



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Morfogénesis temprana del primordio de la raíz lateral en
Arabidopsis thaliana.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

HÉCTOR HUGO TORRES MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Joseph Dubrovsky
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Enrique Salas Vidal
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dr. Luis Alfredo Cruz Ramírez
[Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad](#)

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 2020



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.

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis se llevó a cabo en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología-UNAM, bajo la dirección del Dr. Joseph Dubrovsky.

Este proyecto fue financiado por la beca de Doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con No. de registro 420958 y por los Proyectos de CONACyT (A1-S-9236) y (237430), así como, por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)-UNAM (IN200818).

Se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP)-UNAM por el financiamiento para la asistencia a un congreso nacional y uno internacional.

A mi tutor el Dr. Joseph Dubrovsky, por darme la oportunidad de participar en un proyecto tan interesante además de promover mi formación como científico con una perspectiva crítica. También agradezco su apoyo incondicional bajo cualquier circunstancia, incluyendo situaciones personales.

A los miembros del comité tutor, el Dr. Luis Alfredo Cruz Ramírez y el Dr. Enrique Salas Vidal, por sus valiosos comentarios y sus críticas constructivas que permitieron llevar a cabo un proyecto científico de calidad, así como el desarrollo de mi carrera científica.

A los miembros del jurado de examen de grado, M. en C. María del Carmen Monserrat Quinto Hernández, Dr. José Luis Reyes Taboada, Dr. Mario Alberto Serrano Ortega, Dr. Ángel Arturo Guevara García y Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas, por sus atinados comentarios y correcciones para aumentar la calidad de este trabajo, así como por contribuir en mi formación para redactar un documento científico como el presente.

A nuestros colaboradores, El Dr. Paúl Hernández Herrera y al Dr. Gabriel Corkidi Blanco, por valiosa contribución en el desarrollo de herramientas computacionales para el procesamiento y análisis de imágenes, que fueron una parte muy importante en este proyecto. Prácticamente sin su participación no se hubiera podido llevar a cabo.

A los integrantes del grupo de Biología del Desarrollo de la Raíz, Dra. Svetlana Shishkova, Dra. Selene Napsucialy Mendivil, Dr. Gustavo Rodríguez Alonso, Dra. Blanca Jazmín Reyes Hernández, por todas las críticas constructivas y discusiones, dentro y fuera del laboratorio, que ayudaron a mejorar el proyecto y mi formación como científico.

Al apoyo técnico en el laboratorio, Dra. Selene Napsucialy Mendivil y I.B.I. Marcela Ramirez Yarza por su apreciable ayuda en la generación de líneas transgénicas con marcajes fluorescentes tanto por cruzas entre diferentes líneas como por técnicas de transformación genética, además de otros aspectos básicos del laboratorio.


Al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada-UNAM y al personal técnico, Dr. Jaime Arturo Pimentel Cabrera, M. en C. Andrés Martín Saralegui Amaro y Q.F.B. Xóchitl del Carmen Alvarado Affantranger. Especialmente al Dr. Jaime Arturo Pimentel Cabrera por su paciencia para explicarme varios aspectos del procesamiento y análisis de imágenes.

A la Unidad de Computo del IBT-UNAM, particularmente al M. en T.I. Juan Manuel Hurtado Ramírez, por todo su apoyo en la instalación y mantenimiento del equipo de cómputo tanto del microscopio como un equipo especializado en el procesamiento y análisis de imágenes.

Al resto de mis amigos de la UNAM campus Morelos, Dr. Julio Guerrero, Dr. Ramcés de Jesús García, Dr. Enrique Raga Carbajal, M. en C. Claire Rioualen, M. en C. Pavel Andrei Montero Domínguez, Dra. Laura Gómez Romero, M. en C. Alfonso Sierra Sarabia, M. en C. Nicholay Díaz, entre otros, por hacer más agradable esta etapa del posgrado 😊

DEDICATORIAS

A mi familia, a mis padres y hermanos, que siempre creyeron en mí y me apoyaron hasta el final del posgrado, a pesar de las diversas dificultades a las que me enfrenté. Muchas gracias por todo su apoyo y cariño.

A Alejandra Mejía Caballero, muchas gracias por acompañarme en este camino, por tu amor y comprensión que siempre me brindaste, además de tus comentarios que siempre me ayudaron a mejorar tanto personal como profesionalmente. Muchas gracias Alita. 

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Desarrollo de la Raíz Primaria en <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
1.2. Desarrollo de Raíces Laterales en <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
1.2.1. Bases Celulares del Desarrollo de Raíces Laterales.....	8
1.2.2. Regulación Hormonal por Auxina y Control Molecular del Desarrollo de Raíces Laterales	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	17
4.1. Objetivo General	17
4.2. Objetivos Particulares	17
5. MÉTODOS	18
5.1. Condiciones para la incubación de las plántulas	18
5.2. Líneas transgénicas marcadoras utilizadas para los experimentos “time-lapse”	18
5.3. Condiciones para la adquisición de imágenes y método de “caza” de los PRLs	19
5.4. Análisis del número de células en el anillo del periciclo	20
5.5. Experimentos con tratamientos farmacológicos (NPA y oryzalina) y para la visualización del floema	20
5.6. Procesamiento y análisis de imágenes	21
5.7. Gráficas y análisis estadístico	21
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
6.1. Desarrollo de un método para analizar la morfogénesis temprana del PRL	22
6.2. Análisis de los datos 4D confirman que el tipo de iniciación unicelular longitudinal es el escenario más común	27
6.3. Después de la división celular de la primera célula fundadora (CF0), las células del periciclo vecinas son reclutadas como CFs del PRL	32
6.4. La auxina participa en el reclutamiento de las CFs durante la morfogénesis temprana del PRL	38
6.5. El campo morfogénico del PRL está delimitado por filas celulares del periciclo en frente del polo del floema	43

7. CONCLUSIONES	48
8. PERSPECTIVAS	49
9. BIBLIOGRAFÍA	52
10.1. Figuras Suplementarias	63
10.2. Datos primarios del análisis de reclutamiento	63
10.3. Publicaciones	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zonas de desarrollo y tejidos de la raíz en <i>A. thaliana</i>	6
Figura 2. Iniciación del primordio de raíz lateral en <i>A. thaliana</i>	8
Figura 3. Los seis principales pasos para la formación de una nueva RL a lo largo de la RP	9
Figura 4. Etapas de desarrollo y adquisición de tipo celular durante la morfogénesis del PRL	10
Figura 5. Actividad del promotor de respuesta a auxina DR5 durante el desarrollo del PRL.....	15
Figura 6. Esquema del método de “caza de los PRLs”	24
Figura 7. Diferentes tiempos (t y $t + 1$) y ángulos de visión de la interfaz del “plugin” HottC	25
Figura 8. Ejemplo representativo del rastreo del linaje celular (círculos verdes) de un PRL de la línea transgénica p35S::H2B-RFP pUBQ10::NPSN12-YFP realizado con el “plugin” HottC.....	26
Figura 9. Ejemplo del análisis de los linajes celulares rastreados de un PRL con el “plugin” HottC	27
Figura 10. Características de los PRLs obtenidos a partir de los experimentos de “caza de los PRLs”	28
Figura 11. No hay diferencias entre los PRLs iniciados por el tipo de iniciación unicelular y bicelular longitudinal.....	30
Figura 12. Después de la activación de las CF0 nuevas, las CFs vecinas son reclutadas	34
Figura 13. Dinámica de reclutamiento de las CFs.....	36
Figura 14. Análisis del reclutamiento de las CFs en la línea transgénica pDR5rev::3XVENUSN7 pUBQ10::NPSN12-YFP a partir de experimentos tipo “time-lapse” durante 24 h.....	39
Figura 15. Análisis de la señalización y transporte de auxina en el reclutamiento de las CFs.....	42
Figura 16. Secciones transversales de la RP en una zona cercana a un PRL.....	45
Figura 17. Análisis de los límites transversales del campo morfogénico	46
Fig. Sup. 1. Esquema de la terminología de los ejes y las direcciones usados en este estudio	63
Fig. Sup. 2. Esquema de un PRL y sus dominios observados desde una vista lateral (VL).....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Duración del ciclo celular de la progenie de la CF0 durante la iniciación del tipo unicelular y bicelular	31
Tabla 2. Análisis de la asimetría de la división celular de las CF0 de los PRLs iniciados del tipo unicelular	32
Tabla 3. Dinámica de propagación de la señal de respuesta a auxina analizando la actividad del promotor DR5, en plantas no tratadas y tratadas con ácido N-1-Naftilftalámico (NPA) y oryzalina	42

RESUMEN

El sistema radical en plantas espermatofitas se establece por la formación iterativa de nuevas raíces laterales (RLs). Sin embargo, aún no se entienden completamente las bases celulares de la morfogénesis temprana del primordio de la raíz lateral (PRL). En la planta modelo, *Arabidopsis thaliana*, el PRL es iniciado a partir de células del periciclo de la raíz parental, el cual es un tejido interno que forma parte del cilindro vascular. Algunas células del periciclo, localizadas en frente del polo del xilema (periciclo xilemático), se especifican como células fundadoras (CFs) y dan lugar al PRL. Se sabe que tres filas de CFs adyacentes lateralmente en el plano transversal, participan en la formación de un PRL. Como consenso, se considera que hay dos CFs en cada una de las filas celulares en el plano longitudinal (iniciación longitudinal bicelular) que dan origen a un PRL. Sin embargo, también ha sido demostrado que una sola CF a lo largo de la raíz puede dar origen al PRL. Además, fue propuesto que, en las etapas tardías del desarrollo de un PRL, participan un mayor número de filas de CFs, sugiriendo que existe un reclutamiento de CFs después de los primeros eventos de iniciación del PRL.

En este trabajo se analizó la morfogénesis temprana del PRL en *A. thaliana* mediante experimentos de tipo “time-lapse”, usando microscopía de laser confocal de barrido en raíces vivas. Para dilucidar específicamente los patrones y la secuencia de la participación de las CFs en el desarrollo de los PRLs, se llevaron a cabo experimentos adquiriendo imágenes en 3D a diferentes tiempos (4D). Para identificar las primeras CFs especificadas que dan origen a un PRL, se desarrolló un nuevo enfoque metodológico, llamado “caza de PRLs”. Este enfoque consiste en el escaneo de una porción de la raíz primaria, correspondiente a una ventana de tiempo del desarrollo, donde hay una probabilidad de que ocurra la iniciación del PRL. También, se desarrolló una serie de protocolos que permitieron seguir el linaje celular a partir de las CFs y construir los árboles genealógicos celulares de su progeie.

Con el uso de una línea transgénica doble (*p35S::H2B-RFP pUBQ10::NPSN12-YFP*) que permite visualizar los núcleos y las membranas plasmáticas, demostramos que en la mayoría de los casos los PRLs son iniciados a partir de una sola CF en el plano longitudinal y muy pocos eventos de iniciación fueron del caso bicelular longitudinal. Sin embargo, por medio del análisis de patrones de proliferación celular y morfológico, no se encontró diferencia entre los PRLs iniciados a partir de una o dos células en el plano longitudinal. Además, se encontró que la primera CF, llamada CF₀, recluta células del periciclo vecinas para especificarlas como CFs. Una vez que CF₀ comienza a dividirse, el primer reclutamiento ocurre en un promedio de 0.8 h, mientras que los reclutamientos

sucesivos ocurrieron en 2.2 y 4.4 h. Por tanto, el proceso de iniciación del PRL es gradual, muy dinámico e involucra varios pasos.

Por otro lado, se estableció que el reclutamiento de las CFs es dependiente del transporte y la señalización de auxina, mediante el análisis de la actividad del promotor de respuesta a auxina *pDR5rev::3XVENUS-N7* y de la respuesta al tratamiento farmacológico con un inhibidor del transporte polar de auxina, el ácido N-1-Naftilftalamico (NPA). Cuando las plantas de esta misma línea transgénica fueron tratadas con un inhibidor de la polimerización de microtúbulos y un bloqueador de la mitosis (oryzalina), la señal de la respuesta a auxina se propagó hacia presuntas CFs de manera similar a las plantas no tratadas. En línea con lo anterior, el análisis de la expresión de la proteína de transporte de eflujo de auxina *pPIN1::PIN1-GFP* mostró también un patrón gradual de reclutamiento de CFs. Este reclutamiento de CFs, mediado por auxina, establece un campo morfogenético en donde las CFs de las filas celulares periféricas en el plano transversal tienen una menor respuesta a auxina. Lo anterior está asociado a un potencial menor de proliferación, en comparación con las células ubicadas en la parte central del PRL. Las últimas CFs reclutadas son las células del periciclo frente al polo del floema, el periciclo floemático (PF), las cuales comúnmente no se considera que participan en la formación del PRL. El potencial de proliferación de estas CFs es limitado, pero su reclutamiento parece ser esencial para la formación de la conexión floemática entre la raíz parental y la futura RL.

En este trabajo se dilucidó la existencia de un campo morfogenético a partir del cual se desarrolla una RL. Este campo se establece por el proceso de reclutamiento gradual de las CFs, involucrado en la iniciación y la morfogénesis temprana del PRL, el cual depende de la señalización y del transporte de auxina.

SUMMARY

In spermatophytes plants, the root system is established mainly by the iterative formation of new lateral roots (LRs). However, the cellular bases of early morphogenesis of lateral root primordium (LRP) is still not fully understood. It has been established in the model plant, *Arabidopsis thaliana*, that the LRP is initiated from parental root pericycle, an internal tissue which is a part of vascular tissues. Some pericycle cells adjacent to the xylem, xylem pole pericycle, are specified as founder cells (FCs) that give rise to a new LRP. It is known that three laterally adjacent FCs, in a transverse view, participate in LRP formation. The predominant point of view considers that there are two FCs in each cell file in a longitudinal plane that start an LRP formation (bicellular longitudinal initiation). However, it has also been demonstrated that one FC along the root can also give rise to an LRP. Furthermore, it was proposed that a greater number of FC files participate in LRP formation at later stages, suggesting that there is a recruitment of new FCs after LRP initiation.

In this study, the early LRP morphogenesis of *A. thaliana* was analyzed in detail. We carried out time-lapse experiments using Confocal Laser Scanning Microscopy. We used 3D imaging in time (4D) to decipher patterns and sequences of FCs participation in LRP development. To this end we designed an approach of “confocal hunting” to identify the first specified FCs that start LRP initiation. This approach permits the scanning of a primary root portion corresponding to a developmental window where LRP initiation could be predicted statistically. Furthermore, we developed new protocols that allowed us to track cell lineages of FCs and to construct genealogic trees of FC progenies.

With the use of *p35S::H2B-RFP pUBQ10::NPSN12-YFP* double transgenic line that permits visualization of nuclei and plasma membranes, we demonstrated that in most cases the LRPs are initiated from a single FC in the longitudinal plane. The rest of LRP initiation events were of bicellular longitudinal type. However, morphological and cell proliferation pattern analyses did not show differences between the two types of LRP initiation. We established that thereafter, the first FC, called, FC0, recruited neighboring pericycle cells as FCs. Once FC0 starts to divide, the first recruitment took place on average 0.8 h later, while subsequent recruitments took place 2.2 and 4.4 h later. Hence, the LRP initiation is a gradual and dynamic multistep process.

On the other hand, using auxin response reporter *pDR5rev::3XVENUS-N7* and the pharmacological treatment with N-1-Naphthylphthalamic acid (NPA), an auxin polar transport inhibitor, we established that FC recruitment depends on auxin signaling and transport. Furthermore, when plants of the same transgenic line were treated with oryzalin, a microtubule polymerization inhibitor, and thus mitotic inhibitor, the auxin response signal

was spread to presumptive FCs similar to that in untreated plants. In line with this, analysis of auxin efflux carrier *pPIN1::PIN1-GFP* expression showed also a gradual FC recruitment pattern. Furthermore, this auxin-mediated FC recruitment created a morphogenetic field where peripheral FC files in the transverse plane had lower cell proliferation potential compared to centrally located cell files. The last recruited FCs were from pericycle adjacent to the phloem pole, phloem pole pericycle (PPP), which is commonly considered not to participate in the formation of the PRL. The cell proliferation potential of these cells was limited but their recruitment was apparently essential for the formation of phloem connection between parent and lateral root.

This work allowed us to establish the existence of a morphogenetic field from which an LR develops. This field is established by the gradual recruitment process of FCs involved in LRP initiation and early morphogenesis, which depends on auxin signaling and transport.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las principales características del desarrollo de las plantas es la formación continua de órganos que mayormente ocurre durante el periodo post-embriionario, mientras que en los animales la mayoría de los órganos se desarrollan durante la embriogénesis (Gilbert, 2010). En el estudio de la biología del desarrollo de plantas, *Arabidopsis thaliana* es actualmente el modelo experimental más utilizado. Durante la embriogénesis de *A. thaliana*, únicamente, se desarrollan algunos órganos rudimentarios, como los cotiledones (hojas embrionarias), la plúmula (brote embrionario) y la radícula (raíz embrionaria), que desempeñan un papel importante durante las primeras etapas de la germinación de la semilla. Además, durante la embriogénesis, también se establecen poblaciones de células que formarán eventualmente dos meristemos apicales. Uno de éstos es el meristemo apical del brote que dará origen a todos los órganos aéreos. El otro es el meristemo apical de la raíz (MAR), el cual se establece en la parte distal de la radícula y generará todo el sistema radical (Leysner, 2009; Westhoff, 1998). En *A. thaliana*, el sistema radical se compone de una raíz primaria (RP), que se origina a partir de la radícula, de las raíces laterales (RLs), que se desarrollan a partir de la raíz primaria o de otras raíces laterales, y de raíces adventicias, que se desarrollan a partir de otros órganos distintos a una raíz (Leysner, 2009; Westhoff, 1998).

1.1. Desarrollo de la Raíz Primaria en *Arabidopsis thaliana*

Una vez que la radícula emerge de la semilla durante la germinación, la RP mantiene su crecimiento por la actividad proliferativa del MAR y subsecuentemente, por expansión y diferenciación celular (Leysner, 2009; Westhoff, 1998). Específicamente, en la RP se pueden reconocer tres zonas de desarrollo, con vista en un plano longitudinal, además de la cofia en la punta de la raíz, considerada principalmente como una estructura de protección (Dolan et al., 1993; Ivanov & Dubrovsky, 2013; Scheres et al., 2002) (Fig. 1B). En el ápice de la raíz se encuentra el MAR. Esta zona está compuesta de dos dominios, el dominio de proliferación, en la parte más distal del ápice y el dominio de transición, en la parte proximal (Fig. 1 B). En el dominio de proliferación, las células aumentan su tamaño para posteriormente dividirse, mientras que en el dominio de transición las células ya no se dividen, o lo hacen con muy baja probabilidad, pero conservan la misma tasa relativa de crecimiento, como en el dominio de proliferación (Ivanov & Dubrovsky, 2013; Lavrekha et al., 2017; Pacheco-Escobedo et al., 2016). Dentro del dominio de proliferación, se puede reconocer un grupo de células llamado centro quiescente (CQ) (Fig. 1 C y D), cuyas células presentan una menor frecuencia de proliferación celular y que tienen como función mantener en un estado indiferenciado y activo al MAR (Dolan et al., 1993; Drisch & Stahl, 2015; Scheres et al., 2002). Conjuntamente, existe un grupo de células conocidas como células iniciales o troncales que rodean al CQ. Este grupo de células dan origen a los

diferentes tejidos que componen la raíz (Doerner, 2003; Dolan et al., 1993; Drisch & Stahl, 2015; Scheres et al., 2002). La segunda zona de desarrollo, subsiguiente al MAR, es la zona de elongación (Fig. 1 B), aquí las células experimentan una expansión celular rápida, alcanzando una longitud de entre 20 y 30 veces más con respecto a su tamaño inicial, una vez que fueron desplazadas del MAR (Dolan et al., 1993; Ivanov & Dubrovsky, 2013; Scheres et al., 2002). La tercera y última zona de desarrollo es la zona de diferenciación (Fig. 1 B), en donde las células ya salieron de la zona de elongación y adquirieron su madurez; esta zona es fácilmente reconocible por la presencia de pelos radicales en las células de la epidermis (Dolan et al., 1993; Ivanov & Dubrovsky, 2013; Scheres et al., 2002).

Por otro lado, en un plano transversal, la RP presenta una simetría radial. En sentido del exterior al interior, se encuentran los tejidos epidermis, cortex, y endodermis, arreglados como anillos concéntricos (Fig. 1 C y D). De manera interna a estos tejidos, se encuentra la estele que tiene como capa más externa, en forma de anillo al periciclo que, encierra a los tejidos de xilema, floema y parénquima vascular (Dolan et al., 1993; Scheres et al., 2002). Particularmente, tanto los elementos del floema como del xilema se encuentran dispuestos en haces vasculares distribuidos polarmente dentro de la estele (Fig. 2 A). Debido a que existen dos polos del xilema y, perpendicular a éstos, dos polos del floema, las raíces de *A. thaliana* son conocidas como diarcas (Dolan et al., 1993; Parizot et al., 2008).

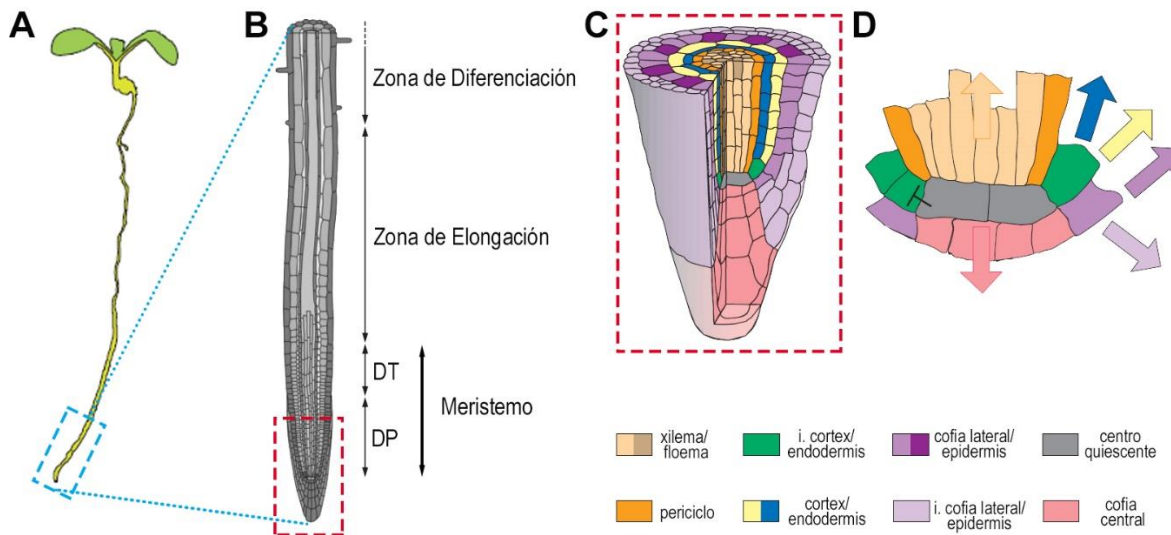


Figura 1. Zonas de desarrollo y tejidos de la raíz en *A. thaliana*

(A) Esquema de una plántula de *A. thaliana*. (B) Zonas de desarrollo de la RP. (C) Representación de una magnificación del recuadro delineado en rojo en (B). (D) Centro Quiescente y las células iniciales alrededor. DP dominio de proliferación y DT dominio de transición. (A) Imagen modificada de Ten Hove et al., (2015), (B) Imagen modificada de Benfey et al., (2010), (C) y (D) Imágenes modificadas de Benfey & Scheres (2000).

En *A. thaliana*, el periciclo también ha sido propuesto como un tejido funcionalmente diarco, es decir, que existen dos subtipos celulares como parte del anillo del periciclo, que dependiendo de su ubicación con respecto a los polos del xilema o del floema, tienen características diferentes (Parizot et al., 2008). De esta manera, por un lado, se encuentran las células del periciclo adyacentes a los polos del xilema, el periciclo xilemático (PX), por otro, están las células del periciclo adyacentes a los polos del floema, el periciclo floemático (PF), además de las células en zonas intermedias (Fig. 2 A). En la zona de diferenciación temprana, se pueden notar diferencias entre ambos subtipos celulares. Las células del PX en la zona de diferenciación presentan una longitud promedio significativamente menor que las células del PF, sugiriendo que las células del PX después de haber salido del MAR han experimentado al menos una ronda de división celular más que las del PF (Beeckman et al., 2001; Dubrovsky et al., 2000; Laskowski et al., 1995; Sussex et al., 1995). El análisis del contenido de ácido desoxirribonucleico (ADN), mostró que algunas células del PX presentan núcleos de mayor tamaño, como signo de que se encuentran en fase G2 del ciclo celular, mientras que las células del PF siempre fueron encontradas en G1 (Beeckman et al., 2001). También se ha reportado que, en células del PX dentro de la zona de diferenciación, están presentes figuras mitóticas (Dubrovsky et al., 2000) no relacionadas con el desarrollo de los PRLs, así como la expresión específica de marcadores del ciclo celular, que indican la transición entre la fase del ciclo G2 y M, como *CYCLINA B1;1* (*CYCB1;1*) (Beeckman et al., 2001). Estas características están ausentes en el PF. Las células del PX presentan muchas vacuolas pequeñas y un citoplasma denso, rasgos característicos de células meristemáticas; mientras que las células del PF forman una sola vacuola grande y un citoplasma menos denso, características de células diferenciadas (Parizot et al., 2008). Todas estas características en conjunto sugieren que las células del PX mantienen su actividad proliferativa, incluso después de haber salido del MAR, a diferencia de las células del PF. Sumado a esto, también se ha identificado claramente una diferencia de identidad celular entre ambos subtipos celulares, debido al patrón de expresión de proteínas fluorescentes reporteras observado en las líneas reporteras de tipo “enhancer trap”, J0121 y Rm1007, que se expresan únicamente en células del PX (Casimiro et al., 2001; Dubrovsky et al., 2006; Laplaze et al., 2005; Parizot et al., 2008). En células del PF se ha identificado la expresión específica de proteínas reporteras de la línea “promoter trap”, s17, que representa el patrón de expresión del factor de transcripción *At2g22850* (Lee et al., 2006; Marquès-Bueno et al., 2016). En resumen, entre el PX y el PF existen diferencias importantes tanto en su actividad proliferativa, como en su identidad celular, y es comúnmente aceptado que el PF no participa en el desarrollo de los PRLs (Beeckman et al., 2001; Dubrovsky et al., 2000; Laskowski et al., 1995; Parizot et al., 2008; Sussex et al., 1995).

1.2. Desarrollo de Raíces Laterales en *Arabidopsis thaliana*

1.2.1. Bases Celulares del Desarrollo de Raíces Laterales

A nivel celular, los PRLs se desarrollan a partir del periciclo. Particularmente, algunas células del PX se especifican como células fundadoras (CFs), llamadas así por ser aquellas células que adquieren un destino celular diferente al de su célula parental y comienzan el desarrollo del PRL (Fig. 2) (Casimiro et al., 2003; Dubrovsky et al., 2001). Sin embargo, no en todas las plantas la especificación de las CFs ocurre a partir de este tipo celular; por ejemplo, en monocotiledóneas, como en *Zea mays*, solo las células del PF son las que participan en la iniciación del PRL, y esto está asociado a una máxima respuesta a la hormona auxina en las células del floema (Jansen et al., 2012).

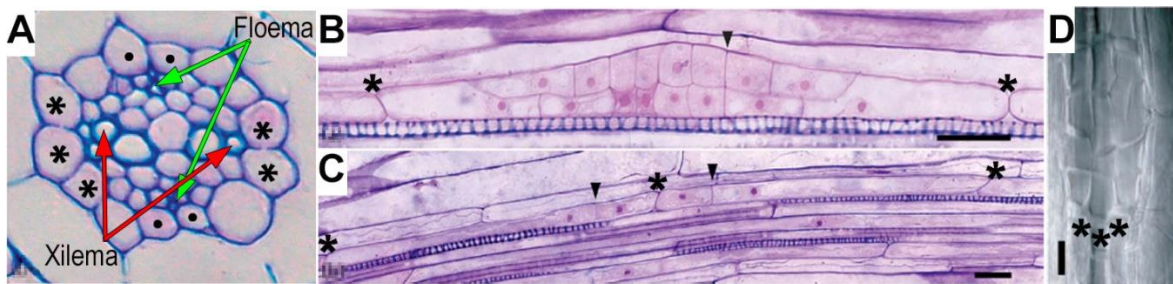


Figura 2. Iniciación del primordio de raíz lateral en *A. thaliana*

(A) Corte transversal de la raíz primaria a 6 mm de la punta. Las células del periciclo en contacto con los elementos del xilema están marcadas con asteriscos y las células del periciclo en contacto con los elementos del floema están marcadas con puntos. Los elementos del xilema están indicados con flechas rojas y los elementos del floema con flechas verdes. (B) y (C) Cortes longitudinales de la raíz de *A. thaliana*. (B) PRL formado a partir del tipo de iniciación unicelular longitudinal. Las células del PRL están encerradas por la pared celular de la CF a 6-8 mm de la punta de la raíz. (C) PRL en la etapa I formado por el tipo de iniciación bicelular longitudinal. Se muestran las primeras divisiones celulares asimétricas de dos células adyacentes longitudinalmente. En (B) y (C) los asteriscos indican las paredes anticlinales que delimitan longitudinalmente a las CFs y las cabezas de flechas indican las paredes celulares resultantes de las primeras divisiones celulares de las CFs. (D) Sección longitudinal frontal óptica de un PRL con microscopía Nomarski. Los asteriscos indican las filas celulares del periciclo involucradas en el PRL. Ver también Fig. Sup. 1. Barras = 20 μm en (B) y (C), 10 μm en (D). (A-C) Imágenes modificadas de Dubrovsky & Rost (2012), (D) Imagen modificada de Dubrovsky et al., (2001).

En *A. thaliana* la iniciación de los PRLs ocurre en un patrón acropétalo, es decir, el desarrollo de los nuevos PRLs inicia en dirección hacia el ápice de la raíz (Dubrovsky et al., 2006). Este proceso de iniciación de los PRLs está asociado a una ventana de desarrollo

que abarca un lapso de aproximadamente 10 h y a una zona de la raíz que va de 2 a 6 mm a partir del CQ (Fig. 3) (Dubrovsky et al., 2006; Dubrovsky et al., 2001).

Se ha establecido que en *A. thaliana* existen dos tipos de iniciación del PRL. Uno de estos tipos, llamado iniciación bicelular longitudinal, consiste en que dos CFs vecinas, en el plano longitudinal, se dividen simultáneamente anticlinalmente (perpendicular a la superficie más cercana y al eje longitudinal de la RP) y dan origen al PRL (Fig. 2 C y Fig. Sup. 1). El otro tipo de iniciación, llamado unicelular longitudinal, es cuando una sola CF en el plano longitudinal se divide anticlinalmente y su descendencia forma parte del PRL (Fig. 2 B y Fig. Sup. 1) (Dubrovsky et al., 2001). También se han descrito procesos subcelulares que han sido identificados como “signos” específicos del proceso de iniciación. Uno de estos es la migración de los núcleos a la pared celular en común, que ocurre durante la iniciación del tipo bicelular longitudinal (De Rybel et al., 2010). Además, durante la iniciación del PRL está documentada la expansión radial asimétrica de las CFs; las células incrementan su volumen sólo en uno de sus extremos (Vermeer et al., 2014; Vilches Barro et al., 2019). Esta asimetría de la expansión está mediada por la reorganización del citoesqueleto y por la pérdida de volumen de las células vecinas de la endodermis (Vermeer et al., 2014; Vilches Barro et al., 2019). Por otro lado, en el plano transversal, se ha establecido que en las etapas tempranas de la morfogénesis del PRL, participan CFs de tres filas celulares del PX (Fig. 2 D) (Casimiro et al., 2001; Dubrovsky et al., 2000; Dubrovsky et al., 2001; Kurup et al., 2005; Lucas et al., 2013; Parizot et al., 2008). De estas tres filas celulares, las CFs de la fila celular de en medio, producen la mayoría del linaje celular del PRL, mientras que las CFs de las dos filas celulares vecinas contribuyen a los tejidos de la RL en menor medida (Kurup et al., 2005; Lucas et al., 2013; Von Wangenheim et al., 2016). Sin embargo, en las CFs de las filas celulares vecinas ocurren divisiones celulares oblicuas (perpendicular a la superficie y en un ángulo de 45° con respecto al eje longitudinal de la RP) (Fig. Sup. 1) que permiten el cambio de simetría del PRL, de bilateral a radial (Lucas et al., 2013).

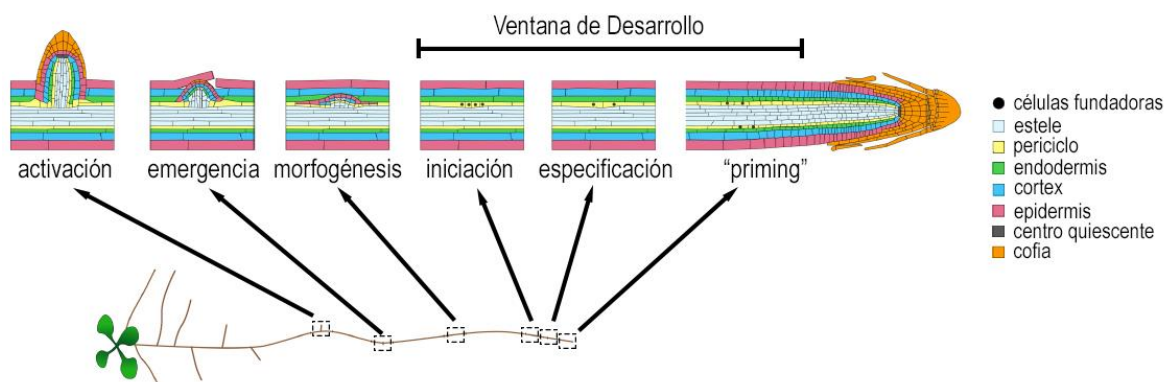


Figura 3. Los seis principales pasos para la formación de una nueva RL a lo largo de la RP
 Los diferentes tejidos de la raíz están indicados en el código de color. Imagen modificada de Banda et al., (2019).

Una vez que ha ocurrido la iniciación del PRL, el proceso de morfogénesis continúa. La morfogénesis del PRL se ha clasificado en siete etapas, y cada etapa está caracterizada por ciertos patrones de división celular y por el número de capas formadas por divisiones periclinales (paralelas a la superficie más cercana) (Fig. 3, 4 y Fig. Sup. 1) (Malamy & Benfey, 1997). Otra característica importante del proceso de morfogénesis es la aparición invariable de la forma de domo y aunque la secuencia de divisiones celulares sigue un patrón, éste no es estricto (Fig. 3 y 4) (Lucas et al., 2013). Simultáneamente a este proceso de morfogénesis, el PRL se va abriendo camino a través de los tejidos superpuestos (endodermis, córtex y epidermis) que imponen cierta resistencia mecánica al desarrollo del PRL, moldeando la morfología de éste (Lucas et al., 2013; Vermeer et al., 2014). Por último, en las etapas tardías de la morfogénesis, se lleva a cabo el establecimiento del nuevo meristemo apical de la RL y su emergencia, como una RL autónoma y funcional (Fig. 3 y 4) (Goh et al., 2016; Laskowski et al., 1995). Todos estos procesos celulares complejos están finamente regulados por señales hormonales, principalmente por auxina, que reprograma a las células, en manera dosis-dependiente, para llevar a cabo todo este programa de desarrollo (Banda et al., 2019; Du & Scheres, 2018; Torres-Martínez et al., 2019; Trinh et al., 2018).

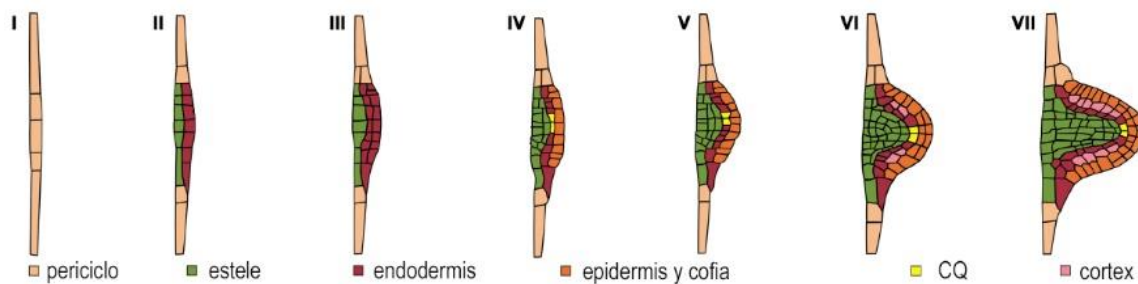


Figura 4. Etapas de desarrollo y adquisición de tipo celular durante la morfogénesis del PRL

Esquema de las diferentes etapas de la morfogénesis del PRL desde la iniciación hasta la emergencia de la RL. Los números romanos corresponden a las etapas de desarrollo definidas por Malamy & Benfey (1997). Se muestra la aparición de diferentes tipos celulares según el código de colores, revisado en Torres-Martínez (2019).

1.2.2. Regulación Hormonal por Auxina y Control Molecular del Desarrollo de Raíces Laterales

La importancia de la hormona auxina se ha reconocido ampliamente en varios procesos de desarrollo en plantas, así como sus diferentes modos de acción (Gallei et al., 2020; O. Leyser, 2018). Específicamente, se ha establecido el papel de la auxina en diferentes pasos del desarrollo de RLs en *A. thaliana*: el “priming” del periciclo, la especificación de las CFs, la iniciación del PRL, la morfogénesis del PRL, la emergencia como RL y la activación del MAR de la RL (Fig. 3) (Banda et al., 2019; Du & Scheres, 2018; Torres-Martínez et al., 2019; Trinh et al., 2018).

El primer paso propuesto es el “priming” (Fig. 3), involucrado en la regulación del posicionamiento de nuevas RLs. Este paso fue identificado inicialmente (De Smet et al., 2007) mediante el estudio de la actividad del promotor sintético de respuesta a auxina a nivel transcripcional, *DIRECT REPEAT 5 (DR5)* (Fig. 5) (Ulmasov et al., 1997). A través del análisis de la actividad del promotor *DR5* se estableció que la respuesta a auxina ocurre de forma oscilatoria en una zona cercana al ápice de la raíz, entre el dominio de transición y la zona de elongación, y que, por lo tanto, ha sido designada como la zona de oscilación (Fig. 3) (De Smet et al., 2007; Moreno-Risueno et al., 2010). Debido a que la RP continúa su crecimiento, la zona en donde ocurrió la oscilación de la actividad de *DR5*, ahora zona de diferenciación temprana de la RP, mantiene de forma estable esta actividad y se convierte en el sitio de “pre-ramificación”, en donde ocurre el desarrollo de un nuevo PRL (Moreno-Risueno et al., 2010). A nivel celular, se ha observado específicamente este nivel máximo de actividad de *DR5* en células del xilema, en donde posiblemente por medio de un mecanismo aún desconocido, sensibiliza a las células del PX adyacentes para ser competentes, las cuales posteriormente pueden ser especificadas como CFs (De Smet et al., 2007). De manera subyacente a este patrón de oscilación de la actividad de *DR5*, existe la oscilación periódica de la expresión de conjuntos de un gran número de genes en fase y anti-fase a la respuesta a auxina (Moreno-Risueno et al., 2010).

Con ayuda del reportero de respuesta a auxina *DR5* y la expresión inducible de una enzima bacteriana de síntesis de auxina, la *INDOLACETIC ACID TRYPTOPHAN MONOOXIGENASE (IAAM)* en células del periciclo, se encontró que la auxina actúa como un “disparador morfogenético”. Lo anterior es debido a que la expresión de esta enzima resulta en la acumulación local de auxina, que conlleva a la especificación de las CFs y, por tanto, al comienzo del programa de desarrollo de un nuevo PRL (Dubrovsky et al., 2008). Por lo tanto, la actividad de *DR5* sirve como un marcador molecular de la identidad de la CF, ya que otras células del periciclo vecinas no presentan la actividad *DR5*, tanto en el plano longitudinal como en el transversal (Dubrovsky et al., 2008). Específicamente, en este paso se ha descrito la acción de un módulo de la vía de señalización de auxina, en donde participan las proteínas *INDOL-3-ACETIC ACID28 (IAA28)* y sus proteínas interactoras *AUXIN RESPONSE FACTORS (ARF5, 6, 7, 8 y 19)*. Este módulo controla la expresión del factor de transcripción *GATA23*, el cual ha sido postulado como uno de los primeros marcadores moleculares de la identidad de las CFs (De Rybel et al., 2010), junto con la proteína *MEMBRANE-ASSOCIATED KINASE REGULATOR4 (MAKR4)* (Xuan et al., 2015).

Posteriormente a la especificación de las CFs, la iniciación del PRL continúa y está caracterizada principalmente por la ocurrencia de las primeras divisiones celulares asimétricas, en términos de desarrollo, es decir, aquellas divisiones que resultan en dos

células hijas con diferentes destinos celulares, produciendo linajes celulares diferentes en el PRL (De Smet & Beeckman, 2011; Dubrovsky et al., 2000). Para que este paso suceda, se ha descrito ampliamente la existencia de un segundo módulo de respuesta a auxina, en donde participan las proteínas SOLITARY-ROOT (SLR)/IAA14 junto con ARF7 y ARF19 (Fukaki et al., 2002, 2005; Vanneste et al., 2005). Este módulo regula directamente la expresión de miembros de la familia de factores de transcripción LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN/ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE (LBD/ASL), específicamente a LBD16, LBD18 y LBD33 (Berckmans et al., 2011; Feng et al., 2012; Goh et al., 2012; Lee et al., 2009, 2015, 2017; Okushima et al., 2007). A continuación, en la vía de la señalización por auxina, estos factores de transcripción tienen como genes “blanco” a algunas proteínas encargadas de la maquinaria del ciclo celular como el factor de transcripción E2Fa (Berckmans et al., 2011), CYCLINAS de tipo D (Feng, *et al.* 2012) y CYCLINA B1;1 (Okushima et al., 2007) quienes participan en estas primeras divisiones celulares. Adicionalmente, otro módulo de señalización, mediado por *SHORT HYPOCOTYL2 (SHY2)/IAA3*, opera en este paso temprano del desarrollo del PRL, controlando mecánicamente la iniciación del PRL desde las células de la endodermis adyacentes a las CFs. Esta señal de la auxina mediada por *SHY2* regula la pérdida de volumen en las células endodérmicas y esto permite la expansión radial de las CFs antes de su división celular posterior (Goh et al., 2012; Vermeer et al., 2014).

