



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Determinación del gen responsable del fenotipo
del mutante *medium-size root (mer)* y
caracterización de un alelo mutante en *Arabidopsis*
thaliana (Brassicaceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CAROLINA GUADALUPE CRUZ NÚÑEZ



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN

CIUDAD DE MÉXICO, 2021



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.

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre (s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma
de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

2. Datos del tutor

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito

Título

Número de páginas
Año

1. Datos del alumno

Cruz
Núñez
Carolina Guadalupe
55-2668-8980
Universidad Nacional Autónoma
de México
Facultad de Ciencias
Biología
313137440

2. Datos del tutor

Doctora
Berenice
García
Ponce de León

3. Datos del sinodal 1

Doctora
Citlali Yurira
Núñez
Mariel

4. Datos del sinodal 2

Doctora
Lourdes Teresa
Agredano
Moreno

5. Datos del sinodal 3

Doctora
Ángela Victoria
Forero
Forero

6. Datos del sinodal 4

Doctora
Rosalinda
Tapia
López

7. Datos del trabajo escrito

Determinación del gen responsable
del fenotipo del mutante *medium-size*
root (mer) y caracterización de un
alelo mutante en *Arabidopsis thaliana*
(Brassicaceae)

68 p
2021

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

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

A los miembros de mi jurado:

Dra. Citlali Yuriria Núñez Mariel

Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno

Dra. Ángela Victoria Forero Forero

Dra. Rosalinda Tapia López

Dra. Berenice García Ponce de León,

por sus enriquecedoras aportaciones y sugerencias sobre mi investigación.

A la Biól. Tania Martínez Hidalgo, por sus enseñanzas en muchas de las técnicas de biología molecular utilizadas en este trabajo.

A Eduardo Torres Flores, quien me prestó su conocimiento y apoyo para realizar la genotipificación de *prt1-1*.

A la Dra. María Teresa Romero Romero, Laura Estela Rodríguez Ávila y a la Dra. Diana Belén Sánchez, por su apoyo en la preparación de soluciones y materiales que se utilizaron durante este proyecto.

Esta investigación fue financiada por los proyectos PAPIIT de la DGAPA (UNAM): IN206220; IN200920, IN203220 e IN211721 a cargo de las Doctoras Berenice García Ponce de León, Adriana Garay Arroyo, Elena Alvarez-Buylla y María de la Paz Sánchez Jiménez, a quienes les agradecemos su apoyo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá y mi hermano, sin quienes esto no sería posible. Mis mayores ejemplos, el motor de mi vida y mis mejores maestros. Los amo.

A Tania, mi dinocuñada, por tantos pasteles del des-estrés.

A mi tía Ana y Esther. Ustedes siempre nos han ayudado inmensamente. Son y han sido un faro y un refugio para nosotros.

A Ángeles y sus padres, porque me han acogido desde hace ya siete años como parte de su familia. Gracias, Angy, eres mi mejor amiga y hermana; te adoro.

A Monse y su familia, por su apoyo incondicional.

A Vane, por ser mi heroína.

A mis amigos, la familia que yo me he formado en la vida: Erick, con quien llevo 11 años de amistad;

Ceci, Brayan, Jessica, mis primeros amigos de la carrera. Chicos, sin ustedes nada sería igual, por ustedes vale cada segundo;

Dany, por cada una de las comidas en clase;

Tania, Eduardo y Brandon, chiquillos, tenemos un mundo de misterios por descubrir, me han enseñado modos muy distintos de ver la vida y he aprendido a valorar aún más la diferencias que nos hacen humanos.

Todos ustedes me han traído hermosos ratos de risa, me han acompañado por muchísimos años y son testigos de todos mis estados de ánimo posibles. Los quiero tres mil.

A Arianna, Melanny, Yulieth y David, quienes me dejaron, en poco tiempo, enseñanzas increíblemente valiosas. Los extraño y pronto volveré a verlos.

A Sergio, por recordarme porqué siempre miro las estrellas.

A todos ustedes, que siempre me han acompañado, que me han aportado tanto personal y académicamente. Son las luces más brillantes de este universo.

*“El grado de responsabilidad aumenta a medida que nos alejamos
del hombre que sostiene en sus manos el instrumento fatal”*

*Dicho a Adolf Eichmann, durante su juicio por genocidio, al tiempo
que argumentaba solo seguir órdenes.*

Núrenberg, Alemania, 1946.

ÍNDICE

I.	ABREVIATURAS.....	1
II.	ÍNDICE DE TABLAS	3
III.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
IV.	RESUMEN.....	4
1.	INTRODUCCIÓN	5
1.1	La raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> : desarrollo y estructura.....	5
1.1.1	Origen embrionario de la raíz.....	5
1.1.2	Estructura de la raíz	6
1.1.3	Control genético y hormonal.....	8
1.2	Expansión celular	11
1.2.1	El efecto de las auxinas en la expansión celular.....	12
1.2.2	La participación del citoesqueleto en el crecimiento de la raíz.....	13
1.2.3	El ciclo celular durante la proliferación y elongación celular de la raíz.....	15
2.	ANTECEDENTES.....	19
3.	HIPÓTESIS	21
4.	OBJETIVO GENERAL.....	21
4.1	Objetivos particulares	21
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1	Material biológico	22
5.2	Esterilización de semillas y condiciones de crecimiento.....	22
5.3	Extracción de DNA genómico	23
5.4	Corroboración de las mutaciones del genoma de <i>mer</i> mediante PCR y secuenciación	23
5.5	Genotipificación de <i>prt1-1</i>	24
5.6	Pruebas de complementariedad o alelismo.....	25
5.7	Análisis celular de las raíces	25
5.7.1	Fijación y aclaramiento de raíces.....	25
5.7.2	Cuantificaciones celulares	26
5.7.3	Cinética de crecimiento	26

5.7.4	Análisis estadístico.....	27
5.8	Ensayos hormonales	27
5.9	Análisis de expresión por RT-PCR semicuantitativa	27
5.10	Análisis filogenéticos.....	28
6.	RESULTADOS.....	28
6.1	Secuenciación de los posibles genes responsables del fenotipo de <i>mer</i>	29
6.1	Evaluación del fenotipo de las líneas mutantes por inserción de T-DNA.....	29
6.1.1	Análisis de complementariedad.....	31
	Figura 13. Análisis del fenotipo de las F1 al cruzar <i>mer</i> con <i>psy</i> , <i>cax7</i> , <i>dsc2</i> y <i>lhpl-6</i> respecto a los parentales.	33
6.2	Cuantificación celular de la raíz de <i>prt1-1</i>	33
6.3	Análisis de acumulación del mensajero de <i>PRT1</i> en el mutante <i>prt1-1</i>	37
6.4	Efecto de la adición de giberelinas al mutante <i>prt1-1</i>	38
6.5	Análisis de similitud de la proteína PRT1	39
7.	DISCUSIÓN.....	41
7.1	PRT1 pertenece al grupo de los tetratricopéptidos.....	41
7.2	El mutante <i>prt1-1</i> tiene afectaciones en el proceso de elongación celular	43
8.	CONCLUSIONES.....	46
9.	PERSPECTIVAS	47
10.	LITERATURA CITADA	47
11.	ANEXOS.....	58
11.1	Anexo 1. Modelo de los genes mutados por inserción de T-DNA en las líneas de plantas utilizadas	58
11.2	Anexo 2. Fragmentos secuenciados de los posibles genes candidatos causales de las mutaciones de <i>mer</i>	59
11.3	Anexo 3. Fenotipo de cuatro de las líneas mutantes utilizadas	61

I. ABREVIATURAS.

ABP: actin binding protein

ACT 2: actina 2

APC/C: ciclosoma/complejo formador de la anafase

ATP: adenosin trifosfato

BRs: brasinoesteroides

CDKs: ciclinas dependientes de quinasas

CKIs: inhibidores de ciclinas dependientes de quinasas

CKs: citoquininas

CYCs: ciclinas

DPG: días post germinación

DPS: días post siembra

DZ: zona de diferenciación

EZ: zona de elongación

F-actina: actina filamentosa

FPP: farnesil pirofosfato

G-actina: actina globular

GDP: guanosin difosfato

GGDP: geranilgeranil difosfato

GGPP: geranilgeranil pirofosfato

GGT2: proteína geranilgeranil transferasa tipo II

GTP: guanosin trifosfato

mer: medium-size root

MFs: microfilamentos

MTs: microtúbulos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PD: dominio de proliferación

