (Okushima *et al.*, 2005) y se ha observado que *IAA14* interacciona con *ARF7* y *ARF19*, indicando que la auxina estimula la iniciación de las RLs a través del módulo de señalización de auxina *SLR/IAA14-ARF7-ARF19* (Fukaki *et al.*, 2005; Vernoux *et al.* 2011). *ACR4* (*ARABIDOPSIS CRINKLY*

4) es otro gen importante para el desarrollo de las RLs, que codifica para un receptor tipo cinasa, involucrado en promover las divisiones celulares formativas en el periciclo y en restringir estas divisiones en células vecinas cuando la organogénesis se ha iniciado (De Smet *et al.*, 2008). El gen *PUCHI*, codifica para un factor de transcripción que pertenece a la familia AP2/EREBP y está involucrado en coordinar los patrones de división celular durante la morfogénesis del primordio de raíz lateral (Hirota *et al.*, 2007).

Por otro lado, el gen *GATA23*, que también codifica para un factor de transcripción, está relacionado con la especificación de la célula fundadora que da lugar a la formación del primordio de raíz lateral. Este factor es regulado por un módulo de señalización de auxina dependiente del represor AUX/IAA28 (De Rybel *et al.*, 2010). Otro gen identificado es *SKP2B* (*S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN2B*) el cual codifica para una proteína con caja F, que regula la formación de las raíces laterales por reprimir las divisiones en las células fundadoras. El promotor de *SKP2B* es regulado por acetilación de la histona 3 en una manera dependiente de IAA14 y de auxina, reforzando la idea de que la epigenética es un mecanismo regulatorio importante durante la formación de la raíz lateral (Manzano *et al.*, 2012).

## **2.5 La remodelación de la cromatina, la modificación postraduccional de histonas y algunos factores epigenéticos involucrados en el desarrollo de la raíz.**

La estructura de la cromatina es dinámica y responde a muchos estímulos que regulan el acceso al DNA y la modificación química de las histonas es uno de los mecanismos más importantes por los cuales la célula modula la estructura de la cromatina (Struhl y Segal, 2013; Zentner y Henikoff, 2013). Estudios en plantas y animales han revelado que el epigenoma contribuye a la función e identidad de las células (Pikaard y Mittelsten, 2014; Moris *et al.*, 2016). Se considera al epigenoma como los estados alternativos de la cromatina que impactan en la actividad genética pero que no están acompañados por alteraciones en la secuencia de nucleótidos y que pueden ser heredados a las células hijas (Xiao *et al.*, 2017). Las modificaciones de la cromatina y la epigenética juegan papeles muy importantes en muchos procesos de las plantas, incluyendo la regulación del desarrollo y las respuestas a estímulos ambientales (Eichten *et al.*, 2014; Takatsuka y Umeda, 2015; Xiao *et al.*, 2017). De esta manera, la modificación covalente de las histonas, el posicionamiento de los nucleosomas, la metilación del DNA, la incorporación de variantes de histonas y otros factores como enzimas remodeladoras de la cromatina o pequeños RNAs, son componentes importantes de las adaptaciones de las plantas que les permiten ajustar la expresión génica para contender con

cambios en el ambiente y durante su desarrollo (Goodrich y Tweedie, 2002; Lämke y Bäurle, 2017; Xiao *et al.*, 2017).

El nucleosoma es la unidad estructural de la cromatina y está conformado de un octámero de histonas (dos copias de cada una: H2A, H2B, H3 y H4), alrededor del cual se enrollan 147 pb de DNA. La histona H1 se une al "DNA linker", que es el DNA que se encuentra entre un nucleosoma y otro. Esta histona juega un papel crucial en la compactación de la cromatina (Xiao *et al.*, 2016, Vergara y Gutierrez, 2017).

Los aminoácidos del "core", así como los aminoácidos que sobresalen de los nucleosomas en el extremo N-terminal de las histonas, están sujetos a diferentes combinaciones de modificaciones como metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación. El tipo y grado de estas modificaciones afectan la configuración de la cromatina por crear conformaciones abiertas o cerradas que activan o reprimen la transcripción de genes respectivamente (Alvarez-Venegas, 2010). Entre los varios tipos de modificación de las histonas la metilación y la acetilación de la histona 3 y de la histona 4 son las mejor caracterizadas en plantas. Las trimetilaciones en H3K93, H3K27 y H4K20 son consideradas marcas de represión para la estructura de la cromatina, mientras que las metilaciones en H3K4 y H3K36 son clasificadas como marcas de activación (Alvarez-Venegas, 2010; Takatsuka y Umeda, 2015). Los reguladores de la estructura de la cromatina caen hacia dos clases generales: los que actúan globalmente sobre grandes regiones del cromosoma que contienen varias kilobases de DNA y los que actúan localmente que afectan un pequeño número de nucleosomas y menos de una kilobase de DNA en una región promotora dada (Wagner, 2003).

Las proteínas de los grupos Trithorax (TrxG) y Polycomb (PcG) son reguladores críticos de numerosos genes de desarrollo tanto de animales como de plantas. Para activar o silenciar la expresión de genes respectivamente, las proteínas TrxG y PcG dirigen la modificación postraducciona de las histonas. En *Drosophila melanogaster*, las proteínas del grupo PcG mantienen un estado reprimido de la expresión del "cluster" de genes homeóticos HOX, mientras que las proteínas del grupo TrxG mantienen el estado activo de estos genes (Schuettengruber *et al.*, 2007, 2011). En animales, el grupo PcG cataliza la trimetilación de H3K27 (Polycomb Repressive Complex 2, PRC2) y la ubiquitinación de H2AK118/119 (Polycomb Repressive Complex 1, PRC1), mientras que el grupo TrxG cataliza la trimetilación de H3K4 y H3K36 (Schuettengruber *et al.*, 2011). En plantas la actividad de metiltransferasa de H3K27 de PRC2 está conservada y aunque el PRC1 está menos caracterizado existe evidencia que muestra actividad de ubiquitinación (Wang *et al.*, 2004). Sin

embargo, la actividad de ubiquitinación no se requiere para el mantenimiento de la represión en *Drosophila melanogaster* (Pengelly *et al.*, 2015).

Se conocen varios remodeladores de la cromatina que están involucrados en el desarrollo de la raíz en *Arabidopsis*. Uno de ellos es el factor *CAF-1* (*CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR-1*), que está implicado en la deposición de histonas en el DNA recientemente replicado y mutaciones en dos de sus subunidades, *FASCIATA1* y *FASCIATA2*, causan desorganización en el RAM (no se mantienen las divisiones celulares estereotípicas), jugando así un papel crítico en la organización y mantenimiento del RAM (Kaya *et al.*, 2001). Por otro lado, *NRP1* (*NAP1-RELATED PROTEIN1*) y *NRP2* (*NAP1-RELATED PROTEIN2*), codifican para miembros de la familia de proteínas NAP1 (*NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN1*), que se requieren para el mantenimiento de la organización y la proliferación celular en el RAM (Zhu *et al.*, 2006). El factor epigenético BRM (*BRAHMA*) es un remodelador de la cromatina dependiente de ATP. Las mutaciones en *BRM* afectan el nicho de células troncales y el crecimiento de la raíz se afecta severamente (Yang *et al.*, 2015). En las mutantes *brm* la expresión de varios genes de la familia PIN se disminuye en células troncales. Como consecuencia, se altera la distribución de auxinas y esto a su vez afecta la expresión de los factores de transcripción PLETHORA que son importantes para el mantenimiento del nicho de células troncales (Yang *et al.*, 2015; Galinha *et al.*, 2007). Otro factor de remodelación de la cromatina es PKL (*PICKLE*) que junto con la proteína CLF (*CURLY LEAF*) del complejo PRC2, determinan la actividad del meristemo de la raíz actuando antagónicamente (Aichinger *et al.*, 2011). La pérdida de función de CLF incrementa la actividad meristemática y esto resulta en una zona meristemática mayor y raíces más grandes, mientras que, en la mutante *pkl* los niveles de H3K27me3 están incrementados sustancialmente. Esto sugiere la interacción antagónica entre PRC2 y PKL que resulta importante para determinar la zonación de la raíz (Aichinger *et al.*, 2011; Takatsuka y Umeda, 2015). Se ha descrito que la metiltransferasa de histona SDG2 que pertenece al grupo de las proteínas Trithorax de *Arabidopsis* se requiere para el crecimiento y el desarrollo de la raíz (Yao *et al.*, 2013). La pérdida de función de SDG2 resulta en una reducción drástica en los niveles de H3K4me3 en el nicho de células troncales en la raíz y afecta la longitud de la raíz primaria y el número de raíces laterales (Yao *et al.*, 2013).

## 2.6 Las proteínas Trithorax en *Arabidopsis*.

Las proteínas de la familia Trithorax contienen un dominio llamado SET (por "Suppressor of variegation, Enhancer of zeste and Trithorax") y están conservadas en plantas como en animales (Schuettengruber *et al.*, 2007; Alvarez-

Venegas, 2010). El dominio SET es el responsable de la actividad catalítica de estas enzimas. Los genes homólogos de *ATX1* son *trx* (*trithorax*), en *D. melanogaster* y *MLL1* (*MAMMALIAN MIXED-LINEAGE LEUKEMIA1*), en mamíferos. *ATX1*, *trx* y *MLL1* son miembros de una familia multigénica y comparten la secuencia que codifica para el dominio SET (Ding *et al.*, 2011a). El genoma de *A. thaliana* codifica para 49 proteínas conocidas como grupo con dominio SET (SDG; [www.chromdb.org](http://www.chromdb.org); Chen *et al.*, 2017). De éstas, 31 tienen actividad de metiltransferasa actuando en las lisinas de las histonas (HKMT) y pueden ser divididas en cinco clases (I-V), de acuerdo a la arquitectura de sus dominios. Dentro de la clase III se agrupan las proteínas que actúan específicamente sobre la lisina 4 de la histona 3 (H3K4). En esta clase se agrupan siete proteínas, cinco de ellas clasificadas como "Trithorax homolog" ATX's 1-5 y dos proteínas clasificadas como "Trithorax-Related" ATXR3 (SDG2) y ATXR7 (SDG25). Las ATX's se dividen a su vez en el grupo 1: ATX1 (SDG27), ATX2 (SDG30) y en el grupo 2: ATX3 (SDG14), ATX4 (SDG16) y ATX5 (SDG29) (Alvarez-Venegas y Avramova, 2002; Thorstensen *et al.*, 2011). El rasgo estructural que separa a estos subgrupos es la presencia del dominio DAST (de función desconocida) en el grupo 1, mientras que el grupo 2 carece de éste pero llevan un dominio "PHD finger" adicional (Avramova, 2009).

Recientemente se ha publicado que la interrupción de los tres genes *ATX3*, *ATX4* y *ATX5* causa una reducción notable en los niveles de las marcas H3K4me2 y H3K4me3 a nivel genoma y como resultado de la reducción en los niveles de estas marcas miles de genes se expresan ectópicamente (Chen *et al.*, 2017). El fenotipo de la triple mutante *atx3 atx4 atx5* presenta un crecimiento retardado severo de los estados vegetativo al reproductivo, lo que resultó en plantas enanas con hojas de la roseta muy pequeñas. Una observación muy interesante de este trabajo es que cuando se cruzó a la triple mutante *atx3 atx4atx5* con la mutante *atx2* para obtener la cuádruple mutante se observaron fenotipos exacerbados en el desarrollo de las plantas, pero esto no sucedió cuando se cruzó a la triple mutante *atx3 atx4 atx5* con la mutante *atx1-1*. Esto sugiere que *ATX3*, *ATX4* y *ATX5* tienen funciones redundantes con *ATX1* y no así con *ATX2* (Chen *et al.*, 2017).

La proteína más estudiada de la clase III es sin duda *ATX1*, que se ha demostrado trimetila a la lisina4 de H3 (Saleh *et al.*, 2008) y se requiere para el desarrollo de órganos florales (Alvarez-Venegas *et al.*, 2003) y para la regulación transcripcional de varios genes de respuesta a estrés (Ding *et al.*, 2011a, 2011b). El gen *ATX1* regula muchas funciones en *Arabidopsis* además de los genes homeóticos involucrados en desarrollo floral. Los análisis de los perfiles de expresión a nivel del transcriptoma han demostrado que la pérdida de función de *ATX1* ocasiona un fuerte cambio en la expresión de ~1,700 genes. Cabe

mencionar que para este análisis se utilizaron plantas completas de la mutante *atx1-1* al inicio de la floración. El cambio en la expresión de todos estos genes sugiere múltiples funciones para ATX1 (Alvarez-Venegas *et al.*, 2006).

### 3. Antecedentes

El interés del grupo es el estudio de la biología del desarrollo de la raíz y una de las herramientas que se utiliza es la caracterización de mutantes afectadas en este proceso. Desde hace algún tiempo se ha estudiado en el laboratorio a la mutante *atx1-1*. El gen afectado en esta mutante, codifica para una metiltransferasa de la histona3 (H3) en la lisina4 (K4) que regula el desarrollo de los órganos florales y funciona como un activador de los genes homeóticos (Alvarez-Venegas *et al.*, 2003). El análisis preliminar del fenotipo de la raíz en la mutante *atx1-1* indicó una clara afectación a nivel del desarrollo de la raíz primaria y las raíces laterales. También se ha estudiado a la versión mutante *setm* de *ATX1*, que fue obtenida por mutagénesis dirigida y posteriormente introducida al fondo genético de la mutante nula *atx1-1* generando la línea transgénica *atx1::ATX1-set* que de aquí en adelante se llamará mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* (Ding *et al.*, 2012). La versión mutante *setm* contiene cinco sustituciones de tirosinas por alaninas en el sitio catalítico SET, lo que permite el plegamiento de la proteína como en el tipo silvestre sin tener actividad catalítica (Figura 5; Ding *et al.*, 2012).

Lo que se ha propuesto como mecanismo de acción, es que ATX1 influencia la transcripción de los genes a los que regula, desempeñando dos funciones distintas. En los promotores de estos genes, ATX1 se requiere para el reclutamiento de la proteína de unión a la caja TATA (TBP, por sus siglas en inglés) y de la RNA polimerasa II (figura 5A). Después ATX1 es reclutada por la forma fosforilada de la RNA polimerasa II en la región +300 pb de la secuencia del gen que se está transcribiendo en donde ATX1 trimetila a H3K4 en los nucleosomas, por lo que, la actividad de ATX1 regula procesos de elongación más que de iniciación de la transcripción (Figura 5B; Ding *et al.*, 2011a; 2012).

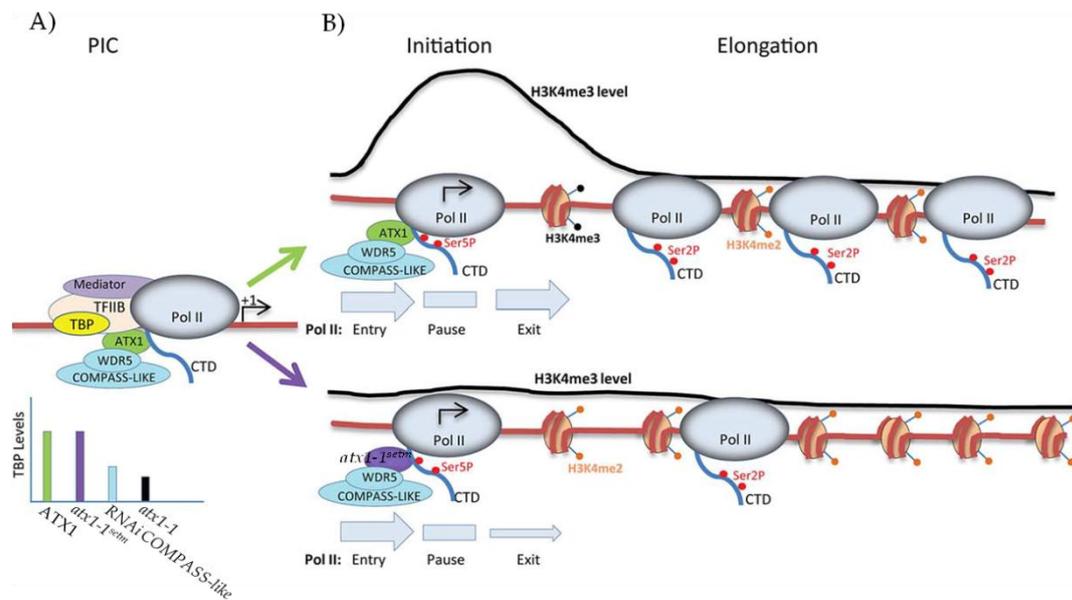


Figura 5. Modelo del modo de acción de ATX1 y la H3K4me3 durante la transcripción. A) La gráfica de barras muestra los templados relativos a los niveles de la proteína TBP en el tipo silvestre (ATX1, en verde), en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* (en violeta), en la mutante por RNAi de COMPASS-like (Arabidopsis Complex Proteins Associated with Set, en azul) y en la mutante *atx1-1* (en negro). En el panel superior, se muestra el complejo de preiniciación (PIC) y las proteínas involucradas en el complejo. B) La transición entre el inicio de la transcripción y la pausa en el promotor (rectángulo gris) ocurren con eficiencias similares en los complejos donde está la ATX1 silvestre (panel superior) y donde está la ATX1 mutada (*atx1-1<sup>setm</sup>*, panel inferior). La proteína ATX1 silvestre produce niveles normales de H3K4me3, pero estos niveles se ven abatidos en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* (línea negra por encima de los templados donde se muestra el perfil de H3K4me3). Los niveles de H3K4me3 afectan la tasa de salida hacia la transcripción de la RNA Pol II a partir de la pausa en el promotor (ver tamaño de la flecha que indica la salida, abajo de los templados), con una tasa de salida superior para el templado del tipo silvestre. Estas diferencias en la tasa de salida hacia la transcripción, favorecen el aumento de los complejos RNA Pol II Ser2P activos en la elongación de la transcripción cuando está la ATX1 de tipo silvestre lo que no ocurre cuando está la ATX1 mutada (modificado de Ding *et al.*, 2012).