Una vez que han pasado las primeras divisiones celulares asimétricas, continúa el proceso de morfogénesis del PRL, en donde ocurren divisiones celulares con orientación controlada del plano de división celular (anticlinales, periclinales y tangenciales), dando lugar a la morfología de “domo”, característica del PRL en etapas tardías (Fig. 4) (Lucas et al., 2013; Von Wangenheim et al., 2016). Observaciones del patrón de expresión del marcador de respuesta a auxina, *DR5*, denotan la importancia que tiene esta hormona a lo largo del proceso de morfogénesis del PRL (Fig. 5) (Benková et al., 2003; Dubrovsky et al., 2008). Este patrón de respuesta a auxina ocurre principalmente debido al flujo polar de auxina mantenido por la acción conjunta tanto de las proteínas transportadoras de eflujo PIN-FORMED1 (PIN1), PIN3, PIN4, PIN6, PIN7 (Benková et al., 2003; Marhavý et al., 2014) como de las proteínas transportadoras de influjo AUXIN1 (AUX1) y LIKE-AUX3 (LAX3) (Marchant et al., 2002; Swarup et al., 2008). Este patrón de la respuesta a auxina muestra un nivel máximo en una región correspondiente a la localización prospectiva del CQ a partir de la etapa III de morfogénesis del PRL (Fig. 4 y 5 D) (Dubrovsky et al., 2008). Lo anterior se ha corroborado con el uso de marcadores específicos de identidad del CQ, en donde se ha demostrado que este tipo celular se especifica en esta misma región del PRL, correspondiente a la máxima respuesta a auxina y en etapas posteriores a la III, dando lugar al comienzo del establecimiento del CQ y a las células iniciales del futuro MAR (Goh et al., 2016). Por otra parte, la expresión de los factores de transcripción PLETHORA (PLT) de la familia APETALA2 (AP2), es importante también para la restricción de la señal de

respuesta a auxina al dominio central del PRL (Fig. Sup. 2), controlando la expresión y la localización apropiada de PIN1 y PIN3, así como la correcta orientación del plano de división celular (Du & Scheres, 2017). Interesantemente, la expresión de los factores de transcripción PLT depende del mismo módulo de respuesta a auxina IAA14-ARF7 y ARF19 (Hofhuis et al., 2013). Este mismo módulo induce la expresión de otro factor de transcripción de la misma familia AP2, PUCHI, que en conjunto con LBD16 y LBD18 es requerido para el establecimiento del patrón correcto de las orientaciones de las divisiones celulares durante las diferentes etapas de la morfogénesis del PRL, además de la delimitación de los bordes flanqueantes del PRL (Fig. Sup. 2), en plano longitudinal (Hirota et al., 2007; Kang et al., 2013). Por último, durante este paso de morfogénesis, existe un tercer módulo de acción de respuesta a auxina que es secuencial y parcialmente complementario al módulo IAA14-ARF7 y ARF19. Este módulo es controlado por el represor BONDELOS/IAA12 y el factor de transcripción MONOPTEROS/ARF5 (De Smet et al., 2010).

El PRL tiene que abrirse camino a través de los tejidos superpuestos de la raíz parental, permitiendo la emergencia de la nueva RL, lo cual ocurre simultáneamente a la morfogénesis. Para que este paso ocurra, también se han descrito una serie de mecanismos, regulados por la señalización de auxina que permiten el acomodamiento espacial de las células de los tejidos superpuestos, por medio de la remodelación de sus paredes celulares. Durante este paso, se ha señalado el papel importante del transportador de influjo LAX3, el cual junto con PIN3, permite y mantiene el flujo de auxina entre el ápice del PRL y los tejidos superpuestos de la raíz parental en donde, a través de la señalización por esta hormona, se regula la expresión de proteínas remodeladoras de la pared celular (Péret et al., 2013; Swarup et al., 2008). Específicamente, río abajo de la señalización de la auxina, importada por LAX3, se induce la expresión de los factores de transcripción LBD16 y LBD18 (Lee et al., 2015), que a su vez promueven la expresión de proteínas no catalíticas, como la EXPANSINA14 (EXP14), la EXP4 y la EXP17, que participan en el relajamiento de la pared celular promoviendo la separación de las células de los tejidos superpuestos (Lee et al., 2013; Lee & Kim, 2013). En paralelo a la regulación de la actividad de las EXPANSINAS, el módulo IAA14-ARF7 y ARF19, en combinación con el influjo de auxina mediado por LAX3, controla la expresión de una vía que se lleva a cabo por la señalización del péptido DEFICIENT IN ABSCISSION (IDA) y sus respectivos receptores cinasas HAESA (HAE) y HAESA-LIKE2 (HSL2) en los tejidos superpuestos. Esto conlleva a la expresión de las enzimas poligalacturonasas (PGs) que hidrolizan la pectina de la lámina media de la pared celular de los tejidos superpuestos, permitiendo el paso del PRL a través de éstos (Kumpf et al., 2013).

Por otro lado, recientemente se ha resaltado la importancia que tienen las especies de oxígeno reactivas (ROS, por sus siglas en inglés), como super óxido (O_2^-) y peróxido de

hidrógeno (H_2O_2) durante el desarrollo y emergencia del PRL. Particularmente, su participación en la remodelación de la pared celular de los tejidos de la raíz parental superpuestos al PRL y por lo tanto promoviendo la emergencia de la RL (Manzano et al., 2014; Orman-Ligeza et al., 2016). Se ha establecido que la auxina, importada por LAX3, induce la expresión de un grupo de enzimas, las RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGS (RBOH) en los tejidos superpuestos, en donde se lleva a cabo la acumulación de ROS, principalmente de H_2O_2 , en la lámina media, que participa en la remodelación de las paredes celulares promoviendo la separación de estos tejidos durante la emergencia de la RL (Orman-Ligeza et al., 2016). Sin embargo, las ROS no solo controlan el desarrollo de los PRLs por su papel en la relajación de las paredes celulares de los tejidos superpuestos y en la emergencia del PRL, sino también en la regulación de los procesos intrínsecos de la morfogénesis del PRL. Se ha establecido el papel del factor de transcripción MYB DOMAIN PROTEIN 36 (MYB36) que se expresa en el dominio basal central y flanqueante del PRL (Fig. Sup. 2) a partir de la etapa IV de la morfogénesis en adelante (Malamy and Benfey, 1997). En esta zona MYB36 activa la expresión de la enzima PEROXIDASE 9 (PER9) que regula el balance de ROS, particularmente de H_2O_2 , y esto está asociado con la transición de un estado proliferativo a un estado de diferenciación en las células de estos dominios del PRL. De esta manera, las ROS participan en la adquisición de la morfología característica de domo del PRL, de etapas intermedias hacia adelante (Fernández-Marcos et al., 2017). Otro ejemplo de la participación de ROS en la regulación de la morfogénesis del PRL fue reportado recientemente por Shukla et al., (2019). En este trabajo se demuestra la aparición un microambiente hipóxico (bajos niveles de O_2) a partir de la etapa IV en adelante de la morfogénesis del PRL (Malamy and Benfey, 1997). El bajo nivel de O_2 fue monitoreado a través de la actividad del promotor del gen *PLANT CYSTEINE OXIDASE 1*, en la línea transgénica *pPCO2::GFP-GUS*, la cual principalmente se localizó en el dominio basal flanqueante y central del PRL (Fig. Sup. 2). Los niveles bajos de O_2 permitieron la estabilización de los factores de transcripción ETHYLENE RESPONSE FACTORS-GROUP VII (ERF-VII) en estos dominios del PRL, los cuales abatieron la expresión de genes de respuesta a auxina *LBD16*, *LBD18*, y *PUCHI*. De esta manera, las condiciones hipóxicas controlan la progresión del proceso de morfogénesis en etapas tardías del PRL, y así regulan el tiempo de emergencia y el espaciamiento correcto de las RLs a lo largo de la RP (Shukla et al., 2019). Todas estas evidencias en conjunto denotan la importancia que tienen las ROS durante diferentes pasos del desarrollo del PRL, así como su interacción con la señalización de auxina durante este proceso organogénico.

Además de la auxina existen otras hormonas que participan en la morfogénesis del PRL (Torres-Martínez et al., 2019). Sin embargo, en este proyecto no fue estudiado su papel. En resumen, este trabajo está enfocado en los eventos celulares que ocurren durante los pasos de la iniciación y la morfogénesis temprana del PRL, así como el papel de la auxina en dichos procesos.

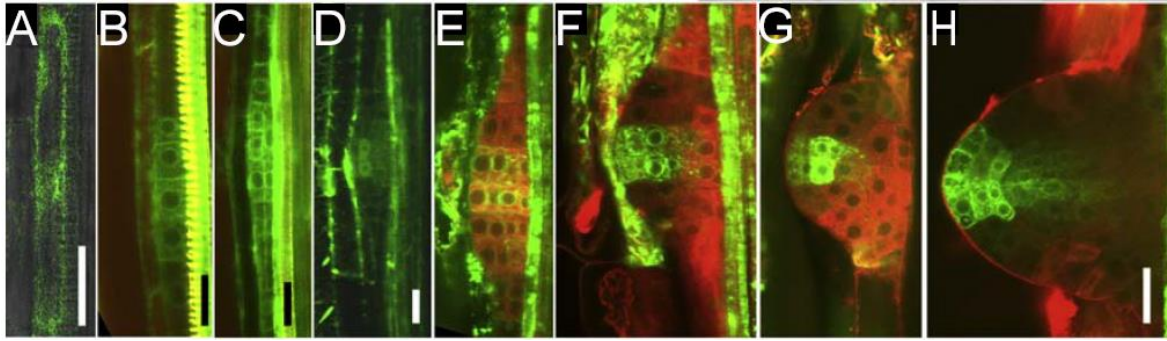


Figura 5. Actividad del promotor de respuesta a auxina *DR5* durante el desarrollo del PRL

(A) Presunta CF. (B) PRL en la etapa I. (C) PRL en la etapa II. (D) PRL en la etapa III. (E) PRL en la etapa IV. (F) PRL en la etapa V. (G) PRL en la etapa VI. (H) RL recién emergida. Imágenes obtenidas por microscopía confocal laser de barrido. La señal en verde corresponde a la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) de la línea transgénica *pDR5rev::GFP*. La señal en rojo en (E)-(H) corresponde a una tinción con yoduro de propidio de raíces fijadas. Barra = 20 μ m. Imagen modificada de Dubrovsky & Laskowski (2016).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de los PRLs en *A. thaliana* ha sido extensamente estudiado, así como el papel de la auxina en este proceso organogénico. Sin embargo, aún quedan algunas preguntas fundamentales sin contestar, con respecto a los primeros pasos del desarrollo, relacionados con la iniciación del PRL. Por ejemplo, se sabe de la existencia de dos tipos de iniciación celular en el plano longitudinal, bicelular y unicelular (Dubrovsky et al., 2001). Sin embargo, estudios posteriores hacen mención únicamente del tipo “bicelular longitudinal” (Casimiro et al., 2001; De Rybel et al., 2010; De Smet et al., 2007; Ramakrishna et al., 2019; Vilches Barro et al., 2019; Von Wangenheim et al., 2016) y es hasta este trabajo, que ha sido abordada la interrogante sobre ¿cuál tipo de iniciación es prevalente?. En varios trabajos en donde analizan las etapas tempranas del PRL, se utilizan sistemas experimentales en donde fuerzan la iniciación del PRL, por medio de tratamiento con auxina exógena (De Smet et al., 2008; Himanen et al., 2002, 2004; Ramakrishna et al., 2019; Vanneste et al., 2005) o, por la generación de una curvatura de la RP por graviestimulación, provocando la inducción de la iniciación del PRL en el lado convexo de la curva, debido a la acumulación de auxina en esta zona (Ditengou et al., 2008; Laskowski et al., 2008; Vilches Barro et al., 2019; Von Wangenheim et al., 2016). Estos datos sugieren que, posiblemente, los sistemas experimentales con los que se han estudiado las etapas tempranas de la morfogénesis del PRL favorecen el tipo de iniciación bicelular. Además, a través de un análisis de la duración del ciclo celular durante las etapas tempranas de la morfogénesis del PRL, en *A. thaliana*, se estimó que esta duración es en promedio de 2.7 h (Dubrovsky et al., 2001). Por lo tanto, podríamos hipotetizar que debido a que la iniciación es un proceso rápido, es posible que la iniciación de tipo bicelular pueda ser una consecuencia de la iniciación unicelular.

Como también ya fue mencionado, el desarrollo del PRL, en el plano transversal, es llevado a cabo a partir de las CFs provenientes de tres filas celulares del PX (Casimiro et al., 2001; Dubrovsky et al., 2000; Dubrovsky et al., 2001; Kurup et al., 2005; Lucas et al., 2013; Parizot et al., 2008). Sin embargo, recientemente, el análisis de los linajes celulares que participan en la morfogénesis del PRL con un enfoque 4D (3D más tiempo), demostró que el PRL puede estar formado a partir de CFs ubicadas hasta en siete filas celulares del periciclo (Von Wangenheim et al., 2016). Curiosamente, las observaciones anatómicas hechas en trabajos clásicos (Casimiro et al., 2001; Laskowski et al., 1995; Sussex et al., 1995) sugieren, de forma indirecta, que existe el proceso de reclutamiento de las CFs en filas celulares vecinas. Incluso, Casimiro et al., (2001), analizaron las etapas tempranas de la morfogénesis del PRL y describieron que la primera división celular detectable ocurrió en una fila celular del periciclo que está en contacto con el polo del xilema y, casi simultáneamente, una célula vecina en el plano transversal, también se divide asimétricamente. Posteriormente, otras filas celulares también se activan mitóticamente y participan en el desarrollo del PRL. Con base en el análisis de las dimensiones de un PRL, en el plano transversal, y su ocupación con respecto al anillo del periciclo, Sussex et al., (1995) dedujeron que el PRL proviene de hasta seis filas celulares del anillo del periciclo (en el plano transversal). En línea con lo anterior, extrapolaciones entre las medidas de la base del PRL tanto en el plano longitudinal como transversal, con la longitud de las células del PX en la zona de diferenciación temprana y el número de células en el anillo del periciclo, permitieron estimar que en la iniciación de los PRLs participan en total hasta 11 CFs (Laskowski et al., 1995). Todos estos datos en conjunto sugieren la posibilidad de que, en la morfogénesis temprana del PRL, entre una y tres filas celulares del periciclo pueden comenzar la iniciación y posteriormente se reclutan otras filas celulares del periciclo vecinas, en donde la auxina posiblemente está involucrada.

Con la finalidad de abordar estas preguntas sobre la iniciación y el proceso de posible reclutamiento de nuevas CFs, en nuestro grupo de investigación fue realizado un análisis clonal robusto en el cual se estableció que, en el plano longitudinal, de una a tres CFs pueden dar lugar a la progenie celular de una RL y que en la mayoría de los casos (70%) esto ocurre a partir de una sola CF (Dubrovsky, 2018). Además, en este mismo análisis se dedujo que el número de CFs en el plano transversal aumenta desde una célula en las etapas tempranas, a seis células en etapas tardías (Dubrovsky, 2018). Por lo tanto, este análisis también sugiere el proceso de reclutamiento de las CFs durante la morfogénesis temprana del PRL.

Estos datos en conjunto demuestran que estamos lejos de entender cómo se inicia el desarrollo de un órgano tan importante para la planta como la RL. El estado del arte del conocimiento en dicha área nos lleva a considerar la posibilidad de que, durante la

morfogénesis temprana del PRL, existe un proceso de reclutamiento de las CFs, en donde una sola célula del PX se especifica como CF y recluta a otras células del periciclo tanto de la misma fila celular como de filas celulares vecinas del periciclo. Debido a la importancia de la auxina como un disparador morfogénico en la especificación de las CFs, teóricamente, esta hormona debe de tener un papel importante en este proceso de reclutamiento. Por tanto, nos propusimos analizar, con experimentos de tipo “time-lapse”, la dinámica de este proceso de reclutamiento de las CFs en la morfogénesis temprana del PRL, así como la posible dependencia de la auxina, en este proceso.

3. HIPÓTESIS

En *A.thaliana*, la morfogénesis temprana del PRL inicia a partir de una sola CF, la cual recluta gradualmente células vecinas del periciclo y este reclutamiento está delimitado en el plano transversal por filas celulares del periciclo floemático.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Analizar la participación de las células fundadoras (CFs) durante la iniciación y la morfogénesis temprana del primordio de raíz lateral (PRL) en *A. thaliana*.

4.2. Objetivos Particulares

- 1.- Desarrollar un método que permita la detección temprana de los eventos de iniciación de los PRLs sin usar el método de inducción farmacológica (auxina exógena) o graviestimulación de la iniciación de los PRLs.
- 2.- Desarrollar un protocolo para el procesamiento y análisis de imágenes 4D adquiridas por microscopía confocal para el análisis espaciotemporal de la proliferación celular relacionada con la morfogénesis temprana del PRL.
3. Analizar cuántas células fundadoras en el plano longitudinal participan en la iniciación del PRL y establecer si existe algún patrón temporal y espacial en este proceso.
- 4.- Evaluar la duración del ciclo celular en células derivadas de las CFs durante la morfogénesis temprana del PRL.
- 5.- Determinar si existe reclutamiento de nuevas CFs, tanto longitudinal como transversal, y evaluar la dinámica y los patrones temporales y espaciales en este proceso.

6. Determinar si las células del periciclo floemático (PF) no participan en la formación del PRL como se considera en la literatura y sirven como frontera de reclutamiento en el plano transversal.
7. Determinar el papel de la auxina en el proceso de reclutamiento de las CFs durante la morfogénesis temprana del PRL.

5. MÉTODOS

5.1. Condiciones para la incubación de las plántulas

Para los diferentes experimentos “time-lapse”, se utilizaron varias líneas transgénicas (con marcadores fluorescentes) del ecotipo Col-0 de *A. thaliana*. Las plantas fueron germinadas y crecidas en cajas Petri cuadradas con medio MS 0.2X con 1% de sacarosa, 0.8% de agar y pH 5.7. Estas cajas fueron mantenidas en una incubadora con temperatura (21°C), fotoperíodo (16 h luz/ 8 h oscuridad) e intensidad luminosa controladas (105 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) por un período de hasta 5 días posteriores a la germinación (dpg). A los seis días post germinación, las plantas (cuatro) fueron transferidas a una cámara (sistema Nunc Lab-Tek II Chamber Slide), que cuenta con un cubreobjeto en el fondo, y cubiertas por un bloque de medio de cultivo, de la misma caja Petri en la que crecieron, con un grosor aproximado de 5 mm. La cámara fue sellada aplicando vaselina en los bordes de la parte superior y por último se cubrió con un portaobjetos. Antes de que el experimento iniciara, las plantas fueron mantenidas en esta cámara, en posición horizontal por 1 h, dentro de la misma incubadora con las condiciones controladas. Posteriormente, esta cámara fue puesta sobre una platina motorizada del microscopio, que permite la configuración del desplazamiento automatizado en los ejes “X, Y, Z” (partes de la compañía THORLABS INC.). Con la finalidad de mantener las condiciones ambientales óptimas para el crecimiento de las plantas, la parte aérea de la planta fue iluminada, específicamente, a través de una fibra óptica de 600 μm de diámetro FP600ERT (THORLABS INC.) acoplada a una fuente de luz LED MWWHF2, 4000 K, 16.3 mW de la misma compañía. Esta fuente de luz fue conectada a un temporizador configurado para mantener el fotoperíodo, como en la incubadora. La temperatura del cuarto del microscopio también fue controlada con la misma intención.

5.2. Líneas transgénicas marcadoras utilizadas para los experimentos “time-lapse”

Para los experimentos de “time-lapse”, se usaron plantas de la generación F1, resultantes de cruza entre diferentes líneas marcadoras enlistadas a continuación (ver también la sección de resultados). Marcador de membrana plasmática Wave 131YFP, *pUBQ10::NPSN12-YFP* (Geldner et al., 2009), marcador de núcleo *35S:H2B:RFP* (Federici et al., 2012), marcador

nuclear de células del periciclo en frente del polo del floema *pS17 (At2g22850)::H2B-2xmCherry* (Lee et al., 2006; Marqués-Bueno et al., 2016), marcador de localización subcelular de la proteína PIN1 *pPIN1::PIN1-GFP* (Benková et al., 2003), marcador de membrana plasmática en versión roja *2x35S::Lti-tdTomato* (Elsayad et al., 2016) y marcador nuclear de respuesta a auxina *pDR5rev::3XVENUS-N7* (Heisler et al., 2005).

5.3. Condiciones para la adquisición de imágenes y método de “caza” de los PRLs

Para la adquisición de imágenes 4D se usó un sistema confocal de la compañía THORLABS INC., que cuenta con una fuente laser de 488 nm. acoplada a un microscopio invertido Axiovert 200M ZEISS, con un objetivo 63x 1.2W y medio de inmersión immersol (ZEISS) con índice de refracción 1.33. Además, el microscopio está equipado con dos platinas motorizadas controladas por software (THORLABS INC.), las cuales permiten el desplazamiento de la muestra en los ejes X, Y y Z. El sistema confocal está cuenta con una fuente laser de estado sólido (diodo) con longitud de onda de 488 nm para excitar los fluoróforos correspondientes de las muestras. La señal emitida por los fluoróforos pasa a través de un espejo dicróico “long pass” de 562 nm en donde la luz de longitudes de onda mayor a 562 nm pasa a otro filtro “band pass” de 584-676 nm (para detectar la señal procedente de los fluoróforos en el espectro de luz roja). La luz reflejada por este espejo dicróico “long pass” (562 nm) es dirigida a otro filtro de emisión “band pass” de 502-547 nm (para detectar las señales provenientes del espectro de luz verde y amarillo). Cada filtro de emisión está acoplado a un módulo de dos fotomultiplicadores para detectar las señales de emisión del espectro rojo y verde de forma independiente. Otras condiciones que se ajustaron para tener una calidad de imagen e intensidad de señal de la fluorescencia suficiente, sin provocar “fotoblanqueo” fueron las siguientes: la potencia del láser fue del 10%, una apertura del “pinhole” de 200 μm y una ganancia (sensibilidad del fotomultiplicador) del 100%.

Con la finalidad de capturar el proceso completo durante la iniciación del PRL se desarrolló una nueva estrategia, denominada aquí como el método de “caza” de los PRLs. Este método consiste en lo siguiente. Se detectó el PRL más joven y se programó el microscopio de tal manera, que permitió coleccionar imágenes en campos contiguos traslapados, hasta 8 campos correspondientes a una porción de la RP aproximadamente de 1.2 mm de largo (cubriendo parte de la ventana de desarrollo del PRL), por cada 30 min durante un periodo total de 24 h. En cada campo se adquirieron pilas/“stacks” de imágenes, de 512 x 512 píxeles, en Z (en total 101 cortes ópticos con espacio de 0.5 μm entre ellos) correspondientes a un grosor de la RP de 51.5 μm . Para otros experimentos, diseñados con la finalidad de analizar todos los linajes originados durante el desarrollo completo del PRL,

se buscaron los PRLs en la etapa I y se adquirieron imágenes de cada uno de ellos en pilas de imágenes en Z (121 cortes ópticos con espacio de 0.5 μm entre ellos, abarcando un grosor total de la RP de 60.5 μm), en el mismo campo, cada 60 min por un período de 48 h.

5.4. Análisis del número de células en el anillo del periciclo

Para el análisis del número de células en el anillo del periciclo, se hicieron pilas de imágenes en Z y se reconstruyeron los cortes ópticos transversales de raíces vivas de plantas F1 de una cruce entre las líneas *pUBQ10::NPSN12-YFP* y *pS17 (At2g22850)::H2B-2xmCherry*, a 6 dpv. Para visualizar los elementos del xilema, las plántulas fueron teñidas con yoduro de propidio (IP) (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal invertido Olympus, FV1000-IX81, con láser de 488 nm para excitar la YFP, mientras que el láser 543 nm para el IP y la proteína mCherry. También se usaron los filtros BA505-525 para la señal proveniente de la YFP y BA560-660, para la señal del IP y la mCherry. Todo esto usando un objetivo 60x LUMFLN 1.3NA.

Con la misma finalidad de analizar el número de células en el periciclo, se hizo una tinción de pseudo-Schiff en plantas del ecotipo Col-0 a 6 dpv. Para esta técnica las raíces fueron fijadas en metanol al 50% y ácido acético al 10% a 4 °C durante 5 h, en seguida se llevó a cabo la tinción según la descripción hecha por Truernit et al., (2008). Posteriormente, las plantas fueron montadas en una solución de aclaración y montaje preparada a base de yoduro de sodio (Dubrovsky et al., 2009). Las plantas fueron analizadas en el sistema confocal de la compañía THORLABS INC. anteriormente descrito.

5.5. Experimentos con tratamientos farmacológicos (NPA y oryzalina) y para la visualización del floema

Para analizar la contribución de células del PF en la formación del PRL se hicieron experimentos con un rastreador del transporte simplástico en células del floema, utilizando diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.24 mg ml^{-1} , v/w (disuelta en agua) (Wright & Oparka, 1996). Para este fin se aplicó una gota de 3 μl de CFDA en una herida del cotiledón provocada con pinzas; 60 min después las plántulas fueron analizadas en el microscopio usando el sistema confocal THORLABS previamente descrito.

Para analizar el efecto del inhibidor del transporte de auxina en el reclutamiento de las CFs, se usaron el ácido N-1-Naftiltalámico (NPA) (ChemService Inc.) y el bloqueador de la mitosis, la oryzalina (ThermoFisher Scientific), para llevar a cabo experimentos de tipo “time-lapse”. Para esto se aplicó el método de “caza” de los PRLs con el uso de la línea transgénica F1 de la cruce entre *pDR5rev::3XVENUS-N7* y *pUBQ10::NPSN12-YFP*.

Para este fin, al medio de cultivo usado en los experimentos “time-lapse” se le adicionó oryzalina a una concentración final de 1 μM (la solución stock fue preparada al 5 mM en DMSO) o NPA a una concentración final de 10 μM (la solución stock fue preparada al 10 mM en DMSO).

5.6. Procesamiento y análisis de imágenes

Para el procesamiento de imágenes se usó el programa FIJI (<http://rsb.info.nih.gov/>) con el cual se construyó un “hyper-stack”, un archivo con las imágenes en 4D, a partir de todas las imágenes que se adquirieron para cada uno de los PRLs. Después se usaron varios “plugins” para corregir el desplazamiento (Parslow et al., 2014), así como varios algoritmos para la optimización de las imágenes. En algunos casos fue necesario unir imágenes de campos vecinos para usar la información de dos o tres campos debido a que el PRL se desarrolló entre estos campos, para esto usamos el “plugin” “stich pairwise” (Preibisch et al., 2009).

Para el rastreo celular fue implementada una interfaz de usuario gráfica (GUI), desarrollada en colaboración con Paul Hernández Herrera y Gabriel Corkidi Blanco (Laboratorio de imágenes y visión por computadora, IBT, UNAM). Este GUI permite visualizar en 3D los “hyper-stacks” en función del tiempo (4D), de imágenes de 2 ángulos diferentes y de 2 tiempos consecutivos, simultáneamente. Esta interfaz genera datos de la posición de cada una de las células y sus descendientes en tiempo y espacio. Posteriormente, esta información se importa a un software paraview (<https://www.paraview.org/overview/>) que permite visualizar y manipular (por medio de rotación en diferentes ángulos) la posición en tiempo y espacio de cada uno de los núcleos y los linajes celulares que se produjeron para cada PRL. Para la generación de los árboles genealógicos de un linaje celular en 2D se usó un script de programación en el software MATLAB (<https://www.mathworks.com/products/matlab.html>). Por otro lado, para analizar la señal de la respuesta a auxina, se midió el valor de los tonos grises de los píxeles en una región de interés (ROI), de 6x6 píxeles dentro de cada núcleo y afuera de los PRLs (señal del fondo), esto para poder restar el valor de los tonos grises correspondiente a los píxeles ruido.

5.7. Gráficas y análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software SigmaPlot 13 (Systat Software, San Jose, CA, USA). El número de experimentos independientes y métodos estadísticos usados en cada caso son indicados en el respectivo pie de figura y tabla, en la sección de resultados. Las gráficas fueron construidas con los softwares SigmaPlot 13 y PlotsOfData (<https://huygens.science.uva.nl/PlotsOfData/>)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Desarrollo de un método para analizar la morfogénesis temprana del PRL

La morfogénesis temprana del PRL se ha estudiado a partir de muestras fijadas, como puntos estáticos del desarrollo (Beeckman et al., 2001; Casimiro et al., 2001; Dubrovsky et al., 2000; Dubrovsky et al., 2001). Sin embargo, esta forma clásica para estudiar un proceso continuo de desarrollo no permite visualizar en tiempo real la dinámica de los procesos celulares o subcelulares que ocurren durante el desarrollo. Para estudiar el desarrollo de raíces en vivo se implementaron análisis de tipo “time-lapse” (Brumfield, 1942). Sin embargo, debido a que el periciclo es un tejido interno y a que los marcadores moleculares de identidad de las CFs no fueron identificados hasta recientemente (Dubrovsky et al., 2008; Xuan et al., 2015), fue muy complicado durante décadas hacer experimentos de tipo “time-lapse” de etapas tempranas del desarrollo del PRL.

Los primeros experimentos de tipo “time-lapse” para estudiar el desarrollo del PRL fueron realizados en nuestro laboratorio (Dubrovsky et al., 2008), en donde se estableció el primer marcador molecular de la especificación de las CFs, así como el estudio de cómo estas células participan en la formación de un PRL y el papel de la auxina en la iniciación de los PRLs. No obstante, es difícil de predecir el sitio exacto de la iniciación del PRL a lo largo de la raíz, saber cuál(es) célula(s) del periciclo va(n) a adquirir la identidad de CFs y en donde buscar los eventos tempranos de la morfogénesis del PRL (Dubrovsky et al., 2006). Debido a esto, la mayoría de los estudios se basan en la inducción forzada de la iniciación del PRL, por tratamiento farmacológico con auxina exógena (De Smet et al., 2008; Himanen et al., 2002, 2004; Laskowski et al., 1995; Ramakrishna et al., 2019; Vanneste et al., 2005). Otro enfoque para la inducción de la iniciación del PRL es por medio de la estimulación mecánica. Este consiste en la creación de una curvatura de la RP por graviestimulación, en donde el PRL se desarrolla a partir del lado convexo de dicha curvatura (Ditengou et al., 2008; Kircher & Schopfer, 2016; Laskowski et al., 2008; Lucas et al., 2008; Richter et al., 2009; Vilches Barro et al., 2019; Von Wangenheim et al., 2016). Incluso, esto puede replicarse también por el encorvamiento mecánico de la parte apical de la RP hecho a mano (Ditengou et al., 2008). Como resultado del encorvamiento, la concentración de auxina aumenta en la parte convexa de la RP (Laskowski et al., 2008) lo que provoca la inducción de la iniciación del PRL (Lucas et al., 2008). Sin embargo, es posible que el programa de desarrollo no se comporte como en condiciones intactas, debido a los artificios que se puedan generar por la inducción forzada, y esto a su vez podría resultar en un desarrollo modificado, por ejemplo, en el enriquecimiento de los avistamientos de un tipo de iniciación, el bicelular longitudinal, preferentemente. Además, está reportado que el tratamiento con auxina induce el desarrollo masivo de los primordios, sin embargo, estos se desarrollan de manera más lenta comparando con las condiciones sin tratamiento (Blakely et al., 1982).

Considerando que la iniciación inducida de los PRLs tiene o puede tener alteraciones en el desarrollo, se diseñó un nuevo método, que permitiera analizar la dinámica celular durante los eventos más tempranos de la morfogénesis del PRL, sin recurrir a una inducción forzada del programa de desarrollo. Este método, llamado “método de caza de los PRLs”, se basa en el aprovechamiento de la existencia de la ventana de desarrollo del PRL, que opera en una zona discreta de la RP (Dubrovsky et al., 2006; Dubrovsky et al., 2011). Esta ventana del desarrollo implica que después de una iniciación, la siguiente ocurre hacia el ápice en una distancia o tiempo estadísticamente predecibles (Dubrovsky et al., 2006). Para este fin, las plantas fueron colocadas en una cámara con condiciones de crecimiento controladas (ver sección de Métodos) la cual fue montada sobre las platinas motorizadas del microscopio confocal. Posteriormente se procedió a buscar el evento de iniciación del PRL más temprano, usando el campo claro del microscopio. A partir de este punto, el microscopio se programó de tal manera que permitía adquirir las imágenes a lo largo de la ventana de desarrollo, hacia el ápice de la RP (ver sección de Métodos) (Fig. 6). El objetivo de este método fue escanear (con pilas/“stacks” de imágenes en Z, en ocho campos sobrelapantes) parte de la zona correspondiente a la ventana de desarrollo, con mayor probabilidad de iniciación del PRL. Debido a que en promedio hay un milímetro de distancia entre los PRLs sucesivos (Dubrovsky et al., 2006; Dubrovsky et al., 2011), escaneamos una región correspondiente a aproximadamente 1.2 mm, desde el evento de iniciación más joven hacia el ápice. El escaneo de esta zona fue programado cada 30 min por un lapso de 24 h, lo que permitió eventualmente “atrapar” un evento más temprano de iniciación del PRL (Fig. 6). Una vez que se adquirieron las imágenes, los archivos fueron procesados y analizados (ver sección de Métodos) con un software que permitió hacer el rastreo celular en función del tiempo y del espacio, de los linajes celulares producidos a partir de las CFs (Fig. 7).

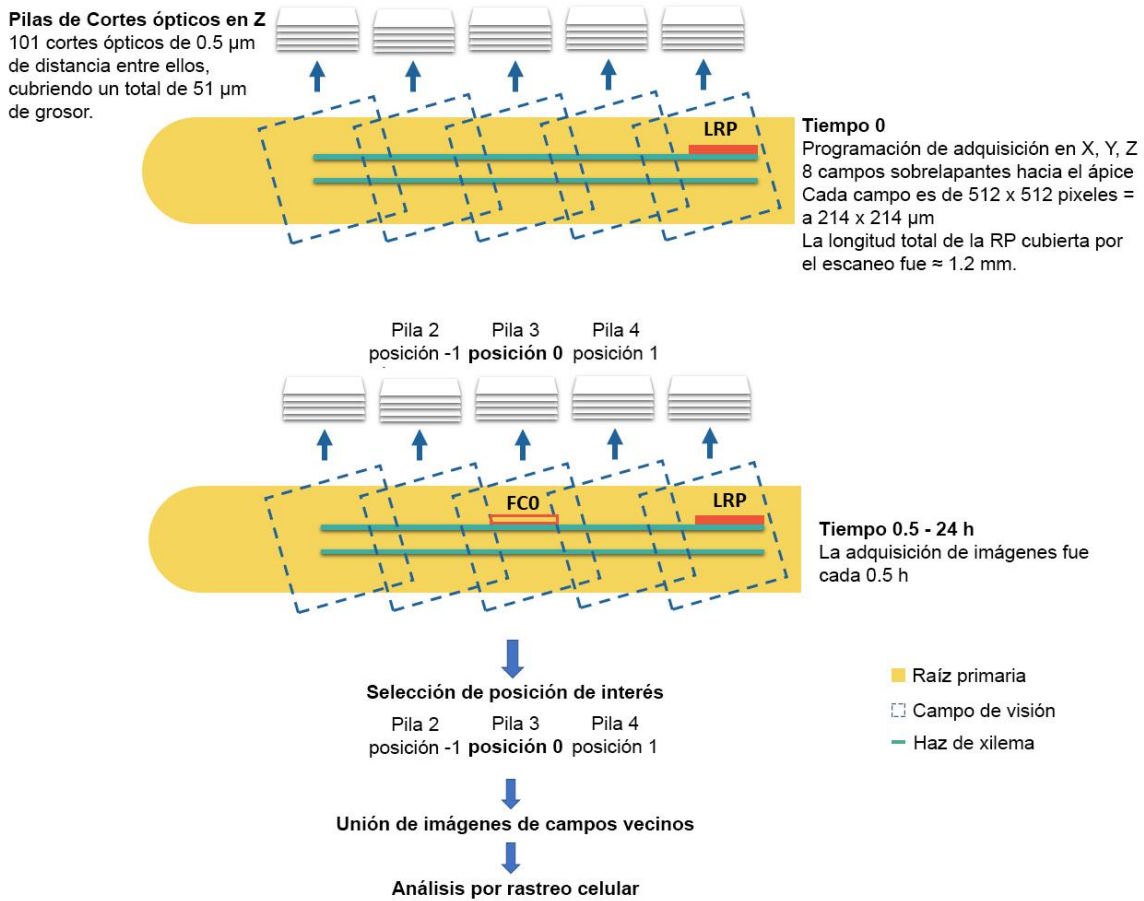


Figura 6. Esquema del método de “caza de los PRLs”

Este esquema describe los pasos a seguir para la adquisición y el procesamiento de las imágenes, con el método de caza de los PRLs.

El software para rastreo celular, “How to track Cells” (HottC) fue desarrollado en colaboración con los Dres. Hernández-Herrera y Corkidi-Blanco del laboratorio de análisis de imagen y visión por computadora del Instituto de Biotecnología (Hernández-Herrera et al., *en preparación*). HottC fue diseñado como una herramienta “plugin” para correr en la paquetería “Image J” (<http://rsb.info.nih.gov/>). HottC permite el rastreo celular manual de imágenes 3D y en función del tiempo (4D), provenientes de experimentos “time-lapse”. Otras características que permite son: (1) trabajar con imágenes en uno o dos canales; (2) visualización simultánea de dos tiempos consecutivos; (3) visualización ortogonal múltiple (“XZ” o “YZ”); (4) navegación sincronizada a través de la pila/“stack” de imágenes (los cortes ópticos en “Z”) en los dos tiempos consecutivos; (5) creación y eliminación de puntos de colores (con clics) para marcar células de interés; (6) copiar el estado actual de células marcadas al siguiente tiempo; y (7) identificar un célula precursora y el linaje

celular proveniente de ella. Además, tiene otras herramientas que la hacen una interfaz “amigable” para todo usuario (Fig. 7) (Hernández-Herrera et al., *en preparación*).

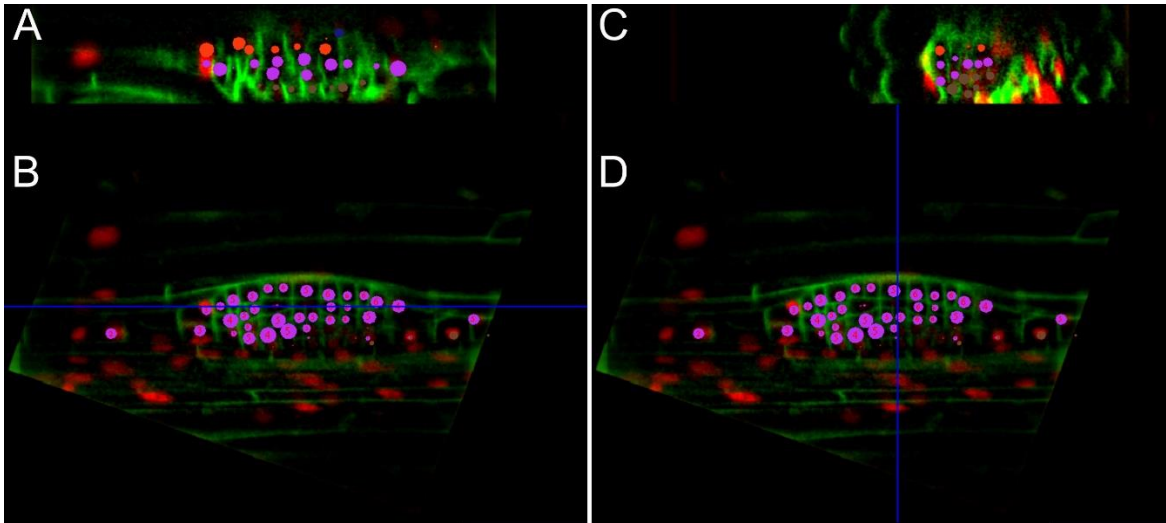


Figura 7. Diferentes tiempos (t y $t + 1$) y ángulos de visión de la interfaz del “plugin” HottC

(A) y (B) representan el tiempo (t) y los paneles (C) y (D) el tiempo ($t + 1$). (A) y (C) son dos formas de vistas ortogonales de los linajes celulares en los planos XZ (A) y YZ (C) de la línea transgénica *p35S::H2B-RFP pUBQ10::NPSN12-YFP*. (B) y (D) son la misma sección longitudinal del PRL en el plano XY. La línea azul en (B) y (D) representan el plano de corte para producir las dos diferentes vistas ortogonales en (A) y (C).