PFT: proteína farnesil-transferasa

PGGT1: proteína geranylgeranyl transferasa tipo I

pH: potencial de hidrógeno

QC: centro quiescente

RAM: meristemo apical de la raíz

SSRS: microsátélites

TD: dominio de transición

TZ: zona de transición

XETs: xiloglucano-endotransglucosilasa

II. ÍNDICE DE TABLAS

1. Cebadores y condiciones de PCR utilizados para la amplificación de los posibles genes mutados.....	24
2. Cebadores y condiciones de PCR utilizados para genotipificar.....	24
3. Cebadores y condiciones de PCR utilizados para el análisis de expresión.....	28
4. Descripción de los cambios encontrados en los posibles genes responsables del fenotipo de <i>mer</i>	29

III. ÍNDICE DE FIGURAS

1. Figura 1. Patrones de división y destinos celulares durante la embriogénesis de <i>A. thaliana</i>	06
2. Figura 2. Linajes celulares y estructura de la raíz primaria de <i>A. thaliana</i>	07
3. Figura 3. Expresión diferencial de las hormonas en la raíz de <i>A. thaliana</i>	11
4. Figura 4. Modelo de acción auxina-H ⁺ /ATPasas de acuerdo con la teoría ácida del crecimiento.....	12
5. Figura 5. Participación de los complejos CDK-ciclinas en los ciclos mitóticos y de endorreplicación.....	16
6. Figura 6. Regulación del endociclo en plantas.....	18
7. Figura 7. Resumen de las señales necesarias para el proceso de elongación celular.....	19
8. Figura 8. Análisis celular de la raíz de <i>mer</i>	20
9. Figura 9. Amplificación de los cinco fragmentos de los posibles genes responsables del fenotipo de <i>mer</i>	29
10. Figura 10. Genotipificación de <i>prt1-1</i>	30
11. Figura 11. Comparación de los mutantes <i>mer</i> y <i>prt1-1</i> con las plantas silvestres (WT).....	31
12. Figura 12. Comparación de los mutantes <i>mer</i> , <i>prt1-1</i> y <i>mer x prt</i> con las plantas silvestres (WT).....	32
13. Figura 13. Análisis del fenotipo de las F1 al cruzar <i>mer</i> con <i>psy</i> , <i>cax7</i> , <i>dsc2</i> y <i>lhp1-6</i> respecto a los parentales.....	33
14. Figura 14. Descripción del crecimiento de <i>prt1-1</i>	34
15. Figura 15. La zona meristemática es igual en <i>prt</i> con respecto a plantas silvestres.....	35
16. Figura 16. Las células de la zona de elongación y diferenciación de <i>prt</i> son más pequeñas que las de las plantas silvestres.....	36
17. Figura 17. Las células del córtex completamente elongadas son significativamente más pequeñas en <i>prt1-1</i>	36
18. Figura 18. La acumulación de <i>PRT1</i> se encuentra disminuida con respecto a la planta.....	37
19. Figura 19. Efecto de la adición de giberelinas sobre el tamaño de la raíz en <i>prt1-1</i>	38
20. Figura 20. Análisis de similitud de la secuencia aminoacídica.....	40
21. Figura 21. Predicción de la estructura de <i>PRT1</i>	41

IV. RESUMEN

Las raíces, además de proporcionar soporte estructural a la parte aérea de la planta, absorben el agua, adquieren nutrientes, producen hormonas e interactúan con una gran cantidad de organismos en la rizosfera, por lo que es importante conocer su desarrollo. El crecimiento de la raíz está dado por el incremento en el número de células, resultado de las divisiones mitóticas en la zona de proliferación del meristemo, y por el aumento en el tamaño de las células preexistentes, derivado del proceso de elongación celular. Este último se observa, primordialmente, en el dominio de transición y la zona de elongación de la raíz. La regulación del proceso de elongación celular es compleja y es controlado a distintos niveles por la acción conjunta de redes genéticas, estructurales y fisiológicas.

Anteriormente se identificó un mutante de *Arabidopsis thaliana* con una raíz que crece aproximadamente la mitad de lo que crece en una planta silvestre de la misma edad, a la que se le llamó *medium-size root* (*mer*). El análisis celular de este mutante mostró que el fenotipo era debido, principalmente, a que las células completamente elongadas son de un tamaño menor con respecto a células de las plantas silvestres.

En el presente trabajo se analizó el fenotipo de cinco mutantes en genes posiblemente responsables del fenotipo de *mer*, y se encontró que la inserción de T-DNA en un gen que codifica para una proteína miembro de la superfamilia de las prenilil-transferasas (*PRT1*; AT5G17270) posee un fenotipo igual al de *mer*. Mediante una prueba de alelismo se comprobó que, ya sea la mutación puntual, o la inserción de T-DNA, *PRT1* es responsable de dicho fenotipo.

La caracterización a nivel celular del alelo *prt1-1* confirmó los resultados obtenidos en *mer*, por lo que en este trabajo se concluyó que la proteína PRT1 participa en el proceso de elongación celular durante el desarrollo de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La raíz de *Arabidopsis thaliana*: desarrollo y estructura

Las raíces son órganos de las plantas que suelen encontrarse debajo de la superficie del suelo, donde responden a una gran variedad de estímulos que repercuten de manera directa en el desarrollo del organismo. Además de proporcionar soporte estructural a la parte aérea de la planta, las raíces absorben el agua, adquieren nutrientes, producen hormonas e interactúan con una gran cantidad de organismos en la rizosfera (Petricka, *et al.*, 2012). Por lo tanto, es importante conocer el desarrollo de la raíz. De manera general, la raíz de *Arabidopsis thaliana* genera sus linajes celulares a través de la división sucesiva de células troncales. Posteriormente, son sometidas a procesos de expansión y diferenciación celular. Una particularidad importante es que, por su tipo de crecimiento, siempre están presentes todos los estadios de desarrollo.

1.1.1 Origen embrionario de la raíz

Durante el desarrollo embrionario de *A. thaliana* se establecen los meristemas apicales en los extremos de un eje ápico-basal en el que el meristemo aéreo se encuentra entre los cotiledones y el meristemo de la raíz primaria en la región basal (Mansfield y Briarty, 1991). En un inicio, el cigoto se divide de forma asimétrica y produce una célula apical más pequeña, que se divide de forma anticlinal y da origen al proembrión (figura 1A). Por otra parte, la segunda célula se divide periclinalmente y produce el suspensor, que es la conexión entre el embrión y el tejido materno (figura 2B). La célula suspensoria superior se especifica y da origen a la célula hipofisiaria, que se divide asimétricamente de forma que la célula superior genera el centro quiescente (QC) y la célula inferior deriva en las células iniciales de la columela (figura 3C y D). A partir de estos linajes celulares se generarán los tejidos post-germinación de la raíz (figura 1E) (Scheres *et al.*, 1994 y 1995; Bayer, *et al.*, 2016; Horn, *et al.*, 2018).