En cuanto a la fisiología de las plantas, se sabe que ATX1 es importante en la señalización por estrés hídrico a través de vías dependientes e independientes del ácido abscísico (ABA). En particular ATX1 regula directamente la transcripción de *NCED3* (*9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa*) cuyo producto es una enzima clave que controla la producción de ABA (Ding *et al.*, 2011b). ATX1 se requiere para la activación de *NCED3* y para la trimetilación de H3K4 en los nucleosomas donde se localiza *NCED3*, lo que ocurre durante el estrés hídrico (Ding *et al.*, 2011b).

También se ha determinado que ATX1 puede unir específicamente al lípido mensajero fosfatidil inositol 5 fosfato (PIP5) a través del motivo "PHD finger". La unión de ATX1 a PIP5, permite que ATX1 se relocalice en el citoplasma, sugiriendo que la localización nuclear de ATX1 puede depender de factores que afectan la concentración de PIP5 (Alvarez-Venegas *et al.*, 2006).

Se cuenta con toda esta información sobre *ATX1*, pero hasta este trabajo no existía ningún reporte de la importancia que pudiera tener este gen en el

desarrollo de la raíz. Para tratar de entender el papel del gen *ATX1* en los procesos que involucran el desarrollo del sistema radical, se abordaron la caracterización detallada a nivel celular del fenotipo de la raíz en las mutantes *atx1-1* y *atx1-1<sup>setm</sup>* y el análisis de la expresión génica global en las raíces de la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*.

#### 4. Hipótesis

La función de *ATX1* regula la expresión de genes importantes para la organización y actividad del meristemo apical de la raíz primaria, así como genes importantes para la morfogénesis de la raíz lateral en *Arabidopsis thaliana*.

#### 5. Objetivo general:

Establecer el papel de gen *ATX1* en el desarrollo del sistema radical e identificar a otros genes candidatos importantes para el desarrollo de la raíz por análisis transcriptómico de la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*.

#### 6. Objetivos particulares:

1. Caracterizar el fenotipo de la raíz primaria a nivel celular en la mutante *atx1-1* de *Arabidopsis thaliana*.
  - a) Analizar la dinámica de crecimiento y la actividad proliferativa del meristemo apical de la raíz primaria (RAM), evaluando la duración del ciclo celular y otros parámetros cuantitativos a nivel celular.
  - b) Analizar la formación del patrón en la raíz primaria (RP), utilizando diferentes marcadores de identidad celular.
2. Caracterizar el fenotipo de la raíz lateral en la mutante *atx1-1*.
  - a) Analizar la densidad de los primordios de raíz lateral (PRLs) y de las raíces laterales (RLs) en las zonas de ramificación y de formación de RLs.
  - b) Analizar los patrones de división celular y el porcentaje de PRLs con anomalías en su desarrollo.
  - c) Analizar el porcentaje de asimetría de los PRLs en las etapas V-VII del desarrollo.
  - d) Analizar la expresión del marcador del centro quiescente, *pWOX5::GFP* y del marcador de respuesta a auxina *DR5rev::GFP* en el fondo genético de la mutante *atx1-1*.
3. Caracterizar el fenotipo de la raíz en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*.
  - a) Analizar la dinámica de crecimiento de la raíz primaria.
  - b) Analizar la densidad de los PRLs y RLs en las zonas de ramificación y de formación de RLs.

- c) Analizar el porcentaje de los PRLs y RLs con anomalías en su desarrollo.
4. Estudiar los cambios de la expresión génica, en la raíz de la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*, mediante el análisis del transcriptoma e identificar a otros genes candidatos involucrados en el desarrollo de la raíz.

## 7. Materiales y Métodos.

### 7.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este estudio fueron del ecotipo silvestre Wassilewskija (Ws), incluyendo a las mutante *atx1-1* (Alvarez-Venegas *et al.*, 2003) y *atx1-1* con el transgen *setm* (Ding *et al.*, 2012). Además, se utilizaron las líneas transgénicas marcadoras *pWOX5::GFP* (Sarkar *et al.*, 2007), *pSCR::GFP* (Heidstra *et al.*, 2004), *DR5rev::GFP* (Friml *et al.*, 2003) y *Cyclin B1;1DB::GUS* (Colón-Carmona *et al.*, 1999) que ya han sido descritas.

Las semillas se esterilizaron con cloro comercial 20% (hipoclorito de sodio 6%) y Tritón X-100 al 0.08% por 10 minutos y se hicieron 4 lavados con agua destilada estéril. Se dejaron estratificando a 4 °C durante 48 horas.

Las semillas se sembraron en medio de cultivo MS 0.2X (Murashige y Skoog, 1962) preparado a partir de Linsmaier y Skoog (LS, L477; Phyto Technology), a pH 5.7, adicionado con vitaminas (0.1 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, de Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 1% de sacarosa y 0.8% de agar (Bacto-Agar, Difco Laboratories). Las cajas Petri cuadradas en las cuales se sembraron las semillas se mantuvieron en una posición vertical en una cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 21° C, intensidad luminosa de 105 µE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

### 7.2 Técnicas de Microscopía.

Las raíces fueron aclaradas usando el método de metanol acidificado (Malamy y Benfey, 1997), con algunas modificaciones (Dubrovsky *et al.*, 2006). Las preparaciones fueron analizadas en el microscopio Zeiss Axiovert 200M (Oberkochen, Germany), equipado con óptica de Nomarski. En la tinción histoquímica para ver actividad de β-glucuronidasa (GUS) las raíces fueron prefijadas en formaldehído al 0.3% por 20 min a temperatura ambiente, lavadas en buffer de fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4 y teñidos como se describe en Hemerly *et al.*, (1993). Para la tinción de pseudo-Schiff, las raíces se fijaron en metanol al 50% y ácido acético al 10%, a 4°C por 5 horas y la tinción se llevó a cabo como se describe en Truernit *et al.*, (2008). Después de la tinción las muestras se montaron en solución de aclaración y montaje preparada en base de yoduro de sodio (Dubrovsky *et al.*, 2009). Para los análisis por microscopía de barrido de láser confocal se utilizó el microscopio Zeiss LSM 510

Meta (Oberkochen, Germany) y raíces vivas teñidas con 1 ó 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich).

### 7.3 Análisis de varios parámetros del crecimiento de la raíz.

La posición de la punta de la raíz de plantas cultivadas verticalmente en las cajas de Petri, se marcó cada 24 horas y al final del experimento se escanearon las cajas para medir el incremento diario usando el programa ImageJ. En las raíces aclaradas se determinaron los parámetros de densidad de RLs y de PRLs, la longitud de células del córtex completamente elongadas, el índice de iniciación de RLs, la longitud del RAM, del dominio de proliferación (PD) y del dominio de transición (TD), como se describe en Dubrovsky *et al.* (2009), Dubrovsky y Forde, (2012) e Ivanov y Dubrovsky, (2013). Los criterios para definir el PD y el TD se han descrito en Ivanov y Dubrovsky (2013) y López-Bucio *et al.* (2014). Todos los parámetros fueron evaluados para raíces individuales. La tasa de producción celular mide la duración del ciclo de división celular. Este método está basado en el crecimiento constante de la raíz, e implica que el número de células que se producen en la raíz por unidad de tiempo, es igual al número de células que pasan a la zona de elongación, e igual al número de células que se elongan completamente. Este método asume que todas las células meristemáticas tienen un mismo tiempo de ciclo celular y que todas proliferan, que el número de células en el meristemo es constante y de manera importante que el flujo de células dentro y fuera de la zona de elongación es el mismo (Ivanov y Dubrovsky, 1997). Utilizando este método se calculó la tasa de producción celular con base en la tasa de crecimiento de la raíz y la longitud de las células del córtex completamente elongadas. La duración del ciclo celular se evaluó con base en la producción celular y el número de células en el dominio de proliferación, como se describe en Ivanov y Dubrovsky (1997). Se estimó el número de células desplazadas desde el dominio de proliferación en un período de tiempo de 24 horas, a partir de la ecuación  $N_{\text{transit}} = (24 \ln 2 N_{\text{PD}}) T^{-1}$  (Ivanov y Dubrovsky, 1997). Donde  $N_{\text{PD}}$ , es el número de células en el dominio de proliferación celular del RAM y  $T$  es el promedio de la duración del ciclo celular (h).

### 7.4 Tiempo de formación de las raíces laterales.

Este parámetro se refiere al período de tiempo que transcurre desde la iniciación del primordio hasta la emergencia de la raíz lateral. Se estima basado en el método que se describe en Ivanov *et al.* (1998), que permite valoraciones a partir de la tasa de crecimiento de la raíz y la longitud de la zona de formación de RLs y asume que la distancia promedio de la punta de la raíz al sitio del primer PRL no cambia con el tiempo. La longitud de la zona de formación de

RLs comprende la región de la raíz que va del PRL más distal a la RL más distal (Dubrovsky y Forde, 2012), (ver parte inferior de la Figura 8C).

#### 7.5 Análisis de la simetría del primordio de la raíz lateral.

El porcentaje de asimetría de los PRLs se estimó sólo para primordios en las etapas V-VII del desarrollo en la mutante *atx1-1*. Sobre las imágenes, se midió la longitud de la base del primordio, incluyendo sólo células del periciclo que se dividieron periclinalmente. Después se trazó una línea perpendicular desde el punto más alto del primordio a la base, lo que se llamó eje longitudinal y una línea horizontal a la mitad de la altura de este eje. A partir del centro del eje longitudinal, se midió cada lado del primordio, lo que se llamó radio 1 y radio 2. Si la longitud de los radios era igual, se consideró un primordio simétrico (asimetría=0), si la longitud de los radios no era igual entonces se establecía un radio largo (*rl*) y un radio corto (*rs*). El porcentaje de asimetría para cada primordio se estimó utilizando la siguiente ecuación:

$$A = \frac{rl - rs}{rl + rs} \cdot 100$$

donde *rl* es la longitud del radio más largo y *rs* es la longitud del radio más corto. Se calculó la asimetría promedio para los primordios del tipo silvestre y de la mutante *atx1-1*.

#### 7.6 Análisis del "RNA-seq" y de RT-qPCR.

Se extrajo RNA total usando el reactivo TRIzol (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a partir de raíces de plantas silvestres *Ws* y *atx1-1<sup>setm</sup>* de 14 días de edad. La preparación de las librerías y la secuenciación de 50 ciclos se realizó en plataforma Illumina HiSeq™ 2000, en BGI-Tech, Hong Kong. Se secuenciaron dos muestras independientes de RNA, de cada genotipo. Se analizó la calidad de las secuencias y las lecturas se mapearon al genoma de referencia *Arabidopsis* (TAIR10). Se realizó el análisis de Detección Empírica de la Expresión Diferencial (EDGE), en el cual se comparó el nivel de expresión de cada transcrito entre el tipo silvestre y la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*, donde se asigna un valor de probabilidad de expresión diferencial al considerar la variabilidad de cada muestra. Para el análisis de la expresión diferencial se utilizaron los parámetros "Fold change"  $\geq 2$ , FDR (False Discovery Rate), "p-value"  $\leq 0.01$ FDR. Para todos estos análisis se utilizó el programa CLC Genomics Workbench v 7.5 (CLC GW, CLCbio, Qiagen, Hilden, Germany; <http://www.clcbio.com/>), (Mortazavi *et al.*, 2008). La validación de los datos del transcriptoma se realizó por análisis de la expresión de 6 genes mediante RT-PCR cuantitativo. Los genes seleccionados fueron *GOLVEN9* (5'-CGAGGCGGTTTCGAGAAATGG-3' y 5'-CATCAGACGATCAACCTCTTCC), *RELATED TO AP2 11* (5'-GGATGTGGCTCGGAACCTTTG-3' y 5'-

GCTGCTTCATGCTCTGCTTCTGG-3'), *COBRA LIKE9* (5'-CCTGTGCCTACTCTTCAAAGCAA-3' y 5'-GTCAAGTCTCCGGGTTGTCG-3'), *SIAMESE RELATED7* (5'-GCCAAAACATCGATTCCGGGCTTC-3' y 5'-TCGCCGTGGGAGTGATACAAAT-3'), *NITRATE TRANSPORTER2* (5'-AACAAAGGGCTAACGTGGATG-3' y 5'-CTGCTTCTCCTGCTCATTC-3') y *SIAMESE RELATED5* (5'-AAACTACGACGACGGAGATACG-3' y 5'-GCTACCACCGAGAAGAACAAGT-3'). Los datos fueron normalizados para el nivel de expresión de dos genes de referencia *UBIQUITIN10* (AT4G05320) y *ELONGATION FACTOR 1 alfa* (AT5G60390) (Czechowski *et al.*, 2005), de acuerdo a Vandesompele *et al.*, (2002). Se realizaron tres réplicas biológicas con dos réplicas técnicas para cada una.

## 8. Resultados Publicados y Discusión.

### 8.1 *ATX1* es importante para el crecimiento de la raíz primaria y para la producción celular en el meristemo apical de la raíz.

La arquitectura del sistema radical está claramente afectada en la mutante *atx1-1* (Figura 6A) lo que se observa muy bien 15 días después de la germinación (ddg). A través del análisis de dinámica de crecimiento se observó que la longitud de la RP de *atx1-1* fue 40% menor que la longitud de la raíz del tipo silvestre a 8 ddg (Figura 6B). Otro resultado interesante fue que la longitud del dominio de transición (que es la zona del RAM en dirección al brote, donde la probabilidad de que ocurran divisiones celulares es más baja) no cambió entre *Ws* y *atx1-1*, mientras que la longitud del dominio de proliferación y el número de células en esta zona fue 51% menor en la mutante versus el tipo silvestre (Figura 6C). Para una mejor comprensión de estos datos, se evaluaron algunos parámetros cuantitativos con respecto a la actividad del RAM (Tabla 1), entre ellos la tasa de producción celular. Este análisis mostró que la mutante produce dos veces menos células por unidad de tiempo que el tipo silvestre, mientras que la longitud de las células del córtex completamente elongadas en la mutante no se afectó con respecto a la del tipo silvestre (Tabla 1). La duración del ciclo celular aumentó en *atx1-1* (Tabla 1) lo que correlacionó con la disminución de la tasa de producción celular. Para corroborar estos datos, se analizó el patrón de expresión del marcador *CycB1;1<sub>DB</sub>::GUS* en el fondo genético de *atx1-1*. Este marcador se expresa de la fase G2 a M del ciclo celular y ha sido utilizado ampliamente (Colón-Carmona *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2015). Se observó un claro decremento del número de células que mostraron actividad histoquímica de GUS en el RAM de la mutante (Figura 6D, E), validando los datos mostrados en la Tabla 1. El mantenimiento del RAM requiere de un balance muy fino entre la división celular y la transición hacia la elongación

(Ivanov y Dubrovsky, 1997; Dello Ioio *et al.*, 2008). El decremento de la longitud del RAM no indica necesariamente diferenciación celular acelerada como algunas veces se ha considerado (Dello Ioio *et al.*, 2008). Para evaluar si la transición a la elongación estaba afectada en la mutante, se determinó el número de células que transitan hacia la elongación, utilizando la ecuación  $N_{\text{transit}}=(24 \ln 2 N_{PD})T^{-1}$  (descrita en materiales y métodos), que evalúa el número de células que dejan el dominio de proliferación del RAM durante un período de 24 horas. Se observó, que en la mutante *atx1-1* el número de células que dejan el dominio de proliferación del RAM fue 2.9 veces más bajo que en el tipo silvestre (Tabla 1).