Un ejemplo en donde se demuestra la funcionalidad de HottC puede ser observado con el rastreo celular de un PRL desde la etapa I (Malamy & Benfey, 1997) presentado en la Fig. 8. Siguiendo la célula marcada con el punto verde en el tiempo 0 (Fig. 8 A) podemos observar que esta se divide anticlinalmente una hora después (Fig. 8 A). Una célula hija posicionada en el dominio central (cabeza de flecha roja) y otra en el dominio flanqueante (cabeza de flecha azul) (Fig. 8 A). La célula hija central se dividió periclinalmente cinco horas después, produciendo una célula hija en la capa externa del PRL y otra en la capa interna (Fig. 8 B, cabezas de flechas rojas). Seis horas después, la célula hija de la capa externa se divide (Fig. 8 D, cabezas de flechas rojas). Una de sus células hijas se divide siete horas más tarde (Fig. 8 E, cabezas de flechas rojas), mientras que, nueve horas más tarde se divide su célula hermana (Fig. 8 F, cabezas de flechas rojas). De esta última división celular, una de las células hijas se divide 9 horas más tarde (Fig. 8 G, cabezas de flechas rojas). Sin embargo, de la división periclinal que ocurrió seis horas después del inicio del experimento (Fig. 8 B, cabezas de flechas rojas), la célula que se posicionó en la capa interna, a diferencia de su hermana de la capa externa, solo experimentó dos ciclos de división celular de 13 (Fig. 8 E, cabezas de flechas rojas) y 12 horas (Fig. 8 H, cabezas de flechas rojas) respectivamente. La descendencia producida por la célula en la posición periférica resultante de la primera división anticlinal al inicio del experimento (Fig. 8 A, cabeza de flecha azul), solo pasó por dos rondas de división celular durante todo el experimento, con una duración de 6 (Fig. 8 C, cabezas de flechas azules) y 23 h (Fig. 8 G, cabezas de flechas azules) respectivamente. El análisis de otros PRLs en desarrollo mostró

patrones similares con respecto a los diferentes destinos celulares que pueden presentar células del PRL en el dominio flanqueante, a diferencia de las células en el dominio central. En este análisis se encontró que las células que se encontraban en el dominio flanqueante pasaron en promedio por 1.5 ($n = 6$) ciclos celulares, mientras que, células presentes en el dominio central experimentaron en promedio 3 ciclos celulares ($n = 6$). En resumen, estos datos muestran que las células provenientes de las primeras divisiones celulares de un PRL en la etapa I y que se encuentran localizadas en otros dominios, pueden tener destinos celulares diferentes durante la morfogénesis del PRL. Este ejemplo también muestra la utilidad del “plugin” HottC para el rastreo celular del desarrollo del PRL implementado en este trabajo

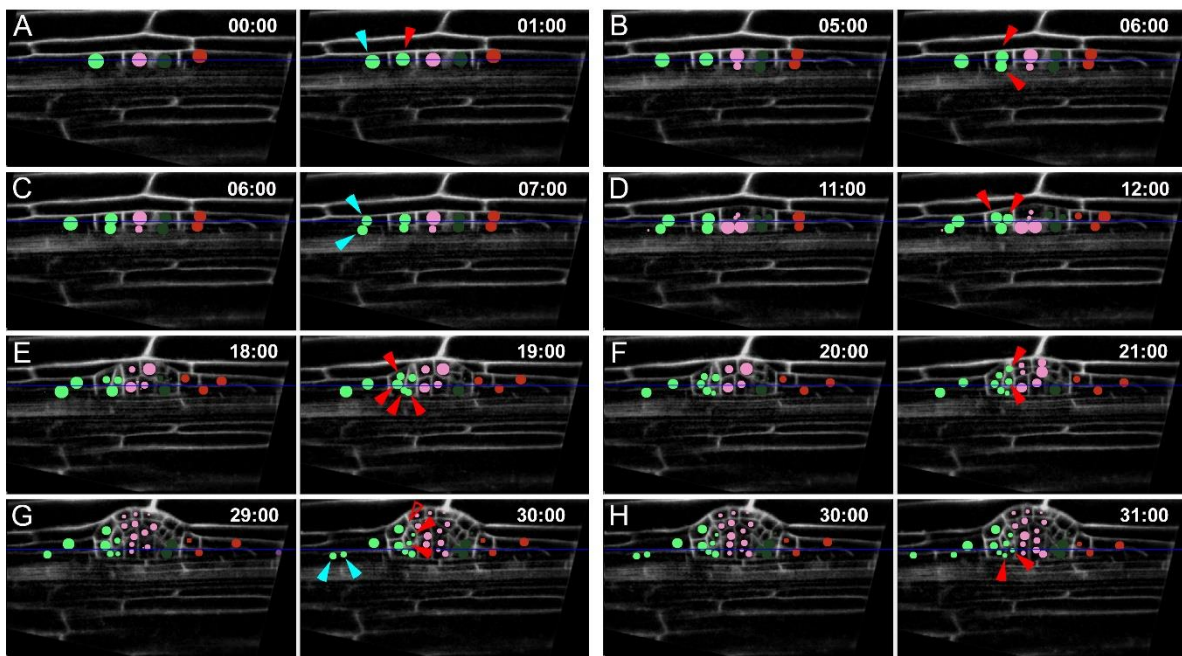


Figura 8. Ejemplo representativo del rastreo del linaje celular (círculos verdes) de un PRL de la línea transgénica *p35S::H2B-RFP pUBQ10::NPSN12-YFP* realizado con el “plugin” HottC

(A-H) Secuencia temporal del rastreo celular de un PRL en un experimento de 48 h con una resolución temporal de 1 h. En cada panel (indicados por las letras A-H) se visualiza el tiempo “t” y el tiempo “t + 1”. La señal en verde del marcador de membranas plasmáticas ha sido pseudo-coloreada en gris. La señal procedente del marcador de núcleos fue ocultada. La cabeza de flecha azul en (A) señala la célula hija en el dominio flanqueante (ver Fig. Sup. 2) y sus descendientes en (C) y (G). Las cabezas de flecha en rojo en (A) indican la célula hija en el dominio central (ver Fig. Sup. 2) y sus descendientes (B, D-H). La cabeza de flecha roja sin relleno en (G) apunta a una célula descendiente fuera de foco que fue originada en la hora 21:00 (F).

Una vez que se tiene el rastreo celular obtenido con ayuda de HottC, este “plugin” permite “imprimir” y exportar la información de la posición de cada célula en 4D. Esto permite abrir el archivo de estos datos en el software paraview (<https://www.paraview.org/overview/>) para visualizar la contribución espacial y temporal de cada uno de los linajes formados en el desarrollo del PRL (Fig. 9 B). Con ayuda de Matlab, a partir de los datos obtenidos con el uso de HottC, se pueden generar árboles

genealógicos en 2D para cada una de las células que comienzan a rastrearse (Fig. 9 C) (Hernández-Herrera et al., *en preparación*). En resumen, esta nueva metodología en conjunto nos permitió identificar la etapa más temprana del desarrollo del PRL y extraer los datos sobre la morfogénesis temprana del PRL, desde la especificación de las CFs hasta las etapas II-IV (Fig. 10). Todo esto fue posible de hacer sin la necesidad de inducir o forzar el programa de desarrollo. Las herramientas computacionales desarrolladas nos permitieron analizar detalladamente los patrones de proliferación y la dinámica celular durante la morfogénesis temprana del PRL (ver secciones posteriores).

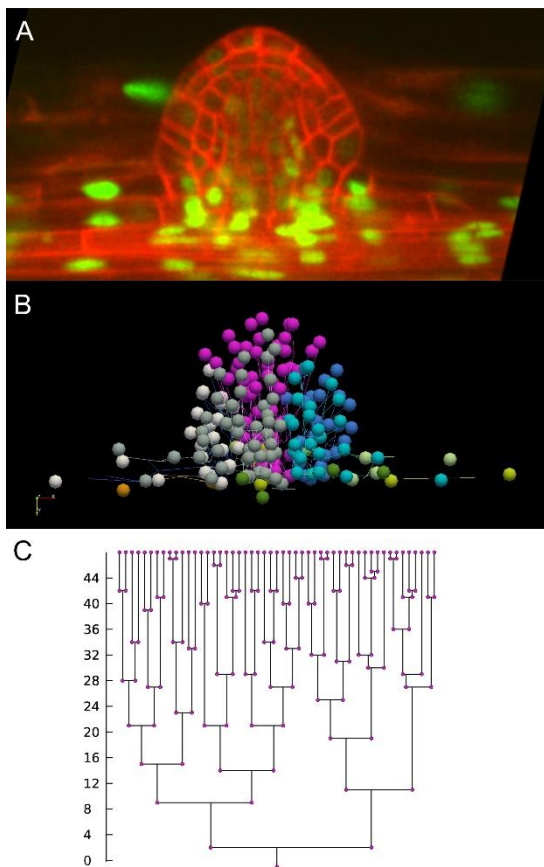


Figura 9. Ejemplo del análisis de los linajes celulares rastreados de un PRL con el “plugin” HottC

(A) Sección longitudinal del último punto de un PRL en el desarrollo de la línea transgénica *p35S::H2B-RFP pUBQ10::NPSN12-YFP*. Los pseudo-colores en la imagen han sido invertidos. (B) Visualización en 3D en el software Paraview del último punto de desarrollo de cada linaje celular rastreado con HottC del PRL mostrado en (A). Diferentes colores indican diferentes linajes celulares producidos en experimentos “time-lapse” de 48 h. (C) Arbol genealógico celular que representa el linaje de las esferas rosas en (B), mostrando los eventos de división celular de las cuales pueden ser deducidas las duraciones de los ciclos celulares.

6.2. Análisis de los datos 4D confirman que el tipo de iniciación unicelular longitudinal es el escenario más común

Con la finalidad de hacer un análisis exhaustivo de la morfogénesis temprana del PRL, desde las etapas que preceden a la iniciación hasta las primeras etapas de la morfogénesis del PRL, implementamos el método de “caza” de los PRLs descrito. En los primeros experimentos usamos plántulas F1 de cruza entre *pUBQ10::NPSN12-YFP* y *p35S::H2B-RFP* (Fig. 9 A). Con esta crusa pudimos visualizar la membrana plasmática y el núcleo de

todas las células y rastrear en qué momento se dividió cada célula del periciclo que tuvo impacto en un PRL. Estas células fueron definidas como células fundadoras (CF). Así se pudieron analizar los eventos tempranos de la morfogénesis por cada uno de los PRLs desarrollados, desde las primeras divisiones de las CFs hasta las etapas II-IV (Malamy & Benfey, 1997) de la morfogénesis del PRL (Fig. 10). Para poder responder a la interrogante de ¿con qué frecuencia podemos encontrar el tipo de iniciación unicelular y el bicelular longitudinal?, seguimos la actividad mitótica de las CFs de la primera fila celular que participa en el desarrollo del PRL. Esta primera célula (en el caso de iniciación unicelular longitudinal) o primeras dos células (en el caso de iniciación bicelular longitudinal) fueron consideradas como CF0. De esta manera, pudimos discernir entre el tipo bicelular, cuando dos células adyacentes en la misma fila celular se dividen simultáneamente, y el unicelular, cuando una sola célula entra a mitosis. Estos análisis mostraron la existencia de ambos tipos de iniciación, unicelular y bicelular longitudinal, en una proporción de 88 y 12 % de los casos, respectivamente ($n = 17$) (Fig. 10 A y 11 A y B). Estos datos confirman los resultados observados a partir del análisis clonal, llevado a cabo por Dubrovsky (2018), en donde en la mayoría de los casos, los datos sugieren la prevalencia del tipo de iniciación unicelular. Las conclusiones de ese trabajo se basan en que en la mayoría de los PRLs y RLs analizados, había clonas que ocupaban completamente el espacio del PRL o la base de la RL, vistos longitudinalmente.

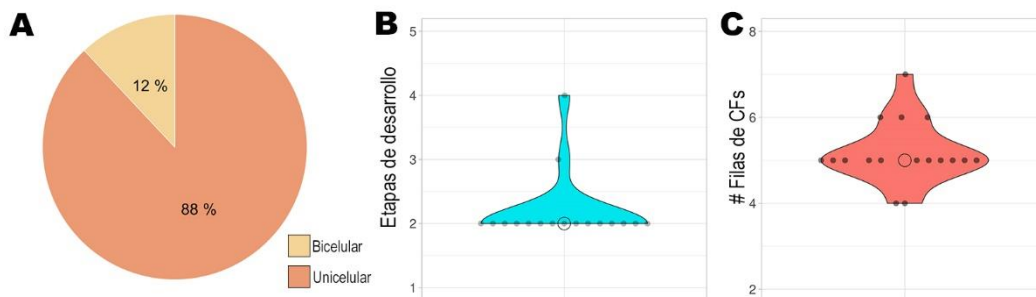


Figura 10. Características de los PRLs obtenidos a partir de los experimentos de “caza de los PRLs”

(A) Gráfica de pastel de las proporciones observadas entre ambos tipos de iniciación: longitudinal unicelular y bicelular. (B) Distribución de las etapas de desarrollo que alcanzaron los PRLs en desarrollo ($n = 17$). (C) Distribución del número de filas celulares con las CFs totales que se observaron en los PRLs al final del experimento ($n = 17$).

Posteriormente, para establecer si había diferencias entre los PRLs generados por los dos tipos de iniciación, analizamos los patrones de proliferación celular, por medio de rastreo celular (ver sección de resultados 6.1) de los linajes celulares producidos a partir de las CFs. Este rastreo celular nos permitió generar y visualizar los árboles genealógicos correspondientes a los linajes celulares producidos por cada una de las CFs (Fig. 11 C y E). A partir de estos árboles genealógicos, registramos la duración del ciclo celular de las células derivativas, es decir, desde que se produce una célula, como resultado de una división celular previa, hasta que las células hijas se vuelvan a dividir (Fig. 11 D y F). Particularmente, solo registramos la duración de los ciclos celulares posteriores a la primer

(o primeras) división(es) dependiendo del tipo de iniciación. Lo anterior se debió a que se desconocía el punto del tiempo en que se originó la CF0, y por tanto no conocemos el lapso completo de la duración del primer ciclo de división que experimenta esta CF0. Teóricamente, la CF0 se originó en el MAR y después fue desplazada a la zona de diferenciación (Dubrovsky et al., 2000). Por lo tanto, estimamos la duración del 2^{do}, 3^{er} y 4^{to} ciclo de división celular durante la morfogénesis temprana del PRL (Fig. 11 D y F). De estos análisis encontramos que, el tiempo de división celular promedio para el 2^{do} ciclo fue significativamente más corto, esto es de 4.1 y 4.4 h para los tipos bicelular y unicelular, respectivamente, en comparación con el 3^{er} y 4^{to} ciclo (Tabla 1 y Fig. 11 D y F, $n = 18-38$ para la unicelular y de 8-16 para la bicelular de 15 y 2 PRLs, respectivamente, prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, método de Dunn, $p < 0.05$ para cada tipo de iniciación).

El análisis de la duración del ciclo celular apoya la propuesta formulada por Dubrovsky et al. (2001) sobre que los ciclos celulares en etapas tempranas del PRL tienden a ser más cortos que los ciclos celulares en las etapas posteriores. Esta misma tendencia también fue observada para otras especies de plantas (Torres-Martínez et al., 2019), de las cuales *A. thaliana* mostró el ciclo celular más corto en las etapas tempranas del PRL, igual a 2.7 h, estimado como el tiempo de duplicación del número de células (“cell doubling time”) (Dubrovsky et al., 2001). Esta duración calculada está bastante cercana al valor mínimo observado en el 2^{do} ciclo de división celular del tipo de iniciación unicelular (Tab. 1 y Fig. 11 D y F). Cuando comparamos las medias de la duración de los ciclos celulares entre los dos tipos de iniciación, encontramos que no hubo diferencias significativas entre ellos (Tab. 1 y Fig. 11 D y F. $n = 18-38$ para la unicelular y de 8-16 para la bicelular, ver detalles del análisis estadístico en la Tabla 1, $p \geq 0.05$). El análisis del desarrollo de los PRLs cuya iniciación fue de tipo uni- y bicelular tampoco mostró algunas diferencias morfológicas entre ellos (Fig. 11 A y B).

Estos análisis en conjunto nos muestran que los patrones de división celular, la duración del ciclo celular, así como la morfología de los PRLs, durante la morfogénesis temprana, son indistintos entre ambos tipos de iniciación. Interesantemente, la duración del ciclo celular del periciclo dentro del MAR fue igual al tiempo que tardan estas células del periciclo desde que salen del MAR hasta que inician un PRL (13.6 h) (Dubrovsky et al., 2000). Esto demostró, por un lado, que las células del periciclo cuando inician la formación de un PRL no tienen un periodo de quiescencia y por otro, nuestros datos indican la aceleración drástica en el ciclo celular durante las primeras etapas de este proceso organogénico. Esto apoya la hipótesis propuesta por Dubrovsky et al., (2001) sobre la importancia del rápido establecimiento de un PRL y su papel en la prevención del desarrollo de nuevos PRLs cercanos para controlar el espaciamiento correcto entre las RLs a lo largo de la RP.

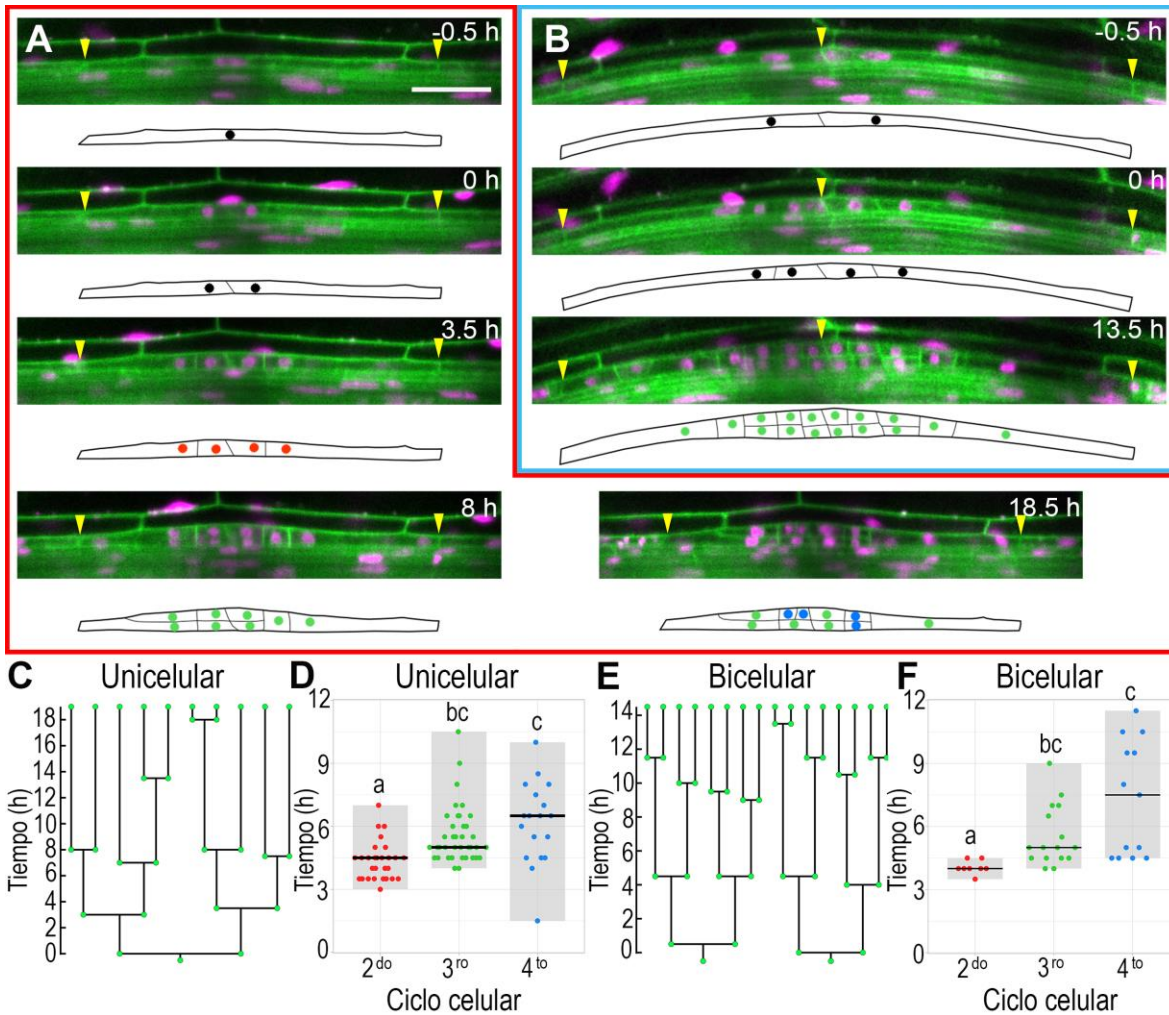


Figura 11. No hay diferencias entre los PRLs iniciados por el tipo de iniciación unicelular y bicelular longitudinal

(A) y (B) Imágenes “time-lapse” y esquemas de la CF inicial (CF0) y su progenie en plantas transgénicas *p35S::H2B-RFP pUBQ10::NPSN12-YFP*. Tipos de iniciación unicelular (A) y bicelular (B). El tiempo 0 corresponde a la primera división celular de la CF0. La señal roja de los núcleos está pseudo-coloreada con magenta. Los esquemas correspondientes a cada tiempo se muestran con los núcleos coloreados basados en un código de color dependiente del ciclo de división celular: primero (negro), segundo (rojo), tercero (verde), cuarto (azul). Barra = 50 μ m. (C) y (E) Árboles genealógicos para las CF0 que se muestran en (A) y (B), respectivamente. (D) y (F) Duración de los primeros ciclos celulares de las células derivativas de las CF0 de los experimentos de tipo “time-lapse” de 24 h. El color de los puntos corresponde al mismo código que en (A) y (B). Las líneas indican el valor de la mediana. $n = 18\text{--}38$ (unicelular) y $8\text{--}16$ (bicelular) ciclos celulares de 15 y 2 PRLs, respectivamente. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas, según el método Kruskal-Wallis, $p < 0.05$. Las plantas fueron analizadas a 6 dp.

Debido a que las células del PX mantienen su actividad proliferativa después de haber sido desplazadas del MAR (Beeckman et al., 2001; Dubrovsky et al., 2000), se espera encontrar divisiones celulares “simétricas”, tanto en geometría como en términos de desarrollo (las dos células hijas tendrán el mismo destino celular que su madre). Sin embargo, cuando las células del periciclo se especifican como CFs estas experimentan

división celular asimétrica (Dubrovsky et al., 2001). Para esto, en nuestros experimentos se debía comprobar que las divisiones celulares que experimentan las CFs0 son asimétricas en términos del desarrollo. El análisis que se llevó a cabo consistió en medir la longitud de las células hijas de cada CF0 y confirmar su impacto en el desarrollo del PRL. Este análisis mostró que, en la mayoría de los casos, 62% ($n = 21$) la división celular fue de tipo asimétrica (Tabla 2) y que la célula más corta predominantemente contribuyó al dominio central del PRL, mientras que la célula más larga, al dominio flanqueante (Fig. Sup. 2). Las mediciones de las células hijas de la CF0 independientemente de su localización, también mostraron que en todos los PRLs analizados ($n = 17$), la proporción del tamaño de la célula hija larga con respecto a la célula hija corta fue de 6.7 a 3.3 (en términos relativos, 10 equivale al 100% de la longitud de la célula, Tabla 2), respectivamente, y la diferencia de estas longitudes relativas fue estadísticamente significativa (Tabla 2, $n = 21$, cuando los datos no siguieron una distribución normal (prueba de normalidad Saphiro-Wilk), se usó la prueba estadística Mann-Whitney, cuando la prueba de normalidad pasó, se hizo la prueba estadística de t de Student, $p < 0.001$). En conclusión, la primera división celular que ocurre a partir de las CFs0 debe ser considerada como una división celular asimétrica. Esta asimetría en términos del desarrollo se refleja en la mayoría de los casos, en donde la célula hija más corta está localizada en el domino central que participa en la formación del nicho de células troncales y en el futuro MAR de la RL, mientras que las células hijas largas se encuentran predominantemente en el domino flanqueante y tienen un papel auxiliar en el desarrollo del PRL (Goh et al., 2016; Von Wangenheim et al., 2016).

Tabla 1. Duración del ciclo celular de la progenie de la CF0 durante la iniciación del tipo unicelular y bicelular

Tipo de iniciación	2 ^{do} ciclo	3 ^{er} ciclo	4 ^{to} ciclo
Bicelular	4.1 ± 0.3 a (3.5-4.5)	5.5 ± 1.4 bc (4.0-9.0)	7.3 ± 2.7 c (4.5-11.5)
Unicelular	4.4 ± 0.9 a (3.0-7.0)	5.6 ± 1.4bc (4.0-10.5)	6.2 ± 2.0 c (1.5-10.0)

Análisis estadístico con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, método de Dunn, para cada tipo de iniciación. Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$. $n = 18$ a 38 (unicelular) y 8 a 16 (bicelular) ciclos celulares de 15 y 2 PRLs, respectivamente. Medias ± SD, los valores mínimos y máximos se muestran entre paréntesis. Diferencias entre los tipos de iniciación unicelular y bicelular para cada ciclo no fueron significativas ($p \geq 0.05$, la misma prueba).

Todos estos datos en conjunto confirman que, en primer lugar, ambos tipos de iniciación del PRL, unicelular y bicelular longitudinal, ocurren durante el desarrollo de las RLs en *A. thaliana*. Sin embargo, el tipo de iniciación unicelular longitudinal es el más común, en una proporción cercana al 90% (Fig. 10 A). En segundo lugar, los ciclos celulares de las primeras divisiones son más cortos, probablemente, debido a la importancia que tiene esta aceleración del ciclo celular en el control del espaciamiento de las RLs a lo largo de la RP. Por último, las divisiones celulares que experimenta la CF en los PRLs son divisiones asimétricas debido a la geometría y localización de sus células hijas, así como el impacto que tienen en el desarrollo del PRL.

Tabla 2. Análisis de la asimetría de la división celular de las CF0 de los PRLs iniciados del tipo unicelular longitudinal

Longitud celular en relación a la posición de la célula		
Posición de las células hijas de CF0	Longitud celular (μm)	Longitud celular relativa (proporción de la CF0)
Hacia el dominio flanqueante	109.1 \pm 25.7 a	6.5 \pm 1.4 a*
Hacia el dominio central	64.8 \pm 37.60 b	3.5 \pm 1.4 b*
Longitud celular independientemente de la posición de la célula		
Células hijas de la CF0	Longitud celular (μm)	Longitud celular relativa (proporción de la CF0)
Célula más larga	114.1 \pm 25.4 a	6.7 \pm 1.1 a
Célula más corta	59.8 \pm 30.1 b	3.3 \pm 1.1 b

Análisis estadístico para comparar las longitudes de las células hijas de cada CF0. Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa. Cuando los datos no siguieron una distribución normal (prueba de normalidad Saphiro-Wilk), se usó la prueba estadística Mann-Whitney, $p < 0.001$, datos indicados con asteriscos. Cuando la prueba de normalidad pasó, se hizo la prueba estadística de t de Student, $p < 0.001$. Medias \pm SD, $n = 21$. En cuatro PRLs la célula hija, de la CF0, posicionada en el dominio flanqueante del PRL, fue más corta que la célula en el dominio central. La segunda mitad de la Tabla muestra los resultados cuando las longitudes celulares fueron agrupadas solo por su longitud, e irrespectivamente de su posición en el PRL (dominio central o flanqueante). En ocho de 21 CF0 (38%) la longitud celular relativa de las dos células hijas (por cada división de una CF0) fue cercana a las proporciones 5:5 o 6:4; estos casos fueron considerados como divisiones simétricas. La longitud celular relativa fue calculada como una fracción de la longitud celular de la CF0, la cual fue tomada como el 100%, cada unidad relativa es igual a un 10% de la longitud de la CF0.

6.3. Después de la división celular de la primera célula fundadora (CF0), las células del periciclo vecinas son reclutadas como CFs del PRL

Con la finalidad de comprobar si, una vez que se haya activado la CF0, se reclutan nuevas CFs en filas celulares del periciclo vecinas, se analizaron los mismos PRLs identificados con el método de “caza” en plántulas con el doble marcaje $pUBQ10::NPSN12-YFP$ y $p35S::H2B-RFP$. Para este fin, se analizaron las filas celulares vecinas del periciclo para identificar si ocurría reclutamiento de nuevas CFs después de que la CF0 se había activado. Reconocimos el reclutamiento de una nueva CF por medio de su activación mitótica

posterior a la de la CF0 cuya progenie hubiera impactado en el desarrollo del PRL (Fig. 12). Como resultado de este análisis encontramos que, en experimentos de 24 h de duración, el número de filas celulares del anillo del periciclo involucradas en la morfogénesis temprana del PRL tuvo un rango de entre 4 y 7 filas, con la mayoría de los casos teniendo 5 filas celulares (65%, $n = 17$ PRLs) y estando en un rango de las etapas de la morfogénesis, de entre la II y la IV (Fig. 10 B y C y Anexo 10.2). Estos resultados confirman nuevamente las observaciones hechas a partir del análisis clonal, en el cual se deduce la existencia del reclutamiento de las CFs debido a que el número de filas del periciclo donde se especifican dichas células, se incrementa de una, en las etapas tempranas del PRL, hasta seis en las etapas tardías, vistas en un plano transversal (Dubrovsky, 2018).

Debido a que en la literatura se reporta que los PRLs pueden ser iniciados a partir de un mínimo de tres filas celulares del periciclo (Dubrovsky et al., 2001; Parizot et al., 2008), y nuestros datos muestran que existe el proceso de reclutamiento de nuevas CFs en filas vecinas del periciclo, decidimos revisar ¿cuál es el número mínimo con el cual puede ser iniciado el desarrollo del PRL?, esto a partir de los datos de los experimentos de tipo “time-lapse”. El análisis mostró que los PRLs pueden ser iniciados a partir de una, dos o tres filas celulares simultáneamente en un 59, 35 y 6% de los casos, respectivamente ($n = 17$ PRLs) (Fig. 13 A y B y Anexo 10.2). Estos datos confirman que de manera simultánea tres CFs en filas celulares vecinas del periciclo pueden participar en la iniciación del PRL (Dubrovsky et al., 2001), aunque no es el caso predominante. Nuestros resultados sugieren que, aunque en la mayoría de los casos la iniciación del PRL se lleva a cabo a partir de una sola CF, también pueden encontrarse otros escenarios de activación mitótica simultánea en más de una fila celular, poniendo en evidencia que el proceso de iniciación del PRL presenta cierta plasticidad sobre el número inicial de filas celulares del periciclo en las que se especifican las CFs. Esto puede ser explicado por el hecho de que en observaciones histológicas de cortes transversales, se ha mostrado que se pueden encontrar una, dos o hasta tres filas celulares del periciclo que están en contacto directo con células del xilema (Dubrovsky et al., 2001). Sin embargo, tampoco se puede descartar la posibilidad de que nuestra resolución temporal durante la adquisición de imágenes en los experimentos de “time-lapse”, no fue lo suficientemente alta para poder resolver de manera clara entre eventos mitóticos simultáneos en filas celulares vecinas, ya que los primeros eventos de reclutamiento de las CFs ocurrieron en una ventana de tiempo muy corta.

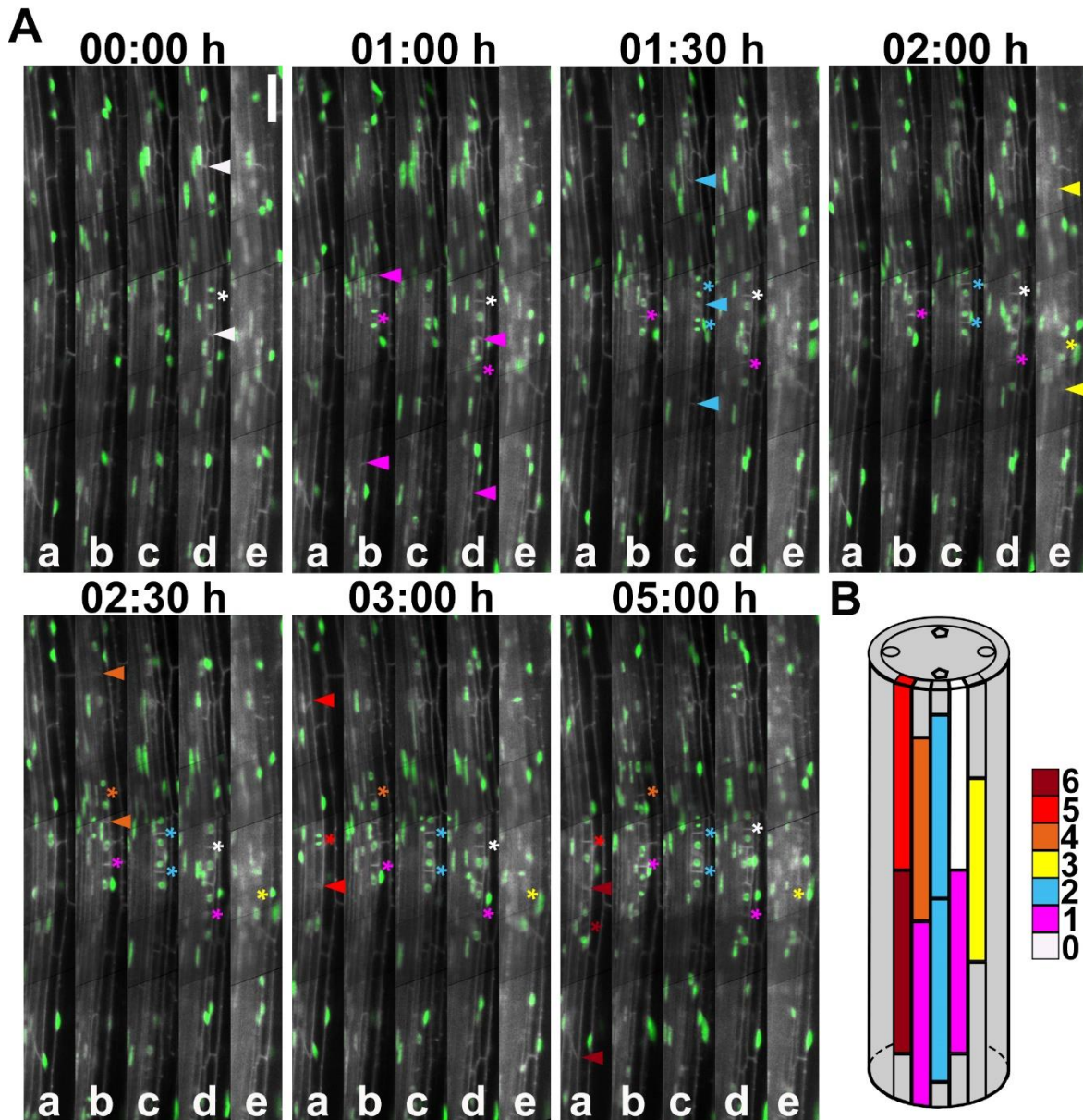


Figura 12. Después de la activación de las CF0 nuevas, las CFs vecinas son reclutadas

(A) Ejemplo de un experimento “time-lapse” en donde se muestra la dinámica de reclutamiento en la línea transgénica *p35S::H2B-RFP pUBQ10::NPSN12-YFP*. La señal roja proveniente de los núcleos está pseudo-coloreada en verde, mientras que la señal verde de las membranas plasmáticas está pseudo-coloreada en gris. Los asteriscos indican la división celular de la CF0 y de las subsiguientes CFs reclutadas. Las cabezas de flechas correspondientes al mismo color del asterisco indican las paredes anticlinales de cada CF. Cada fila celular está indicada por las letras de a-e. Cada fila celular es una proyección en Z de cinco cortes ópticos con una distancia de 0.5 μm entre cada uno (2.5 μm de grosor). El tiempo 0 h corresponde a la división celular de la CF0. Barra = 50 μm . (B) Representación esquemática del proceso de reclutamiento en (A). El cilindro en gris representa la estele de la RP. El periciclo se encuentra arreglado en forma de anillo. Los polígonos y los óvalos ubicados polarmente en el interior de la estele representan a los elementos del xilema y del floema, respectivamente. El orden del reclutamiento de las CFs está representado con el mismo código de color que en (A).

Una vez que se confirmó la existencia del reclutamiento de las CFs en nuevas filas celulares vecinas, se decidió analizar la cinética de reclutamiento de estas CFs. Este análisis mostró que los tiempos de reclutamiento fueron, en promedio, de 0.8, 2.2 y 4.4 h para la primera, la segunda y la tercera fila celular, respectivamente (Fig. 13 C). Estos datos muestran que los primeros reclutamientos de las CFs vecinas, en el plano transversal, son más rápidos que los posteriores, un patrón similar a la drástica aceleración del ciclo celular en las primeras rondas de división celular (ver sección 6.2). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el establecimiento rápido del PRL desempeña un papel importante en la regulación del espaciamiento de RLs a lo largo de la RP (Dubrovsky et al., 2001). Este análisis también nos permite explicar el por qué en trabajos previos, realizados con ayuda de muestras fijadas, era común observar que el PRL iniciaba a partir de tres filas celulares vecinas. La identificación del reclutamiento rápido de las CFs también muestra la importancia de experimentos de tipo “time-lapse” para el estudio de la morfogénesis temprana del PRL.

La evidencia sobre la existencia del reclutamiento lateral nos llevó a investigar sobre la existencia del reclutamiento de las CFs en plano longitudinal, en la misma fila celular, así como a establecer cuáles eran los patrones que éstos seguían. El análisis del reclutamiento longitudinal mostró que en 47% de los casos ($n = 17$ PRLs), después de la activación de la CF0 hubo el reclutamiento de una CF vecina. El análisis de la cinética de reclutamiento longitudinal mostró que esto ocurre, en promedio, en un lapso de 2.4 h (Fig. 13 C y Anexo 10.2). Estos datos muestran que también el reclutamiento longitudinal ocurre en una ventana temporal corta como en el caso del reclutamiento lateral. Este dato nos llevó a preguntarnos ¿hasta cuántas CFs pueden ser reclutadas longitudinalmente? Para este caso se encontró que en un 52% de los PRLs analizados ($n = 17$ PRLs), tomando en cuenta cualquier fila celular del PRL, hubo hasta dos o tres reclutamientos longitudinales, es decir, tres o cuatro CFs en total y en el plano longitudinal participaron en la formación del PRL (Fig. 13 B y Anexo 10.2: PRLs # 1, 4, 8-13, 15). Sin embargo, el análisis por rastreo celular mostró que las CFs flanqueantes, en el plano longitudinal, tuvieron una contribución mínima en la progenie del PRL (Fig. Sup. 2). De manera interesante, se observó que durante el análisis de reclutamiento también encontramos en 48% de los casos ($n = 17$ PRLs), que después de la activación de la CF0, hubo reclutamiento de filas celulares en donde dos CFs fueron reclutadas simultáneamente (Fig. 12 A, tiempo 1.5 h y Anexo 10.2: PRLs # 1, 4, 5, 7, 12-15).

En resumen, todos estos análisis muestran que: (1) el reclutamiento de las CFs en el plano longitudinal es un escenario común durante la morfogénesis temprana; (2) este reclutamiento ocurre en una ventana temporal corta, como en el caso del reclutamiento lateral (en el plano transversal) y probablemente también tenga un papel importante en el control del espaciamiento de las RLs a lo largo de la RP (Dubrovsky et al., 2001). Por último, tomando en cuenta la dinámica con la cual ocurre el reclutamiento longitudinal,

más el hecho de que existen casos en donde dos células se activan simultáneamente, o con un mínimo retraso, nos permite explicar el por qué es tan común encontrar en la literatura que el tipo de “iniciación bicelular longitudinal” es prácticamente el único tipo de iniciación mencionado (Casimiro et al., 2001; De Rybel et al., 2010; De Smet et al., 2008; Fernandez et al., 2015; Lucas et al., 2013; Ramakrishna et al., 2019; Vermeer et al., 2014; Vilches Barro et al., 2019; Von Wangenheim et al., 2016).

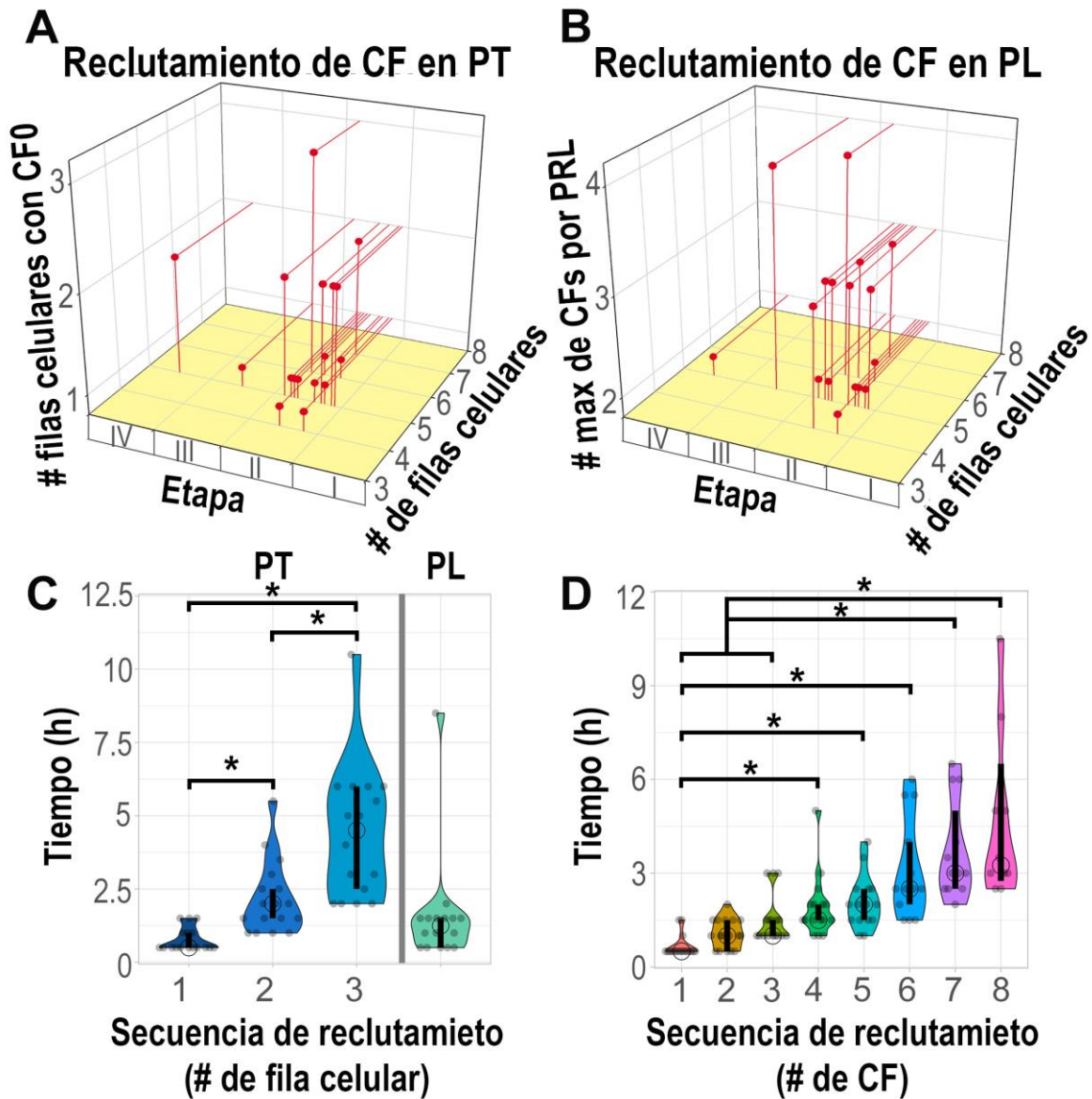


Figura 13. Dinámica de reclutamiento de las CFs

(A) Comparación entre el número de las CF0 iniciales (CF0) y el número de filas celulares que se reclutan (reclutamiento en el plano transversal, PT) (ver Fig. Sup. 1). (B) Registro del número de las CFs que se reclutan en una sola fila celular (reclutamiento en el plano longitudinal, PL) (ver Fig. Sup. 1). (C) Tiempo y secuencia del reclutamiento de las CFs en cada fila celular en el plano transversal (TP) y en el plano longitudinal (LP), solo de los primeros reclutamientos después de la activación de la CF0. (D) Dinámica de la

secuencia del reclutamiento irrespectivamente de la dirección. Los círculos en (C) y (D) muestran el valor de la mediana, las barras verticales negras indican el intervalo de confianza del 95%. Los asteriscos muestran diferencia estadísticamente significativa ($n = 17$) basados en el análisis estadístico con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, método de Dunn, $P < 0.05$. Las plantas fueron analizadas a los 6 dpv.