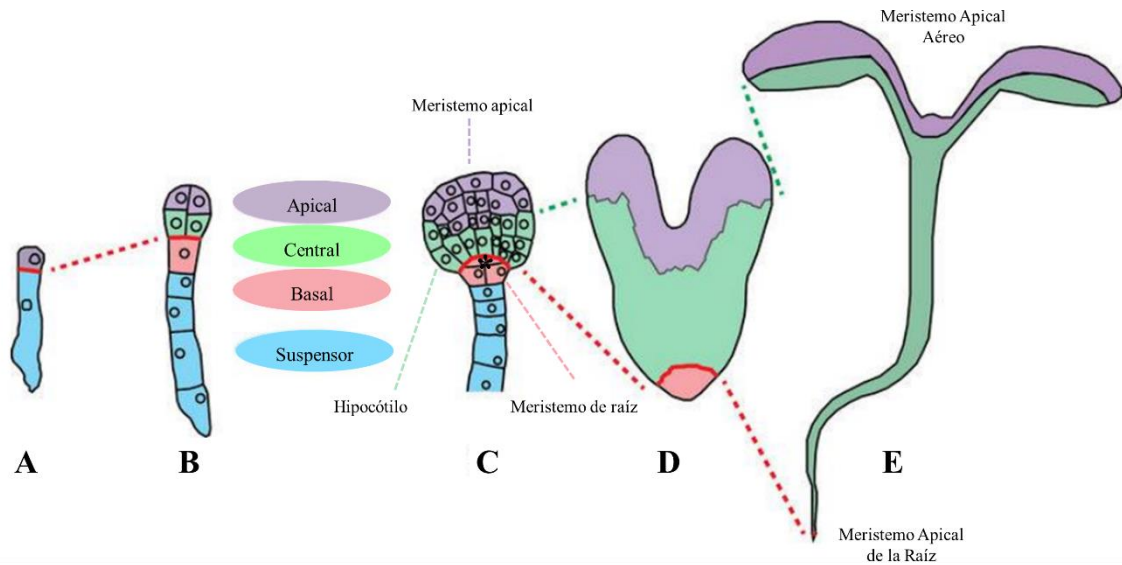


Figura 1. Patrones de división y destinos celulares durante la embriogénesis de *A. thaliana*. **A.** Estadío de dos células y establecimiento del eje apico-basal. **B.** En el estadío octante se distinguen las principales regiones a lo largo del eje embrionario. La célula más grande genera el suspensor por divisiones anticlinales. **C.** Durante el estadío globular, es posible establecer la región del meristemo apical, hipocótilo y el meristemo de la raíz. La célula suspensoria superior (basal) origina a la célula hipofisiaria (*). **D.** En el estadío de corazón, se reconocen los meristemos apicales. La célula hipofisiaria se divide asimétricamente y se genera el QC, así como las células iniciales de la columela. **E.** Plántula después de la germinación donde se muestran los tejidos derivados del desarrollo embrionario. Modificada de Bayer, 2016.

1.1.2 Estructura de la raíz

La raíz de *A. thaliana* tiene una estructura relativamente simple que comprende un número reducido de células troncales en la punta de la raíz, a partir de las cuales se generan todos los linajes celulares a través de divisiones sucesivas, seguidas de procesos de expansión y diferenciación celular. Su crecimiento es continuo e indeterminado, por lo que todos los estadíos de desarrollo están presentes todo el tiempo. Debido a esto, se ha convertido en un modelo de estudio del desarrollo (Scheres, *et al.*, 2002; Taiz, *et al.*, 2010).

A lo largo de la raíz se pueden distinguir tres zonas: la zona de proliferación (PZ; proliferation zone), que corresponde al meristemo apical (RAM; root apical meristem) y se puede subdividir en dos dominios: el dominio de proliferación (PD; proliferation domain), donde la tasa de división mitótica es elevada y el dominio de transición (TD; transition domain), donde la tasa de división disminuye con respecto al primero, pero se conserva la tasa de crecimiento relativo (Ivanov y Dubrovsky, 2013). La siguiente zona, vista desde la

punta de la raíz a la base, es la zona de elongación (EZ; elongation zone), donde las células se alargan rápidamente por un proceso que se ha denominado crecimiento difuso, hasta casi alcanzar su tamaño final (Cosgrove, 2018). Por último, las células adquieren su tamaño y estado final en la zona de diferenciación (DZ), que sigue de la EZ (figura 2) (Ivanov y Dubrovsky, 2013).

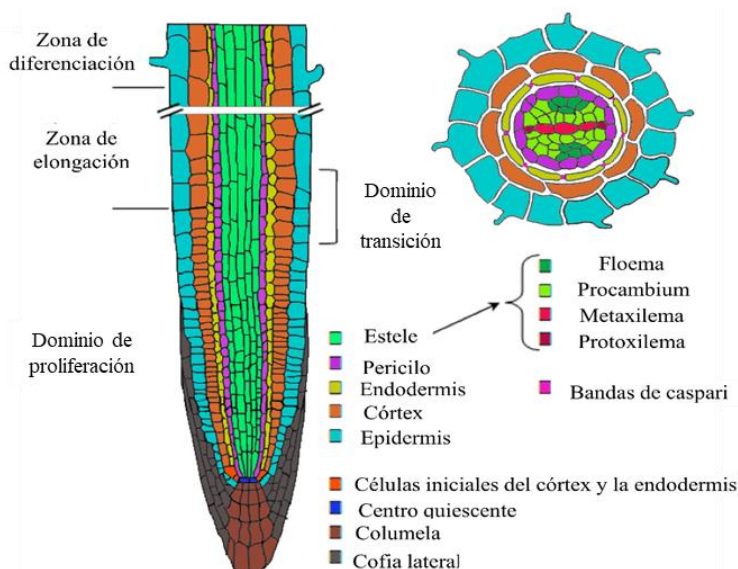


Figura 2. Linajes celulares y estructura de la raíz primaria de *A. thaliana*. A la izquierda se observa la estructura longitudinal de la raíz, donde se muestran las zonas de crecimiento y los diferentes tipos celulares organizados en hileras alrededor del cilindro vascular. A la derecha, se muestra un corte transversal de la zona de diferenciación, donde es evidente la formación de pelos radicales (Modificada de De Smet, 2015).

Radialmente y de fuera al centro, la raíz se conforma de los siguientes tejidos: la cofia lateral de la raíz, la epidermis, el córtex, la endodermis, periciclo y el cilindro vascular, conformado por xilema y floema (figura 2). Todos los tejidos son originados a partir de las células iniciales, que se dividen de forma anticlinal, para mantener la misma capa celular, o periclinal, cuando se genera una segunda fila de células a partir de la primera (De Smet, *et al.*, 2015). Existen cuatro tipos de células troncales: las iniciales epidérmicas y de la cofia lateral de la raíz; las células iniciales de la columela; las células iniciales del córtex y la endodermis, y las células iniciales del tejido vascular y periciclo. En el centro de las células troncales hay cuatro células que mantienen una baja tasa de división y conforman el centro quiescente (QC), a partir del cual se originan todas las células iniciales. Así pues, el QC junto con las células iniciales conforman el nicho de células troncales (Dolan, *et al.*, 1993; Taiz y Zeiger, 2010).

La regulación del crecimiento de la raíz es un proceso complejo que está controlado a distintos niveles por la acción conjunta de redes genéticas y fisiológicas que responden a estímulos externos y que son reguladas por hormonas vegetales (Garay-Arroyo *et al.*, 2014; De Smet, *et al.*, 2015).

1.1.3 Control genético y hormonal

El desarrollo de la raíz comprende la participación de las fitohormonas (figura 3). De estas se destacan las auxinas como claves en la división, elongación y diferenciación celular (Ubeda, *et al.*, 2012; Pacifici, *et al.*, 2015; Hejálko, *et al.*, 2018), y las citoquininas (CKs), que cobran mayor relevancia durante la diferenciación.

Las hormonas tienen relaciones interdependientes que subyacen en los distintos procesos de desarrollo en el que participan (Garay-Arroyo, *et al.*, 2012). Una interacción importante para que las células transiten de la zona de proliferación a la de elongación, y para que se de la diferenciación celular durante el crecimiento de la raíz, es la relación entre auxinas y CKs. Cuando hay más auxinas en relación con las CKs se mantiene el tamaño del meristemo, mientras que las CKs juegan un papel balanceador frente a las auxinas controlando el número de células en división, e inhibiendo el crecimiento de las raíces al promover la diferenciación en el TD (Miyawaki, *et al.*, 2004; Ioio, *et al.*, 2008). Esta relación antagonica se explica porque las CKs regulan positivamente a *SHORT HYPOCOTYL 2* (*SHY2*), un miembro de la familia de represores IAA, que afecta negativamente la señalización de las auxinas y, por tanto, la expresión de los transportadores *PIN1*, *PIN3* y *PIN7* en el tejido vascular y la EZ, promoviendo la disminución en la acumulación neta de auxinas en esa región (Moubayidin, *et al.*, 2010). La preponderancia de las CKs sobre las auxinas induce la diferenciación de las células en la raíz (Ioio, *et al.*, 2008). Para fines de este trabajo se comentará más sobre las auxinas y las giberelinas (GAs), así como su papel en el proceso de la elongación celular.

Auxinas.