Todos estos resultados evidencian la importancia de *ATX1* para mantener el balance entre la proliferación y la elongación durante el crecimiento de la raíz primaria.

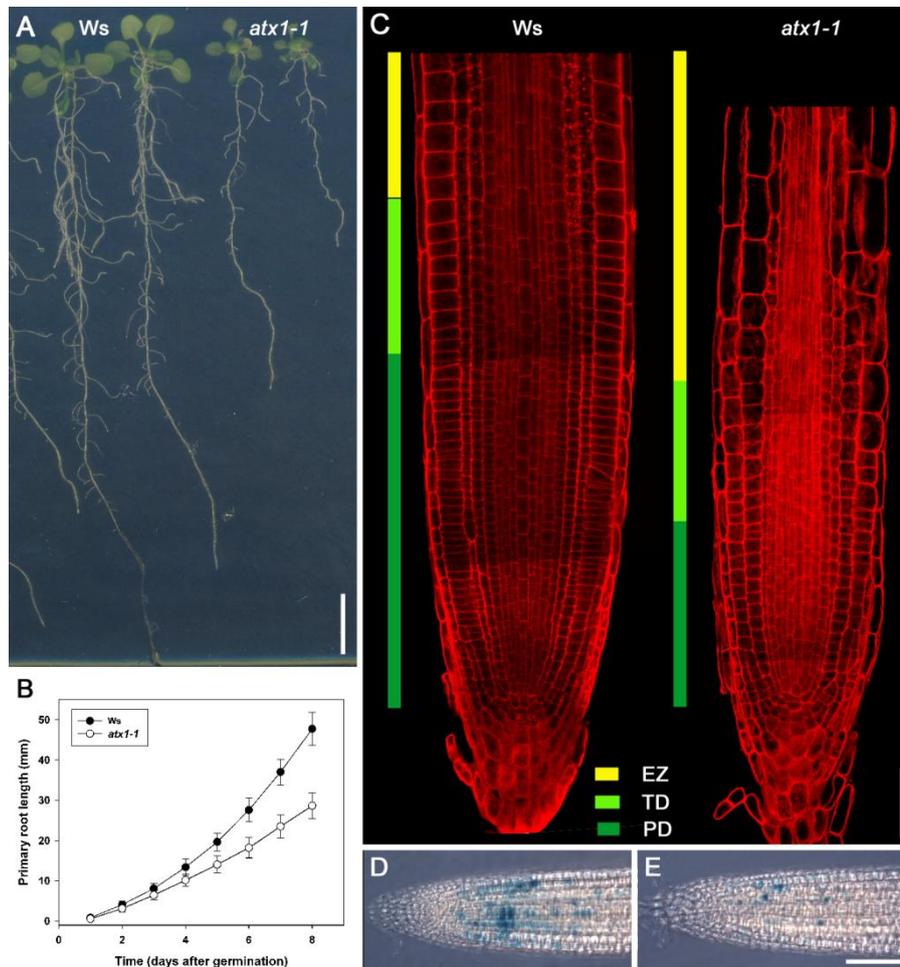


Figura 6. *ATX1* es importante para el crecimiento de la raíz primaria. A) Plantas del tipo silvestre (Ws) y *atx1-1* a 15 días después de la germinación (ddg). B) Dinámica de crecimiento de la RP de Ws y *atx1-1* a 8 ddg. Se muestran los datos del promedio  $\pm$ DE de tres experimentos independientes ( $n=27-32$ ). C) Zonas de la raíz en plano longitudinal de Ws y *atx1-1* a 8ddg. Raíces teñidas con Pseudo-Schiff analizadas por microscopía confocal. El dominio de proliferación (PD) y el de transición (TD) forman el meristemo apical de la raíz (RAM) y junto con la zona de elongación (EZ) están indicados por el código

de colores. D y E) Expresión de *CycB1;1<sub>DB</sub>::GUS* en plantas silvestres Ws (D) y *atx1-1*(E) a 8 ddg. Se muestran raíces representativas ( $n=17-20$ ). Barra de escala, 10 mm (A), 50  $\mu\text{m}$  (C), y 100  $\mu\text{m}$  (D y E).

**Tabla 1. Crecimiento de la raíz primaria de plantas del tipo silvestre (Ws) y *atx1-1* y cuadro comparativo de algunos parámetros de la actividad del RAM en estos dos genotipos.**

Genotype	Rate of root growth ( $\mu\text{m h}^{-1}$ )	Elongated cell length ( $\mu\text{m}$ )	RAM length ( $\mu\text{m}$ )	PD length ( $\mu\text{m}$ )	PD no. of cells	TD length ( $\mu\text{m}$ )	Cell production rate (cell $\text{h}^{-1}$ )	Cell cycle duration (h)	$NC_{\text{transit}}$ during 24 h
Ws	262 $\pm$ 41	169 $\pm$ 17	400 $\pm$ 133	272 $\pm$ 105	43 $\pm$ 4	128 $\pm$ 38	1.5 $\pm$ 0.2	20.8 $\pm$ 2.5	35 $\pm$ 6
<i>atx1-1</i>	91 $\pm$ 24	157 $\pm$ 13	251 $\pm$ 58	132 $\pm$ 36	21 $\pm$ 3	128 $\pm$ 28	0.6 $\pm$ 0.1	30.8 $\pm$ 7.3	12 $\pm$ 3
Statistics.	*	ND	*(NTF)	*	*	ND	*	*	*

Está indicada la longitud de células de córtex completamente elongadas. Promedio  $\pm$  DE,  $n = 12$ .

\*Significancia estadística de  $P < 0.001$  (Prueba  $t$  de Student de dos colas). Cuando la prueba de normalidad falló ("normality test failed, NTF"), se llevó a cabo la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. ND, diferencia no significativa ( $P > 0.05$ ).

## 8.2 *ATX1* es necesario para la organización y la formación del patrón del meristemo apical de la raíz primaria.

Se analizó la organización del meristemo apical de la raíz y algunos marcadores moleculares del centro quiescente (CQ) en el fondo genético de la mutante, porque se sabe que la actividad del RAM depende de la actividad del nicho de las células troncales y se habían observado algunas anomalías en el RAM de *atx1-1*. Lo que se observó en *atx1-1* fueron células del CQ más expandidas que en el tipo silvestre (comparar Figura 7A con 7B, 7C y 7D, entre la zona de los corchetes) y en dirección longitudinal hubo un claro incremento en el tamaño del CQ (Figura 7K). Se observaron divisiones oblicuas aberrantes en todos los tejidos incluyendo al cilindro provascular (Figura 7B-D, ver flechas). La célula inicial de la epidermis y la cofia lateral se divide asimétricamente para dar lugar a dos células hijas que tendrán diferente identidad (Dolan *et al.*, 1993; Baum y Rost, 1996; Wenzel y Rost, 2001; Cruz-Ramírez *et al.*, 2012). La división de tipo T, es una división formativa periclinal que ocurre en la célula inicial de la epidermis y la cofia lateral (Wenzel y Rost, 2001; Rost, 2011). Esta secuencia de eventos de divisiones proliferativas y formativas están muy bien coordinadas y distribuidas regularmente en el tipo silvestre (Baum y Rost, 1996; Wenzel y Rost, 2001) (Figura 7A). En la mutante *atx1-1*, las divisiones de tipo T están muy cercanas una de otra, lo que sugiere que se pierde la sincronía de estas divisiones, alterando la organización del RAM (Figura 7B-D). En el análisis con el marcador del mantenimiento del RAM y del patrón radial, *pSCR::GFP* (Heidstra *et al.*, 2004) no se observó ningún cambio en el patrón de expresión en el fondo genético de *atx1-1*. Sin embargo, con el marcador de identidad del CQ, *pWOX5::GFP* (Sarkar *et al.*, 2007), se observó que el dominio de expresión de este marcador se expande en el fondo

genético de la mutante *atx1-1* (Figura 7G, H) y de manera interesante esto ocurrió también en las RLs (Figura 7I, J). Todas estas irregularidades llevaron a una desorganización evidente del meristemo apical de la raíz (Figura 7) lo que sugiere una falta de coordinación entre la división y el crecimiento celular en la mutante *atx1-1*. Estos resultados muestran que *ATX1* es indispensable para la correcta organización y formación del patrón del meristemo apical de la raíz.

Es interesante que en la mutante *sdg2/atxr3* (Yao *et al.*, 2013) también se han observado irregularidades en la formación del patrón de la raíz primaria, sin embargo, *SDG2* no es capaz de suplir la función de *ATX1* ya que, en la mutante *atx1-1* se observan severos defectos en el ciclo celular (Tabla 1) y en la formación del patrón de la raíz primaria (Figura 7). Además, se sabe que *SDG2* está implicado en modificaciones de H3K4me3 a nivel global, mientras que *ATX1* sólo trimetila a la H3K4 de nucleosomas específicos. Esto implica que las diferentes metiltransferasas de histonas tienen funciones no redundantes durante el proceso de desarrollo de la raíz en *Arabidopsis*.

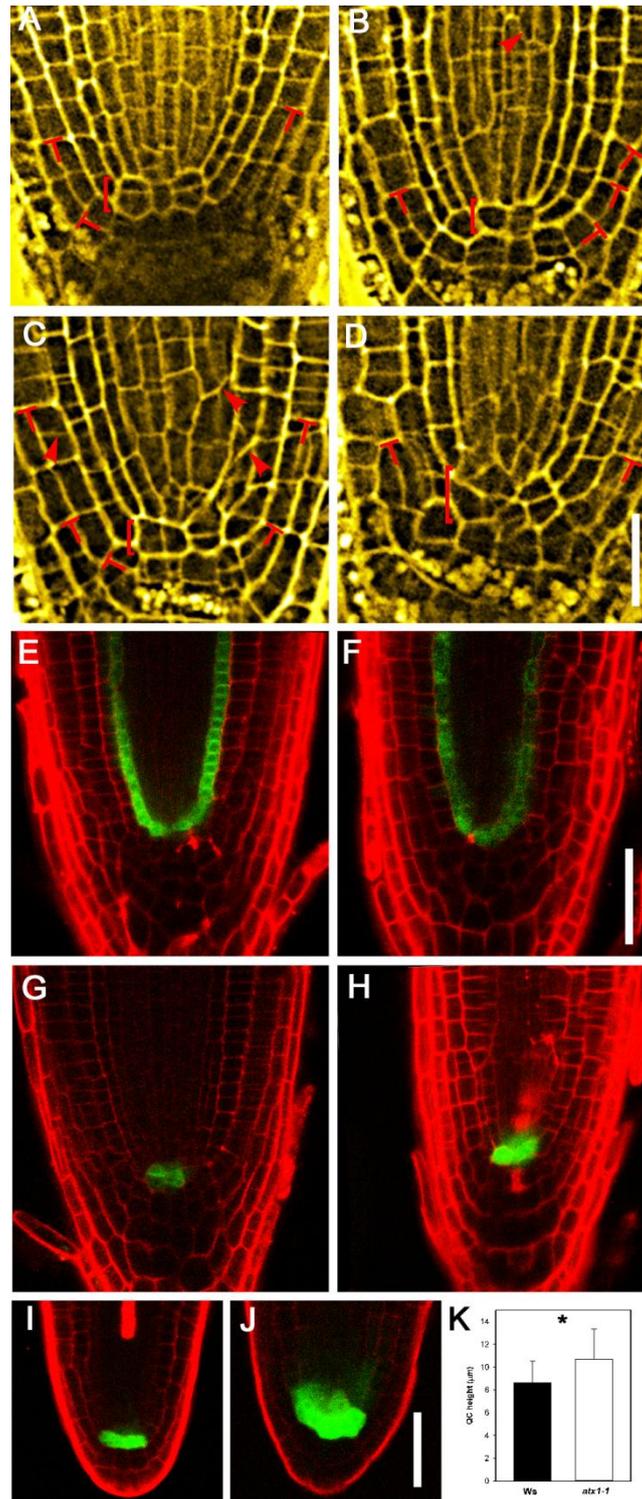


Figura 7. La formación del patrón del meristemo apical de la raíz está alterada en la mutante *atx1-1*. A-D) Organización del meristemo apical de la raíz en Ws (A) y *atx1-1* (B-D). Los corchetes indican la posición del CQ; las divisiones T están indicadas con T en rojo; las cabezas de flecha indican las divisiones oblicuas. E y F) Expresión de *pSCR::GFP* en Ws (E) y *atx1-1* (F). G-J) Expresión de *pWOX5::GFP* en Ws (G, I) y *atx1-1* (H, J) en la raíz primaria (G, H) y raíz lateral (I, J). K) Altura del CQ en Ws y *atx1-1* a 8 ddg. \* $P < 0.05$ ,  $n = 16-29$ , prueba *t* de Student; promedio  $\pm$ DE. A-D, Raíces teñidas con Pseudo-Schiff y analizadas por microscopía confocal. Las imágenes se muestran después de la aplicación de los filtros "Gaussianblur" y "Unshurpmask" para una mejor visualización. E-J, raíces teñidas con yoduro de propidio. Barra de escala, 20  $\mu$ m (A-D), 50  $\mu$ m (E-J).

### 8.3 ATX1 es importante para la emergencia de la raíz lateral porque controla el tiempo de formación de la RL y la proliferación celular.

Otra parte importante de la caracterización del fenotipo de *atx1-1* fue el análisis cuantitativo del desarrollo de las raíces laterales. Se analizó la densidad de todos los eventos de iniciación (Figura 8A), incluyendo tanto a las RLs como a los PRLs y no se encontró ningún cambio en la densidad entre *atx1-1* y el tipo silvestre. Después se analizó el índice de iniciación de RLs. Este es un parámetro que evalúa el número de eventos de iniciación por fragmento de raíz, que comprende la longitud promedio de 100 células corticales (Dubrovsky *et al.*, 2009). Con este análisis no se observó ninguna diferencia entre Ws y *atx1-1* (Figura 8B). Estos datos indicaron que a nivel de la iniciación de las RLs, la mutante *atx1-1* no estuvo afectada. Sin embargo, en la mutante *atx1-1*, el fenotipo de menor número de RLs fue muy evidente. Por esta razón, se evaluó la densidad de PRLs y RLs por zonas de la raíz. La zona de ramificación, se define como la región que va de la RL más distal a la base de la raíz primaria y la zona de formación de RLs, se define como la región que va del PRL más distal a la RL más distal (Dubrovsky y Forde, 2012) (ver parte inferior de la Figura 8C). De esta forma, cuando se analizó la densidad de las RLs en la zona de ramificación, se observó una clara diferencia entre Ws y *atx1-1* (Figura 8C, segundo par de barras) y correlacionó con el hecho de que la densidad de los PRLs en esta misma zona estaba muy aumentada en la mutante (2.1 veces más), con respecto al tipo silvestre (Figura 8C, primer par de barras), mientras que la densidad de PRLs en la zona de formación de RLs no se afectó en la mutante *atx1-1* (Figura 8C, tercer par de barras). Esto indicaba fuertemente que ATX1 estaba involucrado en el control de la emergencia, pero no en la iniciación de las RLs y que probablemente el desarrollo del primordio sería más lento en *atx1-1*. Para explorar esta posibilidad, se analizó el tiempo de formación de RLs (que comprende el período desde la iniciación del primordio hasta la emergencia de la RL). Este período de tiempo se estimó usando el método propuesto por Ivanov *et al.* (1998), que permite valoraciones a partir de la tasa de crecimiento de la raíz y la longitud de la zona de formación de RLs. Se asume que la distancia promedio desde la punta de la raíz al sitio del primer primordio no cambia con el tiempo (Ivanov *et al.*, 1998; Dubrovsky *et al.*, 2011). Se evaluó este parámetro y se estimó que en *Arabidopsis* el tiempo que tarda una RL desde su iniciación hasta la emergencia fue de 38.1 horas para el ecotipo Ws, mientras que en la mutante *atx1-1* la duración de este proceso, fue 1.7 veces mayor (Figura 9A). La formación más lenta de la RL en la mutante con respecto al tipo silvestre, puede explicar en parte el fenotipo menos ramificado de la raíz en la mutante *atx1-1*. Como la producción celular en el RAM de la raíz primaria estuvo afectada (Tabla 1) y la formación de la RL fue más lenta en *atx1-1*, era

probable que también en la RL la proliferación celular estuviera afectada. Para verificar esto, se analizó el marcador de ciclo celular *CycB1;1<sub>DB</sub>::GUS* en el fondo genético de la mutante *atx1-1*. Se encontró que en la mutante sólo el 23% de los PRLs en la zona de formación de RLs mostraron tinción positiva para la actividad histoquímica de GUS (Figura 9B) y aún los PRLs con tinción positiva para GUS mostraron muy pocas células teñidas, en comparación con los PRLs del tipo silvestre (Figura 9C-H).