Con la finalidad de buscar patrones relacionados con el reclutamiento de las CFs, los análisis hechos con este mismo conjunto de datos, mostraron que hubo una preferencia por la dirección del reclutamiento acropétalo (hacia el ápice), en 70 % de los casos ($n = 17$) (Anexo 10.2: PRLs # 1-8, 10, 14-16), similar a la dirección de iniciación de nuevos PRLs (Dubrovsky et al., 2000, 2006). Estos datos, junto con la ventana temporal de reclutamiento longitudinal corta, sugieren la importancia del reclutamiento longitudinal direccionado para establecer de manera rápida una población de células del PRL durante la morfogénesis temprana y evitar la iniciación de nuevos PRLs cercanos. Sin embargo, salvo el patrón de dirección del reclutamiento antes mencionado, no hubo indicios sobre algún patrón más de dirección o secuencia de reclutamiento, tanto en el plano longitudinal como en el plano transversal (Anexo 10.2), haciendo evidente la plasticidad en este paso del desarrollo de los PRLs. Este mecanismo de plasticidad durante el desarrollo del PRL se suma a otros ejemplos de plasticidad antes reportados, como en la secuencia de la proliferación y en la orientación de divisiones celulares durante la morfogénesis del PRL (Lucas et al., 2013; Von Wangenheim et al., 2016), así como en el ángulo de la dirección de crecimiento del PRL (en plano transversal) dependiendo de la ubicación de la fuente disponible de agua (Von Wangenheim et al., 2016).

Todos estos análisis en conjunto muestran que: (1) el reclutamiento de las CFs puede ocurrir tanto en el plano transversal como en el longitudinal; (2) que el reclutamiento es un proceso gradual en donde los primeros reclutamientos ocurren en una ventana temporal más corta que aquellos que ocurren posteriormente, independientemente de la dirección (Fig. 13 D); (3) el proceso de reclutamiento también presenta cierta plasticidad en términos de desarrollo. En resumen, todo este análisis demuestra que la iniciación de los PRLs es un proceso altamente dinámico que no ocurre en un solo paso, sino en varios que suceden de forma gradual (Fig. 12 B y 13 D).

Si hacemos la comparación entre los resultados provenientes del análisis, “time-lapse” (este trabajo) y el análisis clonal (Dubrovsky, 2018), podría parecer que existe una contradicción entre los datos obtenidos. Esto es debido a que si bien, a partir de los datos del “time-lapse”, el desarrollo del PRL puede empezar a partir de una célula (CF0), en el plano longitudinal, también participan más CFs que se reclutan gradualmente. Mientras que en los datos del análisis clonal, en el plano longitudinal, parece que solo una CF produce toda la población celular del PRL (Dubrovsky, 2018). No obstante, esta supuesta contradicción puede ser explicada de la siguiente manera: en el caso de los datos que provienen de los experimentos de tipo “time-lapse”, la CF0 no es la única CF, pero sí es la que participa en la mayor producción del linaje celular del PRL. Un análisis más detallado,

mostró que, en la mayoría de los casos, en 59% de ellos (Anexo 10.2: PRLs # 1-3, 5, 6, 8, 9, 15-17), la progenie de la fila celular, correspondiente a la ubicación de la CF0, fue la que más contribuyó en la formación del PRL. Este dato también se apoya en las observaciones hechas en el trabajo de Von Wangenheim et al., (2016), en donde describen la existencia de una “fila celular maestra”, la fila celular del periciclo que tiene mayor contribución al desarrollo del PRL. Las observaciones hechas en el análisis clonal de los PRLs en las etapas tardías o en las RLs (Dubrovsky, 2018), en donde gran parte del plano medio longitudinal está ocupado principalmente por una clona, concuerda con las observaciones de nuestro análisis de tipo “time-lapse” en donde se demostró que en los PRLs #2-9, 11, 13-17 (14 de 17) (Anexo 10.2) podemos encontrar una sola CF en el plano longitudinal, presente o reclutada en un lapso de 10 h (600 min) después del inicio del desarrollo del PRL.

6.4. La auxina participa en el reclutamiento de las CFs durante la morfogénesis temprana del PRL

Debido a que la auxina actúa como un disparador morfogénico durante la iniciación del PRL (Dubrovsky et al., 2008), nos preguntamos si ¿esta hormona también podría estar involucrada en el proceso de reclutamiento de las CFs? y ¿en qué grado el reclutamiento depende de la auxina?. Para este fin, siguiendo la misma estrategia del “método de caza de PRLs” (ver sección 6.1) y usando plántulas F1 resultantes de la cruce entre un marcador de respuesta a auxina con localización nuclear *pDR5rev::3XVENUS-N7* y el marcador de membranas plasmáticas *pUBQ10::NPSN12-YFP*, realizamos experimentos de tipo “time-lapse” y obtuvimos imágenes 4D (Fig. 15 A). De estos análisis, se encontró que la señal de respuesta a auxina siempre precedió a la división celular de todas las CFs reclutadas (Fig. 14 A y 15 A). El análisis estadístico mostró que existe una correlación entre el tiempo en que se especifican las CFs, juzgado por la presencia de respuesta a auxina y el tiempo en que las CFs se dividen, $r = 0.78$ (Fig. 14 C). También se pudo observar que la señal de la actividad de *DR5* se propaga desde las primeras filas celulares reclutadas hacia las filas celulares más periféricas, en el plano transversal (Fig. 14 A y B, 15 A y Fig. Sup. 1). El análisis cuantitativo de la intensidad de la señal de respuesta a auxina mostró que la mayor respuesta se encuentra entre las filas del periciclo, en donde se encuentran la CF0 y la CF1, mientras que, en las filas celulares que se reclutaron posteriormente, esta señal fue progresivamente más débil (Fig. 14 B). Estos resultados sugieren que la auxina actúa como una señal que participa en el reclutamiento de las CFs.

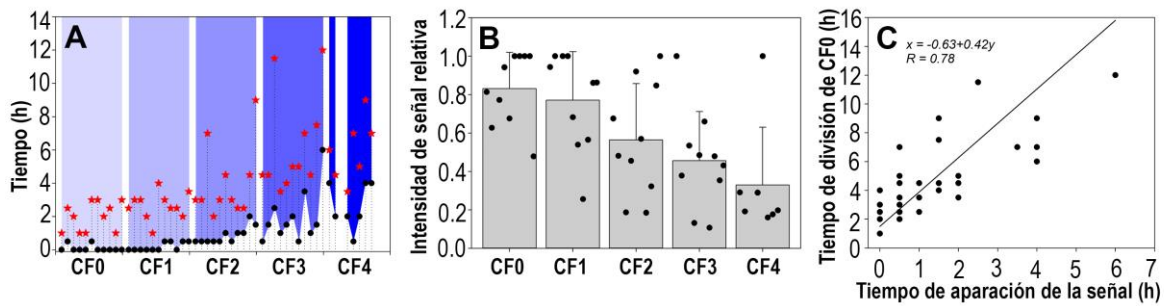


Figura 14. Análisis del reclutamiento de las CFs en la línea transgénica *pDR5rev::3XVENUSN7 pUBQ10::NPSN12-YFP* a partir de experimentos tipo “time-lapse” durante 24 h

(A) Tiempo de aparición de *DR5* (puntos negros) y la subsecuente división de cada CF individual (asteriscos rojos, $n = 10$ PRLs). La CF4 en PRLs 3, 9-11 no se reclutó (el fondo azul aparece solo para CFs reclutadas). (B) Intensidad de la señal relativa en subsecuentes reclutamientos de las CFs. La intensidad de la señal fue medida en las CFs justo 0.5 h antes de la división celular. Para el valor máximo de la señal por PRL fue asignado el valor de uno. Las barras muestran las medias \pm SD ($n = 10$ PRLs). En (A) y (B) se mantuvo el mismo orden de las CFs reclutadas. (C) Análisis de la correlación entre el tiempo de aparición de la señal de respuesta a auxina y la subsecuente división celular por cada CF reclutada ($n = 10$ PRLs). Se muestra la gráfica de regresión lineal y el coeficiente de correlación.

Debido a que la señal de respuesta a auxina involucrada en el reclutamiento debería viajar de las primeras CFs activadas hacia las posteriores CFs reclutadas, quisimos analizar ¿cómo el transporte de la auxina participa en la propagación de esta señal? Para tal fin, se analizó el patrón de expresión de uno de los transportadores de eflujo de auxina, PIN1, que se expresa en etapas muy tempranas de la morfogénesis del PRL (Benková et al., 2003; Marhavý et al., 2011). Para estos experimentos, utilizamos plantas F1 de la cruce entre la línea transgénica *pPIN1::PIN1-GFP* y la línea transgénica que porta un marcador de membrana plasmática con fluorescencia roja *2x35S::Lti-tdTomato* (Fig. 15 B). Los resultados de estos experimentos muestran que la señal de la localización de PIN1 también se propaga de forma gradual durante el reclutamiento de nuevas CFs, de manera similar a la señal proveniente de la actividad de *DR5* (Fig. 15 B). Con la finalidad de seguir indagando sobre la importancia que tiene el papel del transporte de auxina para el reclutamiento de las CFs, analizamos la actividad de *DR5*, pero en esta ocasión con la aplicación del inhibidor del transporte polar de auxina, el ácido N-1-Naftilftalámico (NPA) (Teale & Palme, 2018) que actúa como un bloqueador de la iniciación de los PRLs (Casimiro et al., 2001; Dubrovsky et al., 2011). Con este experimento se demostró que el bloqueo del transporte polar de auxina abate el reclutamiento de nuevas CFs en los PRLs recién iniciados (Fig. 15 C y Tab. 3). Por otro lado, como el tratamiento con NPA también arrestó la proliferación celular, nos preguntamos si ¿esto pudo haber afectado el proceso de reclutamiento de las CFs? Para descartar esta posibilidad, se realizaron experimentos analizando la actividad de *DR5* en presencia de oryzalina, un inhibidor de la polimerización de microtúbulos en todas las etapas de la mitosis (Morejohn et al., 1987) y, por tanto, se ha usado como un bloqueador de la iniciación de los PRLs (Vilches Barro et al., 2019). Estos experimentos

mostraron que, incluso bloqueando la división celular, la señal de respuesta a auxina no fue inhibida y se propagó a otras filas celulares, reclutando presuntas CFs (Fig. 15 D y Tabla 3). El análisis de la cinética de reclutamiento en los experimentos con tratamientos farmacológicos, NPA y oryzalina, en donde se compara el número de filas de las CFs (con señal de respuesta a auxina) a diferentes horas después del inicio del experimento (0, 3, 9 y 24 h), mostró una diferencia significativa a partir de las 9 h (Tabla 3. $n = 8$, prueba estadística de Holm-Sidak, $p < 0.001$). Este comportamiento probablemente fue observado debido a que el tratamiento tardó entre 3 y 9 horas para ejercer el efecto.

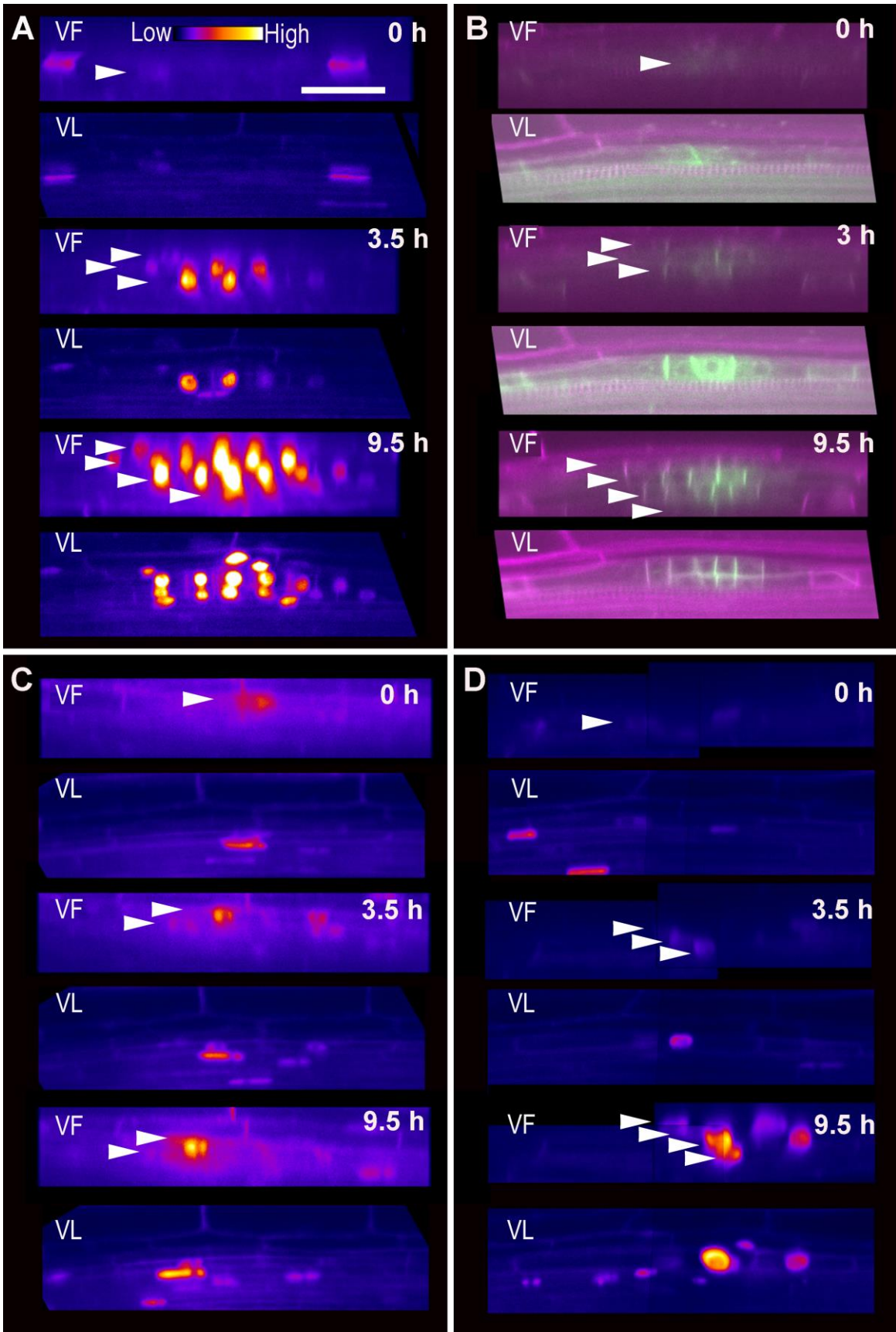


Figura 15. Análisis de la señalización y transporte de auxina en el reclutamiento de las CFs

Imágenes de microscopía de laser confocal de barrido y “time-lapse” de la línea transgénica *pDR5rev::3XVENUSN7 pUBQ10::NPSN12-YFP* (A, C y D) y en la línea *pPIN1::PIN1-GFP2x35S::Lti-tdTomato* (B). Las cabezas de flechas indican nuevas filas de las CFs o presuntas CFs que se reclutan. La señal roja en (B) está pseudo-coloreada en color magenta. $n = 10$ (A) y 6 (B). (C) y (D) Muestran plantas sometidas a tratamientos farmacológicos. (C) 10 μM de NPA inhibe la propagación de la señal de respuesta a auxina ($n = 12$). (D) 1 μM de oryzalina bloquea la división celular pero no inhibe la propagación de la respuesta a auxina ($n = 8$). Todos los paneles muestran un experimento tipo “time-lapse” (24 h) representativo. El tiempo 0 corresponde al tiempo en que aparece la primera señal de respuesta a auxina (actividad de *DR5*) y de la localización de la proteína PIN1. (VF) Corresponde a la vista frontal mientras que (VL) a la vista lateral (ver Fig. Sup. 1). La intensidad de la señal verde en (A, C y D) está pseudo-coloreada con un “look up table” de ImageJ llamado “fire”. La escala de intensidad está mostrada en (A). Las plantas fueron analizadas a 6 dpv. Barra = 50 μm .

Todos estos datos en conjunto sugieren que la señal de la respuesta a auxina a nivel transcripcional y su transporte, juegan un papel importante para el reclutamiento de nuevas CFs durante la morfogénesis temprana del PRL. De esta manera, la auxina actúa como un disparador morfogénico para la especificación y el reclutamiento de nuevas células fundadoras (Benková et al., 2009; Dubrovsky et al., 2008) dando lugar al establecimiento de un campo morfogénico (Gilbert et al., 1997), a partir del cual se desarrollará un PRL. Este mecanismo de acción de la auxina para el establecimiento de campos morfogénicos ya ha sido reportado en otros procesos de desarrollo, como en el meristemo lateral durante el crecimiento secundario (Uggla et al., 1996), para el desarrollo de primordios de órganos laterales en el meristemo apical del brote, regulando la filotaxis (Byrne et al., 2000; Grandjean et al., 2004; Reinhardt et al., 2003) y en el desarrollo de primordios florales (Chandler et al., 2011; Heisler et al., 2005).

Tabla 3. Dinámica de propagación de la señal de respuesta a auxina analizando la actividad del promotor *DR5*, en plantas no tratadas y tratadas con ácido N-1-Naftilftalámico (NPA) y oryzalina

Experimento	Tiempo después del inicio del experimento			
	0 h	3 h	9 h	24 h
Sin tratamiento	1.3 ± 0.5 a	2.8 ± 0.4 a	3.9 ± 0.6 a	5.2 ± 0.8 a
10 μM NPA	1.8 ± 0.7 a	2.6 ± 0.5 a	2.6 ± 0.5 b	2.6 ± 0.5 b
1 μM oryzalina	1.9 ± 0.6 a	3.3 ± 0.7 a	4.3 ± 0.7 a	5.3 ± 0.5 a

Los PRLs en la etapa I fueron reconocidos; el tiempo 0 h corresponde al tiempo de inicio del experimento. La señal de la respuesta a auxina fue registrada en las filas celulares de las CFs o de presuntas CFs. Medias \pm SD, $n = 8-12$. El análisis estadístico fue llevado a cabo entre diferentes experimentos en el mismo punto de tiempo. Cuando los datos no siguieron una distribución normal (prueba de normalidad Shapiro-Wilk), para 0, 3 y 24 h, se llevó a cabo la prueba estadística de Kruskal-Wallis, $p < 0.05$. Cuando la prueba de normalidad pasó (para 9 h), se llevó a cabo el método de Holm-Sidak, $p < 0.001$. Las diferentes letras significan diferencia estadísticamente significativa. Nótese que en el comienzo del experimento y a las 3 h, no hay diferencia en la propagación de la señal de la respuesta a auxina. Esto sugiere que el NPA y la oryzalina no llegaron a tener efecto en el periciclo.

Estos datos apuntan a que la respuesta a auxina en la CF0 es un evento temprano que antecede a la iniciación del PRL. Entonces, esto nos plantea la interrogante sobre la existencia de la relación entre la especificación de la CF0 y los primeros reclutamientos, con el paso de desarrollo del PRL conocido como “priming” (Fig. 3). Por el tipo de experimentos realizados (caza de PRLs), no fue posible determinar el punto exacto en donde ocurre la especificación de la CF0 y los primeros reclutamientos a lo largo de la RP. Sin embargo, por el estado de diferenciación del xilema y el desarrollo de los pelos radicales se deduce que esto ocurrió en la zona de diferenciación temprana de la RP. Considerando que la zona de crecimiento (incluyendo el MAR y la zona de elongación), puede variar de 0.8 mm a 1.5 mm dependiendo de la temperatura (Yang et al., 2017), que en el genotipo Col-0 el alcance de esta zona ha sido reportada para localizarse a 1.23 (Dubrovsky et al., 2000) y a 1.34 mm (Tapia-López et al., 2008) de la punta de la raíz, además de que los primeros eventos de iniciación del PRL fueron reportados para ocurrir entre 2 y 3 mm (Dubrovsky et al., 2011), se puede deducir que la región en donde ocurre la especificación de la primera CF se localiza entre 0.8 y 2 mm de la punta de la raíz.

Por su parte, el inicio de la zona de oscilación observada por la actividad de *pDR5::Luciferasa*, está reportada para localizarse entre el dominio de transición y la zona de elongación de la RP (Moreno-Risueno et al., 2010). Sin embargo, basándose en las imágenes reportadas en ese estudio, el nivel máximo de la señal se encuentra a una distancia entre 0.8 y 1.1 mm de la punta de la raíz. Este análisis nos hace hipotetizar que ambos procesos, la especificación de la CF0 con primeros reclutamientos, y el nivel máximo de oscilación de respuesta a auxina, corresponden al mismo evento o paso de desarrollo del PRL. Según nuestros datos de la dinámica de reclutamiento, este proceso avanza más rápido en las primeras 3-6 h después de que la CF0 inicia la primera división celular. Este tiempo coincide con el período de incremento de la actividad de *pDR5::Luciferasa* en la zona de oscilación (Moreno-Risueno et al., 2010). No obstante, faltan hacer experimentos que comprueben esta hipótesis.

6.5. El campo morfogenético del PRL está delimitado por filas celulares del periciclo en frente del polo del floema

Hasta ahora, se evidencio que durante la morfogénesis temprana del PRL, entre las etapas II y IV, participan hasta 5 filas celulares del periciclo, resultantes del reclutamiento (Fig. 10 B y C). Sin embargo, no se sabe hasta cuántas filas celulares pueden ser reclutadas en las etapas posteriores de la morfogénesis y cómo se delimita este campo morfogenético en el plano transversal. Una hipótesis que se probó fue que este campo morfogenético está delimitado por células del periciclo frente al polo del floema, el periciclo floemático (PF), debido a las características de este tipo celular que fueron evidenciadas en trabajos previos (Beeckman et al., 2001; Dubrovsky et al., 2000; Parizot et al., 2008). Para probar esta hipótesis, primero debíamos saber cuántas filas celulares, en promedio, existen entre los

polos opuestos del PF. Con ayuda de una línea transgénica con el marcador de membranas plasmáticas *pUBQ10::NPSN12-YFP* y el marcador de núcleos del PF *pS17::H2B-2xmCherry* encontramos que hay en promedio 8.1 células entre un polo y el otro del PF (medio anillo del periciclo, $n = 11$ raíces) (Fig. 16 B). Estos datos fueron corroborados analizando raíces fijadas y teñidas con tinción de pseudo-Schiff (Truernit et al., 2008) (Fig. 16 A, $n = 5$).

Por otro lado, para saber cuál es el número total de filas celulares del periciclo involucradas en el desarrollo de los PRLs, hicimos experimentos de tipo “time-lapse” de 48 h de duración para analizar el desarrollo de los PRLs a partir de la etapa I hasta su emergencia. Estos experimentos mostraron que, en promedio, pueden participar en el plano transversal hasta 7.1 filas celulares del periciclo (Fig. 17 A). Estos datos sugirieron que el reclutamiento de las CFs en las filas celulares del periciclo se restringe a los polos del floema, hasta el PF. Mediante experimentos de tipo “time-lapse” con la línea con doble marcaje, *pS17::H2B-2xmCherry pUBQ10::NPSN12-YFP*, se mostró que las CFs de las filas celulares del PF también logran reclutarse como CFs y dividirse, pero con una menor actividad proliferativa e impacto en el desarrollo del PRL (Fig. 17 B, $n = 10$). Por último, como otra línea de evidencia para confirmar que las células del PF habían experimentado división celular, llevamos a cabo otro experimento en donde se usó diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), como marcador verde fluorescente que puede ser transportado por el floema (Wright & Oparka, 1996) en la línea transgénica *2xmCherry pUBQ10::NPSN12-YFP*. Para estos experimentos se colocó una gota de CFDA en heridas hechas en las hojas con unas pinzas, y las plantas se dejaron en posición vertical por 1 h en las mismas condiciones de crecimiento (ver sección de Métodos). Después, las plantas fueron analizadas con microscopia confocal para ver la señal de CFDA transportada a través del floema. Estos experimentos mostraron que las células derivativas del PF eran vecinas de elementos del floema marcados con CFDA (Fig. 17 C, $n = 7$). De esta manera fue confirmado que las CFs de las filas celulares del PF son las últimas en ser reclutadas lateralmente, por lo tanto, restringen el reclutamiento de más filas celulares. Experimentos similares pero usando una línea con marcaje de membranas plasmáticas con una proteína roja fluorescente, *2x35S::Lti-tdTomato*, se mostró que la señal de CFDA se observó dentro de los tejidos del PRL desde las etapas tempranas (Fig. 17 D, $n = 7$). Debido a que el reactivo CFDA se incorporó al PRL desde las etapas iniciales de la morfogénesis y al hecho de que las filas celulares del PF también participan en desarrollo del PRL, podemos hipotetizar que la participación de las filas celulares del PF es importante para el establecimiento de las conexiones vasculares floemáticas durante el desarrollo del PRL.

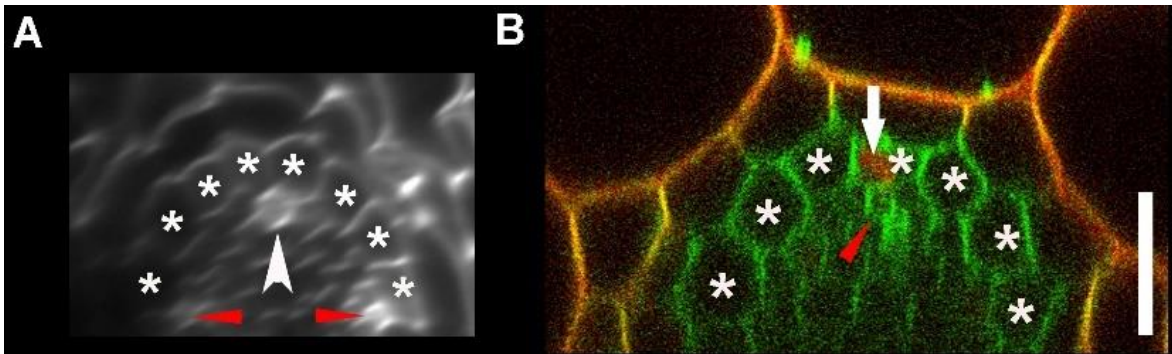


Figura 16. Secciones transversales de la RP en una zona cercana a un PRL

(A) Imagen de una sección óptica transversal de la RP de la línea Col-0 teñida con un método de tinción pseudo-Schiff modificado (Truernit et al., 2008). (B) Línea transgénica *pS17::H2B-2xmCherry pUBQ10::NPSN12-YFP*. Las células del periciclo están marcadas con los asteriscos. La flecha en (B) indica el núcleo del periciclo floemático. Las cabezas de flechas rojas indican elementos del floema. La cabeza de flecha blanca indica un elemento del xilema. Nótese que el número de células del semicírculo del anillo del periciclo varía entre 7 y 8 células. Barra = 20 μ m.

Todos estos experimentos muestran que, durante la morfogénesis temprana del PRL, en el plano transversal, se pueden reclutar hasta siete filas celulares, confirmando los datos reportados por Von Wangenheim et al., (2016). Además, en investigaciones previas en donde hacen estimaciones sobre el número de las CFs que participan en la formación de un PRL, mencionan que el número máximo de CFs es 11 (Laskowski et al., 1995; Sussex et al., 1995), mientras que el número mínimo estimado es de tres CFs (Dubrovsky et al., 2001). Tomando en cuenta los datos obtenidos en este trabajo (ver sección 6.2 y 6.3), los PRLs pueden ser iniciados a partir de una sola CF, pero debido a que durante todo el proceso de morfogénesis pueden ser reclutadas longitudinalmente hasta cuatro CFs y hasta siete filas celulares en el plano transversal, podemos inferir que teóricamente un PRL puede estar formado por entre ocho (mínimo) y 32 (máximo) CFs, considerando la existencia de cierta plasticidad durante este proceso organogénico.

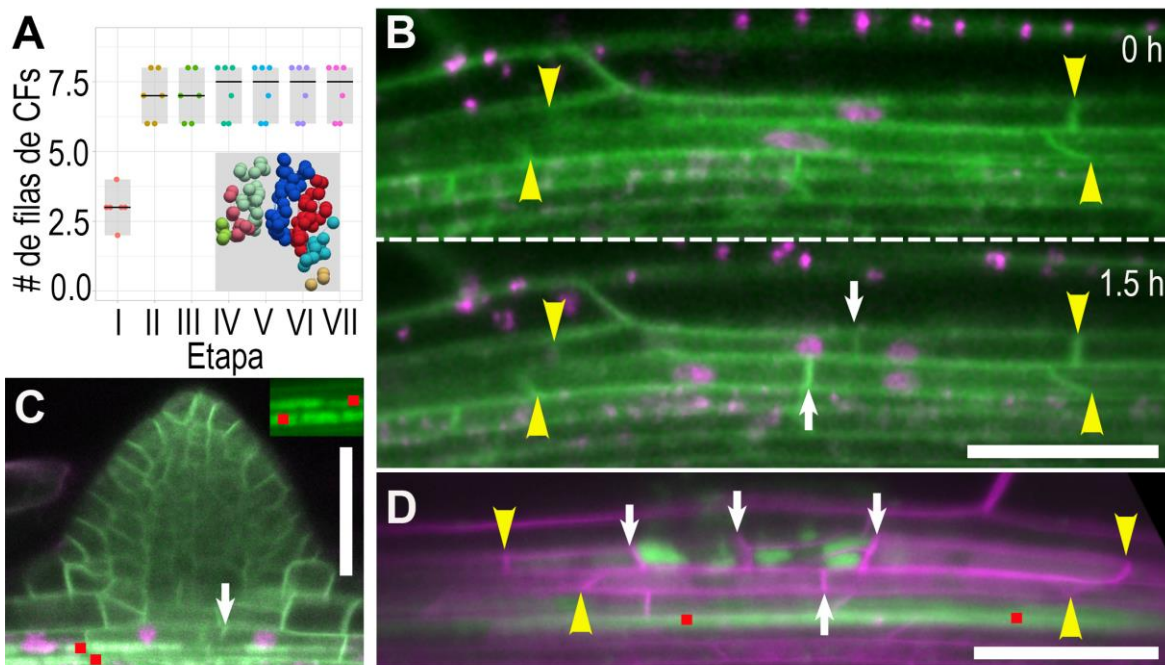


Figura 17. Análisis de los límites transversales del campo morfogénico

(A) Número de filas de las CFs totales determinado por el análisis tipo “time-lapse” (48 h) de PRLs de la línea *p35S::H2B-RFP pUBQ10::NPSN12-YFP*. Las imágenes fueron adquiridas cada 60 min ($n = 6$). El recuadro muestra diferentes clonas celulares (cada color representa una clona) del último tiempo del análisis por rastreo celular de un PRL en desarrollo (ver sección 6.1). Cada linaje celular incluye células formadas de una sola fila de las CFs, independientemente de cuantas CFs haya por fila celular. (B) Análisis “time-lapse” de la actividad proliferativa de células del PF con la línea transgénica *pS17::H2B-2xmCherry pUBQ10::NPSN12-YFP*. Se muestran las primeras divisiones celulares de células del PF de un PRL en la etapa I. El tiempo 0 corresponde al tiempo antes de que ocurre la división celular ($n = 10$). (C) y (D) Experimentos del transporte y visualización de CFDA en el floema. (C) La misma línea usada en (B), 60 min después de que se aplicó CFDA en una herida en los cotiledones. El recuadro muestra un acercamiento de la señal de CFDA en los elementos del floema y cercana al PRL ($n = 7$). (D) PRL en la etapa temprana de la morfogénesis con la señal de CFDA en el interior de sus tejidos y en los elementos del floema, 60 min después de haber aplicado CFDA en los cotiledones ($n = 7$). Las cabezas de flechas amarillas indican las paredes anticlinales que delimitan las CFs en (B) y (D). Los cuadrados rojos están mostrando elementos del floema en (C) y (D). Las flechas blancas indican paredes celulares recientemente formadas en (B)-(D). Las plantas fueron analizadas a 6 dpq. Barra = 50 μm .

Debido a que la mitad del anillo del periciclo contiene en promedio ocho filas celulares, correspondiente al número de filas entre los polos del PF, esto indica que el campo morfogénico está delimitado, en el plano transversal, por filas celulares del PF, y aunque, algunas células del PF son reclutadas, su competencia proliferativa es menor. Estos datos, nos llevan a hipotetizar que las CFs del PF pueden emitir alguna señal que contrarresta el reclutamiento de nuevas filas celulares. Se han reportado diferentes mecanismos o señales por los cuales se delimita el PRL en el plano longitudinal, por tanto, proponemos que, mecanismos parecidos puedan estar involucrados en la delimitación lateral del campo morfogénico del PRL. Un caso específico de inhibición de células del periciclo vecinas longitudinalmente es aquel en donde participa el receptor tipo cinasa

ARABIDOPSIS CRINKLY4 (ACR4). La expresión local de ACR4 en las células resultantes de las primeras divisiones asimétricas del PRL evita que las células del periciclo vecinas, en el plano longitudinal, se activen y participen en el desarrollo del PRL (De Smet et al., 2008). Otro mecanismo similar fue descrito por Fernández, et al. (2020), en donde la señalización mediada por el péptido GOLVEN6 (GLV6), el receptor RGF1 INSENSITIVE (RGI1) y la proteína cinasa MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6 (MPK6) previenen la activación de las células del periciclo vecinas longitudinalmente al PRL (Fernandez et al., 2020). También ha sido descrito otro mecanismo, que regula la iniciación y el espaciamiento de los PRLs, previniendo que las células del periciclo vecinas al PRL en el plano longitudinal se activen. En este mecanismo participan el péptido C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE5 (CEP5) y su receptor XYLEM INTERMIXED WITH PHLOEM 1 (XIP1) los cuales, son expresados específicamente en las células del floema y del PF. Sin embargo, aún no se conoce a detalle este mecanismo que lleva a cabo su efecto en la prevención de la activación mitótica de las células del periciclo vecinas longitudinalmente a un PRL (Roberts et al., 2016). Por otro lado, también se les ha atribuido a las proteínas PLT3, PLT5 y PLT7, el papel de la regulación del límite longitudinal del PRL, inhibiendo la activación de las células del periciclo vecinas al PRL (Hofhuis et al., 2013). En resumen, podemos hipotetizar que ya sea de manera individual o sinérgicamente, los mecanismos antes mencionados puedan estar involucrados en la delimitación transversal del campo morfogénico.

Otro candidato fuerte en la delimitación del campo morfogénico en el plano transversal del PRL, es la señalización mediada por la hormona citocinina la cual ha sido reportada como un regulador negativo, en las etapas tempranas del desarrollo del PRL, asociadas específicamente al paso de iniciación de los PRLs (Bielach et al., 2012; Laplaze et al., 2007), afectando la expresión y localización de las proteínas PIN y, por tanto, la acumulación de la respuesta a auxina durante la iniciación (Laplaze et al., 2007; Marhavý et al., 2011). La síntesis de citocininas, por medio de ISOPENTENYL TRANSFERASE3, IPT5, IPT7 y 5'-MONOPHOSPHATE PHOSPHORIBOHYDROLASE/LONELY GUY (LOG), de manera local y en la vecindad del PRL recién iniciado, suprime la iniciación de los PRLs cercanos (Chang et al., 2015). Sin embargo, tampoco podemos descartar la posibilidad de que esta delimitación transversal del campo morfogénico se deba a que la señal de la auxina llega con menor intensidad a las filas celulares del PF, como fue demostrado por mediciones de la intensidad de la señal emitida por la actividad de *DR5* (ver sección 6.4) y que esto sea suficiente para evitar el reclutamiento de filas celulares más allá de los polos del PF.

7. CONCLUSIONES

- Se desarrolló una nueva estrategia denominada “caza de PRLs”, que permitió identificar y analizar los eventos más tempranos de la iniciación de los PRLs sin la necesidad de inducir la iniciación del PRLs por tratamiento con auxina exógena o por encorvamiento de la raíz debido a graviestimulación. Simultáneamente se desarrolló un procedimiento para el análisis de la morfogénesis en 4D a partir de imágenes de microscopia confocal.
- Se demostró que durante la morfogénesis temprana del PRL, ocurre una iniciación tanto de tipo unicelular, como bicelular longitudinal, siendo la iniciación del tipo unicelular longitudinal la más común.
- Por medio del análisis de la duración de los primeros ciclos de los linajes celulares producidos por las CFs, a partir tanto del tipo de iniciación uni- y bicelular, se demostró que los PRLs son indistintos entre ellos.
- Se demostró que, una vez que se activó la primera o primeras CFs (CF0), ocurre el reclutamiento de nuevas CFs tanto en el plano longitudinal como en el transversal.
- Los datos obtenidos demuestran que la iniciación del PRL es un proceso dinámico y gradual que continúa mientras que las células derivadas de las primeras CFs ya forman parte de la zona central del primordio.
- El campo morfogénético que da lugar al PRL se forma a partir de las CFs que se reclutan durante la morfogénesis temprana del PRL y, en el plano transversal, está delimitado por el periciclo floemático (PF).
- Las células del PF también se reclutan como CFs y los datos sugieren que éstas participan en la formación de la conexión vascular entre la raíz primaria y la lateral.
- La activación de la respuesta a auxina a nivel transcripcional siempre precede la primera división de las CFs, lo que sugiere que la señalización por auxina es importante para el reclutamiento de nuevas CFs durante la morfogénesis temprana del PRL.
- Los resultados generados sugieren que el transporte de auxina también está involucrado en el reclutamiento de nuevas CFs durante la morfogénesis temprana del PRL.

8. PERSPECTIVAS

Este trabajo permitió establecer nuevas características de la iniciación y la morfogénesis temprana del PRL, que anteriormente no eran conocidas, tales como: (1) su iniciación a partir de una sola CF, (2) el proceso de reclutamiento de nuevas CFs, (3) su dependencia de la señalización y transporte de auxina, (4) la dinámica de los primeros ciclos de divisiones celulares y (5) la activación y participación de las células del PF, entre otros. Sin embargo, también generó varias preguntas que permanecen sin respuesta y que abren ventanas hacia diferentes e interesantes proyectos para investigación futura. Las respuestas a estas preguntas importantes, más el aprovechamiento del nuevo método diseñado en este trabajo, “caza de PRLs”, para estudiar estadios tempranos de la morfogénesis del PRL, permitirán entender mejor la biología del desarrollo de RLs en las plantas.

Las preguntas y los problemas que se generaron de este trabajo están enlistados a continuación.

- Establecer la ubicación exacta, a lo largo de la RP, en donde ocurren los primeros reclutamientos de las CFs y analizar la relación entre este reclutamiento y el proceso de “priming” de las células del periciclo para el desarrollo del PRL, propuesto por Moreno-Risueno et al., (2010). Para dirigir esta pregunta será necesario hacer experimentos semejantes a los de “caza de PRLs”, pero con algunas modificaciones. Particularmente, tendría que programarse el microscopio confocal para que adquiriera imágenes de campos vecinos, empezando por el ápice de la RP y hacia la base de la raíz, para analizar la línea marcadora de respuesta a auxina *pDR5rev::3XVENUS-N7*. De esta manera, sería posible cazar tanto los eventos de oscilación de la respuesta a auxina, como el proceso de iniciación y reclutamiento de CFs. Esta estrategia permitiría ubicar en tiempo y espacio estos pasos del desarrollo del PRL.
- Establecer qué factores están involucrados en la delimitación de los bordes del campo morfogénico en el plano transversal ¿Esto se debe al poco alcance de la auxina en la periferia del campo? ¿Hay otra señal hormonal, como citocininas, que contrarresten la señal de auxina? Determinar si es posible limitar el proceso de reclutamiento y si esto ¿induciría el desarrollo de RLs más delgadas? o ¿el programa de reclutamiento es rígido? Para intentar contestar estas interrogantes se llevarían a cabo experimentos de “caza de PRLs”, para analizar el patrón de expresión de diversas líneas marcadoras fluorescentes de posibles señales candidatas (moleculares y genéticas, ver sección de resultados 6.5), que participan en la delimitación del campo morfogénico del PRL. Una vez que se lograra identificar el mecanismo involucrado en la delimitación del campo morfogénico,

se llevarían a cabo experimentos para bloquear la acción de este mecanismo (farmacológica o genéticamente) y se analizaría el efecto de este bloqueo en el proceso de reclutamiento de CFs.