La forma bioactiva de mayor eficiencia de estas hormonas es el ácido-3-indolacético (IAA) (Garay-Arroyo, *et al.*, 2012) y puede sintetizarse a partir de triptófano o de forma independiente a partir del indol-3-glicerolfosfato (Woodward, *et al.*, 2005). La concentración de las auxinas es diferencial en toda la planta y dentro de cada tejido (Scheres, 2002). En la raíz de *A. thaliana* la distribución se asocia con patrones de división celular y proliferación a lo largo del eje ápico-basal. En el QC se encuentran los niveles de concentración más elevados y hay una tasa baja de actividad mitótica, mientras que niveles intermedios, hallados en el nicho de células troncales, favorecen una mayor actividad con respecto al QC (Brady, *et al.*, 2007; Stepanova, *et al.*, 2008). En el resto del RAM, un nivel alto de auxinas con respecto al de CKs permite una tasa elevada de proliferación celular. Por otro lado, en tejidos con niveles bajos de esta hormona y alta concentración de CKs, se observa un arresto de la proliferación, pero se promueve la elongación y diferenciación celular (Muraro, *et al.*, 2011; Garay-Arroyo, *et al.*, 2012; Garay-Arroyo, *et al.*, 2014).

Las auxinas se sintetizan principalmente en la parte aérea de la planta y se transportan por el floema hasta la punta de la raíz, de donde fluyen polarmente hacia la parte basal mediante transportadores de influjo celular, como AUX y LAX y de eflujo, como PIN y ATP-BINDING-CASSETTE B (ABCB) (Gälweiler, *et al.*, 1998; Blilou, *et al.*, 2005; De Smet, 2015). Asimismo, la localización diferencial de transportadores PIN es crucial para la distribución de la hormona, la generación de gradientes de concentración en la raíz y el mantenimiento del meristemo (Blilou, *et al.*, 2005; Grieneisen, *et al.*, 2007).

El gradiente de auxinas regula a los factores transcripcionales de la familia *PLETHORA (PLT)*, que se expresan diferencialmente y mantienen el RAM (Aida, *et al.*, 2004; Garay-Arroyo, *et al.*, 2012). Además de esta familia de genes, existen otros como *SCARECROW (SCR)* y *SHORTROOT (SHR)* de la familia GRAS, que participan en la especificidad del QC y la endodermis (Bennett, T. y Scheres, B., 2010; Goh, *et al.*, 2016). Las plantas mutantes *shr* no presentan la capa de células endodérmicas y no pueden mantener la actividad meristemática, por lo que solo producen raíces cortas con RAM y EZ reducidas (Benfey, *et al.*, 1993; Helariutta, *et al.*, 2000). *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5 (WOX 5)*, se expresa en el QC y está involucrado en dar identidad y mantener el estado indiferenciado de este y las células iniciales (Ding, *et al.*, 2010). Todos ellos son regulados por las auxinas.

Giberelinas

Las hormonas GAs son fitohormonas derivadas del geranilgeranil difosfato (GGDP) y están involucradas en todo el desarrollo de la planta, desde la germinación de la semilla, expansión de las hojas, el tamaño del RAM y la elongación de la raíz. Además, promueven la división celular en la PZ, pero no tienen efecto sobre la actividad de las células troncales (Ubeda, *et al.*, 2009; Takehara, *et al.*, 2018).

Se ha postulado que el crecimiento de la raíz es parcialmente regulado por estas hormonas a través de su acción sobre células en proceso de elongación. Sin embargo, eso solo se ha demostrado en células de la epidermis (Ubeda, *et al.*, 2008). Adicionalmente, se sabe que las raíces de mutantes en la biosíntesis, o señalización de GAs, resulta en plantas con raíces cortas y meristemas pequeños (Fu, *et al.*, 2003; Ubeda, *et al.*, 2008; Ubeda, *et al.*, 2009).

La señalización por GAs está mediada por el receptor nuclear GA-INSENSITIVE DWARF1 (GID1), que se une con SLEEPY1/GID2, una proteína F-box, y a las proteínas DELLA, una subfamilia de los factores transcripcionales GRAS, represoras de la señalización por GAs (Pysh, *et al.*, 1999), a las que marca para su degradación en presencia de la fitohormona (Fu y Harberd, 2003; Feng, *et al.*, 2008).

Existe una relación positiva entre auxinas y GAs durante la elongación de la raíz y en la diferenciación de tejidos. Las auxinas son necesarias para la degradación de las proteínas DELLA (RGA y GAI), inducidas por GAs, lo que media el alargamiento de la raíz (Fu y Harberd, 2003). Asimismo, estudios de Greenboim-Wainberg, *et al.* (2005) y Moubayidin, *et al.* (2010), indican que las GAs suprimen la inhibición del crecimiento radicular mediado por CKs. Así pues, las GAs están involucradas en la regulación del tamaño del meristemo y la elongación celular por su efecto tanto en el balance de auxinas y CKs, como en el ciclo celular (Achard, y Genschik, 2009; Vanstraelen y Benková, 2012).

Aunado a ello, la síntesis de brasinoesteroides (BRs) puede ser inducida por auxinas, y son capaces de actuar en conjunto para promover la elongación celular; también se sabe que los BRs estimulan la producción de etileno en las raíces, que actúa como una señal de retroalimentación negativa entre estas hormonas (Benková, y Hejátko, 2009; Garay-Arroyo, *et al.*, 2012).

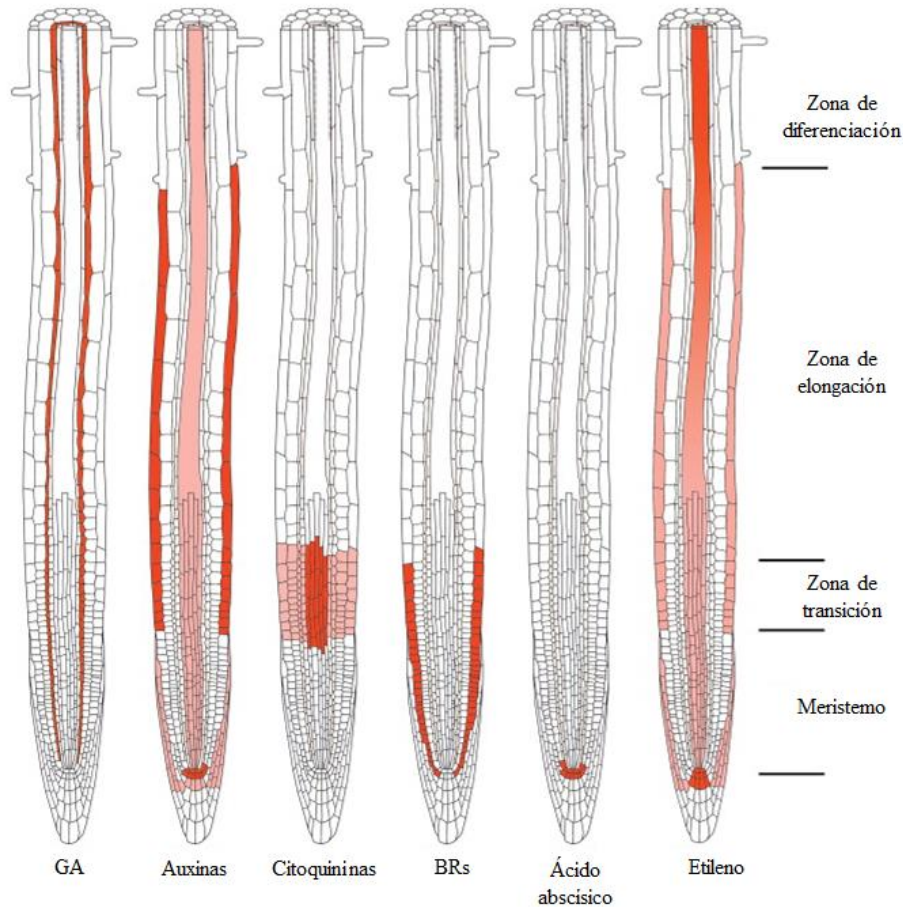


Figura 3. Expresión diferencial de las hormonas en la raíz de *Arabidopsis*. En rojo se muestran los tejidos de predominancia para cada una. De izquierda a derecha, las GAs se encuentran primordialmente en la endodermis, controlando el alargamiento y la división celular. Las auxinas se dirigen a las células epidérmicas durante la respuesta gravitrópica y también regulan la división celular en el meristemo y las células del RAM. Las CKs promueven la diferenciación vascular en el TD y antagonizan el efecto de las auxinas en la división celular. Los BRs se encuentran en las células epidérmicas del meristemo, mientras que el ácido abscísico actúa en el QC y el RAM para regular el tamaño del meristemo de la raíz. Finalmente, el etileno regula la división celular en QC y la biosíntesis de auxinas en células de la columela. Traducida de Ubeda, *et al.*, 2012.