Estos datos sugieren que *ATX1* controla el tiempo de formación de la RL aparentemente, por afectar la proliferación celular durante el desarrollo del primordio de raíz lateral.

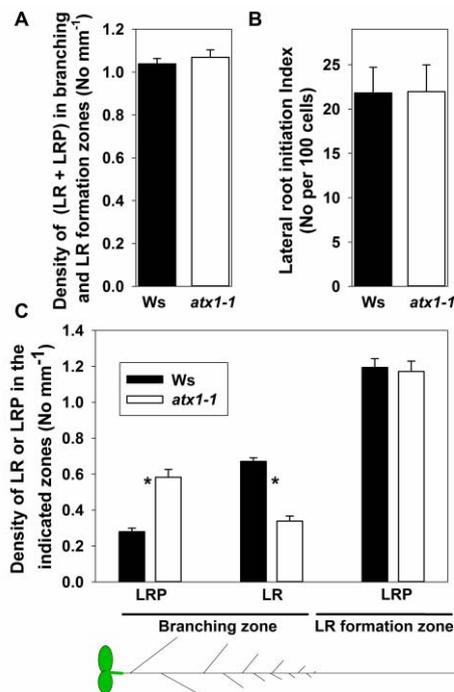


Figura 8. Análisis cuantitativo de la formación de RLs en plantas de *Ws* y *atx1-1*. A) Densidad de los eventos de iniciación de RL (incluye RLs y PRLs). B) Índice de iniciación de RL. Estos dos parámetros se estimaron tomando en cuenta las dos zonas de la raíz. C) Densidad de PRLs y RLs por zonas de la raíz primaria. Promedio  $\pm$ DE,  $n=22$ ,  $*P<0.001$ , prueba *t* de Student. En la parte inferior de la figura, se muestra un esquema de la RP de una plántula, indicando las zonas de formación de RLs y de ramificación, utilizadas para el análisis del panel C.

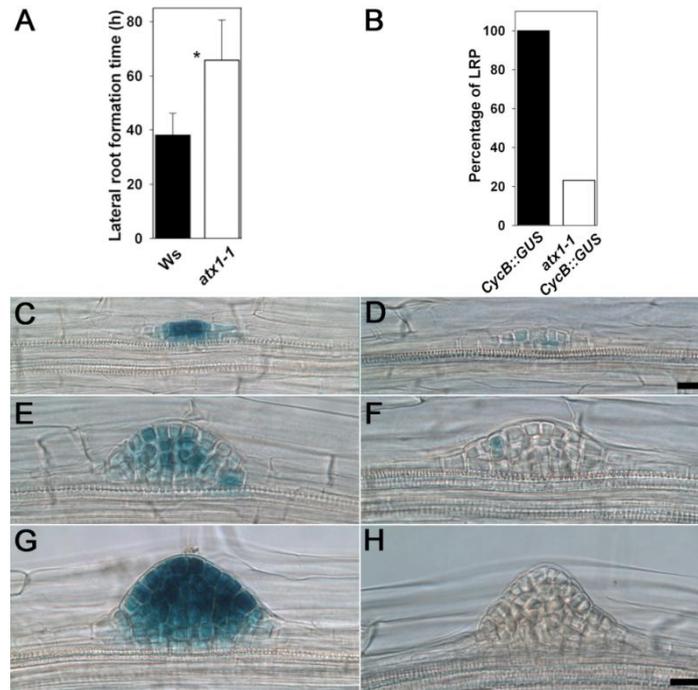


Figura 9. Tiempo de formación de la raíz lateral (RL) y proliferación celular en los primordios de raíz lateral (PRLs). A) Tiempo de formación de la RL desde la iniciación hasta la emergencia, en plantas de Ws y *atx1-1*. \* $P < 0.001$ ;  $n = 22-23$ . Promedio  $\pm$ DE. B) Porcentaje de PRLs con expresión del marcador *CycB1;1DB::GUS*; Ws,  $n = 83$  PRLs (20 plantas); *atx1-1*,  $n = 32$  PRLs (14 plantas). C, E, G) expresión de *CycB1;1DB::GUS* en PRLs de plantas Ws. D, F, H) expresión de *CycB1;1DB::GUS* en PRLs de plantas *atx1-1*. Barra de escala, 20  $\mu$ m (C-H).

#### 8.4 La función de *ATX1* es fundamental para la morfogénesis correcta del primordio de la raíz lateral.

La característica más interesante del fenotipo de esta mutante en la raíz, fue que los PRLs estuvieron fuertemente afectados en la morfogénesis. Por esta razón se realizó un análisis celular detallado de los PRLs en la mutante *atx1-1*. En el tipo silvestre, las primeras divisiones anticlinales en el periciclo normalmente dan lugar a un grupo de varias células que forman un primordio de raíz lateral (de cinco células, ver Figura 10A). En la mutante *atx1-1*, las primeras divisiones anticlinales en el periciclo dan lugar a un primordio que contiene un grupo de mayor número de células (de quince células, ver Figura 10D). Por esta razón, los primordios de la mutante están muy alargados (Figura 10K). Y esto ocurre al parecer, porque no se definen los límites del primordio. Aparentemente, en la mutante *atx1-1* algunas células se retrasan en su tiempo de división y esto contribuyen a la forma heterogénea del domo del primordio y esto parece afectar la forma final del domo (Figura 10E y F), en comparación con el tipo silvestre (Figura 10B y C). Esto sugiere que se pierde la coordinación entre las divisiones anticlinales y periclinales e incluso algunas células dejan de dividirse (Figura 10E y F, ver flechas), lo que genera un primordio asimétrico.

Estas anomalías se observaron en el 71% de todos los PRLs analizados ( $n=324$  PRLs, en 22 plantas).

Posteriormente, se analizó el porcentaje de asimetría de los PRLs en etapas V-VII del desarrollo en la mutante *atx1-1*. Para esto se midió la base del primordio, incluyendo sólo células del periciclo que se hubieran dividido periclinamente (Figura 10J). Después se trazó una línea perpendicular desde el punto más alto del primordio a la base, lo que se llamó eje longitudinal (línea verde en Figura 10J) y una línea horizontal a la mitad de la altura de este eje. A partir del centro del eje longitudinal, se midió cada lado del primordio, lo que se llamó radio 1 y radio 2. Si la longitud de los radios era igual, se consideró un primordio simétrico (asimetría=0), si la longitud de los radios no era igual entonces se establecía un radio largo ( $r_l$ ) y un radio corto ( $r_s$ ). El porcentaje de asimetría para cada primordio se estimó utilizando la siguiente ecuación:  $A = r_l - r_s (r_l + r_s)^{-1} 100$ , donde  $r_l$  es la longitud del radio más largo y  $r_s$  es la longitud del radio más corto. El porcentaje de asimetría de los PRLs fue mayor en *atx1-1*, comparado con *Ws* (Figura 10L). Otras anomalías encontradas en *atx1-1*, fueron los primordios fusionados que llegan a emerger como raíces laterales (Figura 10G-I), aunque esto se observó en un bajo porcentaje de primordios (9%). Lo interesante es que estas anomalías nunca fueron observadas en el tipo silvestre.

Estos resultados mostraron que la formación del patrón celular de los primordios en la mutante *atx1-1* está afectada tanto en estadíos tempranos como tardíos de su desarrollo y condujeron a estudiar cómo se relacionaban estas anomalías con el establecimiento del CQ durante la formación del primordio. El análisis con el marcador *pWOX5::GFP* mostró que en el tipo silvestre la expresión de este marcador está restringida a las células del CQ, mientras que, en el fondo genético de *atx1-1* un mayor número de células expresan el marcador *pWOX5::GFP* lo que se observó en los PRLs (Figura 10M) y en las RLs recién emergidas (Figura 10N). Este patrón de expresión de *pWOX5::GFP* en la mutante sugiere que las anomalías morfogénicas del primordio podrían estar relacionadas con una actividad anormal de las células madre durante el establecimiento de un nuevo RAM.

Se sabe que los gradientes de auxina son muy importantes para la actividad del RAM y la identidad del CQ (Sabatini *et al.*, 1999; Aida *et al.*, 2004; Blilou *et al.*, 2005), por esta razón se analizó el marcador *DR5rev::GFP* (Friml *et al.*, 2003), en el fondo genético de la mutante *atx1-1*. Sin embargo, no se observó ningún cambio en el patrón de expresión de *DR5rev::GFP* cuando se analizaron los primordios (Figura 10O) y las RLs recién emergidas (datos no mostrados), en la mutante *atx1-1*. También se analizó por RT-qPCR la expresión del gen de respuesta a auxina *AUX/IAA14* involucrado en la formación de la RL. Como se esperaba la abundancia del transcrito de este gen se incrementó en respuesta al

tratamiento con auxina (ácido naftalén acético, NAA, por sus siglas en inglés), sin embargo la expresión de *AUX/IAA14* no cambió entre el tipo silvestre y la mutante *atx1-1*, con o sin tratamiento con auxina (Figura 11). Esto sugiere que por lo menos, los gradientes de respuesta a auxina no están relacionados con el fenotipo de los primordios en la mutante.

Estos análisis demostraron que la función de *ATX1* es fundamental para la morfogénesis correcta del primordio de la raíz lateral y es independiente de auxina.

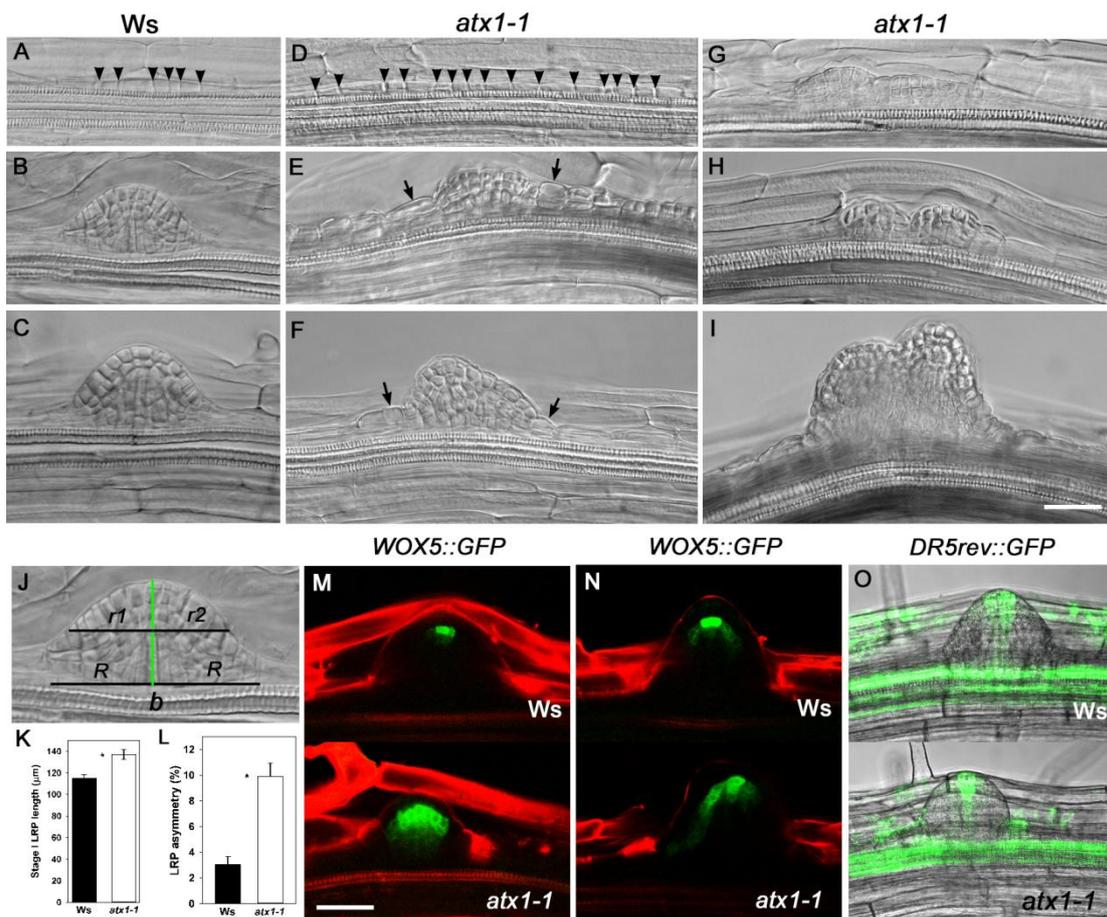


Figura 10. *ATX1* se requiere para la morfogénesis del primordio de la raíz lateral (PRL). Desarrollo del PRL en Ws (A-C) y *atx1-1* (D-I), imágenes tomadas con óptica de Nomarski. G-I) Primordios fusionados en *atx1-1*. Las cabezas de flecha indican las divisiones anticlinales en los PRLs estadio I, las flechas indican células alargadas en los bordes del primordio. J) Esquema que muestra cómo se evaluó la asimetría del primordio. Se midió la longitud de la base ( $b$ ) del primordio ya partir del centro de la base del primordio, se dibujó una línea perpendicular que se denominó eje longitudinal (línea verde). Se trazaron y midieron dos radios,  $r1$  y  $r2$ , a partir del centro de este eje longitudinal. Cuando los radios presentaron longitudes diferentes, el radio más grande fue  $r1$  y el más corto  $r2$ . El porcentaje de asimetría de cada primordio se calculó como  $r1 - r2 / (r1 + r2) \cdot 100$ . K) Longitud de PRLs en estadio I, en plantas Ws y *atx1-1*. \* $P < 0.003$ , prueba  $t$  de Student. Promedio  $\pm$ EE, Ws,  $n=91$  PRLs y *atx1-1*,  $n=79$  PRLs. L) Porcentaje de asimetría del primordio. \* $P < 0.001$ , prueba  $t$  de Student. Promedio  $\pm$ EE; Ws,  $n=25$  PRLs y *atx1-1*,  $n=39$  PRLs. M y N) Expresión de *pWOX5::GFP* en Ws y *atx1-1*, antes (M) y después (N) de la emergencia de la RL. O) Expresión de *DR5rev::GFP* en plantas de Ws y *atx1-1* de 8 ddg. Barra de escala, 10  $\mu$ m (A-I), 50  $\mu$ m (M-O).

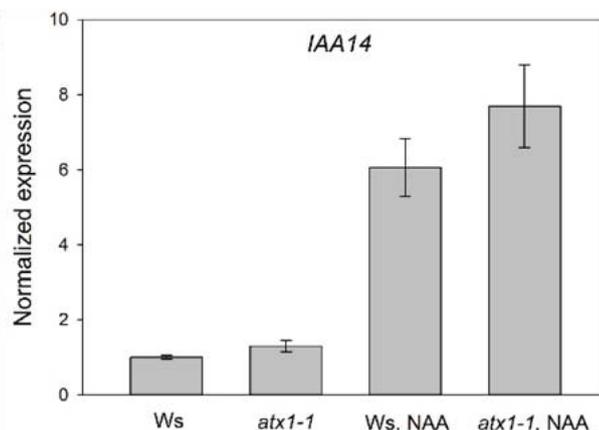


Figura 11. Análisis de la expresión del gen *IAA14* por RT-qPCR. Material colectado a partir de raíces de plantas de *Ws* y *atx1-1* de 8 ddg y plantas no tratadas o tratadas con 1  $\mu$ M de NAA por 12 horas. Los datos fueron normalizados para el nivel de expresión de dos genes de referencia, *UBQ10* y *EF1a*. Promedio  $\pm$ EE de dos experimentos independientes con tres réplicas técnicas cada uno. ( $P > 0.05$ , prueba *t* de Student).