- Analizar qué otros componentes del transporte y señalización de auxina están involucrados en el proceso de reclutamiento de las CFs. Por ejemplo, además del transportador PIN1 (estudiado en este trabajo), también los transportadores de auxina PIN3 y AUX1 son conocidos para ser expresados en etapas tempranas del desarrollo del PRL (Guyomarc'h et al., 2012). Para este fin, se probarían líneas transgénicas con marcadores fluorescentes de estas proteínas para deducir su papel durante el reclutamiento de CFs. Por otro lado, para indagar más sobre su papel en el proceso de reclutamiento de CFs, también se analizaría el fenotipo de los PRLs provocado por las mutaciones en los genes que codifican para estos transportadores.
- Analizar qué otros factores están involucrados durante el reclutamiento de las CFs. Por ejemplo, se han identificado algunos genes que por ser expresados previamente a la iniciación del PRLs en las células del PX, son considerados como marcadores de identidad de las CF. Tal es el caso del factor de transcripción *GATA23* (De Rybel et al., 2010) y la proteína cinasa asociada a la membrana plasmática *MAKR4* (Xuan et al., 2015). En este caso, la pregunta es si ¿Estos genes se expresan como un patrón gradual durante el reclutamiento de las CFs? Para profundizar si estos genes participan durante el proceso de reclutamiento de CFs, se analizaría su patrón de expresión con el método de “caza de PRLs”.
- Explicar ¿Por qué la activación de las células fundadoras no se lleva a cabo como un patrón secuencial específico? Es posible que esto se deba a que las células del periciclo cuando salen del meristemo apical de la raíz no están sincronizadas en la misma fase del ciclo celular. Para comprobar esta hipótesis, sería necesario realizar experimentos de tipo “time-lapse” con marcadores fluorescentes de diferentes fases del ciclo celular, y así evaluar el estadio del ciclo celular de las células del periciclo antes del inicio del proceso de reclutamiento de CFs. Esto permitirá dilucidar la capacidad proliferativa de las presuntas CFs, incluso de aquellas células del PF, y establecer si este hecho es determinante para la especificación de las CFs.
- Analizar otros procesos que ocurren durante la morfogénesis temprana, por ejemplo, la participación de otros tejidos o tipos celulares que no se han reportado previamente que participan en el desarrollo del PRL ¿Como participan las células del parénquima vascular en la morfogénesis temprana?, así como ¿Cuál es el papel del PF en la morfogénesis del PRL? Observaciones preliminares de los mismos datos analizados en los experimentos con la línea doble transgénica *p35S::H2B-RFP pUBQ10::NPSN12-YFP* (ver sección de resultados 6.2 y 6.3) arrojaron pistas sobre la actividad mitótica de otros tipos celulares y su posible participación en el desarrollo del PRL. Sin embargo, aún hace falta hacer un análisis más exhaustivo de estos datos.

- ¿Qué tan común es el proceso de reclutamiento de las CFs en otras especies, además de *A. thaliana*? Para intentar responder a esta pregunta, habrá que realizar experimentos similares a los de este trabajo, pero en otros grupos taxonómicos de plantas. En este caso, hace falta desarrollar toda la tecnología necesaria (líneas transgénicas con marcadores fluorescentes y la estandarización del método de “caza de PRLs”), para cada una de las especies vegetales que se pretendan analizar. Una vez desarrolladas las herramientas experimentales pertinentes, sería posible dilucidar si el mecanismo aquí descrito para el reclutamiento de CFs durante la morfogénesis del PRL, está distribuido y conservado en diferentes grupos de plantas, así como su posible importancia evolutiva.
- Analizar si los datos obtenidos en este trabajo son reproducibles en sistemas experimentales tradicionalmente usados en *A. thaliana* para la inducción de iniciación de PRLs, como son la aplicación de auxina exógena y la generación de la curvatura de la RP por graviestimulación. Esto permitiría comprobar si el rasgo de desarrollo de PRLs por reclutamiento de CFs, es un proceso de morfogénesis “natural” y, por lo tanto, independiente del sistema experimental que se utilice para su estudio. Para abordar esta interrogante, primero se analizarían los datos de otras publicaciones (von Wangenheim et al., 2020; Von Wangenheim et al., 2016) depositados en repositorios públicos. En caso necesario, para confirmar las observaciones de otras publicaciones, se realizarían experimentos de inducción de iniciación de PRLs y se analizarían según las condiciones descritas en este trabajo.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Banda, J., Bellande, K., von Wangenheim, D., Goh, T., Guyomarc'h, S., Laplace, L., & Bennett, M. J. (2019). Lateral Root Formation in Arabidopsis: A Well-Ordered L-Rexit. *Trends in Plant Science*, 24(9), 826–839. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.06.015>
- Beeckman, T., Burssens, S., & Inze, D. (2001). The peri-cell-cycle in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 52(suppl 1), 403–411. https://doi.org/10.1093/jexbot/52.suppl_1.403
- Benfey, P. N., & Scheres, B. (2000). Root development. *Current Biology*, 10(22), 813–815. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00814-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00814-9)
- Benková, E., Ivanchenko, M. G., Friml, J., Shishkova, S., & Dubrovsky, J. G. (2009). A morphogenetic trigger: is there an emerging concept in plant developmental biology? *Trends in Plant Science*, 14(4), 189–193. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.01.006>
- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., & Friml, J. (2003). Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. *Cell*, 115(5), 591–602. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00924-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00924-3)
- Berckmans, B., Vassileva, V., Schmid, S. P. C., Maes, S., Parizot, B., Naramoto, S., Magyar, Z., Lessa Alvim Kamei, C., Koncz, C., Bögre, L., Persiau, G., de Jaeger, G., Friml, J., Simon, R., Beeckman, T., & de Veylder, L. (2011). Auxin-Dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of arabidopsis E2Fa by lateral organ boundary proteins. *The Plant Cell*, 23(10), 3671–3683. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.088377>
- Bielach, A., Podlešáková, K., Marhavý, P., Duclercq, J., Cuesta, C., Müller, B., Grunewald, W., Tarkowski, P., & Benková, E. (2012). Spatiotemporal regulation of lateral root organogenesis in Arabidopsis by cytokinin. *The Plant Cell*, 24(10), 3967–3981. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103044>
- Blakely, L. M., Durham, M., Evans, T. A., & Blakely, R. M. (1982). Experimental Studies on Lateral Root Formation in Radish Seedling Roots. I. General Methods, Developmental Stages, and Spontaneous Formation of Laterals. *Botanical Gazette*, 143(3), 341–352. <https://doi.org/10.1086/337308>
- Brumfield, R. T. (1942). Cell Growth and Division in Living Root Meristems Author (s): Robert T . Brumfield Published by : Wiley Stable URL : <https://www.jstor.org/stable/2437102>. *American Journal of Botany*, 29(7), 533–543. <https://www.jstor.org/stable/2437102>
- Byrne, M. E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J. M., Dunham, M., Hudson, A., & Martienssen, R. A. (2000). Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in arabidopsis. *Nature*, 408(6815), 967–971. <https://doi.org/10.1038/35050091>
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P. J., & Bennett, M. (2001). Auxin transport promotes arabidopsis lateral root initiation. *The Plant Cell*, 13(4), 843–852. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.843>
- Casimiro, Ilda, Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., &

- Bennett, M. J. (2003). Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends in Plant Science*, 8(4), 165–171. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00051-7)
- Chandler, J. W., Jacobs, B., Cole, M., Comelli, P., & Werr, W. (2011). DORNROSCHE-LIKE expression marks Arabidopsis floral organ founder cells and precedes auxin response maxima. *Plant Molecular Biology*, 76(1–2), 171–185. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9779-8>
- Chang, L., Ramireddy, E., & Schmülling, T. (2015). Cytokinin as a positional cue regulating lateral root spacing in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 66(15), 4759–4768. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv252>
- De Rybel, B., Vassileva, V., Parizot, B., Demeulenaere, M., Grunewald, W., Audenaert, D., Van Campenhout, J., Overvoorde, P., Jansen, L., Vanneste, S., Möller, B., Wilson, M., Holman, T., Van Isterdael, G., Brunoud, G., Vuylsteke, M., Vernoux, T., De Veylder, L., Inzé, D., ... Beeckman, T. (2010). A novel Aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Current Biology*, 20(19), 1697–1706. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.007>
- De Smet, I., & Beeckman, T. (2011). Asymmetric cell division in land plants and algae: The driving force for differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(3), 177–188. <https://doi.org/10.1038/nrm3064>
- De Smet, I., Lau, S., Voß, U., Vanneste, S., Benjamins, R., Rademacher, E. H., Schlereth, A., De Rybel, B., Vassileva, V., Grunewald, W., Naudts, M., Levesque, M. P., Ehrismann, J. S., Inzé, D., Luschnig, C., Benfey, P. N., Weijers, D., Van Montagu, M. C. E., Bennett, M. J., ... Beeckman, T. (2010). Bimodular auxin response controls organogenesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(6), 2705–2710. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915001107>
- De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., dit Frey, N. F., Laplaze, L., Casimiro, I., Swarup, R., Naudts, M., Vanneste, S., Audenaert, D., Inzé, D., Bennett, M. J., & Beeckman, T. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. *Development*, 134(4), 681–690. <https://doi.org/10.1242/dev.02753>
- 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., & Beeckman, T. (2008). Receptor-Like Kinase ACR4 Restricts Formative Cell Divisions in the Arabidopsis Root. *Science*, 322(5901), 594 LP – 597. <https://doi.org/10.1126/science.1160158>
- Ditengou, F. A., Teale, W. D., Kochersperger, P., Flittner, K. A., Kneuper, I., Van Der Graaff, E., Nziengui, H., Pinosa, F., Li, X., Nitschke, R., Laux, T., & Palme, K. (2008). Mechanical induction of lateral root initiation in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 18818–18823. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807814105>
- Doerner, P. (2003). Plant meristems: A merry-go-round of signals. *Current Biology*, 13(9), 368–374. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00280-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00280-X)

- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., & Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, *119*(1), 71–84.
- Drisch, R. C., & Stahl, Y. (2015). Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Frontiers in Plant Science*, *6*(JULY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00505>
- Du, Y., & Scheres, B. (2017). PLETHORA transcription factors orchestrate de novo organ patterning during *Arabidopsis* lateral root outgrowth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(44), 11709–11714. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714410114>
- Du, Y., & Scheres, B. (2018). Lateral root formation and the multiple roles of auxin. *Journal of Experimental Botany*, *69*(2), 155–167. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx223>
- Dubrovsky, J. (2018). Clonal analysis reveals gradual recruitment of lateral root founder cells and a link between root initiation and cambium formation in *Arabidopsis thaliana*. 283366. <https://doi.org/10.1101/283366>
- Dubrovsky, J. G., Doerner, P. W., Colón-Carmona, A., & Rost, T. L. (2000). Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *124*(4), 1648–1657. <https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1648>
- Dubrovsky, J. G., Gambetta, G. A., Hernández-Barrera, A., Shishkova, S., & González, I. (2006). Lateral root initiation in *Arabidopsis*: Developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Annals of Botany*, *97*(5), 903–915. <https://doi.org/10.1093/aob/mcj604>
- Dubrovsky, J. G., Soukup, A., Napsucialy-Mendivil, S., Jeknić, Z., & Ivanchenko, M. G. (2009). The lateral root initiation index: An integrative measure of primordium formation. *Annals of Botany*, *103*(5), 807–817. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn267>
- Dubrovsky, J. G., Napsucialy-Mendivil, S., Duclercq, J., Cheng, Y., Shishkova, S., Ivanchenko, M. G., Friml, J., Murphy, A. S., & Benková, E. (2011). Auxin minimum defines a developmental window for lateral root initiation. *New Phytologist*, *191*(4), 970–983. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03757.x>
- Dubrovsky, J. G., Rost, T. L., Colón-Carmona, A., & Doerner, P. (2001). Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, *214*(1), 30–36. <https://doi.org/10.1007/s004250100598>
- Dubrovsky, J. G., Sauer, M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko, M. G., Friml, J., Shishkova, S., Celenza, J., & Benková, E. (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*(25), 8790–8794. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712307105>
- Dubrovsky, J. G. & Rost, T. L. (2012). Pericycle. *ELS, July*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002085.pub2>
- Elsayad, K., Werner, S., Gallemí, M., Kong, J., Sánchez Guajardo, E. R., Zhang, L., Jaillais, Y., Greb, T., & Belkhadir, Y. (2016). Mapping the subcellular mechanical properties of live cells in tissues with fluorescence emission–Brillouin imaging. *Science Signaling*, *9*(435), rs5 LP-rs5.

<https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf6326>

- Federici, F., Dupuy, L., Laplaze, L., Heisler, M., & Haseloff, J. (2012). Integrated genetic and computation methods for in planta cytometry. *Nature Methods*, 9(5), 483–485. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1940>
- Feng, Z., Zhu, J., Du, X., & Cui, X. (2012). Effects of three auxin-inducible LBD members on lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 236(4), 1227–1237. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1673-3>
- Fernández-Marcos, M., Desvoyes, B., Manzano, C., Liberman, L. M., Benfey, P. N., del Pozo, J. C., & Gutierrez, C. (2017). Control of *Arabidopsis* lateral root primordium boundaries by MYB36. *New Phytologist*, 213(1), 105–112. <https://doi.org/10.1111/nph.14304>
- Fernandez, A., Drozdzecki, A., Hoogewijs, K., Vassileva, V., Madder, A., Beeckman, T., & Hilson, P. (2015). The GLV6/RGF8/CLEL2 peptide regulates early pericycle divisions during lateral root initiation. *Journal of Experimental Botany*, 66(17), 5245–5256. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv329>
- Fernandez, A. I., Vangheluwe, N., Xu, K., Jourquin, J., Claus, L. A. N., Morales-Herrera, S., Parizot, B., De Gernier, H., Yu, Q., Drozdzecki, A., Maruta, T., Hoogewijs, K., Vannecke, W., Peterson, B., Opdenacker, D., Madder, A., Nimchuk, Z. L., Russinova, E., & Beeckman, T. (2020). GOLVEN peptide signalling through RGI receptors and MPK6 restricts asymmetric cell division during lateral root initiation. *Nature Plants*, 6(5), 533–543. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0645-z>
- Fukaki, H., Nakao, Y., Okushima, Y., Theologis, A., & Tasaka, M. (2005). Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 44(3), 382–395. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02537.x>
- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., & Tasaka, M. (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the solitary-root/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 29(2), 153–168. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01201.x>
- Gallei, M., Luschnig, C., & Friml, J. (2020). Auxin signalling in growth: Schrödinger’s cat out of the bag. *Current Opinion in Plant Biology*, 53, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.10.003>
- Geldner, N., Déneraud-Tendon, V., Hyman, D. L., Mayer, U., Stierhof, Y.-D., & Chory, J. (2009). Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *The Plant Journal*, 59(1), 169–178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03851.x>
- Gilbert, S. F. (2010). *Developmental Biology - Scott F. Gilbert - Google Libros*. <https://books.google.com.mx/books?id=aLzVQwAACAAJ&dq=developmental+biology+gilbert&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjxiN6u0fjrAhUSi6wKHfevAYcQ6AEwA3oECAQQAg>
- Gilbert, S. F., Opitz, J. M., & Raff, R. A. (1997). Resynthesizing Evolutionary and Developmental Biology. *Ontogeny*, 28(5), 339–343.
- Goh, T., Joi, S., Mimura, T., & Fukaki, H. (2012). The establishment of asymmetry in *Arabidopsis* lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins.

Development, 139(5), 883–893. <https://doi.org/10.1242/dev.071928>

- Goh, T., Kasahara, H., Mimura, T., Kamiya, Y., & Fukaki, H. (2012). Multiple AUX/IAA-ARF modules regulate lateral root formation: The role of Arabidopsis SHY2/IAA3-mediated auxin signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1595), 1461–1468. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0232>
- Goh, T., Toyokura, K., Wells, D. M., Swarup, K., Yamamoto, M., Mimura, T., Weijers, D., Fukaki, H., Laplace, L., Bennett, M. J., & Guyomarc'h, S. (2016). Quiescent center initiation in the Arabidopsis lateral root primordia is dependent on the SCARECROW transcription factor. *Development (Cambridge)*, 143(18), 3363–3371. <https://doi.org/10.1242/dev.135319>
- Grandjean, O., Vernoux, T., Laufs, P., Belcram, K., Mizukami, Y., & Traas, J. (2004). In Vivo Analysis of Cell Division, Cell Growth, and Differentiation at the Shoot Apical Meristem in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(1), 74–87. <https://doi.org/10.1105/tpc.017962>
- Guyomarc'h, S., Léran, S., Auzon-Cape, M., Perrine-Walker, F., Lucas, M., & Laplace, L. (2012). Early development and gravitropic response of lateral roots in Arabidopsis thaliana. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1595), 1509–1516. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0231>
- Heisler, M. G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G. V., Long, J. A., & Meyerowitz, E. M. (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Current Biology*, 15(21), 1899–1911. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.052>
- Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., de Almeida Engler, J., Inzé, D., & Beeckman, T. (2002). Auxin-Mediated Cell Cycle Activation during Early Lateral Root Initiation. *The Plant Cell*, 14(10), 2339 LP – 2351. <https://doi.org/10.1105/tpc.004960>
- Himanen, K., Vuylsteke, M., Vanneste, S., Vercruyse, S., Boucheron, E., Alard, P., Chriqui, D., Van Montagu, M., Inzé, D., & Beeckman, T. (2004). Transcript profiling of early lateral root initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14), 5146–5151. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308702101>
- Hirota, A., Kato, T., Fukaki, H., Aida, M., & Tasaka, M. (2007). The auxin-regulated AP2/EREBP gene PUCHI is required for morphogenesis in the early lateral root primordium of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(7), 2156–2168. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.050674>
- Hofhuis, H., Laskowski, M., Du, Y., Prasad, K., Grigg, S., Pinon, V., & Scheres, B. (2013). Phyllotaxis and rhizotaxis in Arabidopsis are modified by three plethora transcription factors. *Current Biology*, 23(11), 956–962. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.048>
- Ivanov, V. B., & Dubrovsky, J. G. (2013). Longitudinal zonation pattern in plant roots: Conflicts and solutions. *Trends in Plant Science*, 18(5), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.10.002>
- Jansen, L., Roberts, I., de Rycke, R., & Beeckman, T. (2012). Phloem-associated auxin response maxima determine radial positioning of lateral roots in maize. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1595), 1525–1533.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0239>

- Kang, N. Y., Lee, H. W., & Kim, J. (2013). The AP2/EREBP Gene PUCHI Co-Acts with LBD16/ASL18 and LBD18/ASL20 Downstream of ARF7 and ARF19 to Regulate Lateral Root Development in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, *54*(8), 1326–1334. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct081>
- Kircher, S., & Schopfer, P. (2016). Priming and positioning of lateral roots in Arabidopsis. An approach for an integrating concept. *Journal of Experimental Botany*, *67*(5), 1411–1420. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv541>
- Kumpf, R. P., Shi, C. L., Larrieu, A., Stø, I. M., Butenko, M. A., Péret, B., Riiser, E. S., Bennett, M. J., & Aalen, R. B. (2013). Floral organ abscission peptide IDA and its HAE/HSL2 receptors control cell separation during lateral root emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(13), 5235–5240. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210835110>
- Kurup, S., Runions, J., Köhler, U., Laplaze, L., Hodge, S., & Haseloff, J. (2005). Marking cell lineages in living tissues. *The Plant Journal*, *42*(3), 444–453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02386.x>
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., Herrera-Rodriguez, M. B., Offringa, R., Graham, N., Doumas, P., Friml, J., Bogusz, D., Beeckman, T., & Bennett, M. (2007). Cytokinins Act Directly on Lateral Root Founder Cells to Inhibit Root Initiation. *The Plant Cell*, *19*(12), 3889 LP – 3900. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055863>
- Laplaze, L., Parizot, B., Baker, A., Ricaud, L., Martinière, A., Auguy, F., Franche, C., Nussaume, L., Bogusz, D., & Haseloff, J. (2005). GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, *56*(419), 2433–2442. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri236>
- Laskowski, M., Grieneisen, V. A., Hofhuis, H., Ten Hove, C. A., Hogeweg, P., Marée, A. F. M., & Scheres, B. (2008). Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS Biology*, *6*(12), 2721–2735. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060307>
- Laskowski, M. J., Williams, M. E., Nusbaum, H. C., & Sussex, I. M. (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development*, *121*(10), 3303–3310.
- Lavrekha, V. V., Pasternak, T., Ivanov, V. B., Palme, K., & Mironova, V. V. (2017). 3D analysis of mitosis distribution highlights the longitudinal zonation and diarch symmetry in proliferation activity of the Arabidopsis thaliana root meristem. *The Plant Journal*, *92*(5), 834–845. <https://doi.org/10.1111/tpj.13720>
- Lee, H. W., Cho, C., & Kim, J. (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*(4), 1792–1806. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00578>
- Lee, H. W., Kang, N. Y., Pandey, S. K., Cho, C., Lee, S. H., & Kim, J. (2017). Dimerization in LBD16 and LBD18 transcription factors is critical for lateral root formation. *Plant Physiology*, *174*(1),

301–311. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00013>

- Lee, H. W., & Kim, J. (2013). EXPANSINA17 Up-Regulated by LBD18/ASL20 promotes lateral root formation during the auxin response. *Plant and Cell Physiology*, *54*(10), 1600–1611. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct105>
- Lee, H. W., Kim, M. J., Kim, N. Y., Lee, S. H., & Kim, J. (2013). LBD18 acts as a transcriptional activator that directly binds to the EXPANSIN14 promoter in promoting lateral root emergence of Arabidopsis. *The Plant Journal*, *73*(2), 212–224. <https://doi.org/10.1111/tpj.12013>
- Lee, H. W., Kim, N. Y., Lee, D. J., & Kim, J. (2009). LBD18/ASL20 regulates lateral root formation in combination with LBD16/ASL18 downstream of ARF7 and ARF19 in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *151*(3), 1377–1389. <https://doi.org/10.1104/pp.109.143685>
- Lee, J. Y., Colinas, J., Wang, J. Y., Mace, D., Ohler, U., & Benfey, P. N. (2006). Transcriptional and posttranscriptional regulation of transcription factor expression in Arabidopsis roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(15), 6055–6060. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510607103>
- Leyser, O. (2018). Auxin signaling. *Plant Physiology*, *176*(1), 465–479. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00765>
- Leyser, O. D. S. (2009). *Mechanisms in Plant Development - Ottoline Leyser, Stephen Day - Google Libros*. https://books.google.com.mx/books?id=G-NT63MuBJ8C&hl=es&source=gbs_similarbooks
- Lucas, M., Godin, C., Jay-Allemand, C., & Laplace, L. (2008). Auxin fluxes in the root apex co-regulate gravitropism and lateral root initiation. *Journal of Experimental Botany*, *59*(1), 55–66. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm171>
- Lucas, Mikaël, Kenobi, K., Von Wangenheim, D., Voß, U., Swarup, K., De Smet, I., Van Damme, D., Lawrence, T., Péret, B., Moscardi, E., Barbeau, D., Godin, C., Salt, D., Guyomarc'h, S., Stelzer, E. H. K., Maizel, A., Laplace, L., & Bennett, M. J. (2013). Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlaying tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(13), 5229–5234. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210807110>
- Malamy, J. E., & Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development*, *124*(1), 33–44.
- Manzano, C., Pallero-Baena, M., Casimiro, I., De Rybel, B., Orman-Ligeza, B., Van Isterdael, G., Beeckman, T., Draye, X., Casero, P., & del Pozo, J. C. (2014). The emerging role of reactive oxygen species signaling during lateral root development. *Plant Physiology*, *165*(3), 1105–1119. <https://doi.org/10.1104/pp.114.238873>
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P. J., Bennett, M., & Sandberg, G. (2002). AUX1 Promotes Lateral Root Formation by Facilitating Indole-3-Acetic Acid Distribution between Sink and Source Tissues in the Arabidopsis Seedling. *The Plant Cell*, *14*(3), 589–597. <https://doi.org/10.1105/tpc.010354>

- Marhavý, P., Bielach, A., Abas, L., Abuzeineh, A., Duclercq, J., Tanaka, H., Pařezová, M., Petrášek, J., Friml, J., Kleine-Vehn, J., & Benková, E. (2011). Cytokinin Modulates Endocytic Trafficking of PIN1 Auxin Efflux Carrier to Control Plant Organogenesis. *Developmental Cell*, *21*(4), 796–804. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.014>
- Marhavý, P., Duclercq, J., Weller, B., Feraru, E., Bielach, A., Offringa, R., Friml, J., Schwechheimer, C., Murphy, A., & Benková, E. (2014). Cytokinin controls polarity of PIN1-dependent Auxin transport during lateral root organogenesis. *Current Biology*, *24*(9), 1031–1037. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.04.002>
- Marquès-Bueno, M. M., Morao, A. K., Cayrel, A., Platre, M. P., Barberon, M., Caillieux, E., Colot, V., Jaillais, Y., Roudier, F., & Vert, G. (2016). A versatile Multisite Gateway-compatible promoter and transgenic line collection for cell type-specific functional genomics in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *85*(2), 320–333. <https://doi.org/10.1111/tpj.13099>
- Morejohn, L. C., Bureau, T. E., Molè-Bajer, J., Bajer, A. S., & Fosket, D. E. (1987). Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta*, *172*(2), 252–264. <https://doi.org/10.1007/BF00394595>
- Moreno-Risueno, M. A., Van Norman, J. M., Moreno, A., Zhang, J., Ahnert, S. E., & Benfey, P. N. (2010). Oscillating gene expression determines competence for periodic Arabidopsis root branching. *Science*, *329*(5997), 1306–1311. <https://doi.org/10.1126/science.1191937>
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., & Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *19*(1), 118–130. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047761>
- Orman-Ligeza, B., Parizot, B., de Rycke, R., Fernandez, A., Himschoot, E., van Breusegem, F., Bennett, M. J., Périlleux, C., Beeckman, T., & Draye, X. (2016). RBOH-mediated ROS production facilitates lateral root emergence in Arabidopsis. *Development (Cambridge)*, *143*(18), 3328–3339. <https://doi.org/10.1242/dev.136465>
- Pacheco-Escobedo, M. A., Ivanov, V. B., Ransom-Rodríguez, I., Arriaga-Mejía, G., Ávila, H., Baklanov, I. A., Pimentel, A., Corkidi, G., Doerner, P., Dubrovsky, J. G., Álvarez-Buylla, E. R., & Garay-Arroyo, A. (2016). Longitudinal zonation pattern in Arabidopsis root tip defined by a multiple structural change algorithm. *Annals of Botany*, *118*(4), 763–776. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw101>
- Parizot, B., Laplaze, L., Ricaud, L., Boucheron-Dubuisson, E., Bayle, V., Bonke, M., De Smet, I., Poethig, S. R., Helariutta, Y., Haseloff, J., Chriqui, D., Beeckman, T., & Nussaume, L. (2008). Diarch symmetry of the vascular bundle in Arabidopsis root encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation. *Plant Physiology*, *146*(1), 140–148. <https://doi.org/10.1104/pp.107.107870>
- Parslow, A., Cardona, A., & Bryson-Richardson, R. J. (2014). Sample Drift Correction Following 4D Confocal Time-lapse Imaging. *JoVE*, *86*, e51086. <https://doi.org/doi:10.3791/51086>
- Péret, B., Middleton, A. M., French, A. P., Larrieu, A., Bishopp, A., Njo, M., Wells, D. M., Porco, S., Mellor, N., Band, L. R., Casimiro, I., Kleine-Vehn, J., Vanneste, S., Sairanen, I., Mallet, R., Sandberg, G., Ljung, K., Beeckman, T., Benkova, E., ... Bennett, M. J. (2013). Sequential

- induction of auxin efflux and influx carriers regulates lateral root emergence. *Molecular Systems Biology*, 9(699), 1–15. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.43>
- Preibisch, S., Saalfeld, S., & Tomancak, P. (2009). Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics*, 25(11), 1463–1465. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp184>
- Ramakrishna, P., Duarte, P. R., Rance, G. A., Schubert, M., Vordermaier, V., Vu, L. D., Murphy, E., Barro, A. V., Swarup, K., Moirangthem, K., Jørgensen, B., Van De Cotte, B., Goh, T., Lin, Z., Voß, U., Beeckman, T., Bennett, M. J., Gevaert, K., Maizel, A., & De Smet, I. (2019). EXPANSIN A1-mediated radial swelling of pericycle cells positions anticlinal cell divisions during lateral root initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(17), 8597–8602. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820882116>
- Reinhardt, D., Pesce, E. R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J., & Kuhlemeier, C. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*, 426(6964), 255–260. <https://doi.org/10.1038/nature02081>
- Richter, G. L., Monshausen, G. B., Krol, A., & Gilroy, S. (2009). Mechanical stimuli modulate lateral root organogenesis. *Plant Physiology*, 151(4), 1855–1866. <https://doi.org/10.1104/pp.109.142448>
- Roberts, I., Smith, S., Stes, E., De Rybel, B., Staes, A., Van De Cotte, B., Njo, M. F., Dedeyne, L., Demol, H., Lavenus, J., Audenaert, D., Gevaert, K., Beeckman, T., & De Smet, I. (2016). CEP5 and XIP1/CEPR1 regulate lateral root initiation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 67(16), 4889–4899. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw231>
- Scheres, B., Benfey, P., & Dolan, L. (2002). Root Development. *The Arabidopsis Book*, 1, e0101. <https://doi.org/10.1199/tab.0101>
- Shukla, V., Lombardi, L., Iacopino, S., Pencik, A., Novak, O., Perata, P., Giuntoli, B., & Licausi, F. (2019). Endogenous Hypoxia in Lateral Root Primordia Controls Root Architecture by Antagonizing Auxin Signaling in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 12(4), 538–551. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.01.007>
- Sussex, I. M., Godoy, J. A., Kerk, N. M., Laskowski, M. J., Nusbaum, H. C., Welsch, J. A., & Williams, M. E. (1995). Cellular and molecular events in a newly organizing lateral root meristem. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 350(1331), 39–43. <https://doi.org/10.1098/rstb.1995.0135>
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., Levesque, M. P., Carrier, D., James, N., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., ... Bennett, M. J. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology*, 10(8), 946–954. <https://doi.org/10.1038/ncb1754>
- Teale, W., & Palme, K. (2018). Naphthylphthalamic acid and the mechanism of polar auxin transport. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 303–312. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx323>

- Torres-Martínez, H. H., Rodríguez-Alonso, G., Shishkova, S., & Dubrovsky, J. G. (2019). Lateral root primordium morphogenesis in angiosperms. *Frontiers in Plant Science*, *10*.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00206>
- Trinh, C. D., Laplace, L., & Guyomarc'h, S. (2018). Lateral Root Formation: Building a Meristem de novo . In *Annual Plant Reviews online* (Vol. 1).
<https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0650>
- Truernit, E., Bauby, H., Dubreucq, B., Grandjean, O., Runions, J., Barthélémy, J., & Palauqui, J. C. (2008). High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of phloem development and structure in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *20*(6), 1494–1503. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056069>
- Uggla, C., Moritz, T., Sandberg, G., & Sundberg, B. (1996). Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(17), 9282–9286. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9282>
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (1997). Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements. *The Plant Cell*, *9*(11), 1963. <https://doi.org/10.2307/3870557>
- Vanneste, S., De Rybel, B., Beemster, G. T. S., Ljung, K., De Smet, I., Van Isterdael, G., Naudts, M., Iida, R., Gruissem, W., Tasaka, M., Inzé, D., Fukaki, H., & Beeckman, T. (2005). Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, *17*(11), 3035–3050.
<https://doi.org/10.1105/tpc.105.035493>
- Vermeer, J. E. M., von Wangenheim, D., Barberon, M., Lee, Y., Stelzer, E. H. K., Maizel, A., & Geldner, N. (2014). A Spatial Accommodation by Neighboring Cells Is Required for Organ Initiation in Arabidopsis. *Science*, *343*(6167), 178–183.
<https://doi.org/10.1126/science.1245871>
- Vilches Barro, A., Stöckle, D., Thellmann, M., Ruiz-Duarte, P., Bald, L., Louveaux, M., von Born, P., Denninger, P., Goh, T., Fukaki, H., Vermeer, J. E. M., & Maizel, A. (2019). Cytoskeleton Dynamics Are Necessary for Early Events of Lateral Root Initiation in Arabidopsis. *Current Biology*, *29*(15), 2443-2454.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.06.039>
- von Wangenheim, D., Banda, J., Schmitz, A., Boland, J., Bishopp, A., Maizel, A., Stelzer, E. H. K., & Bennett, M. (2020). Early developmental plasticity of lateral roots in response to asymmetric water availability. *Nature Plants*, *6*(2), 73–77. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0580-z>
- Von Wangenheim, D., Fangerau, J., Schmitz, A., Smith, R. S., Leitte, H., Stelzer, E. H. K., & Maizel, A. (2016). Rules and self-organizing properties of post-embryonic plant organ cell division patterns. *Current Biology*, *26*(4), 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.047>
- Westhoff, P. (1998). *Molecular Plant Development: From Gene to Plant - Peter Westhoff, Professor Institute for Plant Development and Molecular Biology Peter Westhoff, Holger Jeske, Gerd Jrgens, Klaus Kloppstech, Gerhard Link - Google Libros*.
https://books.google.com.mx/books/about/Molecular_Plant_Development.html?id=B3HwAAAMAAJ&redir_esc=y

- Wright, K. M., & Oparka, K. J. (1996). The fluorescent probe HPTS as a phloem-mobile, symplastic tracer: An evaluation using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany*, 47(296), 439–445. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.3.439>
- Xuan, W., Audenaert, D., Parizot, B., Möller, B. K., Njo, M. F., De Rybel, B., De Rop, G., Van Isterdael, G., Mähönen, A. P., Vanneste, S., & Beeckman, T. (2015). Root cap-derived auxin pre-patterns the longitudinal axis of the arabidopsis root. *Current Biology*, 25(10), 1381–1388. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.046>

10. ANEXOS

10.1. Figuras Suplementarias

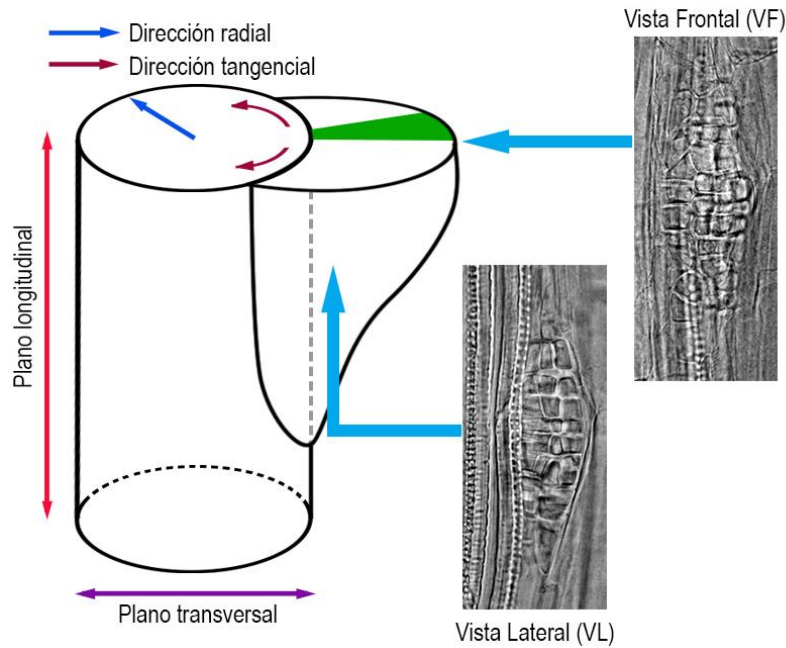


Fig. Sup. 1. Esquema de la terminología de los ejes y las direcciones usados en este estudio

Divisiones celulares anticlinales son perpendiculares a la superficie más cercana de la raíz. Divisiones celulares periclinales son paralelas a la superficie más cercana. Las direcciones de plano/dirección longitudinal y transversal hacen referencia con respecto a la RP. La dirección radial coincide con el radio de la RP. La dirección tangencial es perpendicular a la dirección radial. La vista frontal (VF) y la vista lateral (VL) se refiere a como las imágenes de los PRLs son presentadas en plano longitudinal de la RP. Las flechas azules indican estos puntos de vista.

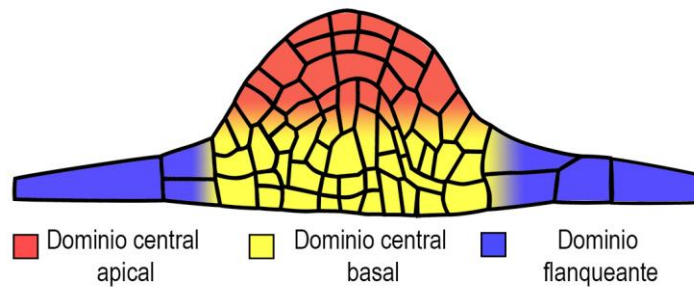
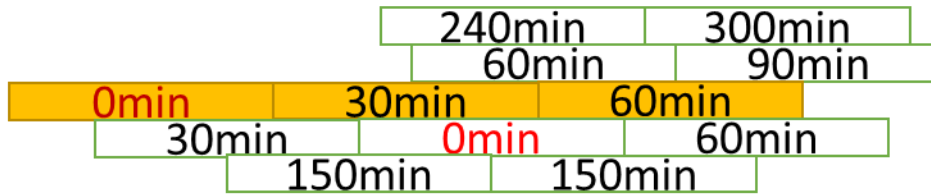


Fig. Sup. 2. Esquema de un PRL y sus dominios observados desde una vista lateral (VL)

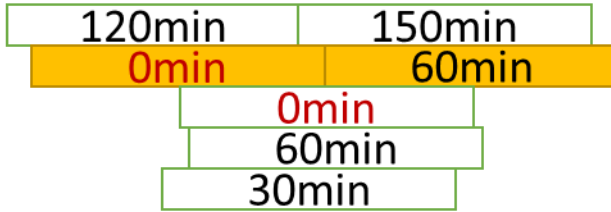
10.2. Datos primarios del análisis de reclutamiento

Se representa cada uno de los PRLs muestreados (por el método de “casa de PRLs”) y analizados. Cada rectángulo con bordes verdes representa una CF. Los rectángulos coloreados de amarillo indican CFs que actúan en la fila celular maestra (ver sección 6.3). El tiempo “0 min” indica el tiempo en que se divide la primera CF (CF0).