1.2 Expansión celular

El crecimiento de la raíz se da por la proliferación del RAM y la elongación de estas células. El proceso de elongación celular es multifactorial y se observa primordialmente en el TD y la EZ de la raíz. Los procesos responsables de la expansión celular se describen a continuación:

1.2.1 El efecto de las auxinas en la expansión celular

Las células de las plantas están limitadas por paredes polipeptídicas rígidas, razón por la que es necesario distender esta estructura para que la célula pueda expandirse; este es el primer paso para iniciar el crecimiento (Chebli y Geitmann, 2017). La señalización de las auxinas y la homeostasis del pH apoplástico regulan el proceso de la expansión celular (Barbez, *et al.*, 2017).

La teoría ácida del crecimiento (Rayle, *et al.*, 1970; Cleland, *et al.*, 1971) postula que las auxinas son captadas por el receptor AUXIN BINDING PROTEIN, lo que genera la activación de la ATPasa de protones (H^+ /ATPasa) de la membrana plasmática, provocando la acidificación del apoplasto (espacio entre la membrana plasmática y la pared celular). La reducción de pH apoplástico activa a las enzimas expansinas (McQueen-Mason, *et al.*, 1992), las endotransglucosil-hidrolasas (XTHs) (Nishitani y Vissenberg, 2006) y las pectin-metil-esterasas (PMEs) (Hocq, *et al.*, 2017), que distienden la pared celular. El potencial osmótico, por su parte, se vuelve mayor en la región intracelular, permitiendo la entrada de agua a la célula e incrementando la presión de turgencia, al tiempo que la secreción y síntesis de la pared celular modulan el grosor final (figura 4) (Hager, *et al.*, 2003; Chebli y Geitmann, 2017; Szymanski y Staiger, 2018).

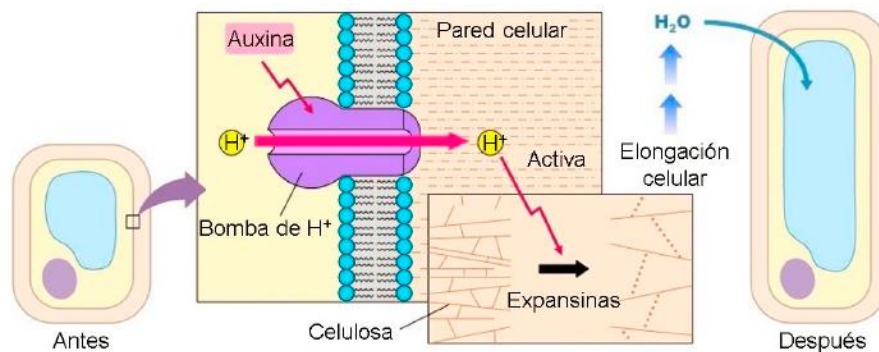


Figura 4. Modelo de acción auxina- H^+ /ATPasas de acuerdo con la teoría ácida del crecimiento. La señalización por auxinas genera la activación de bombas de protones que modifican el pH apoplástico, activando enzimas que distienden la pared celular. Tomada de Taiz y Zeiger, 2010.

Asimismo, el volumen vacuolar se relaciona positivamente con el tamaño de las células (Dünser, *et al.*, 2019). El aumento en el tamaño está dado por una acuaporina del tonoplasto, GAMMA TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN (GAMMA-TIP), cuya pérdida está relacionada con problemas de elongación celular (Petricka, *et al.*, 2012), aunque el solo incremento de la vacuola no es suficiente para promoverla (Du, *et al.*, 2020).

1.2.2 La participación del citoesqueleto en el crecimiento de la raíz

La organización de la pared celular también está influenciada por la distribución de las fibras de celulosa (Fayant, *et al.*, 2010; Yanagisawa, *et al.*, 2015). Por lo tanto, para entender de forma mecánica el control del crecimiento, se requiere conocer cómo se modela la pared celular y cómo el citoesqueleto y la pared celular se retroalimentan entre sí a lo largo del tiempo. Las redes de microtúbulos (MTs) y microfilamentos (MFs) trabajan de manera cooperativa para mantener las propiedades mecánicas de la pared celular y contribuyen a que la expansión sea irreversible (Yanagisawa *et al.*, 2015). La orientación transversal de MTs corticales controla la expansión lateral y la deposición espacio-específica de la celulosa en la pared; mientras que los MFs de actina ayudan a la elongación de la célula (Petricka, *et al.*, 2012).

Para que el crecimiento de las plantas se dé con normalidad y las células adquieran su forma final, las redes de F-actina deben someterse a rondas de remodelación dinámica. Imágenes de fluorescencia en células vivas han demostrado que el rápido movimiento de los MFs de actina es una parte importante en el proceso de división, elongación y diferenciación celular (Higaki, *et al.*, 2007). El proceso mediante el cual se remodela esta estructura está regulado por proteínas de unión a actina (Actin Binding Proteins; ABPs) (Liu, *et al.*, 2011).

Es importante mencionar que el citoesqueleto de actina controla la composición y contribuye a la expansión de la pared celular mediante el transporte polar de polisacáridos diferentes a la celulosa (Li, *et al.*, 2014). En consecuencia, está directamente involucrado con el crecimiento direccional (Orr, *et al.*, 2020).

Por su parte, los MTs se pueden encontrar en cuatro tipos de arreglos, tres de los cuales están implicados en la banda preprofásica, huso mitótico y fragmoplasto. El arreglo cortical, es el que está implicado en la expansión celular (De Keijzer, *et al.*, 2014). Durante

el crecimiento de la raíz, las células que pasan del TD a la EZ se están preparando para un crecimiento rápido y la reorganización de la red de MTs es importante para ello: los MTs corticales están típicamente orientados de manera desordenada en las células de la zona meristemática y el TD (Sedbrook y Kaloriti, 2008).

Sin embargo, cuando las células salen del TD, los MTs se orientan principalmente de forma transversal al eje de crecimiento (Sugimoto, *et al.*, 2000; Verbelen, *et al.*, 2006). Como los MTs corticales guían la síntesis de la pared celular, esta reorientación es importante para el crecimiento celular dirigido (Landrein, *et al.*, 2013). En particular, los MTs guían a la proteína CELLULOSE SYNTHASE INTERACTING1 (CSI1/POM2), la cual participa en la deposición de celulosa (Hauser, *et al.*, 1995; Bringmann, *et al.*, 2012). De esta forma, los MTs organizados transversalmente restringirán la expansión celular radial al dirigir la deposición de microfibrillas de celulosa en las paredes laterales de la célula (Bringmann, *et al.*, 2012).

Otra proteína que podría estar involucrada en la conexión de MTs y la orientación de microfibrillas de celulosa es COBRA (COB) (Roudier, *et al.*, 2005). *COB* se identificó como el responsable del fenotipo de raíz corta de un mutante afectado en la expansión celular (Benfey, *et al.*, 1993). El alargamiento celular reducido se correlacionó con una desorganización de la alineación de microfibrillas de celulosa, lo que resultó en una expansión celular parcialmente isotrópica (Roudier, *et al.*, 2005).

Así mismo, en las células de la raíz mutante del gen *BOTERO 1* (*BOT1*), que codifica para una proteína encargada de la orientación de los MTs corticales durante la interfase, los MTs no tienen una organización definida, lo que resulta en un crecimiento celular anisotrópico defectuoso (Bichet, *et al.*, 2001). Además, el contenido de celulosa en *bot1* es reducido, una característica que comparte con el mutante *procuste 1* (*prc1*; Fagard, *et al.*, 2000). Las plantas *prc1* desarrollan raíces más cortas que las silvestres y tienen células hinchadas en la EZ, lo que sugiere un defecto en el alargamiento celular (Desnos, *et al.*, 1996).

Vale la pena mencionar que el citoesqueleto de actina y tubulina no son sistemas aislados. Se han identificado proteínas como CONDITIONAL LOSS OF GROWTH (CLOG1), involucradas en la despolimerización de los MTs y que se localiza en zonas de superposición con MFs, sobre todo en las puntas (Ding, *et al.*, 2018). De manera similar, se ha encontrado que algunas ABPs, como las forminas, interactúan con los MTs (Li, *et al.*,

2010; Zhang, *et al.*, 2011). Esto deja abierta la posibilidad de que los MTs orquesten la organización de MFs ayudando a la agrupación de vesículas ricas en nucleadores de F-actina (Orr, *et al.*, 2020).