## 9. Resultados No Publicados y Discusión.

### 9.1 El fenotipo de la raíz en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* es más fuerte que el de la mutante *atx1-1*.

Como se mencionó en los antecedentes, la versión mutante *setm* de *ATX1* se obtuvo por mutagénesis dirigida y posteriormente se introdujo al fondo genético nulo de la mutante *atx1-1* y así se generó la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*. La versión mutante *setm* de *ATX1* codifica para la proteína ATX1 con cinco sustituciones de tirosinas por alaninas en el sitio catalítico SET, lo que permite el plegamiento de la proteína como en el tipo silvestre sin tener actividad catalítica (Ding *et al.*, 2012). Se determinó que el fenotipo de estas dos mutantes, *atx1-1* y *atx1-1<sup>setm</sup>* en la parte aérea era el mismo (Ding *et al.*, 2012). Sin embargo hasta la realización de este trabajo no se había analizado el fenotipo de la raíz en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*. Por lo tanto, como un objetivo de este proyecto se realizó el estudio del fenotipo de la raíz de la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*. La dinámica de crecimiento de la RP, indicó que la RP de *atx1-1<sup>setm</sup>* crece 65% menos que la RP del tipo silvestre y 40% menos que la RP de *atx1-1* (Figura 12). Estos datos muestran que en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* se afectó más fuertemente el crecimiento de la raíz primaria.

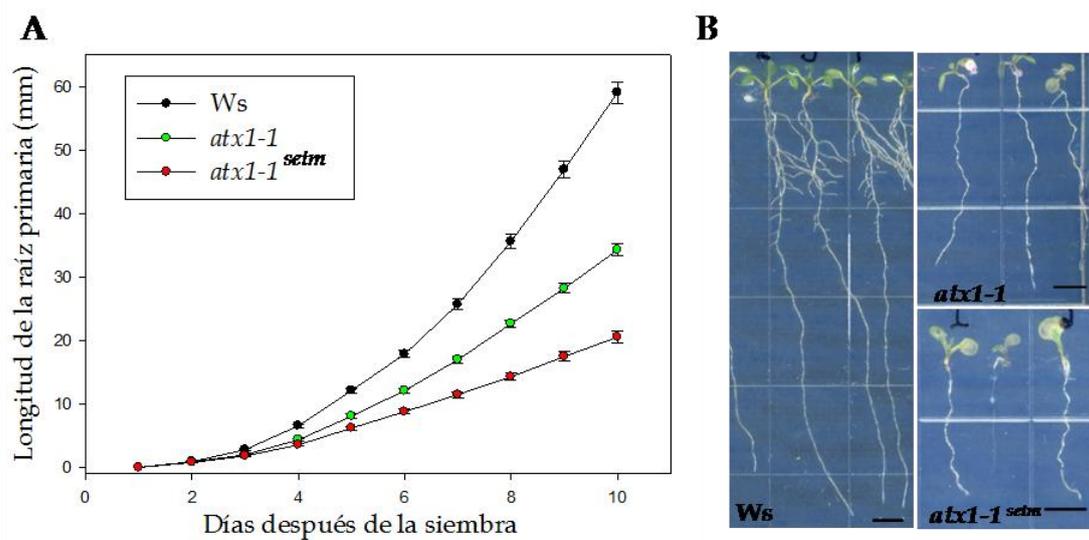


Figura 12. Crecimiento de la raíz primaria (RP). A) Dinámica de crecimiento de la RP en *Ws*, *atx1-1* y *atx1-1<sup>setm</sup>*. B) Imágenes representativas de *Ws*, *atx1-1* y *atx1-1<sup>setm</sup>*. Cada punto representa los promedios  $\pm$ EE de la longitud de la RP. Plantas de 10 días después de la siembra (dds). *Ws*,  $n=31$ ; *atx1-1*,  $n=26$ ; *atx1-1<sup>setm</sup>*,  $n=25$ . Datos de tres experimentos independientes. Barra de escala, 5 mm (B).

Durante el análisis de los PRLs y RLs, se observó que en *atx1-1<sup>setm</sup>*, 13 de 26 plantas de 10 dds (de tres experimentos independientes), no desarrollaron RLs, lo que indicó una penetrancia del 50% para este rasgo fenotípico, mientras que todas las plantas *atx1-1* desarrollaron RLs. Posteriormente, se evaluó la densidad de los PRLs y RLs en las 11 plantas de *atx1-1<sup>setm</sup>* que sí desarrollaron raíces y en las que se distinguían las zonas de ramificación y de formación de RLs (Figura 13). En este análisis se encontró que la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* se comportó igual que la mutante *atx1-1* (Figura 13). Es decir, la densidad de los PRLs en la zona de ramificación fue mayor en las mutantes con respecto al tipo silvestre y la densidad de RLs en esta misma zona, fue menor en las mutantes con respecto al tipo silvestre. Esto sugirió que también en *atx1-1<sup>setm</sup>* está afectada la emergencia y no la iniciación de las RLs como se estableció anteriormente para *atx1-1* (Napsucialy-Mendivil *et al.*, 2014). Esto se puede atribuir, a que algunos primordios que inician su desarrollo en la zona de formación de las RLs (ver esquema en la parte inferior de la Figura 13), se quedan en estado quiescente o se desarrollan más lentamente y no emergen, por lo que se observa menor densidad de RLs. La densidad de los PRLs en la zona de formación de las RLs, tiende a ser mayor en *atx1-1<sup>setm</sup>* comparado con *atx1-1* y el tipo silvestre, aunque el análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas (Figura 13).

Estos resultados evidencian un fenotipo más fuerte en *atx1-1<sup>setm</sup>* comparado con la mutante *atx1-1* y confirman la importancia del gen *ATX1* en el desarrollo de la raíz lateral.

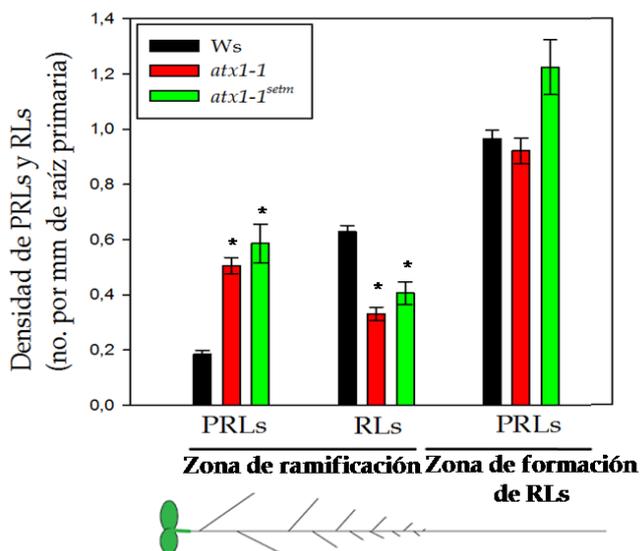


Figura 13. Análisis cuantitativo de la formación de RLs en *Ws*, *atx1-1* y *atx1-1<sup>setm</sup>*. Densidad de PRLs y RLs en *Ws*, *atx1-1* y *atx1-1<sup>setm</sup>* por zonas de la RP. Plantas de 10 dds. Se muestra el promedio  $\pm$ EE de datos de tres experimentos independientes. *Ws*,  $n=28$ ; *atx1-1*,  $n=26$ ; *atx1-1<sup>setm</sup>*,  $n=11$ . \* $P \leq 0.05$ , prueba *t* de Student. En la parte inferior de la figura, se muestra un esquema de la RP de una planta, indicando las zonas de formación de RLs y de ramificación utilizadas para el análisis.

Otro parámetro analizado, fue el porcentaje de los PRLs y RLs con anomalías morfológicas. Este análisis permitió determinar que también existen anomalías en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* en comparación con la mutante *atx1-1* y la tipo silvestre (Figura 14A). Este análisis demostró un aumento en el porcentaje de anomalías en las raíces laterales y primordios de *atx1-1<sup>setm</sup>*. La mutante *atx1-1* presentó un 45% de RLs con anomalías, comparado con el 58% observado en *atx1-1<sup>setm</sup>*. Las anomalías de las RLs se observaron en la base, donde fue mayor el área que ocupaba la base de la RL comparado con el tipo silvestre. También fue característico un crecimiento curvo de la raíz, lo que no se observó en el tipo silvestre, así como la pérdida del espaciamiento longitudinal entre una raíces contiguas (Figura 14B, comparar panel superior con el inferior). Por otro lado, el porcentaje de los PRLs con anomalías en *atx1-1* fue del 57% comparado con el 71% observado en *atx1-1<sup>setm</sup>*.

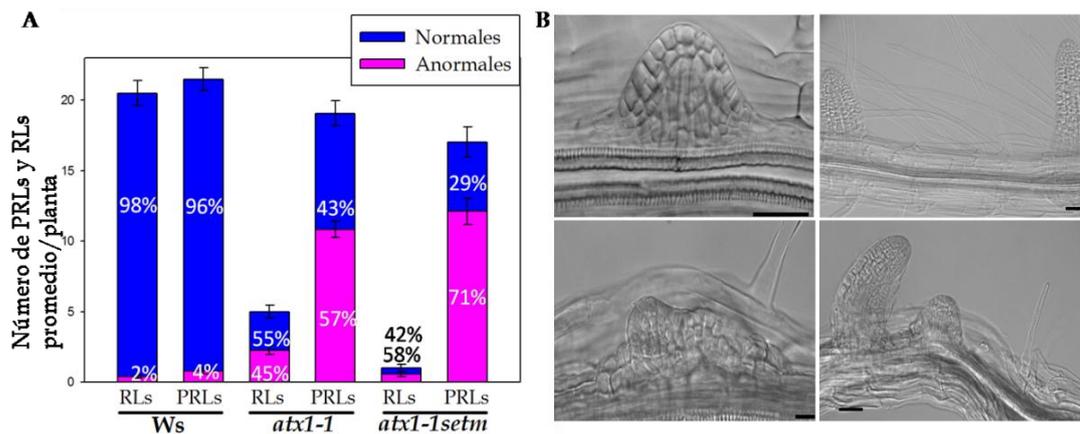


Figura 14. Anomalías de los primordios y las raíces laterales en la mutante *atx1-1setm*. A) Número y porcentaje de PRLs y RLs con anomalías en Ws, *atx1-1* y *atx1-1setm*. B) Imágenes de primordios y raíces laterales en Ws (panel superior) y en *atx1-1setm* (panel inferior). Plantas de 10 dds. Se muestra el promedio  $\pm$ EE de datos de tres experimentos independientes. Ws,  $n=28$ ; *atx1-1*,  $n=48$  y *atx1-1setm*,  $n=26$  raíces. Barra de escala, 50  $\mu$ m (B) a excepción del panel inferior izquierdo donde es de 20  $\mu$ m.

En resumen, en la mutante *atx1-1setm* se observa un fenotipo de la raíz con alteraciones más severas que en la mutante *atx1-1*. Una explicación para estas diferencias entre los fenotipos de ambas mutantes es que probablemente en *atx1-1*, otras metiltransferasas de histonas pueden suplir en cierta medida la función de ATX1, se dice en cierta medida porque existe un claro fenotipo alterado en la mutante *atx1-1*. Recientemente se publicó que las proteínas ATX3, ATX4 y ATX5 tienen funciones redundantes entre sí (Chen *et al.*, 2017) y que muchos sitios genómicos marcados por ATX3/4/5 son también blancos de ATX1 (Chen *et al.*, 2017), por lo que podrían ser éstas metiltransferasas de histonas, las que suplan la función de ATX1 en la mutante.

Sin embargo, en la mutante *atx1-1setm*, no se puede suplir la función de ATX1, porque en esta mutante la proteína está presente, se pliega correctamente y junto con toda la maquinaria de transcripción basal ocupa los promotores de los genes a los que regula ATX1. Muy probablemente esto no permite que otras metiltransferasas ocupen esos sitios. En la mutante *atx1-1setm* está presente la versión de ATX1 que no tiene actividad por lo que se baja fuertemente el nivel de trimetilación de H3K4, específicamente en los nucleosomas de los genes "blanco" de ATX1 (Ding *et al.*, 2012). Y ésta podría ser la razón por la que se observa una alteración más severa durante el desarrollo de la raíz en la mutante *atx1-1setm*.

Todos estos resultados sugieren que la actividad de metiltransferasa de histona de ATX1, así como su reclutamiento en los promotores de los genes a los que regula, es esencial para el desarrollo de la raíz primaria y las raíces laterales. Aún hace falta trabajo dirigido a dilucidar los genes "blanco" directos de ATX1 y cómo estos genes "blanco" pueden estar contribuyendo al desarrollo del sistema radical en *Arabidopsis*.

## 9.2 Análisis del transcriptoma de la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*.

La estrategia que se abordó para discernir las redes genéticas en las que funciona ATX1 y para identificar a otros genes candidatos involucrados en el desarrollo de la raíz primaria y las raíces laterales, fue el análisis global de la expresión de genes en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*. Aquí se estudiaron los cambios de la expresión de genes mediante el análisis del “RNA-seq”. Se extrajo RNA, a partir de raíces de plantas de *Ws* y de *atx1-1<sup>setm</sup>* de 14 días de edad y se enviaron para secuenciación por la plataforma de Illumina HiSeq 2000, dos muestras independientes de RNA, de cada genotipo.

El análisis de los genes diferencialmente expresados (DEGs), arrojó 355 genes que cambian el nivel de expresión al menos dos veces (fold change  $\geq 2$ , FDR  $p$ -value  $\leq 0.01$ ). De estos genes, 195 disminuyen y 160 aumentan sus niveles de abundancia (Figura 15) (CLC GW, CLCbio, Qiagen, Hilden, Germany; <http://www.clcbio.com/>), (Mortazavi *et al.*, 2008).

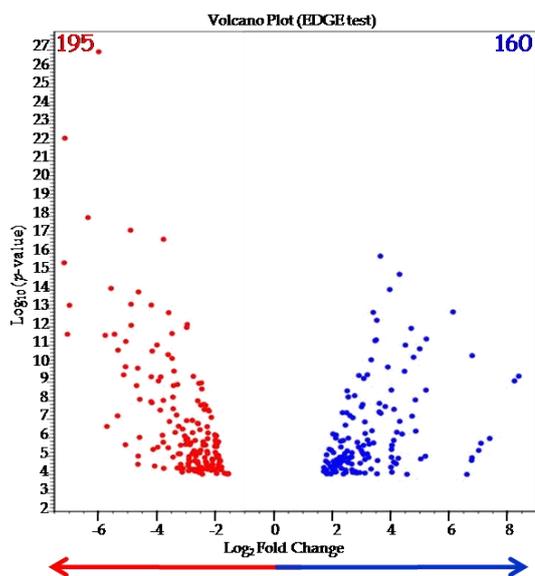


Figura 15. Expresión diferencial de genes en la raíz de la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* en comparación con el tipo silvestre. Los puntos en color rojo representan a los genes que disminuyen (195) y los puntos en color azul a los genes que aumentan (160) su expresión en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* en comparación con el tipo silvestre. (“Fold change”  $\geq 2$ , FDR  $p$ -value  $\leq 0.01$ ).

Para explorar las vías moleculares afectadas en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento de categorías de ontología de genes por proceso biológico (GO biological process), (CLC GW, CLCbio, Qiagen, Hilden, Germany; <http://www.clcbio.com/>), (Mortazavi *et al.*, 2008). El análisis se realizó por un lado para los genes que disminuyen y por otro lado para los genes que aumentan sus niveles de expresión en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* en comparación con el tipo silvestre. En correlación con los fenotipos observados en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* se encontró enriquecimiento de expresión de genes

importantes para la remodelación de la pared celular, para procesos de óxido reducción, para diferenciación de tricoblastos, entre otros. A través de este análisis se identificaron 18 categorías diferentes, que agruparon a 45 genes de los que disminuyeron sus niveles de expresión (Figura 16A) y 12 categorías enriquecidas, que correspondieron a 17 genes de los que aumentaron su expresión (Figura 16B). Estos datos muestran que, tanto el número de categorías como el “*p*-value”, son mayores en los genes que disminuyen su expresión comparado con los que aumentan su expresión en *atx1-1<sup>setm</sup>* (Figura 16 comparar panel A con panel B). Estos datos correlacionan considerando que la marca epigenética que coloca ATX1 (H3K4me3) está asociada a genes transcripcionalmente activos. De esta manera los genes que presentan una disminución en su nivel de expresión podrían ser genes “blanco” directos de ATX1.