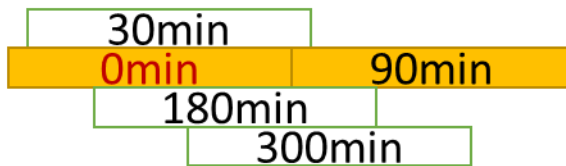
LRP1, exp180403_pos8-9-10



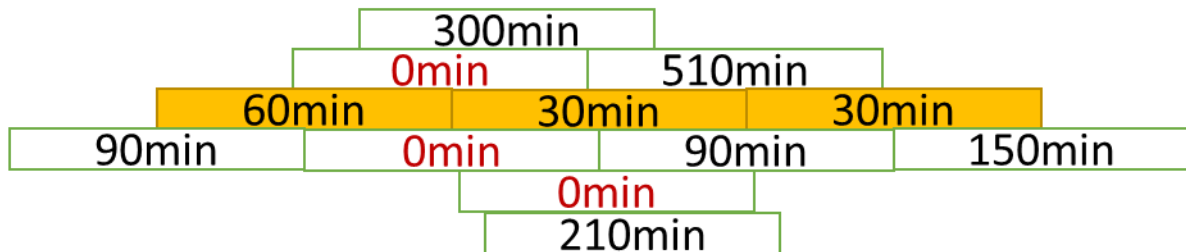
LRP2, exp180411_pos9



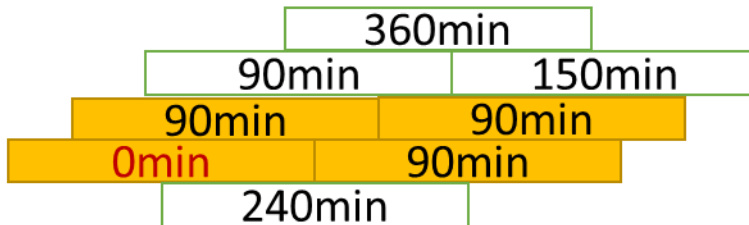
LRP3, exp180411_pos12



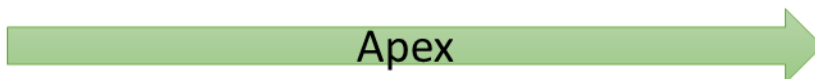
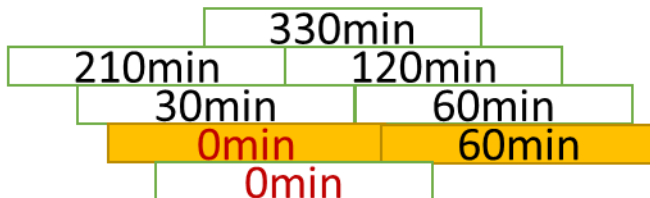
LRP4, exp180411_pos3-4



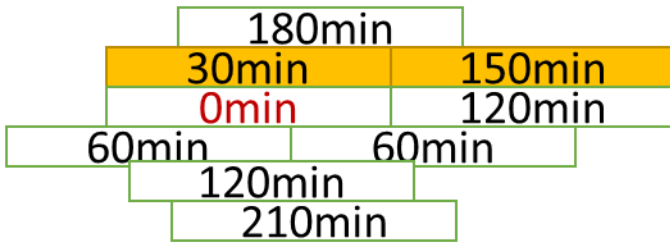
LRP5, exp180413_pos4



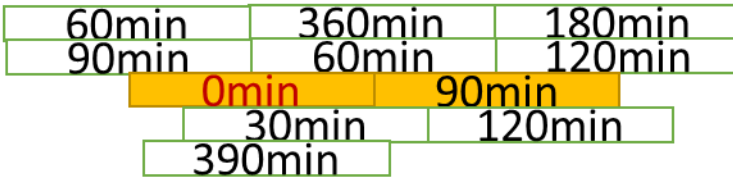
LRP6, exp80413_pos11



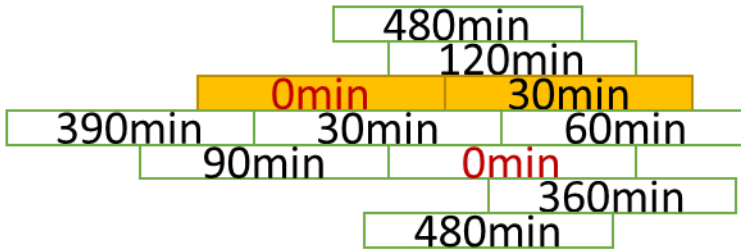
LRP7, exp180917_pos8



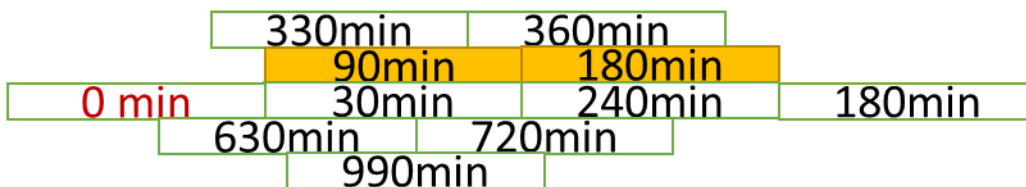
LRP8, exp181019_pos7-8-9



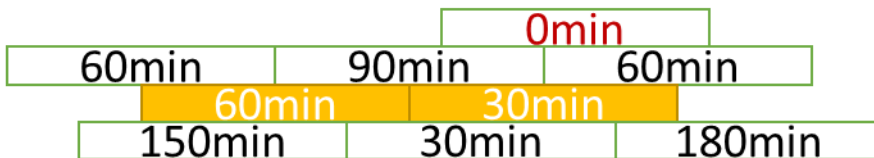
LRP9, exp181020_pos6-5



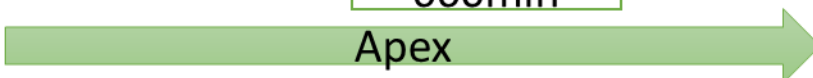
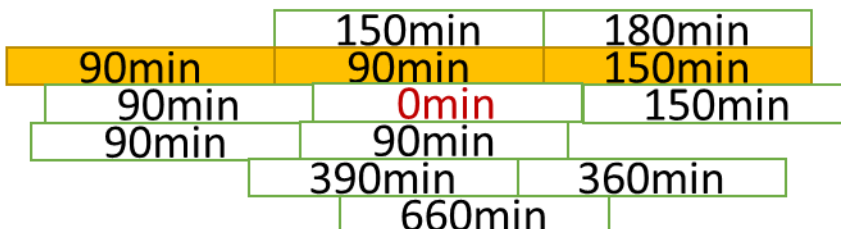
LRP10, exp181209_pos5-6-7



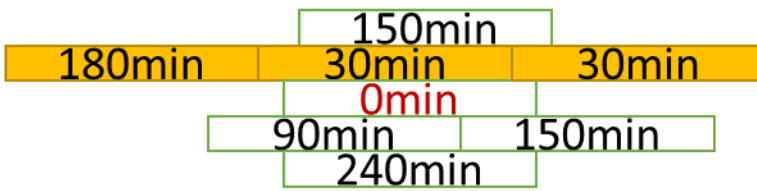
LRP11, exp190410_pos6



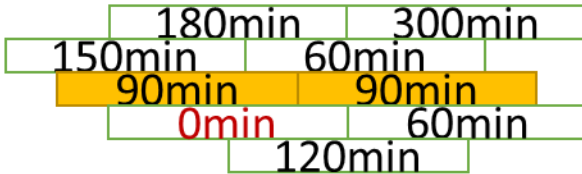
LRP12, exp190622_pos5



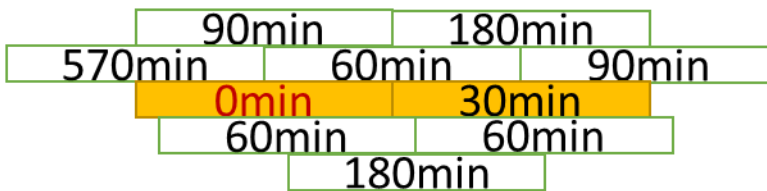
LRP13, exp190917_pos4-5



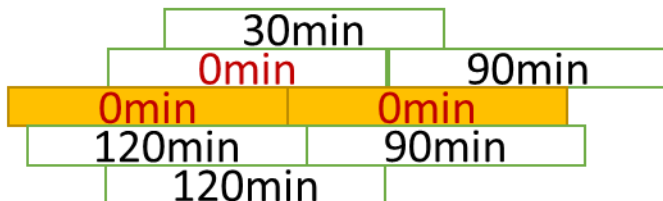
LRP14, exp191120_pos7



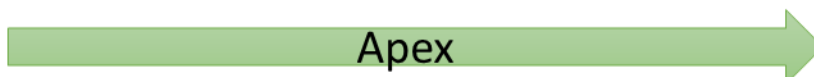
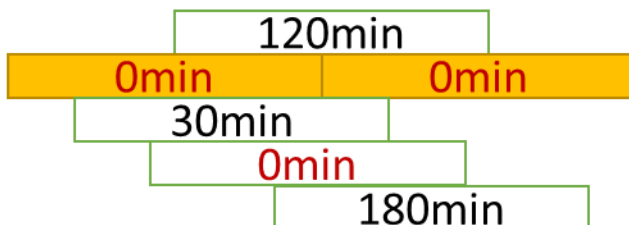
LRP15, exp191121_pos3-4



LRP16, exp180404_pos6-7



LRP17, exp191121_pos2



10.3. Publicaciones

From one cell to many: Morphogenetic field of lateral root founder cells in *Arabidopsis thaliana* is built by gradual recruitment

Héctor H. Torres-Martínez^a, Paul Hernández-Herrera^b, Gabriel Corkidi^b, and Joseph G. Dubrovsky^{a,1}

^aDepartamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca 62250, Mexico; and ^bLaboratorio de Análisis de Imágenes y Visión por Computadora, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca 62250, Mexico

Edited by Philip N. Benfey, Duke University, Durham, NC, and approved July 15, 2020 (received for review April 4, 2020)

Nota: Debido a las políticas de la editorial *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America (PNAS)*, el material correspondiente a la publicación con título “From one cell to many: Morphogenetic field of lateral root founder cells in *Arabidopsis thaliana* is built by gradual recruitment” no puede ser distribuido sin permiso, sin embargo, este material puede ser consultado en:

<https://doi.org/10.1073/pnas.2006387117>



Lateral Root Primordium Morphogenesis in Angiosperms

Héctor H. Torres-Martínez, Gustavo Rodríguez-Alonso, Svetlana Shishkova and Joseph G. Dubrovsky*

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico

Morphogenetic processes are the basis of new organ formation. Lateral roots (LRs) are the building blocks of the root system. After LR initiation and before LR emergence, a new lateral root primordium (LRP) forms. During this period, the organization and functionality of the prospective LR is defined. Thus, proper LRP morphogenesis is a decisive process during root system formation. Most current studies on LRP morphogenesis have been performed in the model species *Arabidopsis thaliana*; little is known about this process in other angiosperms. To understand LRP morphogenesis from a wider perspective, we review both contemporary and earlier studies. The latter are largely forgotten, and we attempted to integrate them into present-day research. In particular, we consider in detail the participation of parent root tissue in LRP formation, cell proliferation and timing during LRP morphogenesis, and the hormonal and genetic regulation of LRP morphogenesis. Cell type identity acquisition and new stem cell establishment during LRP morphogenesis are also considered. Within each of these facets, unanswered or poorly understood questions are identified to help define future research in the field. Finally, we discuss emerging research avenues and new technologies that could be used to answer the remaining questions in studies of LRP morphogenesis.

Keywords: root development, lateral root primordium, morphogenesis, root architecture, crop species, *Arabidopsis*, cell proliferation, stem cells

OPEN ACCESS

Edited by:

José Manuel Pérez-Pérez,
Universidad Miguel Hernández
de Elche, Spain

Reviewed by:

Juan Carlos Del Pozo,
Centro de Biotecnología y Genómica
de Plantas (CBGP), Spain
Franck Anicet Diténgou,
University of Freiburg, Germany

*Correspondence:

Joseph G. Dubrovsky
jdubrov@ibt.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Development and EvoDevo,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 29 November 2018

Accepted: 07 February 2019

Published: 19 March 2019

Citation:

Torres-Martínez HH,
Rodríguez-Alonso G, Shishkova S and
Dubrovsky JG (2019) Lateral Root
Primordium Morphogenesis
in Angiosperms.
Front. Plant Sci. 10:206.
doi: 10.3389/fpls.2019.00206

INTRODUCTION

A key function of roots—water and mineral uptake and transport—is strongly related to the root system surface area. Root branching promotes and underlies the increase in root surface area, and therefore a single lateral root (LR) constitutes a building block of the root system. Thus, root branching is a ubiquitous and widely distributed process in vascular plants. A classic example of the abundance of roots is the extended root system of a single rye plant (*Secale cereale*). During only one growth season of approximately 4 months, a single plant formed 13,815,672 roots (Dittmer, 1937), most of which were LRs. LRs are initiated in the pericycle (Laskowski et al., 1995; Dubrovsky et al., 2000, 2008; Beeckman et al., 2001; Dubrovsky and Rost, 2012; Beeckman and De Smet, 2014), and comprehensive analysis of LR development has been performed on a model species, *Arabidopsis thaliana* (hereafter *Arabidopsis*). In this species, it has been recognized that LR formation is a process that includes multiple steps: (a) pericycle priming; (b) founder cell specification; (c) the first divisions in pericycle founder cells leading to LR formation, processes defined as LR initiation; (d) lateral root primordium (LRP) formation, comprising developmental processes from the first derivatives of the founder cells to formation of the dome-shaped LRP; (e) LR emergence,

i.e., protrusion of the LRP through the external root tissues, including ground tissues and epidermis; (f) activation of the apical meristem in the nascent LR; and (g) LR growth (Malamy and Benfey, 1997; De Smet et al., 2003; Péret et al., 2009; Malamy, 2010; Stoeckle et al., 2018). The details of these processes are studied at different levels, from developmental anatomy to hormonal and genetic control (Casimiro et al., 2003; De Smet et al., 2006a; Fukaki and Tasaka, 2009; De Smet, 2012; Atkinson et al., 2014; Du and Scheres, 2017a; Dubrovsky and Laskowski, 2017; Ötvös and Benková, 2017). However, not all these steps are equally understood. One of the less understood steps comprises morphogenetic processes from LR initiation to LR emergence (**Figure 1**). Indeed, the mechanisms underlying the remarkably stable and reproducible process of formation of the three-dimensional (3D) LRP structure from a 2D plate of founder cell derivatives are a mystery. In this review, we summarize what is known about the essential elements underlying LRP morphogenesis in angiosperms and attempt to identify the basic questions related to LRP morphogenesis that remain to be answered or better understood.

PARENT TISSUES PARTICIPATING IN PRIMORDIUM FORMATION

Although the pericycle is a principal tissue giving rise to LRs in angiosperms, other parent root tissues, including the endodermis, cortex and vascular parenchyma, participate in LRP morphogenesis.

Pericycle

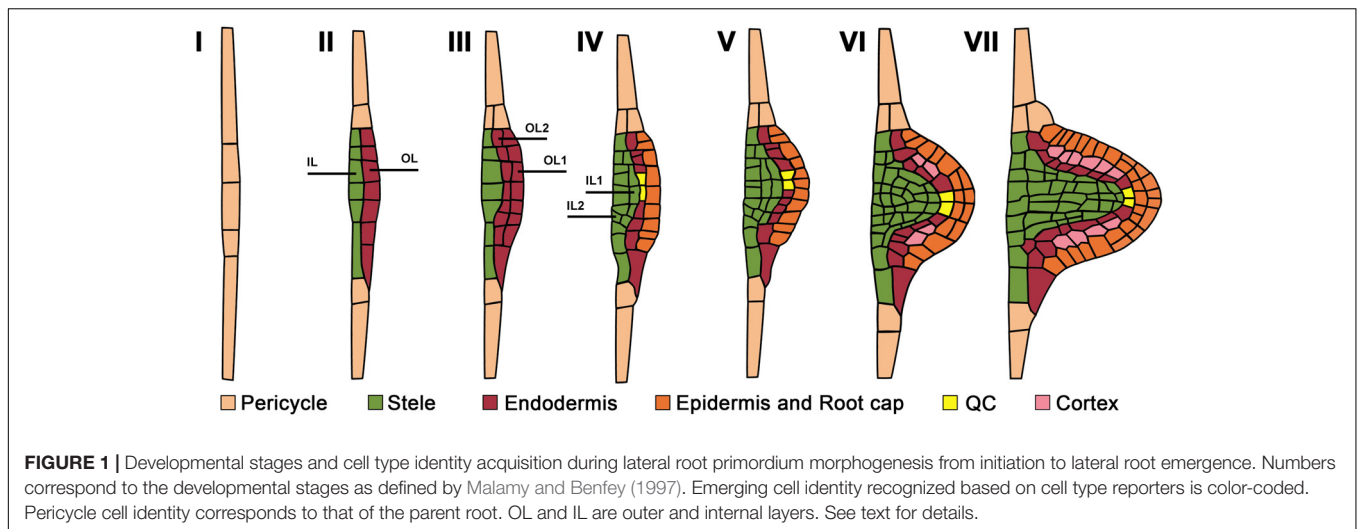
The specification of pericycle founder cells and other pre-initiation events take place before LRP initiation (De Smet et al., 2007; Moreno-Risueno et al., 2010; Van Norman et al., 2013) and are therefore beyond the scope of this review. In *Arabidopsis*, two types of LRP initiation have been recognized: longitudinal unicellular and longitudinal bi-cellular, in which a single or two adjacent pericycle founder cells in the longitudinal plane, respectively, participate in LRP initiation (Dubrovsky et al., 2001, 2008). The most common type of initiation is considered to be longitudinal bi-cellular (Casero et al., 1995; Lloret and Casero, 2002; De Rybel et al., 2010; von Wangenheim et al., 2016). However, it cannot be excluded that the longitudinal bi-cellular type is a result of the cell division of the founder cell following the longitudinal unicellular type of initiation. Even for a model species such as *Arabidopsis*, it is not known how common each initiation type is.

When viewed in a transversal plane, the number of pericycle cell files that participate in the specification of the LRP founder cells varies among species; for instance, 4 to 6 phloem-adjacent files in wheat (*Triticum aestivum*; Demchenko and Demchenko, 2001) and 6–8 xylem-adjacent cell files in *Arabidopsis* (von Wangenheim et al., 2016) are involved in LRP formation. In most species, the pericycle is a unicellular tissue layer. Nevertheless, in Cucurbitaceae, two pericycle layers, internal and external, are formed in the xylem pole, and both participate in LRP formation (Dubrovsky, 1986a; Ilina et al., 2018). The most

detailed analysis of pericycle participation in LRP morphogenesis has been performed in *Arabidopsis*. In this species, the first few divisions in the pericycle leading to LRP formation are anticlinal formative (asymmetrical) divisions (De Smet and Beeckman, 2011). Anticlinal divisions are perpendicular to the nearest root surface. As these divisions take place in few tangentially (i.e., in the direction perpendicular to the radius of the parent root) adjacent founder cells (Dubrovsky et al., 2001; Casimiro et al., 2003; von Wangenheim et al., 2016), a plate of on average 26 pericycle-derived cells is formed (von Wangenheim et al., 2016), corresponding to Stage (St) I, as defined by Malamy and Benfey (1997) (**Figure 1**). This cell plate has 2D organization and, at this point, the transition to the formation of the new growth axis that permits the 3D LRP organization is defined. The first event leading to this transition is the radial growth of StI LRP cells, resulting in the formation of the apical–basal axis of the new LR (**Figure 2**). This new growth direction is controlled by the adjacent endodermis through auxin signaling mediated by SHORT HYPOCOTYL2, SHY2/IAA3 (Vermeer et al., 2014). Radially expanded LRP cells eventually divide periclinally (Malamy and Benfey, 1997), i.e., parallel to the nearest root surface (**Figure 1**), starting in the central xylem-adjacent cell files of the plate. This division follows the established Errera's rule, which states that cells divide preferentially along the shortest distance between cell walls (Besson and Dumais, 2011). Concurrently, the tangentially flanking cells of the plate divide in an oblique orientation, impacting the formation of the oval-shaped basal portion of the prospective LRP (Lucas et al., 2013). Starting from the two-layered LRP, 3D morphogenesis continues along the axis of the future LR. The number of cells at a given developmental stage and the division patterns vary, even though the overall LRP shape changes are conserved (Lucas et al., 2013; von Wangenheim et al., 2016). The developmental stages recognized for *Arabidopsis* (Malamy and Benfey, 1997; Napsucially-Mendivil and Dubrovsky, 2018), depicted in **Figure 1**, are frequently applied to other species (Yu et al., 2016). In most angiosperms examined, pericycle participation in LRP formation is similar, at least during the early stages (Lloret and Casero, 2002).

Endodermis and Cortex

As early as the 1870s, it was documented that in addition to the pericycle, other tissues participate in LRP morphogenesis (Janczewski, 1874; Van Tieghem and Douliot, 1888; Von Guttenberg, 1968). In most dicots and monocots, the endodermis is also involved in LRP formation (Van Tieghem and Douliot, 1888; Kawata and Shibayama, 1965; Bell and McCully, 1970; Seago, 1973). In some orders—for example, Poales—endodermis participation in LRP formation requires cell dedifferentiation (Danilova and Serdyuk, 1982). The first few divisions in the endodermal layer, like in the pericycle, are anticlinal (Seago, 1973; Demchenko and Demchenko, 2001). Next, in maize (*Zea mays*; Bell and McCully, 1970), *T. aestivum* (Demchenko and Demchenko, 2001), tomato (*Solanum lycopersicum*; Ivanchenko et al., 2006) and other species, the endodermal derivatives undergo periclinal divisions and form a two-layered structure. In many angiosperm taxa, even more than two layers

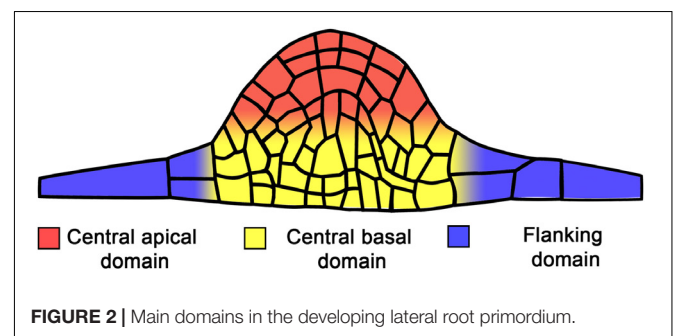


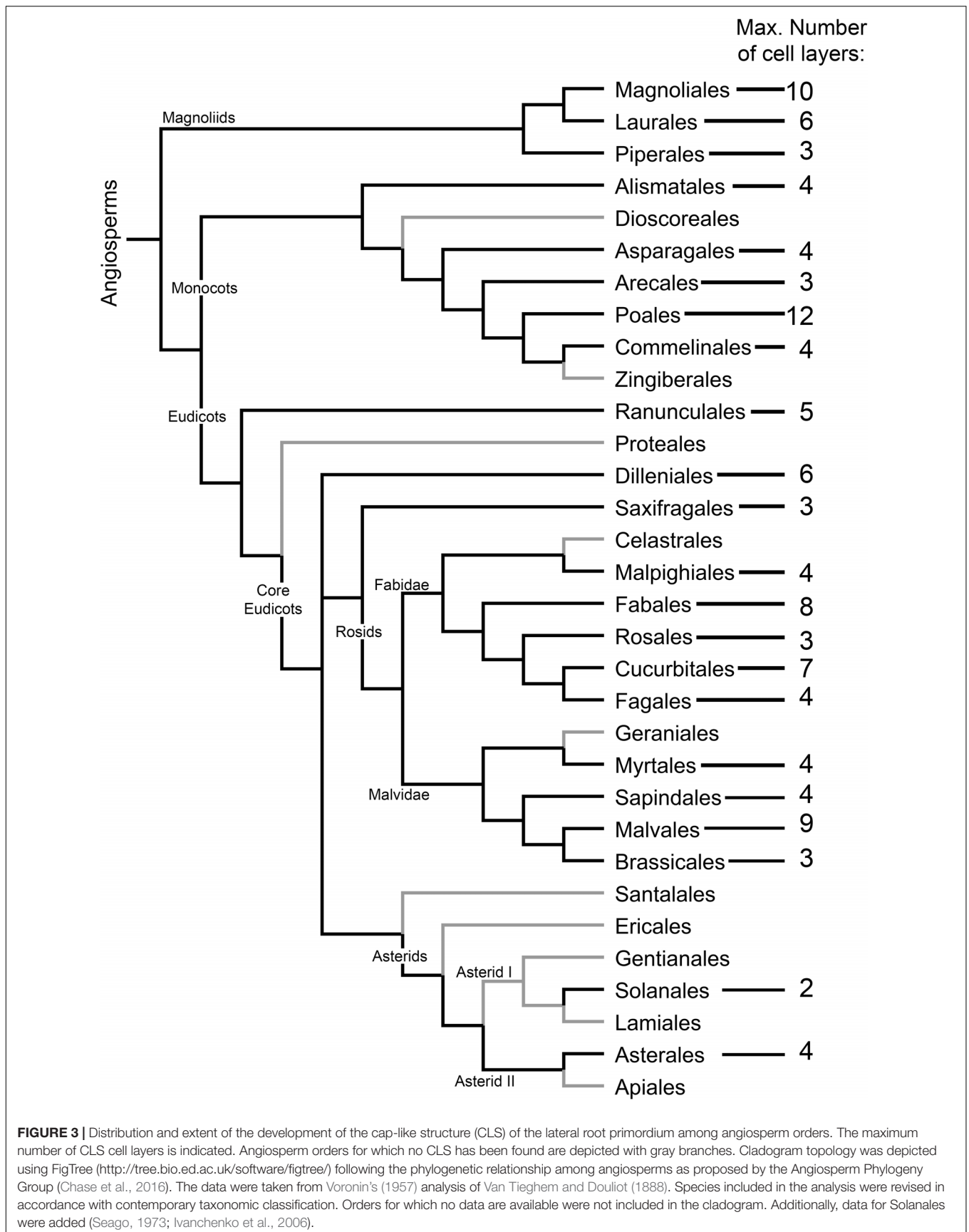
of endodermal origin can be formed (**Figure 3**). The LRP tissues of endodermal origin form a temporary structure called *Tasche* in the German literature and *Poche* in the French (Clowes, 1978a). No specific term for this structure is used in the English literature. This temporary structure has some features of the root cap and sloughs off after LR emergence. Here we call this temporary structure the *Cap-Like Structure* (CLS). The CLS results from both anticlinal and periclinal divisions of the endodermis and sometimes cortex (see below). We should note here that in some cases the CLS is not temporary but a permanent structure (see below). Anatomical studies of *Z. mays* LRPs showed that the endodermis contributes to the formation of the LR's permanent tissues, the epidermis and the root cap (Bell and McCully, 1970; Karas and McCully, 1973; McCully, 1975). This interpretation results from the fact that the epidermis of a recently emerged LR can be traced back to the endodermis of the parent root and that endodermal derivative cells in the central apical domain of the LRP start to divide periclinally and form a root cap (Bell and McCully, 1970; Karas and McCully, 1973). Particularly, when a *Z. mays* LRP protrudes about half the width of the parent root cortex, endodermal derivatives of the LRP contain abundant starch grains (Bell and McCully, 1970). By analyzing colchicine-treated chimeric LRPs that contain cells of different ploidy, Clowes (1978a) showed that the whole LR in *Z. mays* plants is of pericyclic origin and that the endodermis forms the CLS, which is maintained only for a short period after LR emergence. Similar conclusions were reached for more complex scenarios in which not only the endodermis but also the cortex participates in LRP formation (Dubrovsky, 1986a; Demchenko et al., 2001; Ilina et al., 2018), confirming the earlier view that the permanent body of the LR is entirely of pericyclic origin (Van Tieghem and Douliot, 1888).

As it is not always possible to deduce which LRP tissues are formed from the pericycle or endodermis based on anatomical observations alone, there is a need to develop cell type identity markers for this purpose. Nevertheless, anatomical studies are of great value. Based on the classical work of Philippe Van Tieghem and Douliot (1888), Voronin (1957, 1964) analyzed the types and

distribution of the CLS among angiosperms. We incorporated Voronin's data in the angiosperm phylogenetic tree proposed by the Angiosperm Phylogeny Group (Chase et al., 2016), in an effort to visualize the distribution and evolutionary trends of the appearance and types of the CLS in angiosperms (**Figure 3**). This analysis showed that the CLS is present in most angiosperm orders. The distribution of the CLS in angiosperms suggests an evolutionary trend toward CLS reduction until its complete disappearance, as inferred from the absence of a CLS in most orders of the recent Asterids clade (**Figure 3**). In *Arabidopsis*, a CLS is not found, even though it is present in other Brassicales. This 'atypical' pattern is perhaps a consequence of very simple root organization with a two-layered ground tissue composed of single layers of endodermis and cortex. It would be interesting to validate this hypothesis by analyzing LRP formation in *Arabidopsis* transgenic lines with supernumerary ground tissue layers that maintain endodermis identity (Nakajima et al., 2001).

In some species, the developing LRP is capable of inducing cell divisions in the adjacent cortex (Tschermak-Woess and Doležal, 1953; Demchenko et al., 2001) that are unrelated to LRP morphogenesis. The role of these divisions is unclear. In some taxa, cortex adjacent to the endodermis participates in CLS formation. This is commonly found in Fabaceae (Popham, 1955; Byrne et al., 1977) and Cucurbitaceae (Van Tieghem and Douliot, 1886; Dubrovsky, 1986a; Demchenko and Demchenko, 2001;





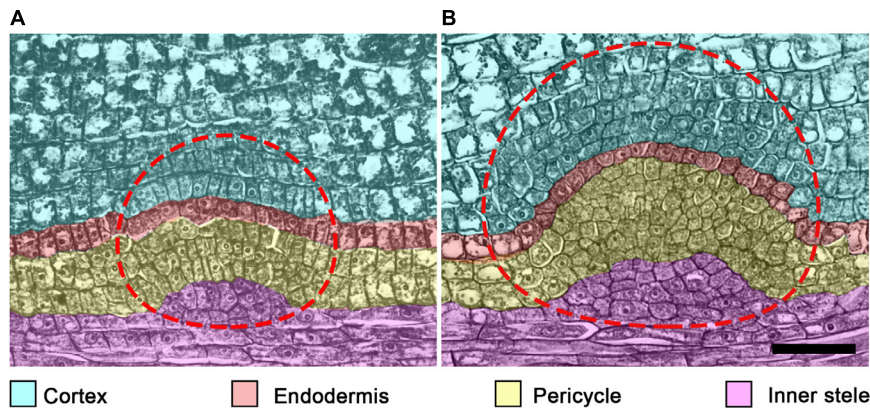


FIGURE 4 | Tissues participating in lateral root primordium (LRP) formation in cucumber (*Cucumis sativus*) root. In *C. sativus*, several embryonic LRPs are formed during embryogenesis. Within the same parent root, the more apical primordium (A) is developed to a lesser extent than the most basal primordium (B). Note the different extent of each cell type participation in LRP morphogenesis in these primordia. The temporal cap-like structure (CLS) includes endodermis and cortex derivatives of the LRP. Cell types and their derivative cells produced within the LRP are color coded. The LRP is indicated by a dashed line. Seeds were imbibed for 18 h and fixed; histological sections of the radicle were prepared and stained as described (Dubrovsky, 1986a). Scale bar = 50 μm .

Ilina et al., 2018), which form a massive CLS (Figure 4). Interestingly, the cortical and endodermal cells of the same files of the parent root that constitute the developing LRP participate in CLS formation and the cells outside the LRP of the same files do not divide (Dubrovsky, 1986a; Demchenko and Demchenko, 2001; Ilina et al., 2018). This endodermis continuity between the parent and lateral roots is not always maintained, and the CLS on the flanks can be destroyed before LR emergence, as in *Z. mays* (Clowes, 1978a). Few studies have examined how the ground tissue and epidermis of endodermal and cortical origin are replaced by the same cell types produced by the pericycle (Dubrovsky, 1986a).

Surprisingly, studies of CLS function during and after LRP formation are scarce. It has been suggested that CLS cells secrete hydrolases that may facilitate LR emergence (Van Tieghem and Douliot, 1888; Bonnett, 1969; McCully, 1975). The early literature on CLSs suggests that this structure protects the pericycle derivatives from mechanical damage as the LRP protrudes through the parental root tissues before LR emergence. Despite the fact that in most angiosperms the CLS is displaced by the permanent cap of pericyclic origin post-emergence, in some hydrophytes (e.g., *Hydrocharis*, *Lemna*, *Pistia*, *Eichornia*, and *Pontederia*) the CLS is permanently maintained on the LRs (Voronin, 1957).

Another possible function of the CLS might be related to cell proliferation. Cell division in the endodermis and the pericycle start simultaneously during LRP initiation and may create a critical mass of cells required to sustain rapid cell divisions (see section “The Cell Cycle During Lateral Root Primordium Morphogenesis and Timing Aspects”). Also, cell proliferation of the CLS is important for quiescent center (QC) establishment (see Section “Cell Type Identity Acquisition”). Whether endodermal participation in LRP morphogenesis in angiosperms is evolutionarily linked to the ability of this tissue in ferns to form LRPs (Mallory et al., 1970; Hou et al., 2004) is an open question.

Vascular Parenchyma

No participation of vascular parenchyma in LRP formation has been documented in *Arabidopsis*. Therefore, this aspect of LRP morphogenesis is seldom discussed in contemporary literature. Nonetheless, the vascular parenchyma participates in primordium formation in both monocots (Ryvosch, 1909; Bunning, 1952; Bell and McCully, 1970; Demchenko and Demchenko, 1996b) and eudicots (Seago, 1973; Byrne et al., 1977) by contributing to the vascular connection of the nascent LR and the parent root. It has been documented that vascular parenchyma cells start to divide very early, in StI LRPs in monocots (e.g., *T. aestivum*; Demchenko and Demchenko, 1996a) and StII LRPs in eudicots (e.g., *Glycine Max*; Byrne et al., 1977). During LRP formation in *G. max*, vascular parenchyma derivatives divide periclinally and form files of 4–5 cells that contribute to the formation of vascular tissues connecting the parent and lateral root (Byrne et al., 1977). Similarly, during embryonic LRP morphogenesis in the cucumber (*Cucumis sativus*) radicle, vascular parenchyma cells of the parent root divide 2–3 times periclinally, forming several layers of derivative cells (Dubrovsky, 1986a) (Figure 4). The contribution of vascular tissues of the parent root to LRP formation was also documented by the analysis of ploidy chimeras in *Z. mays* roots (Clowes, 1978a). Whether the participation of vascular parenchyma during LRP development is related to transport of nutrients or hormones toward the developing LRP remains to be determined.

THE CELL CYCLE DURING LATERAL ROOT PRIMORDIUM MORPHOGENESIS AND TIMING ASPECTS

In most angiosperms, LR initiation takes place post-germination. However, there are well-documented cases in which LR are initiated during embryogenesis, such as in Cucurbitaceae

(Clowes, 1982; Dubrovsky, 1986a,b, 1987) and Polygonaceae (buckwheat, *Fagopyrum sagittatum*, O'Dell and Foard, 1969). The extent to which LRP morphogenesis proceeds during embryogenesis ranges from StII, as in *F. sagittatum* (O'Dell and Foard, 1969), to StVII, as in *C. sativum* (Dubrovsky, 1986a). A number of embryonic LRPs are formed within the embryo (O'Dell and Foard, 1969; Dubrovsky, 1987). Interestingly, in some Cucurbitaceae in which embryonic LRP morphogenesis is documented, post-germination LRP initiation takes place in the root apical meristem (Gulyaev, 1964; Dubrovsky, 1987; Demchenko and Demchenko, 2001; Ilina et al., 2018). Some other angiosperms, especially hydrophytes from Pontederiaceae, Araceae and Alismataceae, also begin LRP morphogenesis within the apical meristem of the parent root, as reviewed elsewhere (Dubrovsky and Rost, 2003; Ilina et al., 2018). Whether there is a correlation between the species capability to start LRP morphogenesis during embryogenesis and its capacity to initiate LRPs within the root apical meristem is an open question. In most angiosperm species, however, initiation starts post-germination within the differentiation zone, where LRP morphogenesis takes place. In this review, we consider mostly these cases.

The time from LR initiation to emergence ranges from 2.8 to 3.6 days in pea (*Pisum sativum*), faba bean (*Vicia faba*), *Z. mays*, and common bean (*Phaseolus vulgaris*) (MacLeod and Thompson, 1979), is about 2.5 days in radish (*Raphanus sativus*) (Blakely et al., 1982) and 1.6–2.2 days in *Arabidopsis* (Napsucially-Mendivil et al., 2014; von Wangenheim et al., 2016). This suggests that the whole new organ can be formed during a relatively short period. Cell cycle studies in developing LRPs using labeled DNA precursors, e.g., tritiated thymidine (^3H -thymidine), have restrictions because LRPs at advanced stages do not incorporate ^3H -thymidine; for example, in *V. faba* LRPs of 1,500 or fewer cells incorporated ^3H -thymidine, whereas LRPs that contained a greater number of cells did not (Davidson and MacLeod, 1968; MacLeod and Davidson, 1968). Similarly, in monocots (*T. aestivum*), LRPs at StIII and later did not incorporate ^3H -thymidine (Demchenko and Demchenko, 1996a). Therefore, most earlier studies were based on estimating cell doubling time (*Td*), and contemporary studies use a time-lapse approach (von Wangenheim et al., 2016). *Td* estimations assume an exponential increase in cell number in the LRP (Thompson and MacLeod, 1981) to estimate the maximal duration of the cell cycle. As all LRP cells become polyploid when treated with colchicine (MacLeod and Davidson, 1968; Friedberg and Davidson, 1971), it is accepted that all the LRP cells proliferate, and the proliferation fraction is equal to one.

Cell proliferation dynamics impact the rate of primordium formation and LRP morphogenesis. It has been proposed that the rapid establishment of an LRP after initiation might have a role in lateral inhibition—i.e., preventing the initiation of new LRPs in the vicinity of ones already initiated (Dubrovsky et al., 2001). Therefore, the cell cycle in young LRPs is expected to be shorter than that in LRPs at a later developmental stage. Indeed, a few studies show that the shortest cell cycle is found at the earliest stages of LRP morphogenesis and increases

at later stages. In *V. faba*, *P. sativum*, *Z. mays*, *P. vulgaris* (MacLeod and Thompson, 1979), and *Arabidopsis* (Dubrovsky et al., 2001), the *Td* from early to later stages of LRP development increases from 8.2, 2.9, 4.5, 6.9, and 2.7 h to 14.16, 9.96, 17.65, 11.4, and 4.9 h, respectively. For *Arabidopsis*, the average *Td* in LRP cells is 7.1 h (von Wangenheim et al., 2016), about half the average cell cycle duration observed in the primary-root apical meristem (reviewed in Zhukovskaya et al., 2018). Therefore, an overall short cell cycle and a gradual increase in cell cycle duration over time seems to be a general tendency. In species with LRPs already initiated during embryogenesis, the opposite trend is found post-germination. For instance, in *C. sativus*, *Td* is the longest (8.7 h) when pre-initiated LRP cells first enter the cell cycle soon after seed imbibition and decreases to 2.7 h in the LRP just before LR emergence (Dubrovsky, 1986b), explaining why LR emerge rapidly after germination in this species.

When *V. faba* LRPs are about to emerge, their cells are less proliferatively active than during previous stages; after emergence, a sharp increase in proliferation is observed (Friedberg and Davidson, 1971; MacLeod, 1972, 1973). The rate of formation of individual LRPs within a parent root is variable, as documented for *V. faba*, *P. sativum*, *Z. mays*, and *P. vulgaris* (MacLeod and Thompson, 1979) and *Arabidopsis* (Dubrovsky et al., 2006; von Wangenheim et al., 2016). This is in agreement with the fact that, contrary to LR initiation, LRP formation along the parent root does not follow an acropetal pattern and is asynchronous. The heterogeneity in the rate of LRP formation explains why younger LRPs are found among the older ones or among emerged LR, even in the zone where the vascular cambium and secondary tissues are formed (Napsucially-Mendivil and Dubrovsky, 2018). Whether slow developing or delayed LRPs are capable of later resuming development is not well documented and remains an open question.

The processes of LR initiation and emergence are coordinated (Lucas et al., 2008b). The distance from the apex of the parent root to the site where the LR emerges depends on the site of LR initiation and on the rate of primordium formation. As mentioned above, in *Arabidopsis*, the time between LRP initiation and LR emergence is one of the shortest reported in Angiosperms. Nonetheless, the LR emerges a few centimeters from the apex. When LR are initiated in the root apical meristem of the parent roots, as in Cucurbitaceae, LR emerge at a shorter distance, e.g., 12–15 mm from the primary root apex in squash, *Cucurbita pepo* (Demchenko and Demchenko, 2001).

The role of cell cycle duration in LRP morphogenesis has not been extensively studied. The central domains of the LRP seem to develop faster than the flanking domains. **Figure 2** shows the terminology used to describe the LRP domains. The progeny of central founder cells is characterized by an average interphase duration of 6.0 h, whereas the corresponding period in the progeny of peripheral founder cells is 7.2 h (von Wangenheim et al., 2016). This suggests that the difference between cell cycle duration in each cell lineage has a profound impact on morphogenesis. It is not understood how heterogeneity in cell cycle time is related to LRP morphogenesis, whether the differences in cell cycle duration in certain domains have a critical role in defining the dome shape of the developing LRP, or whether

cell cycle time heterogeneity dictates the shape of the LRP or if the shape defines the cell cycle duration in different domains. Future studies should address these questions.

HORMONAL REGULATION OF MORPHOGENESIS

Since early studies, the importance of hormonal regulation in all aspects of LR development was recognized (Wightman et al., 1980). The role of auxin in LR development is well documented (Fukaki and Tasaka, 2009; Lavenus et al., 2013; Du and Scheres, 2017a) and LRP morphogenesis is known to depend on endogenous auxins up to StIV (Laskowski et al., 1995). In *P. sativum* plants treated with auxin transport inhibitors, normal LRP dome organization is lost and the primordium structure is transformed into a globular mass of cells (Hinchee and Rost, 1992), highlighting the significance of auxin in LRP morphogenesis. Accordingly, synthetic auxin-response promoter *DIRECT REPEAT5 (DR5)* (Ulmasov et al., 1997) activity is high during both LR initiation (Dubrovsky et al., 2008) and throughout LRP development (Benková et al., 2003; Dubrovsky et al., 2008). The auxin response maximum is present starting from StI in LRPs. From StIII, it is restricted to the central apical domain (**Figure 2**) of the LRP, corresponding to the prospective location of the QC (Dubrovsky et al., 2008). The auxin maximum apparently has a role in stem cell niche establishment and thus is important for normal LRP morphogenesis (see also the next section).

The localized auxin maximum response is present in different angiosperm orders, from monocots (*Z. mays*, Jansen et al., 2012) to eudicots (*S. lycopersicum* and *Arabidopsis*, Dubrovsky et al., 2008). It has been shown that while LR initiation does not depend on shoot-derived auxin, this source of auxin is essential for post-initiation LRP morphogenesis and LR emergence (Bhalerao et al., 2002; Ditengou et al., 2008; Swarup et al., 2008; Richter et al., 2009). A recent study strongly suggests that formation of an auxin maximum in the LRP also depends on local auxin synthesis in proliferating cells (Brumos et al., 2018). In most angiosperms, LR initiation starts in the young differentiation zone. Interestingly, when the LRP forms within the root apical meristem of the parent root, as in *C. pepo*, the auxin maximum is also established from the very early stages of LRP formation and is subsequently maintained throughout LRP development (Ilina et al., 2018). This suggests that LRP morphogenesis depends on auxin regardless of the differentiation state of the parent root cells giving rise to the LRP.

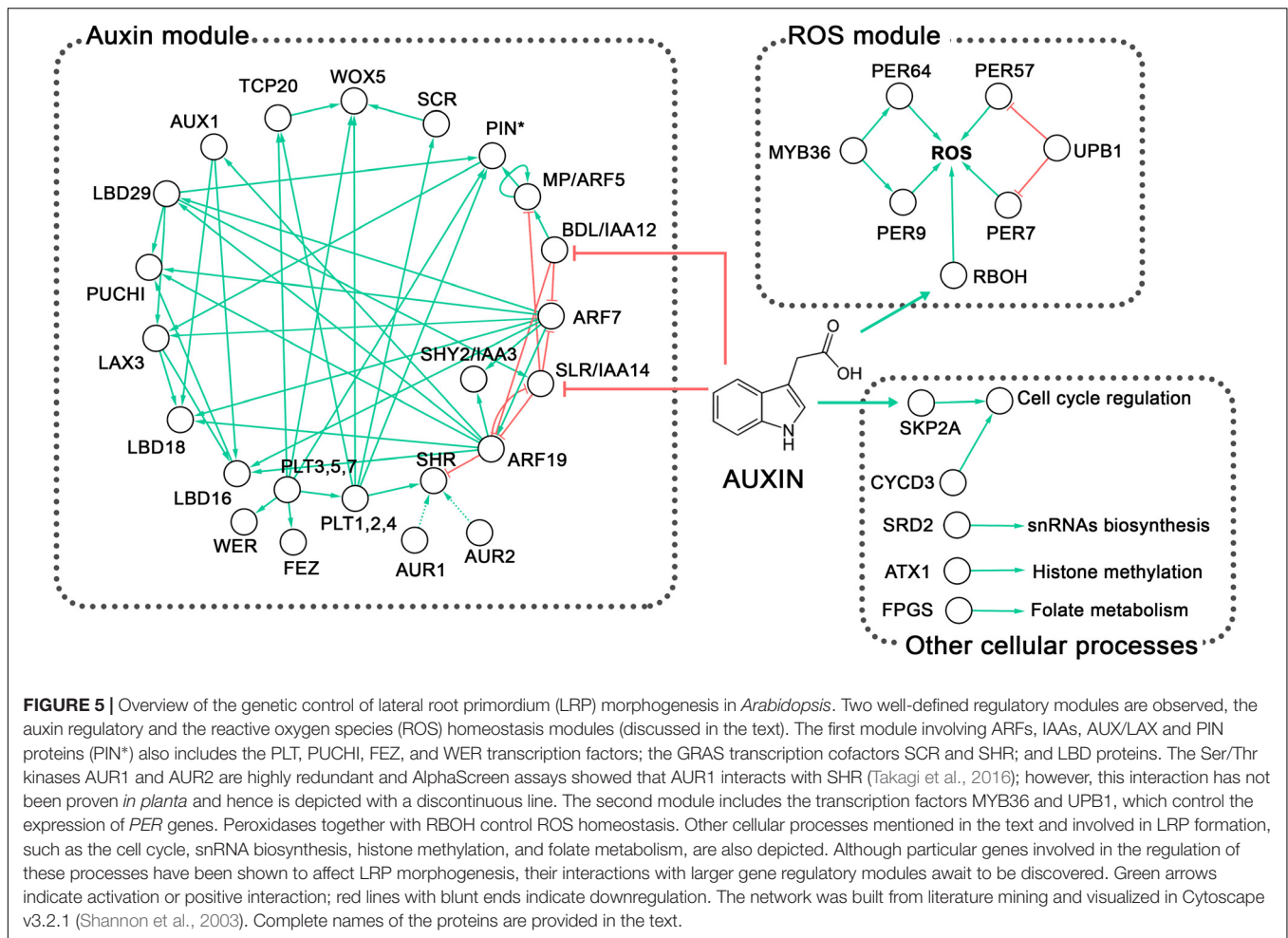
The auxin gradient with a maximum in the central apical domain (**Figure 2**) of the developing LRP is created by the auxin efflux carriers PIN-FORMED 1 (PIN1), PIN3, PIN4, PIN6, and PIN7 (Benková et al., 2003; Marhavý et al., 2014) and the auxin influx carriers AUX1 and LIKE AUX 3 (LAX3) (Marchant et al., 2002; Péret et al., 2012b). This gradient is formed by auxin flux from the flanking to the central domain and from the basal to the apical domain (**Figure 2**). Mutations that affect auxin transport lead to abnormal LRP formation. In the *pin1* mutant, LRP formation is slow and DR5 promoter activity is extended to

more cells (Benková et al., 2003). Similarly, LRP formation takes more time in a *lax3* mutant (Swarup et al., 2008). Additionally, similar phenotypes are found in single and multiple mutants in *LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN/ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE (LBD)* genes encoding transcription factors, such as *lbd29* (Porco et al., 2016), *lbd16 lbd18* double and *lbd16 lbd18 lbd29* triple mutants (Feng et al., 2012; Lee et al., 2015), which are targets of auxin signaling through AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (ARF7) and ARF19 transcription factors (Okushima et al., 2007). These phenotypes are explained by the finding that LBDs directly or indirectly promote expression of auxin influx carriers (Feng et al., 2012; Lee et al., 2015; Porco et al., 2016).