En lo que se refiere a la intervención hormonal, se sabe que las GAs, BRs, y el etileno inducen la reorganización del citoesqueleto y alteran los procesos de elongación y diferenciación: las GAs son capaces de alinear los MTs transversalmente a la dirección de alargamiento de las células en crecimiento (Fujino, *et al.*, 1995, Wenzel y Wasteneys, 2000), pero también son promotoras de la elongación y expansión celular. Por su parte, en mutantes en BRs, como *boule1 (bul1-1)*, *dwarf7-4 (dwf7-3)* y *steroll-4 (te1-4)*, existen afecciones en la expresión de α -tubulina y la organización cortical (Catterou, *et al.*, 2001a, Catterou, *et al.*, 2001b).

1.2.3 El ciclo celular durante la proliferación y elongación celular de la raíz

El ciclo celular está altamente regulado en los organismos multicelulares. El ciclo mitótico tiene una progresión G1-S-G2-M, al cabo del cual se generan dos células (Zielke; *et al.*, 2013; Shu, *et al.*, 2018). En la fase G1, la célula se prepara para la duplicación del material genético, posteriormente el DNA se sintetiza en la fase S. En G2, se prepara para la mitosis y finaliza con la separación y distribución cromosómica en la fase M (De Veylder, *et al.*, 2011). La progresión del ciclo celular se controla mediante quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que se asocian a las ciclinas CYCA y CYCB. Los complejos de tipo CDK-CYCA favorecen la transición a la fase S gracias a la fosforilación de la proteína RETINOBLASTOMA-RELATED 1 (RBR1), que libera a los factores de transcripción tipo E2F para la expresión de genes propios de esta fase. Mientras que los complejos de tipo CDKs-CYCB impulsan el avance mitótico (De Veylder, *et al.*, 2011).

El ciclo mitótico está relacionado con la proliferación celular; sin embargo, las células que están en proceso de diferenciación, o que ya pasaron por este, experimentan un ciclo celular en que la fase G2 y la citocinesis son omitidas. A este tipo de ciclo celular se le llama endorreplicación o endociclo (Sugimoto-Shirasu, *et al.*, 2002), y resulta en un incremento de material genético en el núcleo celular, que a menudo coincide con el inicio de la expansión y la diferenciación (Breuer, *et al.*, 2010; Shu, *et al.*, 2018). Este proceso es más común en

plantas que en animales y juega un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento de las funciones celulares (Shu, *et al.*, 2018). En *A. thaliana* se han encontrado células poliploides en la epidermis de las hojas, raíz e hipocótilo (Galbraith, *et al.*, 1991). Asimismo, en muchas especies de plantas se han reportado fuertes correlaciones entre un nivel de ploidía elevado con un mayor tamaño celular (Breuer, *et al.*, 2010).

Existen dos mecanismos por los cuales se puede iniciar la endorreplicación: el primero es la represión transcripcional de las ciclinas de tipo A2 (CYCA2) por medio de INCREASED LEVELS OF PLOIDY (ILP2) (Yoshizumi, *et al.*, 2006). Por otra parte, durante el ciclo mitótico, el complejo CDKB1-CYCA2 promueve la división celular e inhibe la endorreplicación, por lo que la inhibición de la actividad de la CDKB1, específica de las fases G2 y M, propicia el comienzo del endociclo (Boudolf, *et al.*, 2004). Al disminuir el complejo CDKB1-CYCA2, no pueden activarse los factores de transcripción tipo MYB (MYB3R), que controlan la transcripción de genes presentes en G2-M, como las CYCB (Araki, *et al.*, 2004).

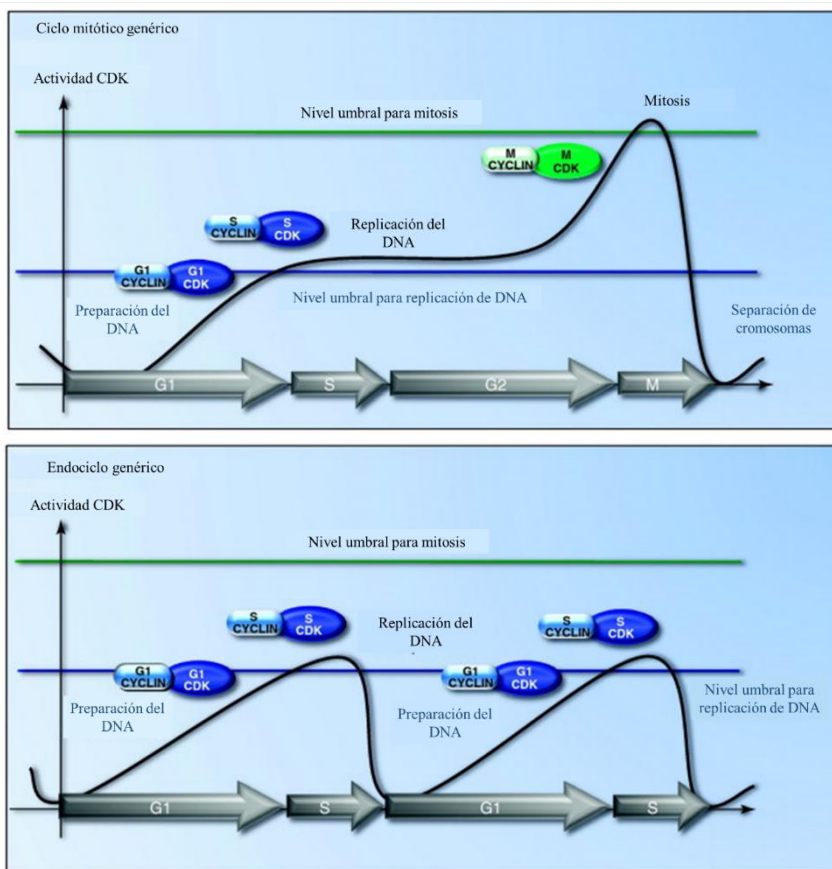


Figura 5. Participación de los complejos CDK-ciclinas en los ciclos mitóticos y de endorreplicación. **A.** Ciclo mitótico. Durante el inicio de G1, la actividad de CDK es baja e incrementa hasta ser suficiente para inactivar Rb (o sus homólogos) y desencadenar la fase S. Durante G2, la transcripción de las ciclinas de la fase M aumenta hasta formar complejos de CDK-ciclina activa y comienza la fase M. En la mitad de la fase M las ciclinas mitóticas son marcadas para degradación por APC/C y los niveles de CDKs decaen. **B.** Ciclo de endorreplicación. Los niveles de CDK de G1 y S se mantienen en niveles similares a los de la fase G1, con ligeros incrementos que desencadenen la fase S. Los complejos CDK-ciclina que permiten la mitosis no se forman o su actividad se suprime, inactivando como consecuencia la fase M. Traducida de De Veylder, L., *et al.*, 2011.

El mecanismo por el que se producen ciclos de replicación del DNA (figura 5) es muy similar entre todos los organismos. Se conduce por alteraciones en la actividad de CDKs, mediante la destrucción de inhibidores de CDKs (CKIs) de tipo KIP y ciclinas (Kamura, *et al.*, 2003; Lee, *et al.*, 2009). El proceso de supresión de la mitosis requiere del complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) para reprimir las fases G2-M.

Para que el complejo APC/C sea activo en plantas es necesaria la regulación positiva de las proteínas CELL CYCLE SWITCH 52 (CCS52), que son homólogas a APC/C activator protein CDH1 (CDH1) y FIZZY-RELATED PROTEIN (FZR) en mamíferos y *D. melanogaster*, respectivamente (Cebolla, *et al.*, 1999; Larson-Rabin, *et al.*, 2009). CCS52 interactúa físicamente con CYCA y B y se ha demostrado que CCS52A1 regula negativamente el nivel de los complejos CDKB1-CYCA2 al inducir la ubiquitinación y degradación de CYCA2 por activación de CKIs de la familia SIAMESE (SIM) / SIAMESE-RELATED (SMR) (Walker, *et al.*, 2000; Boudolf, *et al.*, 2009), que es regulado transcripcionalmente por GLABRA 3 (GL3) (figura 6; Morohashi, *et al.*, 2007). La participación de SIM se comprobó en los tricomas de mutantes *sim*, donde se observó represión del endociclo y divisiones mitóticas continuas (Walker, *et al.*, 2000).