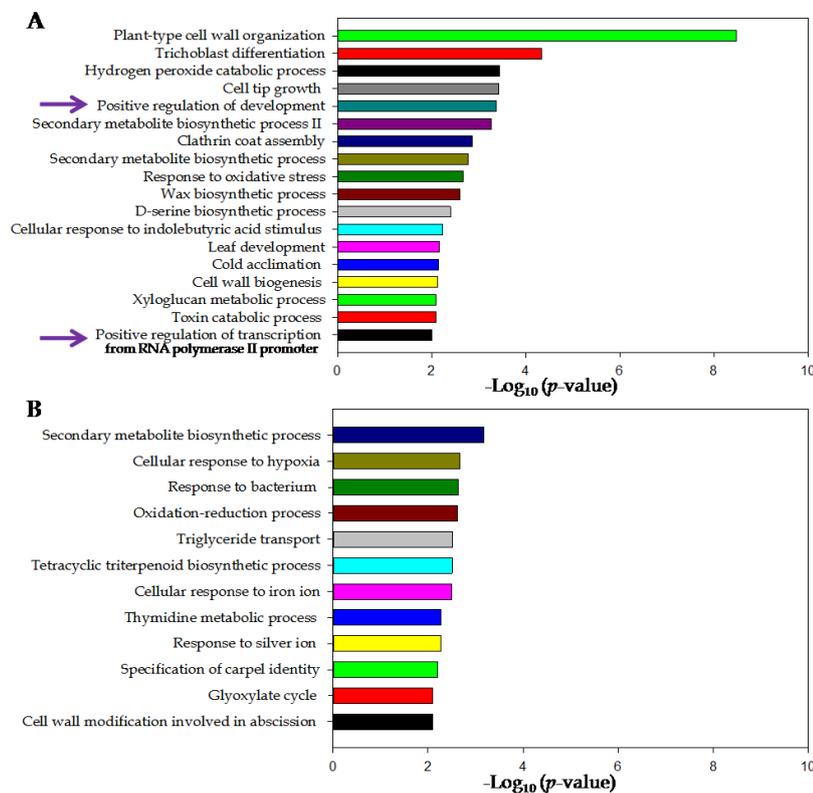


Figura 16. Análisis de enriquecimiento de categorías por proceso biológico de los genes expresados diferencialmente en *atx1-1<sup>setm</sup>*. A) Categorías donde se agrupan los genes que disminuyen su nivel de expresión en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*. B) Categorías donde se agrupan los genes que aumentan su nivel de expresión en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*. Las flechas en el panel A, indican las categorías donde se agruparon los factores de transcripción. Los valores en el eje X se presentan como  $-\text{Log}_{10}(p\text{-value})$ .

El fenotipo de alteraciones más severas en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* se presentó en el desarrollo de la raíz primaria y las raíces laterales, por esta razón, se buscaron específicamente los DEGs relacionados con el desarrollo del sistema radical. Se tomó en cuenta la función de ATX1, para buscar

preferencialmente genes que codifican para factores de transcripción. Se consideró que estos filtros en conjunto, podrían arrojar identidad de genes que tal vez no hubieran sido catalogados aún como importantes para el desarrollo de la raíz, pero que de acuerdo al fenotipo de la mutante en estudio, se podrían considerar como genes candidatos para cumplir una función importante en el desarrollo de la raíz (Tabla 2).

Este fue el caso de los genes *TCPs*. Los genes *TCP2* y *TCP24*, codifican para factores de transcripción y son miembros de la familia TCP (TEOSINTE BRANCHED1 de *Zea mays*, CYCLOIDEA de *Antirrhinum majus* y PROLIFERATING CELL FACTOR1 de *Oryza sativa*), que constituyen una familia específica de reguladores del desarrollo en plantas. Estos genes están involucrados en una gran variedad de procesos biológicos como en la simetría floral, en la arquitectura de la planta que incluye la ramificación de brote y el desarrollo de órganos laterales, también son importantes para la germinación de la semilla, la senescencia de la hoja, los ritmos circadianos, etc. (Shutian, 2015). Los TCPs comparten una región conservada en donde se encuentra un motivo (bHLH) no canónico de unión a DNA llamado TCP. En particular los genes *TCP2* y *TCP24* pertenecen a la clase II, subgrupo CINCINNATA (CIN) porque presentan mayor similitud con este último gen, involucrado en el desarrollo de órganos laterales de brote en *A. majus*. Es probable que estos genes también estén involucrados en el desarrollo de las raíces laterales en *Arabidopsis* y lo importante es que podrían ser genes “blanco” directos de ATX1 debido a que presentaron una disminución en su nivel de expresión en el fondo de la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*.

Otro grupo de genes interesantes que se encontraron, codifican para los factores de transcripción de la familia MADS, *AGAMOUS LIKE14* (*AGL14*), *AGL79*, *AGL71* y *AGL96*. Es conveniente resaltar que de estos genes, *AGL14* y *AGL79*, se expresan fuertemente en la raíz, además que *AGL14* controla el transporte de auxina a través de la regulación transcripcional de los genes *PIN1* y *PIN4*, durante el desarrollo de la raíz primaria en *Arabidopsis* (Garay-Arroyo *et al.*, 2013). Para el caso de otros genes como *NRT2.1*, *LBD33* y *LBD29*, se sabe que están directamente relacionados con el desarrollo de las raíces laterales (Little *et al.*, 2005; Porco *et al.*, 2016).

**Tabla 2. Genes candidatos importantes para el desarrollo de la raíz, identificados con el análisis transcriptómico en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*.**

Identificador	Nombre del gen	Veces de cambio (“Fold Change”)	Función*	Descripción**
AT4G18390	<i>TCP2</i> , <i>TEOSINTE BRANCHED 1</i> , <i>CYCLOIDEA</i> y <i>PROLIFERATING</i>	<b>-18,23</b>	Factor de transcripción específico de	Regulación positiva del desarrollo.

	CELL FACTOR 24.		plantas.	
AT1G30210	<i>TCP24</i> , TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA y PROLIFERATING CELL FACTOR 24.	<b>-9,09</b>	Factor de transcripción específico de plantas.	Regulación positiva del desarrollo.
AT1G26945	<i>KDR</i> , <i>KIDARI</i> .	<b>-3,76</b>	Codifica para una proteína con el motivo hélice-vuelta-hélice básico (bHLH).	Involucrado en la señalización por luz azul/rojo lejano. Regulación del crecimiento.
AT1G08090	<i>NRT2.1</i> , NITRATE TRANSPORTER 2.	<b>10,06</b>	Transportador de nitrato de alta afinidad.	Funciona como un represor de la iniciación de la raíz independientemente de la absorción de nitrato.
AT5G06080	<i>LBD33</i> , <i>LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN 33</i> .	<b>12,61</b>	Factor de transcripción específico de plantas.	Media la organogénesis de la raíz lateral.
AT3G58190	<i>LBD29</i> , <i>LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN29</i> .	<b>5,37</b>	Factor de transcripción específico de plantas.	Involucrado en la formación de la raíz lateral.
AT4G11880	<i>AGL14</i> , <i>AGAMOUS LIKE 14</i> .	<b>-29,89</b>	Factor de transcripción específico de plantas.	Involucrado en el desarrollo de la raíz.
AT5G51870	<i>AGL71</i> , <i>AGAMOUS LIKE 71</i> .	<b>-43,07</b>	Factor de transcripción específico de plantas.	Involucrado en la transición floral.
AT3G30260	<i>AGL79</i> , <i>AGAMOUS LIKE 79</i> .	<b>-25,19</b>	Factor de transcripción específico de plantas.	Involucrado en el desarrollo de la raíz lateral.
AT5G06500	<i>AGL96</i> , <i>AGAMOUS LIKE 96</i> .	<b>-24,13</b>	Factor de transcripción específico de plantas.	Se expresa durante el desarrollo del embrión de la planta.
AT2G18550	<i>ATHB21</i> , <i>HOMEODOMAIN PROTEIN 21</i>	<b>-25,87</b>	Factor de transcripción específico de plantas (HD-Zip I).	Su función es inhibir la ramificación del brote bajo condiciones de iluminación limitada.
AT4G30140	<i>CDEF1</i> , <i>CUTICLE DESTRUCTING FACTOR 1</i> .	<b>12,52</b>	Codifica para un miembro de la familia de proteínas GDSL lipasa/esterasa.	Se expresa en la zona de emergencia de raíz lateral.
AT5G15725	<i>GLV9</i> , <i>GOLVEN 9</i> .	<b>-14,75</b>	Péptido de señalización pequeño.	Involucrado en múltiples programas de desarrollo de la raíz.

\* Función y \*\* Descripción revisado en [www.arabidopsis.org/](http://www.arabidopsis.org/) y [phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html](http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html). Fold change  $\geq 2$ , FDR  $p$ -value  $\leq 0.01$ . En rojo, se indican los genes que disminuyeron su nivel de expresión y en azul, los que aumentaron su nivel de expresión.

Se sabe que en *Arabidopsis*, las células del periciclo enfrente de los polos del xilema, son las que dan lugar a los primordios de raíz lateral (Laskowski *et al.*, 1995). Y debido a que existe la información de qué genes son los que enriquecen su expresión en las células del periciclo enfrente de los polos del xilema (XPP) y enfrente de los polos del floema (PPP) (Parizot *et al.*, 2012) se decidió realizar un análisis con base en estos datos. De esta manera, otro filtro aplicado a los datos del transcriptoma de *atx1-1<sup>setm</sup>* fue la búsqueda específica de los genes cuya expresión se enriquece particularmente, en el periciclo (Tabla 3).

**Tabla 3. Genes identificados en el análisis transcriptómico de *atx1-1<sup>setm</sup>* que cambian su nivel de expresión y que se enriquecen en XPP (polo enfrente del xilema) o PPP (polo enfrente del floema).**

Identificador	Nombre del gen/Descripción	Veces de cambio ("Fold Change")	Función	Sitio específico de enriquecimiento
AT1G60190	<i>PUB19</i> , PLANT U-BOX 19.	-6.00	Ligasa de ubiquitina E3.	PPP
AT3G49960	<i>PEROXIDASE 35-RELATED</i> .	-5.18	Peroxidasa	XPP
AT2G42840	<i>PDF1</i> , PROTODERMAL FACTOR 1.	-3.81	Codifica para una proteína rica en prolina.	XPP
AT5G64060	<i>NAC103</i> , NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 103.	8.9	Factor de transcripción de la familia NAC.	XPP
AT5G06570	<i>Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein</i> .	6.08	Hidrolasa.	PPP
AT1G36180	<i>ACC2</i> , ACETYL-COA CARBOXYLASE 2.	4.91	Carboxilasa.	XPP

Debido a que los genes *PEROXIDASE 35-RELATED* (AT3G49960) y *PDF1*, *PROTODERMAL FACTOR1* (AT2G42840) presentan una reducción en su nivel de expresión en el fondo de la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*, mientras que se enriquecen en las células del periciclo enfrente de los polos del xilema en plantas del tipo silvestre (Parizot *et al.*, 2012) estos genes fueron seleccionados para continuar con el análisis.

Se sabe que la actividad de las peroxidasas y la señalización por las especies reactivas de oxígeno (ROS) son muy importantes, particularmente

durante la emergencia de las raíces laterales (Manzano *et al.*, 2014; Orman-Ligeza *et al.*, 2016). El modelo que se ha planteado, considera que las ROS permiten la remodelación de las paredes celulares en los sitios donde se ha iniciado el desarrollo de los primordios y de esta manera, se facilita la emergencia de las RLs (Orman-Ligeza *et al.*, 2016). Con base en esta información, en este trabajo se propone que el gen *PEROXIDASE 35-RELATED*, podría estar participando en la remodelación de las paredes celulares en los sitios donde el desarrollo de los primordios se inicia, lo que correlaciona con el fenotipo de menor número de RLs observado en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*, donde los niveles de expresión de este gen están disminuidos. La hipótesis general es que ATX1 trimetila a la H3K4 de los nucleosomas, donde se localiza el gen *PEROXIDASE 35-RELATED* y cuando esto no ocurre, como en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*, se afectaría de manera considerable la emergencia de las raíces laterales. Otro dato que refuerza la hipótesis, es que la expresión de *PEROXIDASE 35-RELATED* se enriquece en las células del periciclo enfrente de los polos de xilema (XPP, células a partir de las cuales se desarrollan las RLs), en el tipo silvestre. También se ha determinado que la expresión de este gen se enriquece en los pelos radicales y esto se ha asociado con un incremento en la marca H3K4me3 (Deal y Henikoff, 2010).

Por otro lado, el cambio en la abundancia de los transcritos del gen *PDF1* en *atx1-1<sup>setm</sup>* también es muy interesante, porque este gen se expresa en la capa L1 del meristemo apical del brote (SAM), donde ocurre un proceso de desarrollo coordinado que involucra a las capas L2 y L3 del SAM para la formación de órganos laterales del brote u órganos florales (Abe *et al.*, 2001). El gen *PDF1* también se expresa en los primordios de la raíz lateral (Abe *et al.*, 2001), donde también ocurre un proceso de desarrollo altamente coordinado, que culmina con la formación del primordio de raíz lateral (como ya se mencionó en la introducción). Con base en esto se sugiere que ATX1 podría estar trimetilando a la H3K4 del nucleosoma, donde se localiza el gen *PDF1* permitiendo así la transcripción del gen *PDF1* que a su vez podría estar participando en la formación del primordio, probablemente coordinando las rondas de divisiones celulares que tienen que ocurrir para la formación de un primordio simétrico. Lo anterior correlaciona con el fenotipo de primordios asimétricos observado en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* y con la expresión de *PDF1*, que se enriquece en los polos enfrente del xilema en plantas del tipo silvestre mientras que su nivel de expresión disminuye en la mutante. Otro dato interesante es que la proteína con homeodominio MERISTEM LAYER (*ATML1*) se une a una caja-L1 localizada en el promotor del gen *PDF1* (Abe *et al.*, 2001) y este gen *ATML1* también se encuentra con nivel de expresión disminuido en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*. Esto sugiere que ambos genes también podrían estar

relacionados en el contexto del desarrollo de los PRLs lo que robustece la hipótesis.

En cuanto a la validación de los datos del “RNA-seq”, ésta se realizó mediante el análisis de la expresión de varios genes por RT-PCR cuantitativo. Se seleccionaron seis genes, de los cuales tres de ellos disminuyeron (*GOLVEN9*, *RELATED TO AP2 11* y *COBRA LIKE9*) y los otros tres aumentaron (*SIAMESE RELATED7*, *NITRATE TRANSPORTER2* y *SIAMESE RELATED5*) sus niveles de expresión en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* con respecto al tipo silvestre (Tabla 4).

Tabla 4. Genes seleccionados para validar los datos del transcriptoma de la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*.

Nombre del Gen	Eficiencia	Cq*	Veces de cambio (“fold change”)**
<i>UBQ10</i> , <i>UBIQUITIN 10</i> . Gen de referencia.	1.96	13.5	-
<i>EF1a</i> , <i>GTP binding Elongation factor</i> . Gen de referencia.	2.09	15.2	-
<i>GLV9</i> , <i>GOLVEN (GLV)/ROOT GROWTH FACTORS/CLE-Like</i> . Es un miembro de la familia de péptidos pequeños de señalización.	2.08	22.6	-14.7
<i>RAP2.1</i> , <i>RELATED TO AP2 11</i> . Factor de transcripción de la familia ERF/AP2.	1.89	20.6	-3.5
<i>COBL9</i> , <i>COBRA-LIKE 9</i> . Componente anclado a la membrana involucrado en el establecimiento exitoso de la punta de crecimiento de los pelos radicales.	1.97	20.8	-3.1
<i>SMR7</i> , <i>SIAMESE-RELATED7</i> . Es un miembro de la familia de inhibidores de cinasa dependientes de ciclina. Su expresión se induce por estrés oxidativo.	2.03	24.5	26
<i>NRT2.1</i> , <i>NITRATE TRANSPORTER 2</i> . Transportador de nitrato de alta afinidad.	1.99	22.4	10
<i>SMR5</i> , <i>SIAMESE-RELATED5</i> . Es un miembro de la familia de inhibidores de cinasa dependientes de ciclina. Su expresión se induce por estrés oxidativo.	1.82	22.7	6.3

Todos los datos de eficiencia de los oligonucleótidos y Cq presentados aquí son a partir de 75 ng de cDNA sintetizados a partir de RNA extraído de raíces del tipo silvestre. \*Cq, ciclo en el cual la cantidad de producto de RT-qPCR alcanza un umbral establecido; \*\*Veces de cambio (“fold change”) de la expresión de los genes seleccionados a partir de los datos del transcriptoma. En rojo los genes que disminuyeron su expresión, en azul los genes que aumentaron su expresión.