In the *pin1 pin3 pin4* triple mutant, treatment with exogenous auxin results in a massive division of pericycle cells and formation of a multilayered pericycle without a defined LRP structure, a phenotype similar to that of wild-type (Wt) seedlings treated with auxin transport inhibitor (Benková et al., 2003). Similarly, the role of auxin in correct cell division orientation during LRP morphogenesis is shown in *pin2 pin3 pin7* triple mutants that form fused LR (Laskowski et al., 2008). *S. lycopersicum* *DIAGEOTROPICA (DGT)* encodes Cyclophilin A, which negatively regulates PIN protein localization and thereby affects both LRP initiation and morphogenesis (Ivanchenko et al., 2015). When pericycle cell proliferation is induced by auxin treatment in a *dgt* mutant, massive cell proliferation without formation of a recognizable primordium is observed (Ivanchenko et al., 2006). Auxin response restriction to the central apical domain of the LRP depends on the APETALA2-class transcription factor *PLETHORA (PLT)* genes (Du and Scheres, 2017b), whose expression in turn depends on AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (ARF7) and ARF19 (Hofhuis et al., 2013). In the *plt3 plt5 plt7* triple mutant, DR5 activity is more diffuse and PIN1 and PIN3 expression is low or absent. In addition, due to abolishment of the auxin gradient in the mutant, periclinal cell divisions in LRPs are delayed or absent from StII onwards (Du and Scheres, 2017b). This work underlines the importance of auxin in LRP morphogenesis and cell division orientation. In line with this, it was shown that the correct orientation of pericycle cell divisions leading to LRP formation is abolished when the adjacent endodermal cell is ablated, but it is restored when exogenous auxin is added (Marhavý et al., 2016).

The processes of LRP initiation and LRP morphogenesis are linked, as the first cell division of founder cells triggers a new developmental program that permits *de novo* organ formation (Dubrovsky et al., 2008). This triggering is dependent on ARF7, ARF19, and INDOLE-3 ACETIC ACID 14 (IAA14)/SOLITARY-ROOT, the latter of which represses ARFs (Fukaki et al., 2005). Importantly, in the lateral rootless mutant *solitary root (slr)/iaa14* (Fukaki et al., 2002) and double mutant *arf7 arf19* (Okushima et al., 2005; Wilmoth et al., 2005), LRP initiation is almost completely abolished, although some StI but no StII LRPs still form. This phenotype cannot be rescued by the application of exogenous auxin (Fukaki et al., 2002; Okushima et al., 2005; Wilmoth et al., 2005).

Overexpression of *CYCLIND3;1* in the *slr* mutant background promotes cell proliferation in pericycle cells but no



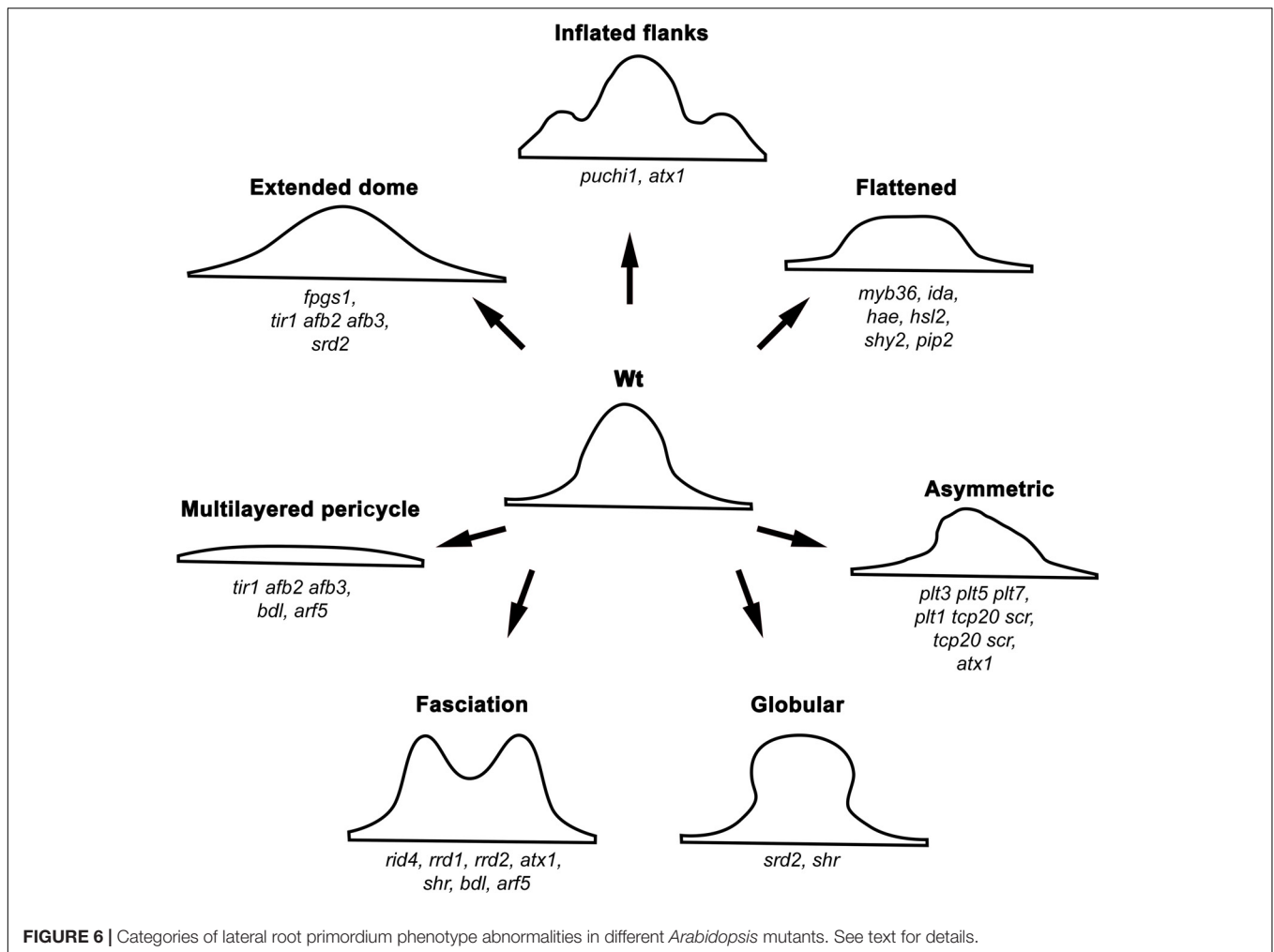
organized LRPs are formed beyond StI (Vanneste et al., 2005; De Smet et al., 2010). This LRP arrest is bypassed when the *slr* *CYCD3;1^{OE}* line is treated with exogenous auxin. The treatment re-establishes normal LRP morphogenesis, which is accompanied by restoration of *ARABIDOPSIS CRINKLY4* (*ACR4*) and *PLT3* expression, which are downregulated in *slr-CYCD3;1^{OE}* (De Smet et al., 2010). Therefore, activation of cell proliferation is necessary but not sufficient to trigger LRP morphogenesis, and both correct auxin signaling and cell proliferation are required for normal LRP morphogenesis (Figure 5). It seems that auxin is linked to cell proliferation in this context through an F-box protein S-Phase Kinase-Associated Protein 2A (SKP2A) (Jurado et al., 2010).

Another important auxin-signaling module involved in LRP morphogenesis was revealed based on phenotypic analysis of the *bodenlos* (*bdl*)/*iaa12* and *monopteros*/*arf5* mutants (De Smet et al., 2010). In these mutants, a multilayered pericycle and fused LRPs show clear abnormalities in morphogenesis (Figure 6), demonstrating again that auxin signaling is of paramount importance for organized LRP development. Similarly, in the triple mutant affected in proteins involved in auxin perception, TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1), AUXIN SIGNALING F-BOX2 (AFB2), and AFB3 (Dharmasiri

et al., 2005; Kepinski and Leyser, 2005), LRP morphogenesis turns out to be abnormal, resulting either in a multilayered pericycle or unusually wide LRPs (Figure 6) (Dubrovsky et al., 2011).

Cytokinins (CKs) are likewise important for LRP morphogenesis. CK biosynthesis takes place in the developing LRPs as shown using the PHOSPHATES-ISOPENENTENYL TRANSFERASE *pIPT5::GFP* reporter (Takei et al., 2004). CKs are negative regulators of LR development (Li et al., 2006; Laplaze et al., 2007; Marhavý et al., 2011; Bielach et al., 2012). Specifically, CKs inhibit LRP initiation or some of the anticlinal divisions in StI LRPs (Li et al., 2006; Laplaze et al., 2007; Bielach et al., 2012). Later stages of LRP development are also inhibited, but they are less sensitive to CKs and, for this reason, time from initiation to emergence is increased (Li et al., 2006; Laplaze et al., 2007; Bielach et al., 2012). CK-treated plants show abnormal patterns of cell division throughout LRP morphogenesis. During the early stages, a series of periclinal divisions in external and internal layers occurs out of sequence (Laplaze et al., 2007). These irregularities at the cellular level result in a flattened LRP (Laplaze et al., 2007).

Cytokinins affect the auxin response maximum in developing LRPs, diffusing or abolishing it (Laplaze et al., 2007; Marhavý et al., 2011) through downregulation of PIN expression (Laplaze



et al., 2007). From StIII onwards, low concentrations of exogenous N6-benzyladenine (a synthetic cytokinin) promote depletion of PIN1 in the plasma membrane to a greater extent at anticlinal cell walls than at periclinal ones (Marhavý et al., 2014). In this manner, cytokinin modulates the polarity of PIN1, allowing auxin to flow toward the LRP central apical domain (Figure 2) (Marhavý et al., 2014). In support of this notion, in Wt, PIN1 is predominantly found at periclinal cell walls, while in CK receptor mutants, PIN1 becomes localized at anticlinal walls (Marhavý et al., 2014). This CK-dependent redistribution of PIN1 in the mutants does not permit maintenance of the same number of cells in the external layer of the StIV LRP (Marhavý et al., 2014). This analysis clearly demonstrates that both auxins and CKs are involved in maintaining LRP morphogenesis and that crosstalk between these hormones is essential at all LRP developmental stages.

The role of other hormones in LRP morphogenesis is unclear. Ethylene promotes LR emergence through its effect on cell proliferation, at least in the outer LRP layers (Ivanchenko et al., 2008), but the mechanism has not been addressed. Abscisic acid (ABA) inhibits the emergence of LRPs and promotes its dormancy (De Smet et al., 2006b; Fukaki and

Tasaka, 2009). In the parent root, a fraction of arrested or slowly developing LRPs is frequently found (Dubrovsky et al., 2006; Napsucially-Mendivil and Dubrovsky, 2018). The most plausible scenario is that ABA inhibits cell proliferation in the developing LRP, keeping it 'dormant,' but this is yet to be shown.

Knowledge of the role of brassinosteroids and gibberellins (GA) in LRP morphogenesis is fragmentary (Fukaki and Tasaka, 2009). In poplar (*Populus* sp.), GA negatively regulates LRP initiation (Gou et al., 2010), but its role in LRP formation is unknown. The *Gibberellic Acid Stimulated-Like* (*GAST-like*) gene family, regulated by GA, is suggested to be involved in LRP development in rice (*Oryza sativa*) and *Z. mays*, but its exact role has yet to be established (Zimmermann et al., 2010). Nitric oxide was recently considered to be a phytohormone (Santner and Estelle, 2009). It inhibits LRP initiation but does not affect LR emergence (Lira-Ruan et al., 2013); however, its role in LRP morphogenesis is unknown. Many—if not all—of the hormone signaling pathways converge at one point or another. These interactions can potentially influence various aspects of LRP morphogenesis and further investigation is needed to address this complex cross-talk.

MECHANICAL FORCES AND LATERAL ROOT EMERGENCE

Even from early studies, it was known that developing LRPs experience mechanical stress imposed by the overlying tissues (Pond, 1908). Additionally, the LRP is influenced by external factors such as substrate particles, soil compaction, and parent root curvatures. Roots in soil frequently meet mechanical barriers. The internal and external mechanical forces affect LRP morphogenesis, and we will briefly review what is known in this respect.

When roots were grown in beds of glass spheres, roots curved and LR initiation occurred on the external (convex) root side (Goss, 1977; Goss and Russell, 1980). Moreover, when a root is bent during the gravitropic response, or after permanent or transient manual bending that can be as short as 20 s, the LR is also formed on the convex root side (Ditengou et al., 2008; Laskowski et al., 2008; Lucas et al., 2008a,b; Richter et al., 2009; Kircher and Schopfer, 2016). At the bending site, auxin induces *AUX1* expression within the root stele of the young differentiation zone, which together with PIN protein reorientation promotes increased auxin transport toward the convex side of the root, creating a positive feedback loop that results in greater auxin levels and eventually in LR initiation (Ditengou et al., 2008; Laskowski et al., 2008).

The possibility of inducing LR initiation at the desired time and place provides a useful experimental system for studying LRP morphogenesis. With this approach, it has been shown that shootward (basipetal) transport of solutes is important for LR initiation and LRP morphogenesis. After root apical meristem removal and experimental root bending (Ditengou et al., 2008) or only after bending (Lucas et al., 2008b), the LRP develops faster on the convex side compared to intact roots. Interestingly, manual root bending promotes LRP initiation in *slr/iaa14* and *arf7 arf19* mutants and they become capable of proceeding with LRP morphogenesis, though in the latter mutant only LRPs but not LR are formed (Ditengou et al., 2008). Similarly, the ability of other auxin-related mutants to form LRPs and proceed with morphogenesis increases significantly after root bending (Richter et al., 2009). Specifically, these mutants are those affected in *AUX1*, *AUXIN RESISTANT4 (AXR4)* encoding an accessory protein involved in correct localization of *AUX1* (Dharmasiri et al., 2006), and *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1)* encoding the F-box protein auxin receptor (Tan et al., 2007). Overall, these experiments show a clear link between root bending, LR initiation, auxin accumulation at the convex root side, and the rate of LRP formation. The reasons for accelerated LRP formation in bent roots have not yet been addressed. A potential increase in auxin content during LR initiation could impact posterior development of the LRP. An increase of cytosolic Ca^{2+} in the pericycle on the convex side of bent root (Richter et al., 2009) could also impact LRP morphogenesis. Finally, mechanical forces affect cell wall properties in the root portion from which the LRP is emerging.

Cell wall remodeling and cell separation in tissues overlying the LRP are well documented and required for LRP protrusion. These processes depend on auxin signaling. Cell wall remodeling

enzymes encoded by *PECTATE LYASE1 (PLA1)* and *PLA2* are active during LRP protrusion (Laskowski et al., 2006). During this process, expression of *EXPANSIN14 (EXPA14)* (Lee et al., 2013) and *EXPA17* (Lee and Kim, 2013), which encode cell wall remodeling proteins, is activated by LBD18 transcription factor in response to auxin. A loss-of-function mutant *lbd18* is significantly affected in the progression of LRP morphogenesis, resulting in delayed LR emergence (Lee and Kim, 2013; Lee et al., 2013). This demonstrates an auxin signaling-dependent crosstalk in the tissues overlying the developing LRP. A similar delayed LR emergence phenotype is found in the loss-of-function auxin influx carrier mutant *lax3* (Swarup et al., 2008). *LAX3* is expressed in the cortex and epidermis overlying the LRP and is involved in regulating the expression of *AUXIN INDUCED IN ROOT3 (AIR3)*, encoding a subtilisin-like protease (Neuteboom et al., 1999). Furthermore, *POLYGALACTURONASES (PG)* and a *XYLOGLUCAN:XYLOGLUCOSYL TRANSFERASE 6 (XTR6)* were reported to be regulated by a signaling pathway mediated by *ARF7*, *ARF19-IAA14* and *LAX3* and by the peptide *INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION (IDA)* through the leucine-rich repeat receptor-like kinases *HAESA (HAE)* and *HAESA-LIKE2 (HSL2)* (Swarup et al., 2008; Kumpf et al., 2013). Consequently, mutations in *IDA*, *HAE*, and *HSL2* result in both delayed LR emergence and flattened LRPs (Kumpf et al., 2013).

A more severe phenotype of no LR emergence and flattened LRPs is found in auxin-treated plants carrying the stabilized variant of *SHY2/IAA3* expressed from the endodermis-specific promoter of *CASPARIAN STRIP DOMAIN PROTEIN (CASP1)* (Vermeer et al., 2014). In these transgenic lines, endodermal cells overlying the LRP were unable to decrease their turgor pressure and consequently the cell volume to permit LRP protrusion. The authors also showed that *SHY2* activity in the endodermis and not in the cortex and epidermis is important for LR emergence (Vermeer et al., 2014). Furthermore, the aquaporin water channel *PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEINS (PIPs)* have essential roles in the turgor pressure control of both the LRP and the overlying cells (Péret et al., 2012a). As expected, in *pip2* mutants, LRPs are flattened and LR emerge at a slower rate (Péret et al., 2012a).

These data collectively demonstrate the importance of auxin signaling in the control of cell wall remodeling and turgor pressure in the overlying tissues that impact LRP morphogenesis and LR emergence. However, the mechanism by which the mechanical forces are perceived, the respective signal transduction pathways, the modes of communication between overlying tissues and LRP cells, and the morphogenesis mechanisms dependent on these factors, are still to be discovered.

CELL TYPE IDENTITY ACQUISITION

In vascular plants, three main tissue systems form: dermal, ground, and vascular tissues, originating from the protoderm, periblem, and plerome histogens, respectively (Hanstein, 1870; Esau, 1977; Evert, 2006). The idea that cell types acquire their identity in the very early stages of LRP formation was first

deduced from an anatomical retrospective analysis. Going back from advanced LRP stages, when cell types can be recognized, to earlier stages, Von Guttenberg (1960) proposed that the first periclinal division in StI primordium cells forms two layers, the internal and external layer, with different developmental fates. These layers are marked on **Figure 1** as IL and OL following Malamy and Benfey (1997). The internal layer is already specified at this early stage as plerome, giving rise to the future vascular cylinder or stele. Next, the external layer of StII LRPs (OL) undergoes a second periclinal division that gives rise to two outer layers (the external OL1 and the internal outer OL2), again with different cell fates. The protoderm (prospective epidermis) and the root cap are specified from OL1 layer, and OL2 gives rise to the periblem (prospective ground tissue; Von Guttenberg, 1960). Thus, the main cell types can be recognized already in StIII LRPs. It seems that this holds true in different taxa (Von Guttenberg, 1960; Voronkina, 1978).

Remarkably, although this conclusion was based on anatomical studies, it was later confirmed using cell type-specific marker lines of *Arabidopsis* (Malamy and Benfey, 1997). **Figure 1** illustrates the sequence of the cell type identity acquisitions in the developing LRP based on cell type reporters. It was reported that the enhancer trap markers for different cell types are expressed similarly in the primary and lateral roots. The stele-specific marker *SHORT-ROOT* (*SHR*) is transcribed in the stele of the primary root (Helariutta, 2000), and also in the internal cell layer of the StII LRP (IL), confirming its vascular (stele) identity (Tian et al., 2014; Goh et al., 2016; Du and Scheres, 2017b). The endodermis-specific *SCARECROW* (*SCR*; Di Laurenzio et al., 1996) is expressed in the external layer of the StII LRP (OL), confirming its endodermal identity (Tian et al., 2014; Goh et al., 2016; Du and Scheres, 2017b). After the second periclinal division in OL of StII LRP, both resulting outer layers (OL1 and OL2) maintain endodermal identity, as confirmed by *pSCR::GFP:SCR* expression (Goh et al., 2016). When the third periclinal division occurs in the StIII LRP, it takes place in the innermost layer (IL). As evidenced by *pSHR::SHR:GFP* expression, both new layers maintain the stele identity (Goh et al., 2016). At this stage (StIV), the endodermal cell identity becomes restricted to the second outer layer (OL2).

When the internal layer of the StIII LRP (IL) divides periclinally, it forms the most internal (IL1) layer, presumably giving rise to pericycle, and the second layer (IL2), giving rise to other provascular tissues of the LRP (Malamy and Benfey, 1997). However, no pericycle-specific markers have been shown to be expressed within the central domains of an LRP. At stages V and VI, the external cells of the central domain of the LRP acquire root cap and epidermis identities, as evidenced by the promoter activity of the NAC domain transcription factor FEZ (Willemsen et al., 2008; Du and Scheres, 2017b) and of the MYB-related transcription factor WEREWOLF (Lee and Schiefelbein, 1999; Du and Scheres, 2017b), respectively. Therefore, the use of cell type-specific marker lines substantially enhanced our understanding of LRP morphogenesis and revealed that practically all meristematic cell type identities are acquired before LR emergence (Malamy and Benfey, 1997; Du and Scheres, 2017b). These

studies clearly demonstrate that differential gene expression involved in cell type identity acquisition starts very early in LRP morphogenesis.

A GFP reporter of the enhancer trap line J0121 is expressed specifically in the protoxylem-adjacent pericycle of the parent root. J0121 GFP expression was detected in all layers of the developing LRP from StI to StIII (Laplaze et al., 2005; Dubrovsky et al., 2006). This suggests that the early LRP cells possess a mixed identity. In the J0121 line, GFP is not expressed in the root apical meristem, but it is expressed throughout the elongation and differentiation zones of the parent root. Importantly, starting from StIV, GFP expression in the J0121 line is excluded from the central domains of the LRP and is maintained in the flanking domains until LR emergence, suggesting that the central and flanking domains have different developmental fates. Furthermore, this pattern suggests that, starting from StIV, the central LRP domain acquires features of a root apical meristem, as it no longer expresses J0121 GFP. This observation is in line with the fact that, from StIV onwards, the LRP becomes less dependent on the parent root (Laskowski et al., 1995), which could be related to the beginning of autonomous auxin synthesis in the LRP. Additionally, a gene regulatory network analysis showed that the formation of the central and flanking domains is controlled by two distinct gene clusters (Lavenus et al., 2015).

As discussed, the first periclinal divisions are developmentally asymmetric (Scheres and Benfey, 1999), i.e., different developmental fates are acquired by the daughter cells. Indeed, each cell type origin is dependent on these asymmetric divisions and we still do not understand how these are regulated. We do not yet know how early pericycle, xylem, phloem, and vascular parenchyma cell type identities are acquired during LRP morphogenesis. Cell type identity acquisition studies with the aid of cell type reporters are limited to *Arabidopsis*. Extension to other angiosperms is needed.

NEW STEM CELL NICHE ESTABLISHMENT

The QC in roots is a population of slowly cycling cells that gives rise to all the cells of the apical meristem and serves as an organizing center with stem cell properties (Clowes, 1954, 1975; Barlow, 1997; Bennett and Scheres, 2010; Dubrovsky and Barlow, 2015). In some species, such as *Malva sylvestris* (Byrne, 1973) and *V. faba* (MacLeod and McLachlan, 1974; MacLeod, 1977), the QC is established after LR emergence. In other species, such as *Eichornia*, *Pistia* (Clowes, 1958), and *Arabidopsis* (Goh et al., 2016), the QC is established during LRP morphogenesis. In yet other species, e.g., *Z. mays* (Clowes, 1978b), the QC can be established either before or after LR emergence. The establishment of a functional QC requires a critical mass of proliferating cells within a developing LRP. In *Z. mays*, cell proliferation in the CLS of endodermal origin is essential for QC establishment (Clowes, 1978b). This early-established QC vanishes when the CLS cells are sloughed off. Soon after, the new root cap initial cells of pericyclic origin are

produced and simultaneously a new cap and QC are established (Clowes, 1978b).

In *Arabidopsis*, the *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5* (*WOX5*) gene is specifically expressed in the QC (Sarkar et al., 2007). The *pWOX5::GFP* reporter is expressed already at StI (Ditengou et al., 2008), when LRP initiation is triggered by a primary root bending, or at StII in intact roots (Tian et al., 2014; Du and Scheres, 2017b; Shimotohno et al., 2018). This expression pattern, which resembles the expression of *WOX5* soon after the onset of embryogenesis (Sarkar et al., 2007), suggests that the cell lineage that will lead to QC establishment is specified early in root development. Moreover, the possibility exists that correct *WOX5* expression is required and sufficient to define the central domain of the LRP and could provide a hallmark for the neighboring domains (Figure 2). Another QC marker, *QC25* (Sabatini et al., 2003; ten Hove et al., 2010), starts to be expressed in the OL2 of StIV LRPs, when the cycle time increases by 70% in that layer compared to that in the most external layer, OL1 (Goh et al., 2016). QC establishment depends on *SCR*, as in the *scr* loss-of-function mutant, the specification of QC identity—as monitored by the *pWOX5::n3GFP* reporter—does not take place in the OL2 LRP layer but in the more internal layers that have stele identity (Goh et al., 2016). QC identity is completely lost in the *plt3 plt5 plt7* mutant, underlying the importance of these transcription factors in QC establishment (Du and Scheres, 2017b). *PLT1* or *PLT3* and *SCR* form a protein complex mediated by *TCP20/21* (a plant-specific *Teosinte-branched-Cycloidea* PCNA [Proliferating cell nuclear antigen]) transcription factor that binds to the *WOX5* promoter, and this complex is important for QC specification and LRP morphogenesis (Shimotohno et al., 2018). Triple mutants in genes encoding members of this complex show LRP morphogenesis abnormalities in both the central and flanking domains (Shimotohno et al., 2018). This phenotype reveals a tight link between cell type identity acquisition and morphogenetic processes. The observation that the QC is established before LR emergence suggests that LRP morphogenesis culminates with a new root apical meristem that becomes functional post-emergence. An open question is how the stem cell identity is acquired during LRP morphogenesis and what other factors are involved in this process. Again, our knowledge of this process for species other than *Arabidopsis* is limited.

GENETIC CONTROL OF LATERAL ROOT PRIMORDIUM MORPHOGENESIS

A morphogenetic process must be considered from a 3D perspective. How gene regulatory networks define an organized structure is a central question for understanding morphogenesis. The 3D structure during embryogenesis was first acquired and fixed in evolution starting from gametophore development in bryophytes. In this basal land plant, rotation in the orientation of the cell division plane in stem cells permitted 3D morphogenesis (Harrison, 2017), an evolutionary novelty involving the *CLAVATA* (*CLV*) signaling pathway (Whitewoods et al., 2018). Time-lapse (4D) analyses of the genetic control

of LRP morphogenesis are only beginning to be possible (Lucas et al., 2013; Vermeer et al., 2014; Goh et al., 2016; von Wangenheim et al., 2016) and few detailed studies of mutants affected in LRP morphogenesis have been performed. To examine the genetic control of LRP morphogenesis (Figure 5), we consider mutants that exhibit abnormal LRP formation and attempt to discern which morphogenetic processes are affected.

Some of the first mutants reported to be affected in LRP morphogenesis were *shoot redifferentiation defective* (*srd2*), *root initiation defective* (*rid4*), and *root redifferentiation* (*rrd1* and *rrd2*) (Yasutani et al., 1994; Konishi and Sugiyama, 2003; Sugiyama, 2003). These mutants were isolated in a temperature-dependent mutant screen aimed at identifying genes involved in root development that could be essential, and thus conditionally lethal if absent, during early developmental stages. In the *srd2* mutant, time from LRP initiation to LR emergence is significantly increased (Ohtani and Sugiyama, 2005; Ohtani et al., 2010). Furthermore, from StV onwards, LRP morphogenesis becomes abnormal. The altered cell division pattern results in the formation of an LRP with a wider dome than in the Wt (Ohtani et al., 2010) due to increased length and thickness of the flanking domains and a decrease in the apical-basal axis length (see the respective domains in Figure 2). This *srd2* phenotype is related to the lack of auxin maximum establishment in the apical domain of the LRP in the mutant, which results from downregulation of the PIN proteins (Ohtani et al., 2010). *SRD2* encodes a nuclear protein that shares sequence similarity with human SOLUBLE NSF ATTACHMENT PROTEIN 50 (SNAP50), a subunit of the SNAPc multiprotein complex required for small nuclear RNA transcription (Ohtani and Sugiyama, 2005; Ohtani et al., 2010). The precise mechanism of *SRD2* action in LRP morphogenesis is unknown.

The phenotype of the *rrd1*, *rrd2*, and *rid4* mutants during the LRP pre-emergence stages is similar to that described for *srd2*. Surprisingly, the post-emergence LR phenotype in these mutants is different from that of *srd2*. While in *srd2*, the LRs are globular without pronounced growth, those of the *rrd1*, *rrd2*, and *rid4* mutants do grow, but produce fasciated (fused) roots (Konishi and Sugiyama, 2003; Sugiyama, 2003). During abnormal LRP development, the internal LRP cells form the prospective stele, which appears as a fusion of two adjacent LRPs. This was shown using *pSHR::GFP* and *pPIN1::PIN1-GFP* reporters. At the same time, *pSCR::GFP* expression revealed that the single external layer corresponding to the developing endodermis encloses the fused steles of the developing LRP (Otsuka and Sugiyama, 2012). The molecular function of genes affected in these mutants remains to be identified. The abnormal cell division pattern, which is more evident when seedlings are transferred from permissive to restrictive temperatures during the earlier stages of LRP morphogenesis, is a common feature of the mutants (Otsuka and Sugiyama, 2012). Furthermore, in the non-temperature-dependent *atx1* mutant affected in a H3K4-methyltransferase, similar LRP phenotypes (wider LRP and fasciated primordia) were found (Napsucially-Mendivil et al., 2014). Abnormalities in cell division pattern and proliferation in the LRP at different developmental stages are also reported in the

shr (Lucas et al., 2011) and *folylpolyglutamate synthetase1* (*fpgs1*) mutants (Reyes-Hernández et al., 2014). LRP morphogenesis in the *srd2*, *rrd1*, *rrd2*, *rid4*, *atx1*, *shr*, and *fpgs1* mutants shows that correct cell division patterns and proliferation are critical factors in sustaining normal LRP development. In most of these cases, the abnormalities are equally distributed throughout all the LRP domains.

Lateral root primordium morphogenesis could also be affected either at specific stages or in specific LRP domains. Thus, in the *puchi* mutant, anticlinal and periclinal divisions are supernumerary in both the central and flanking domains, resulting in an increased thickness of the flanking domain and an overall flatter LRP at later stages of development (Hirota et al., 2007). *PUCHI* encodes an AP2/EREBP transcription factor that acts downstream of auxin signaling and is most strongly expressed in the flanking and basal domains (Hirota et al., 2007). Thus, *PUCHI* is apparently required to limit the extent of cell proliferation in the flanking domain and to restrict it to the central domain during LRP morphogenesis (Hirota et al., 2007). Similarly, *myb36* mutant LRPs are flatter than those of the Wt and, from StIV onwards, a defect in the transition from the flat to dome-shaped LRP is observed (Fernández-Marcos et al., 2017). More cells along the central basal and flanking domains of the *myb36* LRP are produced, resulting in wider LRPs than in the Wt (Fernández-Marcos et al., 2017). MYB36 is a transcription factor expressed in the LRP from StV onwards and is restricted to the central basal and flanking domains, where it controls the expression of peroxidases PER9 and PER64 (Fernández-Marcos et al., 2017). Thus, MYB36 apparently regulates LRP width through limiting cell proliferation mediated by changes in reactive oxygen species (ROS) balance.

In addition to the genetic control of morphogenesis at specific times and places, another aspect of morphogenesis is the control of cell division patterns and the orientation of the cell division plate. In the *aurora* (*aur*)1 *aur*2 double mutant, oblique or irregularly shaped divisions take place during StI, after the first 2–3 anticlinal divisions. Therefore, the typical layered structure of the LRP is not formed (Van Damme et al., 2011). *AUR1* and *AUR2* encode Ser/Thr kinases that phosphorylate Ser 10 of Histone H3 during mitosis (Demidov et al., 2005, 2009; Kawabe et al., 2005). A recent *in vitro* study showed that *AUR1* interacts and phosphorylates the SHR transcription factor; however, this interaction has not been confirmed *in planta* (Takagi et al., 2016). Interestingly, despite altered orientation of cell division throughout LRP development, the overall shape of the primordium is not significantly affected (Lucas et al., 2013). Nevertheless, LR emergence is substantially delayed in the *aur1 aur2* mutant (Van Damme et al., 2011; Lucas et al., 2013).

Other genes controlling the cell division orientation are those encoding PLT transcription factors. The triple mutant *plt3 plt5 plt7* is characterized by multiple defects in LRP formation, including irregular cell shapes, aberrant LRP morphology, and a lack of layered LRP structure (Hofhuis et al., 2013; Du and Scheres, 2017b). *PLT1*, *PLT2*, and *PLT4* are expressed at later stages during LRP development and their expression depends on the expression of *PLT3*, *PLT5*, and *PLT7*, which are expressed from StI onward. Therefore, the *plt3 plt5 plt7* mutant is affected

in these six *PLT* genes, highlighting their importance in LRP morphogenesis. An overview of the genetic control of LRP morphogenesis is presented in **Figure 5**, while categories of the outlined abnormal LRP phenotypes are shown in **Figure 6**.

Together with genetic analysis, transcriptomic approaches (Brady et al., 2007; Moreno-Risueno et al., 2010) have also been used recently to analyze the genetic control of LRP morphogenesis. Together, these two approaches permit construction of gene regulatory networks and thus contribute to the identification of genes involved in LR development (Lavenus et al., 2015; Voß et al., 2015). Recent papers report how the architecture of gene regulatory networks changes during LRP formation. In one such study, the gravistimulation-induced LRP system (Lucas et al., 2008a) was implemented and time-series expression data sets collected starting from LRP initiation. In this way, two mutually exclusive gene clusters regulated by auxin were identified that act in non-overlapping central and flanking domains of the LRP (Lavenus et al., 2015). One cluster involves regulation by ARF7 and ARF19 and first acts in both domains, but soon becomes restricted to the flanking domain, where it is maintained until LR emergence. The second cluster is regulated by MP, ARF6, and ARF8 and acts in the central LRP domain (Lavenus et al., 2015). This analysis confirmed the importance of previously known genes involved in LRP morphogenesis and allowed the identification of new gene regulatory network nodes that potentially participate in LRP morphogenesis (Lavenus et al., 2015). Experimental validation of the identified genes will settle their particular roles in this process.

A transcriptomic approach was also used to identify new genes involved in LRP formation. For this, cell sorting of roots expressing the *pSKP2B:GFP* reporter, which is active at all LRP stages (Manzano et al., 2012), was performed and used to identify SKP2B-coexpressed genes (Manzano et al., 2014). This analysis revealed genes involved in ROS signaling, among others. One of these genes, *UPBEAT1* (*UPB1*), encodes a bHLH transcription factor and is expressed in the flanking LRP domain (Manzano et al., 2014). *UPB1* regulates the expression of a subset of *PEROXIDASE* (*PER*) genes involved in maintaining the ROS balance (Tsukagoshi et al., 2010; Manzano et al., 2014). LR emergence is significantly delayed in *per7* and *per57* loss-of-function mutants and is promoted in the *PER7* overexpression line, suggesting the importance of ROS in LRP morphogenesis through *UPB1*-mediated signaling (Manzano et al., 2014). In line with these studies, RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGS (*RBOH*) NADPH oxidases that produce extracellular ROS are also involved in LRP development (Manzano et al., 2014; Orman-Ligeza et al., 2016). Interestingly, nitroblue tetrazolium (NBT) staining, employed for the localization of superoxide, was detected in the central domain, but staining was absent or much lower in the flanking LRP domains (Manzano et al., 2014). In double and triple *rboh* mutants, LR emergence was also delayed, while it was accelerated in *RBOHD*-overexpressor lines (Orman-Ligeza et al., 2016). Collectively, these studies demonstrate that ROS promote progression of LRP formation and that redox state is important for LRP morphogenesis, even though it is not known

which specific morphogenetic processes are involved. Overall, transcriptomic approaches permit efficient identification of many new players involved in LRP formation and further studies should clarify their roles.

LATERAL ROOT MORPHOGENESIS AND PLANT HEALTH

A better understanding of LRP morphogenesis is important for both basic and applied science. Correct root primordium morphogenesis is the foundation of a healthy root system and appropriate root architecture. Abnormal primordium morphogenesis is a characteristic of rhizomania disease of sugar beet (*Beta vulgaris*) (D'ambra et al., 1972; Pollini and Giunchedi, 1989). This disease is induced by the beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) and causes supernumerary LR formation on the taproot, leading to a dramatic decrease of root mass and yield. The viral P25 virulence factor mimics auxin action by deregulating BvAUX28. As a result, some root-specific LBD transcription factors and EXPANSINS are upregulated, which in turn promote uncontrolled LR formation (Gil et al., 2018) and probably cause abnormal morphogenesis. Early processes of LR development affected by this and other root diseases are underexplored, and studies of these diseases may suggest strategies to control and/or prevent abnormalities in LRP morphogenesis.

CONCLUDING REMARKS AND FUTURE PERSPECTIVES

Here we outlined the main components of LRP morphogenesis in angiosperms. Each facet of LRP morphogenesis reflected in the respective sections of this review outlines specific open questions. Most data on the genetic control of LRP morphogenesis are available for *Arabidopsis* and can be used for comparative studies in angiosperms. Further understanding of LRP morphogenesis in crop species is needed to modulate or adjust root system architecture to specific growth conditions.

The main tendencies, important for further research in this field, are related to the development of new technologies that could be used to address the open questions. These tendencies are as follows:

- (1) Addressing the genetic control of morphogenesis in mutants and Wt plants by 3D analysis in time (4D) can significantly advance our understanding of root system formation. New imaging technologies and new microscopy approaches (Ovečka et al., 2018) that could be used for this purpose are already accessible. Deciphering cell division patterns and developmental rules involved in morphogenesis (Yoshida et al., 2014; von Wangenheim et al., 2016) is an important goal.
- (2) Gene regulatory networks uncover complex relationships between pathways involved in regulating different processes during LRP morphogenesis (Lavenus et al., 2015; Voß et al., 2015). Further studies of gene regulatory

networks at the single cell level and implementation of plant systems biology approaches (Libault et al., 2017) will undoubtedly contribute to answering the questions of how different LRP domains and cell types are specified and maintained, how the overall shape of the developing LRP emerges, and how timing control is operated.

- (3) LRPs develop under mechanical constraints imposed by the external parent root tissues. The role of mechanical forces during LRP morphogenesis was recognized in early studies, but only recently did their roles in both LR initiation (Vermeer et al., 2014) and morphogenesis (Stoeckle et al., 2018) begin to be understood. Models of auxin transport coupled to mechanical forces provide explanations for the robust morphogenesis observed in the *Arabidopsis* root (Romero-Arias et al., 2017) and application of these models to LRP morphogenesis should be promising. Developing new biophysical methods to monitor the mechanical properties of live cells (e.g., Elsayad et al., 2016) is challenging, but required to discern the role of the mechanical forces in LRP morphogenesis. LRP formation is closely linked to external and internal mechanical forces and the cytoskeleton (Eng and Sampathkumar, 2018), but it is unclear how the mechanical forces contribute to LRP morphogenesis.
- (4) We outlined a possible role of the temporal CLS formed during LRP morphogenesis and attempted to visualize related evolutionary trends of this particular feature of LRP morphogenesis. Understanding the relationships between different facets of LRP morphogenesis (e.g., orientation of cell division, developmental rules, participation of different cell types) and how they change during evolution is challenging but feasible in the post-genomic era. Integration of different approaches from genomics and molecular to cell biology and anatomy could help reveal evo–devo relationships in LRP morphogenesis of angiosperms.

Here we reviewed the main aspects of LRP morphogenesis that have been under investigation for more than a century. Not all available information was discussed; for instance, we did not include the role of environmental factors and mineral nutrition. We hope that the historical perspective combined here with our overview of contemporary studies of LRP morphogenesis highlights key questions that will guide future research aimed at elucidating the morphogenetic processes that take place during LRP development. Such research would yield important insights into root biology and evolution, providing a framework to modulate root system architecture, root production and root adaptation to the environment in crop species.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

HT-M and JD conceived the idea and designed the outlines of this review article. SS and JD conceptualized the content. HT-M and JD wrote the article. GR-A performed phylogenetic and gene regulatory network analyses. GR-A, HT-M, and JD

prepared the illustrations. All authors participated in the editorial improvement of the text and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico (CONACyT Grants 237430 to JD and 240055 to SS) and DGAPA-PAPIIT-UNAM (Grants IN200818 to JD and IN201318 to SS).