En *A. thaliana* hay tres genes CCS52: *CCS52A1*, *CCS52A2* y *CCS52B1*. Estudios con mutantes de pérdida de función demostraron que *CCS52A1* regula positivamente la entrada al endociclo en la EZ de la raíz, mientras que *CCS52A2* inhibe la división celular en el nicho de células troncales, manteniendo la identidad del centro quiescente y la organización del meristemo (Vanstraelen, *et al.*, 2009; Kasili, *et al.*, 2010).

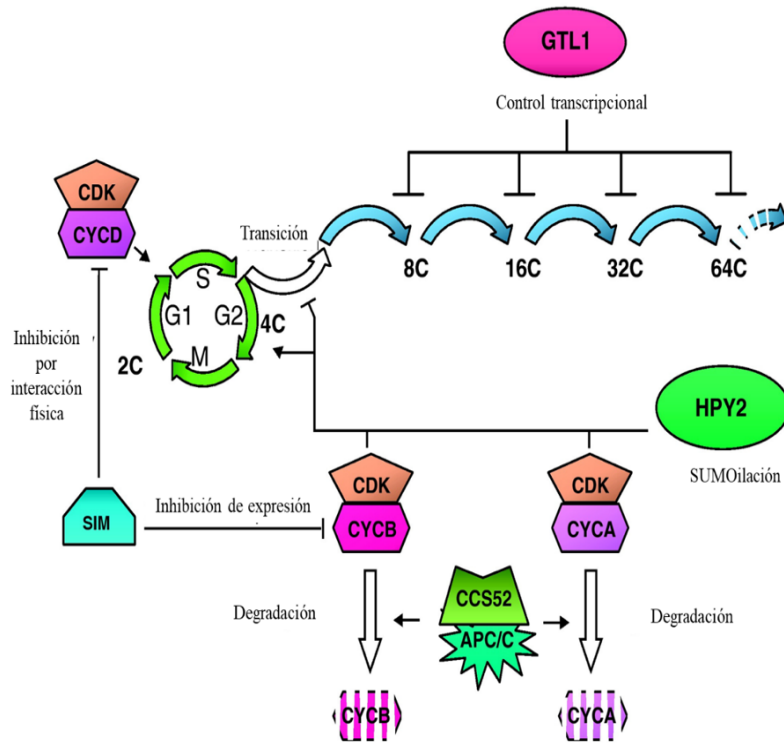


Figura 6. Regulación del endociclo en plantas. Los complejos de fase G2 y M CYCA/CDK y CYCB/CDK y la ligasa de SUMO, HPY2, promueven los ciclos mitóticos y reprimen la entrada al endociclo. CCS52 regula la abundancia de los complejos CYC/CDK al activar a APC/C, mientras que SIM reprime la transcripción de CYCB a través de mecanismos indirectos, lo que permite la progresión sucesiva del endociclo. Por su parte, GTL1 regula negativamente algunos de los componentes que impide la endorreplicación (Breuer, *et al.*, 2010).

En plantas aún no es claro el papel de las hormonas durante la transición al endociclo. No obstante, se ha sugerido que el gradiente de auxinas a lo largo de la raíz está implicado ya que mutaciones en la biosíntesis, transporte o señalización promueven la aparición prematura de endociclos (Ishida, *et al.*, 2010). De forma opuesta, mutaciones en la biosíntesis de CKs retrasan la entrada al endociclo, lo que apoya el papel antagonista de ambas hormonas en la proliferación y diferenciación celular (Ioio, *et al.*, 2007; Ishida, *et al.*, 2010). Asimismo, se ha demostrado que la E3 ligasa de SUMO, HIGH PLOIDY 2 (HPY2), que funciona por debajo de las vías de señalización dependientes de PLT, se expresa primordialmente en células proliferativas, y su pérdida reditúa en la aparición de endociclos en el meristemo, lo que ha sugerido que se requiere de la sumorilación mediada por HPY2 para la represión de endociclos en el RAM (figura 6) (Ishida *et al.*, 2009).

En resumen, la elongación celular es un proceso en el que interviene la expansión de la pared celular mediada por el citoesqueleto, algunas hormonas, en particular las auxinas y la giberelinas, que son relevantes para inducir las enzimas que degradan la pared celular, y el cambio de un ciclo celular mitótico a la replicación del ADN sin división celular, a lo que se llama endorreplicación o endociclo (figura 7).

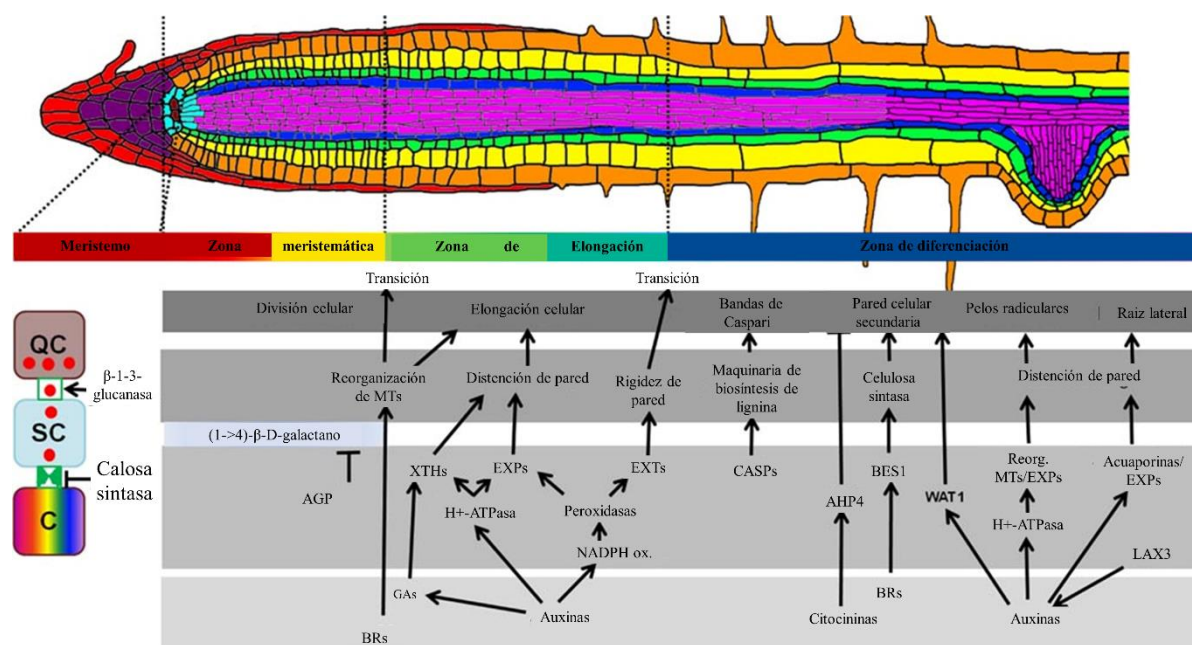


Figura 7. Resumen de las señales necesarias para el proceso de elongación celular. La elongación es regulada por el conjunto de señales químicas, como las fitohormonas, modificaciones en la composición de la pared celular y cambios en el citoesqueleto de actina y tubulina, así como la transición del ciclo mitótico al endociclo (modificado de Somssich, *et al.*, 2016).

2. ANTECEDENTES

Una herramienta poderosa para conocer la función de los genes es generar mutaciones puntuales mediante mutagénesis al azar, lo que genera fenotipos que son seleccionados en una condición de crecimiento específica. Así se descubrió el mutante en *ACTINA2* (*act2-5*) de *A. thaliana*, que tiene un fenotipo de raíz ondulada constitutiva al crecer en cajas petri verticales (Lanza *et al.*, 2012). Posteriormente, se realizó una segunda mutagénesis de *act2-5* para identificar mutantes que tuvieran un fenotipo incrementado o que suprimieran el

fenotipo de *act2-5* y se encontró un mutante con ondulación potenciada en la raíz, al que se le llamó *superwavy* (*swav*; Abad, 2009).

El mutante *swav* fue retrocruzado para separar la mutación de *act2-5* del nuevo mutante y se recuperó una planta que, después de limpiar el genoma mediante retro cruza, exhibió un fenotipo de raíz que crece menos que las plantas silvestres, pero que tampoco se puede considerar que es una raíz corta, al que se le llamó *medium-size root* (*mer*). El análisis celular de este mutante mostró que el fenotipo era debido a que las células se elongan menos que las células silvestres en la EZ de la raíz y, por lo tanto, también las células completamente elongadas de la DZ son de menor tamaño. Asimismo, no se encontró diferencia en el tamaño del meristemo entre las plantas silvestres y *mer* (figura 8). Por lo tanto, la raíz de menor tamaño en *mer* se debe, principalmente, a problemas en la elongación celular; sin embargo, no se encontraron cambios aparentes en el citoesqueleto de actina de *mer* (Dimas, 2018).