Los datos fueron normalizados para el nivel de expresión de dos genes de referencia *UBQ10* (AT4G05320) y *EF1a* (AT5G60390) (Czechowski *et al.*, 2005), de acuerdo a Vandesompele *et al.*, (2002). Se realizaron tres réplicas biológicas con dos réplicas técnicas para cada una. En general, los datos de nivel de expresión de los genes obtenidos del transcriptoma (Tabla 4) correlacionan con la abundancia de transcrito en el análisis de RT-PCR cuantitativo (Figura 17).

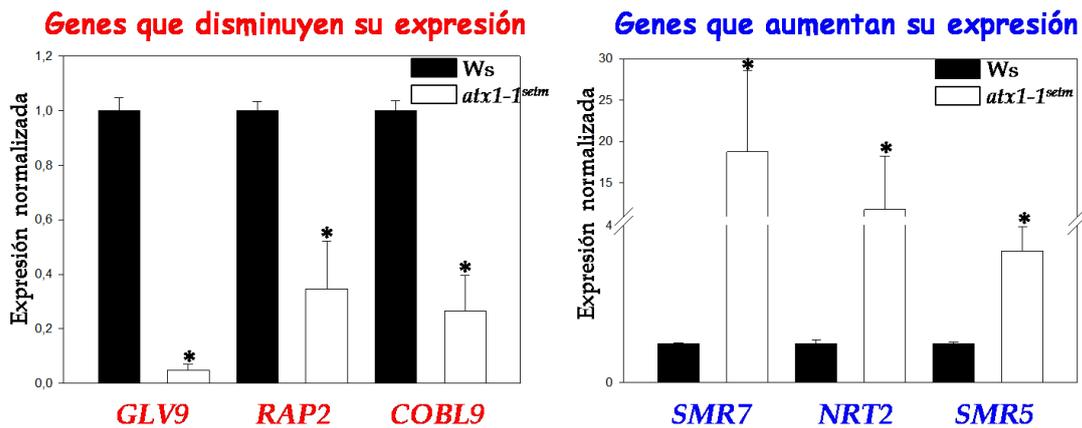


Figura 17. Análisis de la expresión diferencial de los genes *GLV9*, *RAP2.1*, *COBL9*, *SMR7*, *NRT2.1* y *SMR5* por RT-PCR cuantitativo en *Ws* y *atx1-1<sup>setm</sup>*. Datos de tres réplicas biológicas con dos réplicas técnicas. Promedio  $\pm$ DE. Genes de referencia *UBQ10* y *EF1a*.

\* Indica diferencia significativa ( $P < 0.05$ ; prueba *t* de Student) entre el tipo silvestre (*Ws*) y la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*.

Estos resultados validan los datos de la expresión diferencial de genes obtenidos a partir del análisis del “RNA-seq” en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>*. Los resultados del análisis del transcriptoma de *atx1-1<sup>setm</sup>* han permitido encontrar probables genes “blancos directos” de la actividad de ATX1, relacionados con diferentes aspectos del fenotipo de la mutante. Sin embargo, se requiere de más trabajo dirigido a establecer sobre qué genes ATX1 influencia la transcripción y si estos genes tienen alguna función durante el desarrollo del sistema radical en *Arabidopsis*.

## 10. Conclusiones de los resultados publicados.

- 1) *ATX1* es importante para el crecimiento de la raíz primaria y para la producción celular en el meristemo apical de la raíz.
- 2) *ATX1* es necesario para la organización y la formación del patrón del meristemo apical de la raíz primaria.
- 3) *ATX1* es importante para la emergencia de la raíz lateral y su función es fundamental para la correcta morfogénesis del primordio de la raíz lateral.

## 11. Conclusiones de los resultados no publicados.

1) El fenotipo de alteraciones de la raíz en la mutante *atx1-1<sup>setm</sup>* es más severo que el de la mutante *atx1-1*.

-La RP de *atx1-1<sup>setm</sup>* crece 40% menos que la RP de *atx1-1*.

-En *atx1-1<sup>setm</sup>*, el porcentaje de RLs con anomalías es del 58%, mientras que, en *atx1-1* es del 45%.

-En *atx1-1<sup>setm</sup>* el porcentaje de los PRLs con anomalías es del 71% mientras que en *atx1-1* es del 57%.

2) El análisis del transcriptoma de *atx1-1<sup>setm</sup>* mostró que 355 genes se expresan diferencialmente cuando se inactiva a ATX1. De estos genes, 195 disminuyen y 160 aumentan sus niveles de expresión.

3) El análisis de ontología de genes mostró enriquecimiento significativo de genes que bajan su nivel de expresión en 18 categorías, entre ellas, "organización de la pared celular", "diferenciación de tricoblastos", "regulación del desarrollo" y "regulación de la transcripción a partir de la RNA polimerasa II". En las últimas dos categorías se agruparon sólo factores de transcripción (*TCP2*, *TCP24*, *AGL14*, *AGL71*, *AGL79* y *AGL96*).

4) El análisis del transcriptoma de *atx1-1<sup>setm</sup>* permitió identificar genes potencialmente "blanco" de ATX1, relacionados con procesos de desarrollo que probablemente tienen una función importante en el desarrollo del sistema radical en *Arabidopsis*.

## 12. Perspectivas.

I.- Estudiar con detalle a los probables blancos de ATX1.

1) Para los genes *PEROXIDASE 35-RELATED* y *PROTODERMAL FACTOR*.

a) Analizar el fenotipo de las mutantes en estos genes.

b) Corroborar por RT-qPCR que los niveles de transcrito de estos genes se disminuyen en *atx1-1<sup>setm</sup>*

c) Establecer si ATX1 está asociada a la cromatina de estos genes, por ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina.

2) Para los genes *TCP2* y *TCP24*.

a) Corroborar por RT-qPCR que los niveles de transcrito de estos genes se disminuyen en *atx1-1<sup>setm</sup>*.

b) Por ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina establecer si ATX1 está asociada a la cromatina de estos genes.

3) Para los genes *KIDARI* (factor de transcripción) y *ATHB21* (factor de transcripción con homeodominio) que bajan su expresión en *atx1-1<sup>setm</sup>* y están relacionados con desarrollo y crecimiento en *Arabidopsis*.

- a) Analizar el fenotipo de las mutantes en estos genes.
- b) Corroborar por RT-qPCR que los niveles de transcrito de estos genes se disminuyen en *atx1-1<sup>setm</sup>*.

II.- Estudiar algunos genes expresados diferencialmente en *atx1-1<sup>setm</sup>*, particularmente de los siguientes grupos:

- 1) Genes que están directamente relacionados con el desarrollo de raíces laterales en *Arabidopsis*: *NTR2.1* y *LBD33*.
- 2) Genes homeóticos: *AGL14*, *AGL71*, *AGL79* y *AGL96*.
- 3) Genes que se expresan en los primordios o en la zona donde éstos emergen: *CDEF1* y *GLV9*.
- 4) Genes relacionados con reparación del DNA: *SMR7*, *TSO2* (*TSO MEANING 'UGLY' IN CHINESE 2*), *ANAC103*, y *ATCTH/AtZFP1* (*C3HC4-type RING finger*).

III.- Para corroborar que efectivamente en *atx1-1<sup>setm</sup>* hay un menor nivel de H3K4me3 comparado con *atx1-1* y Ws. Analizar mediante la técnica de Western blot, el nivel de trimetilación de H3K4 en las mutantes *atx1-1* y *atx1-1<sup>setm</sup>* comparados entre sí y con el tipo silvestre.

IV.- Explorar si en las células del RAM de *atx1-1* y *atx1-1<sup>setm</sup>*, se presenta muerte celular y si estas células sufren de daño al DNA. El antecedente directo para plantear esto fue la observación sistemática de células muertas en el RAM de la mutante *atx1-1*, lo que no se observó en el tipo silvestre.

### 13. Referencias.

**Abe, M., Takahashi, T. and Y. Komeda.** 2001. Identification of a cis-regulatory element for L1 layer-specific gene expression, which is targeted by an L1-specific homeodomain protein. *Plant Journal*, 26:487-494.

**Abel, S. and A. Theologis.** 1996. Early genes and auxin action. *Plant Physiology*, 111:9-17.

**Aichinger, E., Villar, C.B., Di Mambro, R., Sabatini, S. and C. Köhler.** 2011. The CHD3 chromatin remodeler PICKLE and polycomb group proteins antagonistically regulate meristem activity in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell*, 23:1047-1060.

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

**Alvarez-Venegas, R.** 2010. Regulation by Polycomb and Trithorax group proteins in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, e0128: 2-20.

**Alvarez-Venegas, R. and Z. Avramova.** 2002. SET-domain proteins of the Su (var) 3-9, E (z) and trithorax families. *Gene*, 285:25-37.

**Alvarez-Venegas, R., Pien, S., Sadler, M., Witmer, X., Grossniklaus, U. and Z. Avramova.** 2003. ATX-1, an *Arabidopsis* homolog of trithorax, activates flower homeotic genes. *Current Biology*, 13:627-637.

**Alvarez-Venegas, R., Sadler, M., Hlavacka, A., Baluska, F., Xia, Y., Lu, G., Firsov, A., Sarath, G., Moriyama, H., Dubrovsky, J.G. and Z. Avramova.** 2006. The *Arabidopsis* homolog of trithorax, ATX1, binds phosphoinositide 5-phosphate and the two regulate a common set of target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:6049-6054.

**Arabidopsis Genome Initiative.** 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408:796-815.

**Avramova, Z.** 2009. Evolution and pleiotropy of TRITHORAX function in *Arabidopsis*. *International Journal of Developmental Biology*, 53:371-381.

**Baum, S.F. and T.L. Rost.** 1996. Root apical organization in *Arabidopsis thaliana*. 1. Root cap and protoderm. *Protoplasma*, 192:178-188.

**Beeckman, T., Burssens, S. and D. Inzé.** 2001. The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 52:403-411.

**Benfey, P.N. and B. Scheres.** 2000. Root development. *Current Biology*, 10:813-815.

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

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

**Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G. and J. Friml.** 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115:591-602.

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

**Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G. and J.M. Bennett.** 2003. Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science*, 8:165-171.

**Casson, S. A. and K. Lindsey.** 2003. Genes and signalling in root development. *New Phytologist*, 158:11-38.

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

**Chen, L., Luo, J., Cui, Z., Xue, M., Wang, L., Zhang, X., Pawlowski, W.P. and Y. Heb.** 2017. *ATX3*, *ATX4*, and *ATX5* encode putative H3K4 methyltransferases and are critical for plant development. *Plant Physiology*, 174:1795-1806.

**Clowes, F.A.L.** 1975. The quiescent centre. In: Torrey, J.G, Clarkson, D.T., eds. *The development and function of roots*. London, UK: Academic Press, 3-19.

**Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T. and P. Doerner.** 1999. Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant Journal*, 20:503-508.

**Cruz-Ramírez, A., Díaz-Trivino, S., Blilou, I., Grieneisen, V.A., Sozzani, R., Zamioudis, C., Miskolczi, P., Nieuwland, J., Benjamins, R., Dhonukshe, P., Caballero-Pérez, J., Horvath, B., Long, Y., Mähönen, A.P., Zhang, H., Xu, J., Murray, J.A., Benfey, P.N., Bako, L., Marée, A.F. and B. Scheres.** 2012. A bistable circuit involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA integrates cues to inform asymmetric stem cell division. *Cell*, 150:1002-1015.

**Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K. and W.R. Scheible.** 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139:5–17.

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

**De Smet, I.** 2012. Lateral root initiation: one step at a time. *New Phytologist*, 193:867–873.

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

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

**Deal, R.B. and S. Henikoff.** 2010. A simple method for gene expression and chromatin profiling of individual cell types within a tissue. *Developmental Cell*, 18:1030-1040.

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

**Di Donato, R.J., Arbuckle, E., Buker, S., Sheets, J., Tobar, J., Totong, R., Grisafi, P., Fink, G.R and J.L. Celenza.** 2004. *Arabidopsis* ALF4 encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. *Plant Journal*, 37:340-53.

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

**Ding, Y., Avramova, Z. and M. Fromm.** 2011a. Two distinct roles of ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX1 (ATX1) at promoters and within transcribed regions of ATX1-regulated genes. *Plant Cell*, 23:350-363.

**Ding, Y., Avramova, Z. and M. Fromm.** 2011b. The Arabidopsis trithorax-like factor ATX1 functions in dehydration stress responses via ABA-dependent and ABA-independent pathways. *Plant Journal*, 66:735-744.

**Ding, Y., Ndamukong, I., Xu, Z., Lapko, H., Fromm, M. and Z. Avramova.** 2012. ATX1-Generated H3K4me3 is required for efficient elongation of transcription, not initiation, at ATX1-regulated genes. *PLOS Genetics*, 8:1-12.

**Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K. and B. Scheres.** 1993. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, 119:71-84.

**Drisch, R.C. and Y. Stahl.** 2015. Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Frontiers in Plant Science*, 6:1-5.

**Dubrovsky, J.G. and B.G. Forde.** 2012. Quantitative analysis of lateral root development: pitfalls and how to avoid them. *Plant Cell*, 24:4-14.

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

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

**Dubrovsky, J. G., Napsucialy-Mendivil, S., Duclercq, J., Cheng, Y., Shishkova, S., Ivanchenko, M.G., Friml, J., Murphy, A.S. and E. Benkova.** 2011. Auxin minimum defines a developmental window for lateral root initiation. *New Phytologist*, 191:970–983.

**Dubrovsky, J. G., Sauer, M., Napsucially-Mendivil, S., Ivanchenko, M., Friml, J., Shishkova, S., Celenza, J. and E. Benkova.** 2008. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105:8790–8794.

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

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

**Eichten, S.R., Schmitz, R.J. and N.M. Springer.** 2014. Epigenetics: Beyond chromatin modifications and complex genetic regulation. *Plant Physiology*, 165:933–947.

**Forzani, C., Aichinger, E., Sornay, E., Willemsen, V., Laux, T., Dewitte, W. and J.A. Murray.** 2014. WOX5 suppresses CYCLIND activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Current Biology*, 24:1939–1944.

**Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schuwarz, H., Hamann, T., Offringa, R. and G. Jurgens.** 2003. Efflux-dependent aux gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 13:147-153.

**Friml, J., Wisniewska, J., Benková, E., Mendgen, K. and K. Palme.** 2002. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, 415:806–809.

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

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

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

**Garay-Arroyo, A., Ortiz-Moreno, E., de la Paz Sánchez, M., Murphy, A., García-Ponce, B., Marsch-Martínez, N., de Folter, S., Corvera-Poiré, A., Jaimes-Miranda, F., Pacheco-Escobedo, M.A., Dubrovsky, J.G., Pelaz, S. and Elena R. Álvarez-Buylla.** 2013. The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during *Arabidopsis* root development by regulating PIN expression. *European Molecular Biology Organization Journal*, 21:2884-2895.

**Goodrich, J. and S. Tweedie.** 2002. Remembrance of things past: chromatin remodeling in plant development. *Annual Review Cell Development Biology*, 18:707-746.

**Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. and M. Estelle.** 2001. Auxin regulates SCF<sup>TIR1</sup>-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, 414:271-276.

**Grieneisen, V.A., Xu, J., Marée, A.F.M., Hogeweg, P. and B. Scheres.** 2007. Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature*, 449:1008-1013.

**Haecker, A., Gross-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M. and T. Laux.** 2004. Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131:657-68.

**Heidstra, R., Welch, D. and B. Scheres.** 2004. Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect *Arabidopsis* SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes and Development*, 18:1964-1969.

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

**Hemerly, A.S., Ferreira, P., de Almeida Engler, J., Van Montagu, M., Engler, G. and D. Inzé.** 1993. *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell*, 5:1711-1723.

**Hirano, Y., Nakagawa, M., Suyama, T., Murase, K., Shirakawa, M., Takayama, S., Sun, T. and T. Hakoshima.** 2017. Structure of the SHR-SCR heterodimer bound to the BIRD/IDD transcriptional factor JKD. *Nature Plants*, 3:1-10.