REFERENCES

- Atkinson, J. A., Rasmussen, A., Traini, R., Voß, U., Sturrock, C. J., Mooney, S. J., et al. (2014). Branching out in roots: uncovering form, function and regulation. *Plant Physiol.* 166, 538–550. doi: 10.1104/pp.114.245423
- Barlow, P. W. (1997). “Stem cells and founder zones in plants, particularly their roots,” in *Stem Cells*, ed. C. S. Potten (London: Academic Press), 29–57. doi: 10.1016/B978-012563455-7/50003-9
- Beekman, T., Burssens, S., and Inzé, D. (2001). The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 52, 403–411.
- Beekman, T., and De Smet, I. (2014). Pericycle. *Curr. Biol.* 24, R378–R379. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.031
- Bell, J. K., and McCully, M. E. (1970). A histological study of lateral root initiation and development in *Zea mays*. *Protoplasma* 70, 179–205. doi: 10.1007/BF01276979
- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., et al. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115, 591–602. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00924-3
- Bennett, T., and Scheres, B. (2010). “Root development—Two meristems for the price of one?,” in *Current Topics in Developmental Biology Plant Development*, ed. C. P. T. Marja (Cambridge, MA: Academic Press), 67–102.
- Besson, S., and Dumais, J. (2011). Universal rule for the symmetric division of plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 6294–6299. doi: 10.1073/pnas.1011866108
- Bhalerao, R. P., Eklöf, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M., and Sandberg, G. (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* 29, 325–332. doi: 10.1046/j.0960-7412.2001.01217.x
- Bielach, A., Podlešáková, K., Marhavý, P., Duclercq, J., Cuesta, C., Müller, B., et al. (2012). Spatiotemporal regulation of lateral root organogenesis in *Arabidopsis* by Cytokinin. *Plant Cell Online* 24, 3967–3981. doi: 10.1105/tpc.112.103044
- Blakely, L. M., Durham, M., Evans, T. A., and Blakely, R. M. (1982). Experimental studies on lateral root formation in radish seedling roots. I. General methods, developmental stages, and spontaneous formation of laterals. *Bot. Gaz.* 143, 341–352. doi: 10.1086/337308
- Bonnett, H. T. (1969). Cortical cell death during lateral root formation. *J. Cell Biol.* 40, 144–159. doi: 10.1083/jcb.40.1.144
- Brady, S. M., Orlando, D. A., Lee, J.-Y., Wang, J. Y., Koch, J., Dinneny, J. R., et al. (2007). A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science* 318, 801–806. doi: 10.1126/science.1146265
- Brumos, J., Robles, L. M., Yun, J., Vu, T. C., Jackson, S., Alonso, J. M., et al. (2018). Local auxin biosynthesis is a key regulator of plant development. *Dev. Cell* 47, 306–318.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2018.09.022
- Bunning, E. (1952). Weitere Untersuchungen; über die Differenzierungsvorgänge in Wurzeln. *Z. Bot.* 40, 385–406.
- Byrne, J. M. (1973). The root apex of *malva sylvestris*. III. lateral root development and the quiescent center. *Am. J. Bot.* 60, 657–662. doi: 10.1002/j.1537-2197.1973.tb05970.x
- Byrne, J. M., Pesacreta, T. C., and Fox, J. A. (1977). Development and structure of the vascular connection between the primary and secondary root of *glycine max* (L.) Merr. *Am. J. Bot.* 64, 946–959. doi: 10.1002/j.1537-2197.1977.tb11939.x
- Casero, P. J., Casimiro, I., and Lloret, P. G. (1995). Lateral root initiation by asymmetrical transverse divisions of pericycle cells in four plant

ACKNOWLEDGMENTS

A Ph.D. fellowship to HT-M from CONACyT and DGAPA-PAPIIT-UNAM and postdoctoral fellowship from CONACyT to GR-A are thankfully acknowledged. We thank the members of the Unidad de Cómputo, Instituto de Biotecnología and S. Ainsworth for logistic help. We also thank K. Farquharson for editing the English text. We apologize to all those authors whose work was not cited due to time and space constraints.

- species: *Raphanus sativus*, *Helianthus annuus*, *Zea mays*, and *Daucus carota*. *Protoplasma* 188, 49–58. doi: 10.1007/BF01276795
- Casimiro, I., Beekman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., et al. (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci.* 8, 165–171. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00051-7
- Chase, M. W., Christenhusz, M., Fay, M., Byng, J., Judd, W., Soltis, D., et al. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* 181, 1–20. doi: 10.1016/j.jep.2015.05.035
- Clowes, F. A. L. (1954). The promeristem and the minimal constructional centre in grass root apices. *New Phytol.* 53, 108–116. doi: 10.1111/j.1469-8137.1954.tb05227.x
- Clowes, F. A. L. (1958). Development of quiescent centres in root meristems. *New Phytol.* 57, 85–88. doi: 10.1111/j.1469-8137.1958.tb05918.x
- Clowes, F. A. L. (1975). “The quiescent centre,” in *Development and Function of Roots*, eds J. G. Torrey and D. Clarkson (London: Academic Press), 3–19.
- Clowes, F. A. L. (1978a). Chimeras and the origin of lateral root primordia in *Zea mays*. *Ann. Bot.* 42, 801–807. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a085519
- Clowes, F. A. L. (1978b). Origin of the quiescent centre in *Zea mays*. *New Phytol.* 80, 409–419. doi: 10.1111/j.1469-8137.1978.tb01575.x
- Clowes, F. A. L. (1982). Changes in cell population kinetics in an open meristem during root growth. *New Phytol.* 91, 741–748. doi: 10.1111/j.1469-8137.1982.tb03353.x
- D’ambra, V., Giulini, P., and Orsenigo, M. (1972). Ricerche anatomiche e istologiche sul fittone di bietole rizomani. *Riv. Patol. Veg.* 8, 359–372.
- Danilova, M. F., and Serdyuk, E. M. (1982). Formation of the lateral roots in *Hordeum vulgare* (Poaceae) (The data of electron microscopy). *Bot. Z.* 67, 140–145.
- Davidson, D., and MacLeod, R. D. (1968). Heterogeneity in cell behaviour in primordia of *Vicia faba*. *Chromosoma* 25, 470–474. doi: 10.1007/BF02327723
- De Rybel, B., Vassileva, V., Parizot, B., Demeulenaere, M., Grunewald, W., Audenaert, D., et al. (2010). A novel Aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Curr. Biol.* 20, 1697–1706. doi: 10.1016/j.cub.2010.09.007
- De Smet, I. (2012). Lateral root initiation: one step at a time. *New Phytol.* 193, 867–873. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03996.x
- De Smet, I., and Beekman, T. (2011). Asymmetric cell division in land plants and algae: the driving force for differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 177–188. doi: 10.1038/nrm3064
- De Smet, I., Lau, S., Voá, U., Vanneste, S., Benjamins, R., Rademacher, E. H., et al. (2010). Bimodular auxin response controls organogenesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 2705–2710. doi: 10.1073/pnas.0915001107
- De Smet, I., Signora, L., Beekman, T., Inze, D., Foyer, C. H., and Zhang, H. (2003). An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant J.* 33, 543–555. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01652.x
- De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., Frei dit Frey, N., Laplaze, L., Casimiro, I., et al. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* 134, 681–690. doi: 10.1242/dev.02753
- De Smet, I., Vanneste, S., Inz, D., and Beekman, T. (2006a). Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Mol. Biol.* 60, 871–887.
- De Smet, I., Zhang, H., Inze, D., and Beekman, T. (2006b). A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends Plant Sci.* 11, 434–439.
- Demchenko, K. N., and Demchenko, N. P. (1996a). Early stages of lateral root development in *Triticum aestivum* L. *Acta Phytogeogr. Suec.* 81, 71–75.

- Demchenko, K. N., and Demchenko, N. P. (1996b). Lateral root initiation in seedlings of *Triticum aestivum* (Poaceae). *Bot. Z.* 81, 47–50.
- Demchenko, K. N., and Demchenko, N. P. (2001). “Changes of root structure in connection with the development of lateral root primordia in wheat and pumpkins,” in *Recent Advances of Plant Root Structure and Function*, eds M. Čiamporová, I. Mistrik, and F. Baluška (Netherlands: Springer), 39–47.
- Demchenko, K. N., Demchenko, N. P., and Danilova, M. F. (2001). Initiation and development of lateral root primordia in *Triticum aestivum* (Poaceae) *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) seedlings. *Bot. Z.* 86, 14–30.
- Demidov, D., Hesse, S., Tewes, A., Ruttén, T., Fuchs, J., Karimi Ashtiyani, R., et al. (2009). Aurora1 phosphorylation activity on histone H3 and its cross-talk with other post-translational histone modifications in *Arabidopsis*. *Plant J.* 59, 221–230. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03861.x
- Demidov, D., Van Damme, D., Geelen, D., Blattner, F. R., and Houben, A. (2005). Identification and dynamics of two classes of aurora-like kinases in *Arabidopsis* and other plants. *Plant Cell* 17, 836–848. doi: 10.1105/tpc.104.029710
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 441–445. doi: 10.1038/nature03543
- Dharmasiri, S., Swarup, R., Mockaitis, K., Dharmasiri, N., Singh, S. K., Kowalchuk, M., et al. (2006). AUX1 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1. *Science* 312, 1218–1220. doi: 10.1126/science.1122847
- Di Lorenzo, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysch, L., Helariutta, Y., Freshour, G., et al. (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. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80115-4
- Ditengou, F. A., Teale, W. D., Kochersperger, P., Flittner, K. A., Kneuper, I., van der Graaff, E., et al. (2008). Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 18818–18823. doi: 10.1073/pnas.0807814105
- Dittmer, H. G. (1937). A quantitative study of the roots and root hairs of a winter rye plant (*Secale cereale*). *Am. J. Bot.* 24, 417–420. doi: 10.1002/j.1537-2197.1937.tb09121.x
- Du, Y., and Scheres, B. (2017a). Lateral root formation and the multiple roles of auxin. *J. Exp. Bot.* 69, 155–167. doi: 10.1093/jxb/erx223
- Du, Y., and Scheres, B. (2017b). PLETHORA transcription factors orchestrate de novo organ patterning during *Arabidopsis* lateral root outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 11709–11714. doi: 10.1073/pnas.1714410114
- Dubrovsky, J. G. (1986a). Origin of tissues of embryonic lateral root in the cucumber, tissue interactions, and positional control in development. *Ontogenез* 17, 176–189 (English translation from Russian appeared in Soviet Journal of Developmental Biology, New York, NY: Consultant Bureau 117, 119–128).
- Dubrovsky, J. G. (1986b). Dynamics of cell reproduction and cell complexes (cell packets) in the embryonic lateral root primordium of the cucumber. *Ontogenез* 17, 525–534 (English translation from Russian appeared in Soviet Journal of Developmental Biology, New York, NY: Consultant Bureau, 517, 337–344).
- Dubrovsky, J. G. (1987). Latent embryonic root system of the cucumber. *Bot. Z.* 72, 171–176.
- Dubrovsky, J. G., and Barlow, P. W. (2015). The origins of the quiescent centre concept. *New Phytol.* 206, 493–496. doi: 10.1111/nph.13307
- Dubrovsky, J. G., Doerner, P. W., Colón-Carmona, A., and Rost, T. L. (2000). Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124, 1648–1657. doi: 10.1104/pp.124.4.1648
- Dubrovsky, J. G., Gambetta, G. A., Hernández-Barrera, A., Shishkova, S., and González, I. (2006). Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Ann. Bot.* 97, 903–915. doi: 10.1093/aob/mcj604
- Dubrovsky, J. G., and Laskowski, M. (2017). “Lateral Root Initiation,” in *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 2nd Edn, eds B. G. Murray and D. J. Murphy (Oxford: Academic Press), 256–264. doi: 10.1016/B978-0-12-394807-6.00126-X
- Dubrovsky, J. G., Napsucialy-Mendivil, S., Duclercq, J., Cheng, Y., Shishkova, S., Ivanchenko, M. G., et al. (2011). Auxin minimum defines a developmental window for lateral root initiation. *New Phytol.* 191, 970–983. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03757.x
- Dubrovsky, J. G., and Rost, T. L. (2003). “Lateral root initiation,” in *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, eds B. Thomas, D. J. Murphy, and B. J. Murray (Oxford: Elsevier Academic Press), 1101–1107.
- Dubrovsky, J. G., and Rost, T. L. (2012). *Pericycle*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1002/9780470015902.a0002085.pub2
- Dubrovsky, J. G., Rost, T. L., Colón-Carmona, A., and Doerner, P. W. (2001). Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 214, 30–36. doi: 10.1007/s004250100598
- Dubrovsky, J. G., Sauer, M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko, M. G., Friml, J., Shishkova, S., et al. (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 8790–8794. doi: 10.1073/pnas.0712307105
- Elsayad, K., Werner, S., Gallemlí, M., Kong, J., Guajardo, E. R. S., Zhang, L., et al. (2016). Mapping the subcellular mechanical properties of live cells in tissues with fluorescence emission–Brillouin imaging. *Sci. Signal.* 9:rs5. doi: 10.1126/scisignal.aaf6326
- Eng, R. C., and Sampathkumar, A. (2018). Getting into shape: the mechanics behind plant morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 46, 25–31. doi: 10.1016/j.pbi.2018.07.002
- Esau, K. (1977). *Anatomy of the Seed Plants*, 2nd Edn. New York, NY: John Wiley & Sons Ltd.
- Evert, R. F. (2006). *Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: their Structure, Function, and Development*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. doi: 10.1002/0470047380
- Feng, Z., Zhu, J., Du, X., and Cui, X. (2012). Effects of three auxin-inducible LBD members on lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 236, 1227–1237. doi: 10.1007/s00425-012-1673-3
- Fernández-Marcos, M., Desvoyes, B., Manzano, C., Liberman, L. M., Benfey, P. N., Pozo, J. C., et al. (2017). Control of *Arabidopsis* lateral root primordium boundaries by MYB36. *New Phytol.* 213, 105–112. doi: 10.1111/nph.14304
- Friedberg, S., and Davidson, D. (1971). Cell population studies in developing root primordia. *Ann. Bot.* 35, 523–533. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a084496
- Fukaki, H., Nakao, Y., Okushima, Y., Theologis, A., and Tasaka, M. (2005). Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 44, 382–395. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02537.x
- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., and Tasaka, M. (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *Plant J.* 29, 153–168. doi: 10.1046/j.0960-7412.2001.01201.x
- Fukaki, H., and Tasaka, M. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol. Biol.* 69, 437–449. doi: 10.1007/s11103-008-9417-2
- Gil, J. F., Liebe, S., Thiel, H., Lennfors, B. L., Kraft, T., Gilmer, D., et al. (2018). Massive up-regulation of LBD transcription factors and EXPANSIN s highlights the regulatory programs of rhizomania disease. *Mol. Plant Pathol.* 19, 2333–2348. doi: 10.1111/mpp.12702
- Goh, T., Toyokura, K., Wells, D. M., Swarup, K., Yamamoto, M., Mimura, T., et al. (2016). Quiescent center initiation in the *Arabidopsis* lateral root primordia is dependent on the SCARECROW transcription factor. *Development* 143, 3363–3371. doi: 10.1242/dev.135319
- Goss, M. (1977). Effects of mechanical impedance on root growth in barley (*Hordeum vulgare* L.) I. Effects on the elongation and branching of seminal root axes. *J. Exp. Bot.* 28, 96–111. doi: 10.1093/jxb/28.1.96
- Goss, M., and Russell, R. S. (1980). Effects of mechanical impedance on root growth in barley (*Hordeum vulgare* L.) III. Observations on the mechanism of response. *J. Exp. Bot.* 31, 577–588. doi: 10.1093/jxb/31.2.577
- Gou, J., Strauss, S. H., Tsai, C. J., Fang, K., Chen, Y., Jiang, X., et al. (2010). Gibberellins regulate lateral root formation in populus through interactions with auxin and other hormones. *Plant Cell* 22, 623–639. doi: 10.1105/tpc.109.073239
- Gulyaev, V. A. (1964). Initiation and formation of lateral roots in some species of Cucurbitaceae family. *Bot. Z.* 49, 1482–1485.
- Hanstein, J. (1870). Die Entwicklung des Keimes der Monocotylen und der Dikotylen. *Bot. Abhandl.* 1:1.
- Harrison, C. J. (2017). Development and genetics in the evolution of land plant body plans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 372:20150490. doi: 10.1098/rstb.2015.0490
- Helariutta, Y. (2000). The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101, 555–567. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80865-X

- Hinchee, M. A. W., and Rost, T. L. (1992). The control of lateral root development in cultured pea seedlings. II. Root fasciation induced by auxin inhibitors. *Bot. Acta* 105, 121–126. doi: 10.1111/j.1438-8677.1992.tb00276.x
- Hirota, A., Kato, T., Fukaki, H., Aida, M., and Tasaka, M. (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. doi: 10.1105/tpc.107.050674
- Hofhuis, H., Laskowski, M., Du, Y., Prasad, K., Grigg, S., Pinon, V., et al. (2013). Phyllotaxis and rhizotaxis in *Arabidopsis* are modified by three PLETHORA transcription factors. *Curr. Biol.* 23, 956–962. doi: 10.1016/j.cub.2013.04.048
- Hou, G., Hill, J., and Blancaflor, E. B. (2004). Developmental anatomy and auxin response of lateral root formation in *Ceratopteris richardii*. *J. Exp. Bot.* 55, 685–693. doi: 10.1093/jxb/erh068
- Iliina, E. L., Kiryushkin, A. S., Semenova, V. A., Demchenko, N. P., Pawlowski, K., and Demchenko, K. N. (2018). Lateral root initiation and formation within the parental root meristem of Cucurbita pepo: is auxin a key player? *Ann. Bot.* 122, 873–888. doi: 10.1093/aob/mcy052
- Ivanchenko, M. G., Coffeen, W. C., Lomax, T. L., and Dubrovsky, J. G. (2006). Mutations in the Diageotropica (Dgt) gene uncouple patterned cell division during lateral root initiation from proliferative cell division in the pericycle. *Plant J.* 46, 436–447. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02702.x
- Ivanchenko, M. G., Muday, G. K., and Dubrovsky, J. G. (2008). Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 55, 335–347. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03528.x
- Ivanchenko, M. G., Zhu, J., Wang, B., Medvecká, E., Du, Y., Azzarello, E., et al. (2015). The cyclophilin A *DIAGEOTROPICA* gene affects auxin transport in both root and shoot to control lateral root formation. *Development* 142, 712–721. doi: 10.1242/dev.113225
- Janczewski, E. (1874). Recherches sur le Developpement des Radicelles dans les Phanerogames. *Ann. Sci. Nat. Bot.* 20, 208–233.
- Jansen, L., Roberts, I., De Rycke, R., and Beekman, T. (2012). Phloem-associated auxin response maxima determine radial positioning of lateral roots in maize. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 367, 1525–1533. doi: 10.1098/rstb.2011.0239
- Jurado, S., Abraham, Z., Manzano, C. Y., López-Torrejón, G., Pacios, L. F., and del Pozo, J. C. (2010). The *Arabidopsis* cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin. *Plant Cell* 22, 3891–3904. doi: 10.1105/tpc.110.078972
- Karas, I., and McCully, M. E. (1973). Further studies of the histology of lateral root development in *Zea mays*. *Protoplasma* 77, 243–269. doi: 10.1007/BF01276762
- Kawabe, A., Matsunaga, S., Nakagawa, K., Kurihara, D., Yoneda, A., Hasezawa, S., et al. (2005). Characterization of plant Aurora kinases during mitosis. *Plant Mol. Biol.* 58, 1–13. doi: 10.1007/s11103-005-3454-x
- Kawata, I., and Shibayama, H. (1965). On the lateral root primordia formation in the crown roots of rice plants. *Jpn. J. Crop Sci.* 33, 423–431. doi: 10.1626/jcs.33.423
- Kepinski, S., and Leyser, O. (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 446–451. doi: 10.1038/nature03542
- Kircher, S., and Schopfer, P. (2016). Priming and positioning of lateral roots in *Arabidopsis*. An approach for an integrating concept. *J. Exp. Bot.* 67, 1411–1420. doi: 10.1093/jxb/erv541
- Konishi, M., and Sugiyama, M. (2003). Genetic analysis of adventitious root formation with a novel series of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 130, 5637–5647. doi: 10.1242/dev.00794
- Kumpf, R. P., Shi, C.-L., Larrieu, A., Stø, I. M., Butenko, M. A., Péret, B., et al. (2013). Floral organ abscission peptide IDA and its HAE/HSL2 receptors control cell separation during lateral root emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 5235–5240. doi: 10.1073/pnas.1210835110
- Laplaze, L., Benková, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., et al. (2007). Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell* 19, 3889–3900. doi: 10.1105/tpc.107.055863
- Laplaze, L., Parizot, B., Baker, A., Ricaud, L., Martiniere, A., Auguy, F., et al. (2005). GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 56, 2433–2442. doi: 10.1093/jxb/eri236
- Laskowski, M., Biller, S., Stanley, K., Kajstura, T., and Prusty, R. (2006). Expression profiling of auxin-treated *Arabidopsis* roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant Cell Physiol.* 47, 788–792. doi: 10.1093/pcp/pcj043
- Laskowski, M., Grieneisen, V. A., Hofhuis, H., Ten Hove, C. A., and Hogeweg, P. (2008). Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS Biol.* 6:e307. doi: 10.1371/journal.pbio.0060307
- Laskowski, M. J., Williams, M. E., Nusbaum, H. C., and Sussex, I. M. (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* 121, 3303–3310.
- Lavenus, J., Goh, T., Guyomarc'h, S., Hill, K., Lucas, M., Voß, U., et al. (2015). Inference of the *Arabidopsis* lateral root gene regulatory network suggests a bifurcation mechanism that defines primordia flanking and central zones. *Plant Cell* 27, 1368–1388. doi: 10.1105/tpc.114.132993
- Lavenus, J., Goh, T., Roberts, I., Guyomarc'h, S., Lucas, M., De Smet, I., et al. (2013). Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci.* 18, 450–458. doi: 10.1016/j.tplants.2013.04.006
- Lee, H. W., Cho, C., and Kim, J. (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 Physiol.* 168, 1792–1806. doi: 10.1104/pp.15.00578
- Lee, H. W., and Kim, J. (2013). EXPANSIN17 up-regulated by LBD18/ASL20 promotes lateral root formation during the auxin response. *Plant Cell Physiol.* 54, 1600–1611. doi: 10.1093/pcp/pct105
- Lee, H. W., Kim, M. J., Kim, N. Y., Lee, S. H., and Kim, J. (2013). LBD18 acts as a transcriptional activator that directly binds to the EXPANSIN14 promoter in promoting lateral root emergence of *Arabidopsis*. *Plant J.* 73, 212–224. doi: 10.1111/tpj.12013
- Lee, M. M., and Schiefelbein, J. (1999). WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* 99, 473–483. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81536-6
- Li, X., Mo, X., Shou, H., and Wu, P. (2006). Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 47, 1112–1123. doi: 10.1093/pcp/pcj082
- Libault, M., Pingault, L., Zogli, P., and Schiefelbein, J. (2017). Plant systems biology at the single-cell level. *Trends Plant Sci.* 22, 949–960. doi: 10.1016/j.tplants.2017.08.006
- Lira-Ruan, V., Mendivil, S. N., and Dubrovsky, J. G. (2013). Heuristic aspect of the lateral root initiation index: a case study of the role of nitric oxide in root branching. *Appl. Plant Sci.* 1:1300029. doi: 10.3732/apps.1300029
- Lloret, P. G., and Casero, P. J. (2002). “Lateral root initiation,” in *Plant Roots: the Hidden Half*, 3rd Edn, Vol. 2002, eds U. Kafkafi, Y. Waisel, and A. Eshel (Boca Raton, FL: CRC Press), 127–155. doi: 10.1201/9780203909423.ch8
- Lucas, M., Godin, C., Jay-Allemand, C., and Laplaze, L. (2008a). Auxin fluxes in the root apex co-regulate gravitropism and lateral root initiation. *J. Exp. Bot.* 59, 55–66.
- Lucas, M., Guédou, Y., Jay-Allemand, C., Godin, C., and Laplaze, L. (2008b). An auxin transport-based model of root branching in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 3:e3673. doi: 10.1371/journal.pone.0003673
- Lucas, M., Kenobi, K., von Wangenheim, D., Voß, U., Swarup, K., De Smet, I., et al. (2013). Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlying tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 5229–5234. doi: 10.1073/pnas.1210807110
- Lucas, M., Swarup, R., Paponov, I. A., Swarup, K., Casimiro, I., Lake, D., et al. (2011). SHORT-ROOT regulates primary, lateral, and adventitious root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 155, 384–398. doi: 10.1104/pp.110.165126
- MacLeod, R. (1972). Lateral root formation in *Vicia faba* L. I. The development of large primordia. *Chromosoma* 39, 341–350. doi: 10.1007/BF00290792
- MacLeod, R. (1977). Proliferating and quiescent cells in the apical meristem of elongating lateral roots of *Vicia faba* L. *Ann. Bot.* 41, 321–329. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a085294
- MacLeod, R., and Davidson, D. (1968). Delayed incorporation of H 3-thymidine by primordial cells. *Chromosoma* 24, 1–9. doi: 10.1007/BF00329602
- MacLeod, R., and McLachlan, S. (1974). The development of a quiescent centre in lateral roots of *Vicia faba* L. *Ann. Bot.* 38, 535–544. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a084839
- MacLeod, R. D. (1973). The response of root meristems to colchicine and Indol-3yl-acetic acid in *Vicia faba* L. *Ann. Bot.* 37, 687–697. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a084736
- MacLeod, R. D., and Thompson, A. (1979). Development of lateral root primordia in *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*: Rates of

- primordium formation and cell doubling times. *Ann. Bot.* 44, 435–449. doi: 10.1007/BF00384887
- Malamy, J. E. (2010). “Lateral root formation,” in *Root Development. Annual Plant Reviews*, Vol. 37, ed. T. Beeckman (Hoboken, NJ: Blackwell Publishing), 83–126.
- Malamy, J. E., and Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124, 33–44.
- Mallory, T. E., Chiang, S., Cutter, E. G., and Gifford, E. M. Jr. (1970). Sequence and pattern of lateral root formation in five selected species. *Am. J. Bot.* 57, 800–809. doi: 10.1093/jxb/erv346
- Manzano, C., Pallero-Baena, M., Casimiro, I., De Rybel, B., Orman-Ligeza, B., Van Isterdael, G., et al. (2014). The emerging role of reactive oxygen species signaling during lateral root development. *Plant Physiol.* 165, 1105–1119. doi: 10.1104/pp.114.238873
- Manzano, C., Ramirez-Parra, E., Casimiro, I., Otero, S., Desvoyes, B., De Rybel, B., et al. (2012). Auxin and epigenetic regulation of *SKP2B*, an F-Box that represses lateral root formation. *Plant Physiol.* 160, 749–762. doi: 10.1104/pp.112.198341
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P. J., Bennett, M., et al. (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, 589–597. doi: 10.1105/tpc.010354
- Marhavý, P., Bielach, A., Abas, L., Abuzeineh, A., Duclercq, J., Tanaka, H., et al. (2011). Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Dev. Cell* 21, 796–804. doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.014
- Marhavý, P., Duclercq, J., Weller, B., Feraru, E., Bielach, A., Offringa, R., et al. (2014). Cytokinin controls polarity of PIN1-dependent auxin transport during lateral root organogenesis. *Curr. Biol.* 24, 1031–1037. doi: 10.1016/j.cub.2014.04.002
- Marhavý, P., Montesinos, J. C., Abuzeineh, A., Van Damme, D., Vermeer, J. E., Duclercq, J., et al. (2016). Targeted cell elimination reveals an auxin-guided biphasic mode of lateral root initiation. *Genes Dev.* 30, 471–483. doi: 10.1101/gad.276964.115
- McCully, M. E. (1975). “The development of lateral roots,” in *The Development and Function of Roots*, eds J. G. Torrey and D. T. Clarkson (Cambridge, MA: Academic Press).
- Moreno-Risueno, M. A., Van Norman, J. M., Moreno, A., Zhang, J., Ahnert, S. E., and Benfey, P. N. (2010). Oscillating gene expression determines competence for periodic *Arabidopsis* root branching. *Science* 329, 1306–1311. doi: 10.1126/science.1191937
- Nakajima, K., Sean, G., Nawy, T., and Benfey, P. N. (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413, 307–311. doi: 10.1038/35095061
- Napsucially-Mendivil, S., Alvarez-Venegas, R., Shishkova, S., and Dubrovsky, J. G. (2014). *ARABIDOPSIS* *HOMOLOG* of *TRITHORAX1* (*ATX1*) is required for cell production, patterning, and morphogenesis in root development. *J. Exp. Bot.* 65, 6373–6384. doi: 10.1093/jxb/eru355
- Napsucially-Mendivil, S., and Dubrovsky, J. G. (2018). Genetic and phenotypic analysis of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Mol. Biol.* 1761, 47–75. doi: 10.1007/978-1-4939-7747-5_4
- Neuteboom, L. W., Ng, J. M., Kuyper, M., Clijdesdale, O. R., Hooykaas, P. J., and Van Der Zaal, B. J. (1999). Isolation and characterization of cDNA clones corresponding with mRNAs that accumulate during auxin-induced lateral root formation. *Plant Mol. Biol.* 39, 273–287. doi: 10.1023/A:1006104205959
- O’Dell, D. H., and Foard, D. E. (1969). Presence of lateral root primordia in the radicle of buckwheat embryos. *Bull. Torrey Bot. Club* 96, 1–3. doi: 10.2307/2484002
- Ohtani, M., Demura, T., and Sugiyama, M. (2010). Particular significance of SRD2-dependent snRNA accumulation in polarized pattern generation during lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 51, 2002–2012. doi: 10.1093/pcp/pcq159
- Ohtani, M., and Sugiyama, M. (2005). Involvement of SRD2-mediated activation of snRNA transcription in the control of cell proliferation competence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 43, 479–490. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02469.x
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., and Tasaka, M. (2007). *ARF7* and *ARF19* regulate lateral root formation via direct activation of *LBD/ASL* Genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 118–130. doi: 10.1105/tpc.106.047761
- Okushima, Y., Overvoorde, P. J., Arima, K., Alonso, J. M., Chan, A., Chang, C., et al. (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. doi: 10.1105/tpc.104.028316
- Orman-Ligeza, B., Parizot, B., De Rycke, R., Fernandez, A., Himschoot, E., Van Breusegem, F., et al. (2016). RBOH-mediated ROS production facilitates lateral root emergence in *Arabidopsis*. *Development* 143, 3328–3339. doi: 10.1242/dev.136465
- Otsuka, K., and Sugiyama, M. (2012). Tissue organization of fasciated lateral roots of *Arabidopsis* mutants suggestive of the robust nature of outer layer patterning. *J. Plant Res.* 125, 547–554. doi: 10.1007/s10265-011-0471-5
- Ötvös, K., and Benková, E. (2017). Spatiotemporal mechanisms of root branching. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 45, 82–89. doi: 10.1016/j.gde.2017.03.010
- Ovečka, M., von Wangenheim, D., Tomančák, P., Šamajová, O., Komis, G., and Šamaj, J. (2018). Multiscale imaging of plant development by light-sheet fluorescence microscopy. *Nat. Plants* 4, 639–650. doi: 10.1038/s41477-018-0238-2
- Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplaze, L., et al. (2009). *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.* 14, 399–408. doi: 10.1016/j.tplants.2009.05.002
- Péret, B., Li, G., Zhao, J., Band, L. R., Voß, U., Postaire, O., et al. (2012a). Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nat. Cell Biol.* 14, 991. doi: 10.1038/ncb2573
- Péret, B., Swarup, K., Ferguson, A., Seth, M., Yang, Y., Dhondt, S., et al. (2012b). *AUX/LAX* genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during *Arabidopsis* development. *Plant Cell Online* 24, 2874–2885. doi: 10.1105/tpc.112.097766
- Pollini, C. P., and Giunchedi, L. (1989). Comparative histopathology of sugar beets that are susceptible and partially resistant to rhizomania. *Phytopathol. Mediterr.* 28, 16–21.
- Pond, R. H. (1908). Emergence of lateral roots. *Bot. Gazette* 46, 410–421. doi: 10.1086/329783
- Popham, R. A. (1955). Zonation of primary and lateral root apices of *Pisum sativum*. *Am. J. Bot.* 42, 267–273. doi: 10.1002/j.1537-2197.1955.tb11118.x
- Porco, S., Larrieu, A., Du, Y., Gaudinier, A., Goh, T., Swarup, K., et al. (2016). Lateral root emergence in *Arabidopsis* is dependent on transcription factor *LBD29* regulating auxin influx carrier *LAX3*. *Development* 143, 3340–3349. doi: 10.1242/dev.136283
- Reyes-Hernández, B. J., Srivastava, A. C., Ugartechea-Chirino, Y., Shishkova, S., Ramos-Parra, P. A., Lira-Ruan, V., et al. (2014). The root indeterminacy-to-determinacy developmental switch is operated through a folate-dependent pathway in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 202, 1223–1236. doi: 10.1111/nph.12757
- Richter, G. L., Monshausen, G. B., Krol, A., and Gilroy, S. (2009). Mechanical stimuli modulate lateral root organogenesis. *Plant Physiol.* 151, 1855–1866. doi: 10.1104/pp.109.142448
- Romero-Arias, J. R., Hernández-Hernández, V., Benítez, M., Alvarez-Buylla, E. R., and Barrio, R. A. (2017). Model of polar auxin transport coupled to mechanical forces retrieves robust morphogenesis along the *Arabidopsis* root. *Phys. Rev. E* 95:032410. doi: 10.1103/PhysRevE.95.032410
- Ryosch, S. (1909). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Seitenwurzeln der Monocotylen. *Z. Bot.* 1, 253–283.
- Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., and Scheres, B. (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes Dev.* 17, 354–358. doi: 10.1101/gad.252503
- Santner, A., and Estelle, M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* 459, 1071–1078. doi: 10.1038/nature08122
- Sarkar, A. K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., et al. (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446, 811–814. doi: 10.1038/nature05703
- Scheres, B., and Benfey, P. N. (1999). Asymmetric cell division in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 505–537. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.505

- Seago, J. L. (1973). Developmental anatomy in roots of *Ipomoea purpurea*. II. initiation and development of secondary roots. *Am. J. Bot.* 60, 607–618. doi: 10.1002/j.1537-2197.1973.tb05965.x
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., et al. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. doi: 10.1101/gr.1239303
- Shimotohno, A., Heidstra, R., Blilou, I., and Scheres, B. (2018). Root stem cell niche organizer specification by molecular convergence of PLETHORA and SCARECROW transcription factor modules. *Genes Dev.* 32, 1085–1100. doi: 10.1101/gad.314096.118
- Stoeckle, D., Thellmann, M., and Vermeer, J. E. (2018). Breakout—lateral root emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 41, 67–72. doi: 10.1016/j.pbi.2017.09.005
- Sugiyama, M. (2003). Isolation and initial characterization of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana* that are impaired in root redifferentiation. *Plant Cell Physiol.* 44, 588–596. doi: 10.1093/pcp/pcg077
- Swarup, K., Benkova, E., Swarup, R., Casimiro, I., Peret, B., Yang, Y., et al. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat. Cell Biol.* 10, 946–954. doi: 10.1038/ncb1754
- Takagi, M., Sakamoto, T., Suzuki, R., Nemoto, K., Obayashi, T., Hirakawa, T., et al. (2016). Plant Aurora kinases interact with and phosphorylate transcription factors. *J. Plant Res.* 129, 1165–1178. doi: 10.1007/s10265-016-0860-x
- Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kurotori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., et al. (2004). *AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 45, 1053–1062. doi: 10.1093/pcp/pch119
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L. A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V., Estelle, M., et al. (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 640–645. doi: 10.1038/nature05731
- ten Hove, C. A., Willemsen, V., de Vries, W. J., van Dijken, A., Scheres, B., and Heidstra, R. (2010). *SCHIZORIZA* encodes a nuclear factor regulating asymmetry of stem cell divisions in the *Arabidopsis* root. *Curr. Biol.* 20, 452–457. doi: 10.1016/j.cub.2010.01.018
- Thompson, A., and MacLeod, R. D. (1981). Increase in size and cell number of lateral root primordia in the primary of intact plants and in excised roots of *Pisum sativum* and *Vicia faba*. *Am. J. Bot.* 68, 955–964. doi: 10.1002/j.1537-2197.1981.tb07812.x
- Tian, H., Jia, Y., Niu, T., Yu, Q., and Ding, Z. (2014). The key players of the primary root growth and development also function in lateral roots in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 33, 745–753. doi: 10.1007/s00299-014-1575-x
- Tschermak-Woess, E., and Doležal, R. (1953). Durch Seitenwurzelbildung induzierte und spontane Mitosen in den Dauergeweben der Wurzel. *Österreichische Bot. Z.* 100, 358–402. doi: 10.1007/BF01805779
- Tsukagoshi, H., Busch, W., and Benfey, P. N. (2010). Transcriptional Regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143, 606–616. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.020
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9, 1963–1971. doi: 10.1105/tpc.9.11.1963
- Van Damme, D., De Rybel, B., Gudesblat, G., Demidov, D., Grunewald, W., De Smet, I., et al. (2011). *Arabidopsis* α Aurora kinases function in formative cell division plane orientation. *Plant Cell* 23, 4013–4024. doi: 10.1105/tpc.111.089565
- Van Norman, J. M., Xuan, W., Beeckman, T., and Benfey, P. N. (2013). To branch or not to branch: the role of pre-patterning in lateral root formation. *Development* 140, 4301–4310. doi: 10.1242/dev.090548
- Van Tieghem, P., and Douliot, H. (1886). Origine des Radicelles et des Racines Laterales Chez les Legumineuses et les Cucurbitacees. *Bull. Soc. Bot. France* 8, 494–501. doi: 10.1080/00378941.1886.10828482
- Van Tieghem, P., and Douliot, H. (1888). Recherches comparatives sur l'origine des membres endogènes dans les plantes vasculaires. *Ann. Sci. Natur. Bot. Ser.* 8:660.
- Vanneste, S., De Rybel, B., Beemster, G. T. S., Ljung, K., De Smet, I., Van Isterdael, G., et al. (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. doi: 10.1105/tpc.105.035493
- Vermeer, J. E., von Wangenheim, D., Barberon, M., Lee, Y., Stelzer, E. H., Maizel, A., et al. (2014). A spatial accommodation by neighboring cells is required for organ initiation in *Arabidopsis*. *Science* 343, 178–183. doi: 10.1126/science.1245871
- Von Guttenberg, H. (1960). *Grundzüge der Histogenese höherer Pflanzen. I Die Angiospermen*. Berlin: Gebruder Borntraeger.
- Von Guttenberg, H. (1968). *Der Primäre Bau der Angiospermenwurzel VIII/5*. Berlin: Gebruder Borntraeger.
- von Wangenheim, D., Fangerau, J., Schmitz, A., Smith, R. S., Leitte, H., Stelzer, E. H., et al. (2016). Rules and self-organizing properties of post-embryonic plant organ cell division patterns. *Curr. Biol.* 26, 439–449. doi: 10.1016/j.cub.2015.12.047
- Voronin, N. S. (1957). On evolution of plant roots. 2, Evolution of the root's origin. *Bull. Moscow Soc. Nat. Biol. Ser. Russ.* 62, 35–49.
- Voronin, N. S. (1964). Evolution of the primary structures in plant roots. *Uchenye Zapiski Kaluzhskogo Gosudarstvennogo Pedagogicheskogo Instituta* 13, 3–179.
- Voronkina, N. (1978). Early ontogenetic stages of lateral root development and their significance for understanding of the evolution of root histogenesis. *Bot. Z.* 63, 205–214.
- Vofß, U., Wilson, M. H., Kenobi, K., Gould, P. D., Robertson, F. C., Peer, W. A., et al. (2015). The circadian clock rephases during lateral root organ initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Commun.* 6:7641. doi: 10.1038/ncomms8641
- Whitewoods, C. D., Cammarata, J., Venza, Z. N., Sang, S., Crook, A. D., Aoyama, T., et al. (2018). CLAVATA was a genetic novelty for the morphological innovation of 3D growth in land plants. *Curr. Biol.* 28, 2365–2376.e5. doi: 10.1016/j.cub.2018.05.068
- Wightman, F., Schneider, E. A., and Thimann, K. V. (1980). Hormonal factors controlling the initiation and development of lateral roots II. effects of exogenous growth factors on lateral root formation in pea roots. *Physiol. Plant.* 49, 304–314. doi: 10.1111/j.1399-3054.1980.tb02669.x
- Willemsen, V., Bauch, M., Bennett, T., Campilho, A., Wolkenfelt, H., Xu, J., et al. (2008). The NAC domain transcription factors FEZ and SOMBRERO control the orientation of cell division plane in *Arabidopsis* root stem cells. *Dev. Cell* 15, 913–922. doi: 10.1016/j.devcel.2008.09.019
- Wilmoth, J. C., Wang, S., Tiwari, S. B., Joshi, A. D., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., et al. (2005). NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *Plant J.* 43, 118–130. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02432.x
- Yasutani, I., Ozawa, S., Nishida, T., Sugiyama, M., and Komamine, A. (1994). Isolation of temperature-sensitive mutant of *Arabidopsis thaliana* that are in the redifferentiation of shoots. *Plant Physiol.* 105, 815–822. doi: 10.1104/pp.105.3.815
- Yoshida, S., de Reuille, P. B., Lane, B., Bassel, G. W., Prusinkiewicz, P., Smith, R. S., et al. (2014). Genetic control of plant development by overriding a geometric division rule. *Dev. Cell* 29, 75–87. doi: 10.1016/j.devcel.2014.02.002
- Yu, P., Gutjahr, C., Li, C., and Hochholdinger, F. (2016). Genetic control of lateral root formation in cereals. *Trends Plant Sci.* 21, 951–961. doi: 10.1016/j.tplants.2016.07.011
- Zhukovskaya, N. V., Bystrova, E. I., Dubrovsky, J. G., and Ivanov, V. B. (2018). Global analysis of an exponential model of cell proliferation for estimation of cell cycle duration in the root apical meristem of angiosperms. *Ann. Bot.* 122, 811–822. doi: 10.1093/aob/mcx216
- Zimmermann, R., Sakai, H., and Hochholdinger, F. (2010). The gibberellic acid stimulated-like gene family in maize and its role in lateral root development. *Plant Physiol.* 152, 356–365. doi: 10.1104/pp.109.149054

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Torres-Martínez, Rodríguez-Alonso, Shishkova and Dubrovsky. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.