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

**Ivanov, V.B. and J.G. Dubrovsky.** 1997. Estimation of the cell-cycle duration in the root meristem: a model of linkage between cell-cycle duration, rate of cell production, and rate of root growth. *International Journal of Plant Sciences*, 158:757-763.

**Ivanov, V.B. and J.G. Dubrovsky.** 2013. Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends in Plant Science*, 18:237-243.

**Ivanov, V.B., Bystrova, E.I., Dubrovsky, J.G. and M.E. Ploshinskaya.** 1998. Duration of lateral root formation in maize seedlings as affected by diverse factors. In: Box JE Jr, ed. *Root demographics and their efficiencies in sustainable agriculture, grasslands and forest ecosystems*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 777-787.

**Jiang, K. and L.J. Feldman.** 2005. Regulation of root apical meristem development. *Annual Review Cell Developmental Biology*, 21:485-509.

**Kaya, H., Shibahara, K., Taoka, K., Iwabuchi, M., Stillman, B. and T. Araki.** 2001. *FASCIATA* genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell*, 104:131-142.

**Kirschner, G.K., Stahl, Y., Imani, J., von Korff, M., and R. Simon.** 2018. Fluorescent reporter lines for auxin and cytokinin signalling in barley (*Hordeum vulgare*). *Public Library of Science one*, 13:1-25.

**Lämke, J. and I. Bäurle.** 2017. Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biology*, 18:2-11.

**Laskowski, M.J., Williams, M.E., Nusbaum, H.C. and I.M. Sussex.** 1995. Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development*, 121:3303-3310.

**Lavenus, J., Lucas, M., Laplaze, L. and S. Guyomarc'h.** 2013. The Dicot Root as a Model System for Studying Organogenesis. Ivo De Smet (editor). *Plant*

Organogenesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Vol. 959: Springer Science, Business Media, New York.

**Lee, H.W., Cho, C. and J. Kim.** 2015. Lateral organ boundaries domain16 and 18 act downstream of the AUXIN1 and LIKE-AUXIN3 auxin influx carriers to control lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 168:1792–1806.

**Leyser, O.** Auxin Signaling. 2018. *Plant Physiology*, 176:465–479.

**Little, D., Rao, H., Oliva, S., Daniel-Vedele, F., Krapp, A. and J.E. Malamy.** 2005. The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20:13693–13698.

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

**Linsmaier, E.M. and F. Skoog.** 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 18:100-127.

**López-Bucio, J.S., Dubrovsky, J.G., Raya-González, J., Ugartechea-Chirino, Y., López-Bucio, J., de Luna-Valdez, L.A., Ramos-Vega, M., León, P. and A.A. Guevara-García.** 2014. *Arabidopsis thaliana* mitogen activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *Journal of Experimental Botany*, 65:169–183.

**Malamy, J.E.** 2005. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell and Environment*, 28:67–77.

**Malamy, J. E and P.N. Benfey.** 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124:33-44.

**Manzano, C., Pallero-Baena, M., Casimiro, I., De Rybel, B., Orman-Ligeza, B., Isterdael, G.V., Beeckman, T., Draye, X., Casero, P. and J.C. del Pozo.** 2014. The emerging role of reactive oxygen species signaling during lateral root development. *Plant Physiology*, 165:1105–1119.

**Manzano, C., Ramirez-Parra, E., Casimiro, I., Otero, S., Desvoves, B., De Rybel, B., Beeckman, T., Casero, P., Gutierrez, C. and J.C. del Pozo.** 2012.

Auxin and epigenetic regulation of SKP2B, an F-box that represses lateral root formation. *Plant Physiology*, 160:749–762.

**Mähönen, A.P., Tusscher, K., Siligato, R. Smetana, O., Díaz-Triviño, S., Salojärvi, J., Wachsman, G. Prasad, K. Heidstra, R. and B. Scheres.** 2014. PLETHORA gradient formation mechanism separates auxin responses. *Nature*, 515:125-129.

**Maraschin, F. dos S., Memelink, J. and R. Offringa.** 2009. Auxin-induced, SCF (TIR1)-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *Plant Journal*, 59:100–109.

**Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P.J., Bennett, M. and G. Sandberg.** 2002. AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell*, 14:589-97.

**Marhavý, P., Montesinos, J.C., Abuzeineh, A., Van Damme, D., Vermeer, J.E.M., Duclercq, J., Rakusová, H., Nováková, P., Friml, J., Geldner, N. and E. Benková.** 2016. Targeted cell elimination reveals an auxin-guided biphasic mode of lateral root initiation. *Genes Development*, 30:471–483.

**Mironova, V.V., Omelyanchuk, N.A., Wiebe, D.S. and V.G. Levitsky.** 2014. Computational analysis of auxin responsive elements in the *Arabidopsis thaliana* L. genome. *Bio Med Central Genomics*, 15:1-14.

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

**Moris, N., Pina, C. and A.M. Arias.** Transition states and cell fate decisions in epigenetic landscapes. *Nature Review Genetics*, 17:693–703.

**Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L. and B. Wold.** 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by rna-seq. *Nature Methods*, 5:621-628.

**Murashige T. and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Phosiology*, 15:473-497.

**Nakajima, K., Sean, G., Nawy, T. and P.N. Benfey.** 2001. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature*, 413:307–311.

**Napsucialy-Mendivil, S., Alvarez-Venegas, R., Shishkova, S. and J.G. Dubrovsky.** 2014. *ARABIDOPSIS* HOMOLOG of *TRITHORAX1* (*ATX1*) is required for cell production, patterning, and morphogenesis in root development. *Journal of Experimental Botany*, 65:6373–6384.

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

**Orman-Ligeza, B., Parizot, B., Rycke, R., Fernandez, A., Himschoot, E., Van Breusegem, F., Bennett, M.J. Périlleux, C., Beeckman, T. and X. Draye.** 2016. RBOH-mediated ROS production facilitates lateral root emergence in *Arabidopsis*. *Development*, 143:3328–3339.

**Perilli, S. Di Mambro, R. and S. Sabatini.** 2012. Growth and development of the root apical meristem. *Current Opinion in Plant Biology*, 15:17–23.

**Parizot, B., Roberts, I., Raes, J., Beeckman, T. and I. De Smet.** 2012. In silico analyses of pericycle cell populations reinforce their relation with associated vasculature in *Arabidopsis*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 367:1479–1488.

**Paponov, I.A., Paponov, M., Teale, W., Menges, M., Chakrabortee, S., Murray, J.A. and K. Palme.** 2008. Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 1:321–337.

**Pengelly, A.R., Kalb, R., Finkl, K. and J. Müller.** 2015. Transcriptional repression by PRC1 in the absence of H2A monoubiquitylation. *Genes and Development*, 29:1487–1492.

**Petersson, S.V., Johansson, A.I., Kowalczyk, M., Makoveychuk, A., Wang, J.Y., Moritz, T., Grebe, M., Benfey, P.N., Sandberg, G. and K. Ljung.** 2009. An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *Plant Cell*, 21:1659–1668.

**Petricka, J.J. and P.N. Benfey.** 2008. Root layers: complex regulation of developmental patterning. *Current Opinion in Genetics Development*, 18:354-61.

**Pi, L., Aichinger, E., van der Graaff, E., Llavata-Peris, C.I., Weijers, D., Hennig, L., Groot, E. and T. Laux.** 2015. Organizer-derived WOX5 signal maintains root columella stem cells through chromatin-mediated repression of *CDF4* expression. *Developmental Cell*, 33:576-588.

**Pikaard, C.S. and S.O. Mittelsten.** 2014. Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6:1-31.

**Porco, S., Larrieu, A., Du, Y., Gaudinier, A., Goh, T., Swarup, K. Swarup, R., Kuempers, B., Bishopp, A., Lavenus, J., Casimiro, I., Hill, K., Benkova, E., Fukaki, H., Brady, S.M., Scheres, B. Peret, B. and M.J. Bennett.** 2016. Lateral root emergence in *Arabidopsis* is dependent on transcription factor LBD29 regulation of auxin influx carrier LAX3. *Development*, 143:3340-3349.

**Ristova, D. and W. Busch.** 2014. Natural variation of root traits: from development to nutrient uptake. *Plant Physiology*, 166:518-527.

**Rost, T.L.** 2011. The organization of roots of dicotyledonous plants and the positions of control points. *Annals of Botany*, 107:1213-1222.

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

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

**Saini, S., Sharma, I., Kaur, N. and P.K. Pati.** 2013. Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant Cell Reports*, 32:741-57.

**Saleh, A., Alvarez-Venegas, R., Yilmaz, M., Le, O., Hou, G., Sadler, M., Al-Abdallat, A., Xia, Y., Lu, G., Ladunga, I., and Z. Avramova.** 2008. The highly similar *Arabidopsis* homologs of trithorax *ATX1* and *ATX2* encode proteins with divergent biochemical functions. *Plant Cell*, 20:568-579.

**Santuari, L., Sanchez-Perez, G.F., Luijten, M., Rutjens, B., Terpstra, I., Berke, L., Gorte, M., Prasad, K., Bao, D., Timmermans-Hereijgers, J.L.P.M., Maeo, K., Nakamura, K., Shimotohno, A., Pencik, A., Novak, O., Ljung, K., van Heesch, S., de Bruijn, E., Cuppen, E., Willemsen, V., Mähönen, A.P., Lukowitz, W., Snel, B., de Ridder, D., Scheres, B. and R. Heidstra.** 2016. The PLETHORA gene regulatory network guides growth and cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*, 28:2937–2951.

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

**Scheres, B., Benfey, P. and L. Dolan.** 2002. Root development. *Arabidopsis* book, 1:e0101.

**Scheres, B., Di Laurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M.T., Janmaat, K., Weisbeek, P., and P.N. Benfey.** 1995. Mutation affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development*, 121:53–62.

**Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., and G. Cavalli.** 2007. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*, 128:735–745.

**Schuettengruber, B., Martinez, A.M., Iovino, N. and G. Cavalli.** 2011. Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12:799–814.

**Shutian, L.** 2015. The *Arabidopsis thaliana* TCP transcription factors: A broadening horizon beyond development. *Plant Signaling and Behavior*, 10:1-12.

**Smalle, J. and R.D. Vierstra.** 2004. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 55:555–590.

**Sozzani, R. and A. Iyer-Pascuzzi.** 2014. Postembryonic control of root meristem growth and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 17:7–12.

**Sozzani, R., Cui, H., Moreno-Risueno, M.A., Busch, W., Van Norman, J.M., Vernoux, T., Brady, S.M., Dewitte, W., Murray, J.A. and P.N. Benfey.** 2010.

Spatio temporal regulation of cell-cycle genes by SHORT ROOT links patterning and growth. *Nature*, 466:128–132.

**Sparks, E., Drapek, C., Gaudinier, A., Li, S., Ansariola, M., Shen, N., Hennacy, J.H. Zhang, J., Turco, G., Petricka, J.J. Foret, J., Hartemink, A.J., Gordân, R., Megraw, M., Brady, S.M. and P.N. Benfey.** 2016. Establishment of expression in the SHORTROOT-SCARECROW transcriptional cascade through opposing activities of both activators and repressors. *Developmental Cell*, 39:585–596.

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

**Struhl, K. and E. Segal.** 2013. Determinants of nucleosome positioning. *Nature Structural Molecular Biology*, 20:267–273.

**Szemenyei, H., Hannon, M. and J.A. Long.** 2008. TOPLESS mediates auxin dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science*, 319:1384–1386.

**Szymanowska-Pułka, J.** 2013. Form matters: morphological aspects of lateral root development. *Annals of Botany*, 112:1643–1654.

**Taiz, E. and L. Zeiger.** 1998. *Plant Physiology* (Second edition). Sinauer Associates, Inc, Pp. 118-49, 458-460.

**Takatsuka, H. and M. Umeda.** 2015. Epigenetic control of cell division and cell differentiation in the root apex. *Frontiers in Plant Science*, 6:1-9.

**Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I.A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M. and N. Zheng.** 2007. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, 446:640–645.

**Terpstra, I. and R. Heidstra.** 2009. Stem cells: The root of all cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20:1089–1096.

**Tiwari, S.B., Hagen, G. and T.J. Guilfoyle.** 2004. Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell*, 16:533–543.

**Thorstensen, T., Grini, P.E. and R.B. Aalen.** 2011. SET domain proteins in plant development. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1809:407–420.

**Truernit, E., Bauby, H., Dubreucq, B., Grandjean, O., Runions, J., Barthelemy, J. and J.C. Palauqui.** 2008. High-resolution whole-mount imaging of three dimensional tissue organization and gene expression enables the study of phloem development and structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20:1494–1503.

**Ulmasov, T., Hagen, G. and T.J. Guilfoyle.** 1999. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96:5844–5849.

**Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and F. Speleman.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3:1-12.

**Vanneste, S., De Rybel, B., Beemster, G.T., Ljung, K., De Smet, I., Van Isterdael, G., Naudts, M., Iida, R., Gruissem, W., Tasaka, M., Inzé, D., Fukaki, H. and T. Beeckman.** 2005. Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 17:3035–3050.

**Vergara, Z. and C. Gutierrez.** 2017. Emerging roles of chromatin in the maintenance of genome organization and function in plants. *Genome Biology*, 18:2-12.

**Vernoux, T., Brunoud, G., Farcot, E., Morin, V., Van den Daele, H., Legrand, J., Oliva, M., Das, P., Larrieu, A., Wells, D., Guédon, Y., Armitage, L., Picard, F., Guyomarc'h, S., Cellier, C., Parry, G., Koumproglou, R., Doonan, J.H., Estelle, M., Godin, C., Kepinski, S., Bennett, M., De Veylder, L. and J. Traas .** 2011. The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Molecular System Biology*, 7:1-15.

**Verstraeten, I. and I. De Smet.** 2017. Primary Root. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

**von Wangenheim, D., Fangerau, J., Schmitz, A., Smith, R.S., Leitte, H., Stelzer, E.H.K. and A. Maizel.** 2016. Rules and self-organizing properties of postembryonic plant organ cell division patterns. *Current Biology*, 26:1–11.

**Vilarrasa-Blasi, J., González-García, M.-P., Frigola, D., Fàbregas, N., Alexiou, K. G., López-Bigas, N., Rivas, S., Jauneau, A., Lohmann, J.U., Benfey,**

**P.N., Ibañes, M. and A.I. Caño-Delgado.** 2014. Regulation of plant stem cell quiescence by a brassinosteroid signaling module. *Developmental Cell*, 30:36–47.

**Wagner, D.** Chromatin regulation of plant development. 2003. *Current Opinion in Plant Biology*, 6:20-28.

**Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S. and Y. Zhang.** 2004. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*, 431:873–878.

**Wenzel, C.L. and T.L. Rost.** 2001. Cell division patterns of the protoderm and root cap in the ‘closed’ root apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*, 218:203–213.

**Wisniewska, J., Xu, J., Seifertová, D., Brewer, P. B., Ruzicka, K., Blilou, I., Rouquié, D., Benková, E., Scheres, B. and J. Friml.** 2006. Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, 312:883.

**Xiao, J., Jin, R. and D. Wagner.** 2017. Developmental transitions: integrating environmental cues with hormonal signaling in the chromatin landscape in plants. *Genome Biology*, 18:1-14.

**Xiao, J., Lee, U. and D. Wagner.** 2016. Tug of war: adding and removing histone lysine methylation in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology*, 34:41–53.

**Yang, S., Li, C., Zhao, L., Gao, S., Lu, J. Zhao, M., Chen, C.Y., Liu, X., Luo, M., Cui, Y., Yang, C., and K. Wub.** 2015. The *Arabidopsis* SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPase BRAHMA targets directly to PINs and is required for root stem cell niche maintenance. *Plant Cell*, 27:1670–1680.

**Yao, X., Feng, H., Yu, Y., Dong, A. and W. Shen.** 2013. SDG2-mediated H3K4 methylation is required for proper *Arabidopsis* root growth and development. *PLOS ONE*, 8:1-11.

**Zentner, G.E. and S. Henikoff.** 2013. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature Structural Molecular Biology*, 20:259–266.

**Zhang, Y., Jiao, Y., Liu, Z., and Y. Zhu.** 2015. ROW1 maintains quiescent centre identity by confining WOX5 expression to specific cells. *Nature Communications*, 6:1–8.

**Zhu, Y., Dong, A., Meyer, D., Pichon, O., Renoud, J.P., Cao, K., and W. Shena.**  
2006. *Arabidopsis* *NRP1* and *NRP2* encode histone chaperones and are required for maintaining postembryonic root growth. *Plant Cell*, 18:2879–2892.