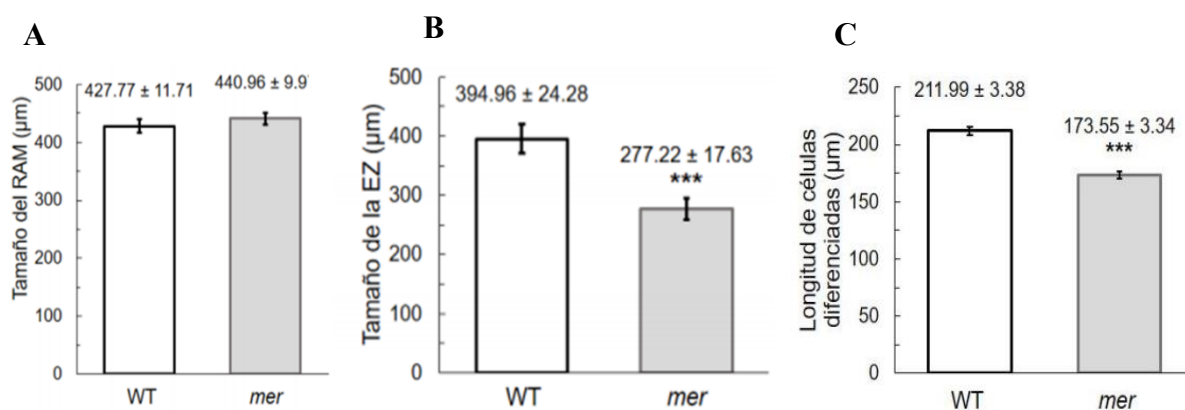


Figura 8. Análisis celular de la raíz de *mer*. **A.** No se encontraron diferencias significativas en el RAM entre las plantas silvestres (WT) y *mer*. **B.** El tamaño de la EZ en *mer* es significativamente más pequeño que en el WT. **C.** Las células totalmente diferenciadas de la DZ son más pequeñas que la células WT. Plantas de 6 dpv (Dimas, 2018).

Por lo tanto, es posible que, al ser más pequeñas las células en la EZ en *mer*, las ondas que se generan en la raíz del doble mutante *mer act2-5*, *swav*, sean más compactas con respecto a *act2-5*.

Con intención de conocer la identidad del gen responsable del fenotipo de *mer* y dado que se encuentra en fondo Columbia (Col), se cruzó con el ecotipo Landsberg *erecta* (*Ler*) silvestre para generar una población polimórfica. Se seleccionaron plantas que exhibieron

raíces medianas, se les extrajo el DNA genómico y se analizó por secuenciación masiva. Se encontró una región responsable del fenotipo en el brazo superior del cromosoma cinco, pero no se logró obtener un solo gen mutado. Bajo el supuesto de que la mutación diera un cambio no sinónimo que se encontrara en una región codificante, se seleccionaron cinco genes candidatos que corresponden a: *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1)*, *DOMINANT SUPPRESSOR OF CAMTA3 NUMBER 2 (DSC2 / TIR-NBS-LRR)*, *FITOENOSINTASA (PSY)*, *PRENILIL TRANSFERASA (PRT1)* Y *CALCIUM INTERCHANGE 7 (CAX7)* (García-Ponce, comunicación personal).

En este proyecto se analizó el fenotipo de mutantes por inserción de T-DNA en los cinco posibles genes responsables y se demostró la identidad del gen cuya mutación genera el fenotipo de *mer*. Además, se confirmó su función en el proceso de elongación celular en un alelo mutante de *A. thaliana*.

3. HIPÓTESIS

Si el fenotipo de *medium-size root (mer)* es causado por la mutación de un solo gen, una mutación nula en el mismo gen dará un fenotipo similar.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el gen responsable del fenotipo del mutante *medium-size root (mer)* y confirmar su función en el proceso de elongación celular en un alelo mutante de *A. thaliana*

4.1 Objetivos particulares

- ✦ Confirmar las mutaciones puntuales en los cinco posibles genes responsables del fenotipo de *mer*.
- ✦ Conocer la identidad del gen mutado en *mer* mediante análisis de complementación con los cinco mutantes candidatos.
- ✦ Confirmar que el fenotipo del mutante seleccionado tenga afectada la elongación celular de forma similar a *mer*.
- ✦ Establecer si la mutación por inserción de T-DNA es de expresión nula.

- ✿ Evaluar el efecto de la adición de giberelinas en el crecimiento de la raíz de *mer* y el alelo mutante.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

Todas las plantas utilizadas en este trabajo pertenecen a la especie *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia (Col-0). Todas las plantas, con excepción de *prt1-1*, son homocigotas. El mutante *mer* tiene una mutación puntual; y los mutantes por inserción de T-DNA (anexo 1; <http://signal.salk.edu/>) fueron los siguientes:

1. *like heterochromatin protein 1 (lhp1-6*; SALK_011762)
2. *dominant suppressor of CAMTA3 number 2 (dsc2 / tir-nbs-lrr*; SALK_200331C)
3. *fitoeno sintasa (psy*; SALK_054288C)
4. *prenilil transferasa 1 (prt1-1*; SALKseq_088634)
5. *calcium interchange 7 (cax7*; SALK_143741.56.00)

5.2 Esterilización de semillas y condiciones de crecimiento

Todas las semillas de plantas silvestres y mutantes se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio, 60 % o 20 %, y polisorbato 20 (Tween 20) 0.005 %, manteniéndose en agitación durante cinco o 15 minutos, respectivamente (la concentración más baja de hipoclorito de sodio se utilizó en semillas que tuvieran una antigüedad mayor a un año o que se hubieran sometido a situaciones que pudieran causar estrés, como fue el caso de las líneas mutantes por inserción de T-DNA). Posteriormente se realizaron tres lavados con agua bidestilada estéril y se estratificaron con agarosa estéril 0.2 % a 4 °C por tres días.

La siembra de las semillas se realizó en cajas estériles (12 x 12 x 1 cm) con 80 ml de medio de cultivo Murashige-Skoog (MS) 0.2X comercial (MP Biomedicals; Murashige y Skoog, 1962), adicionado con MES monohidratado 0.05 %, 1 % de sacarosa y 1 % de agar, ajustado a pH 5.6 con KOH 1 M.

Las placas se colocaron verticalmente en una cámara de crecimiento Percival-Scientific 1-37LL, con un fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y ocho de oscuridad), a una temperatura de 22°C e intensidad lumínica de 6500 luxes.

Para trasplantar se usó tierra esterilizada Sunshine-Mix 1, y se crecieron en cuartos controlados con las mismas condiciones descritas.

5.3 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA se realizó macerando tres hojas de cada planta hasta obtener un polvo fino (se utilizó nitrógeno líquido para mantener el material congelado), al cual se agregaron 700 µl de amortiguador de extracción (Tris-HCL 1 M pH 7.5, NaCl 5 M, EDTA 0.5 M pH 5.8, SDS 10%) y se mantuvo a temperatura ambiente por 10 minutos; posteriormente, se agregó un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico en proporción 25:24:1 y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min. Se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo con un volumen de isopropanol, dejándose por 20 min. a -20°C; después se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min. Finalmente, la pastilla se lavó con etanol 70% y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. Se dejó secar y se re suspendió en agua grado molecular con 1µl de RNAasa (10 µg/µl). Las muestras se conservaron a -20°C.

5.4 Corroboración de las mutaciones del genoma de *mer* mediante PCR y secuenciación

A partir de la secuenciación masiva de *mer*, se detectaron cinco secuencias de genes cercanos con mutaciones en su región codificante. Con la finalidad de corroborar la existencia de dichas mutaciones, se amplificaron específicamente estas cinco secuencias. Para ello, se realizaron ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final, con la enzima Phusion Flash High-Fidelity PCR máster mix (ThermoFisher) y 250 ng de material genético. Los cebadores y condiciones utilizados se encuentran en la tabla 1. Los fragmentos obtenidos de la PCR se extrajeron del gel con el kit One Step PCR inhibitor removal (ThermoFisher) y posteriormente fueron secuenciados. Las secuencias obtenidas se alinearon

con los genes silvestres del genoma de *A. thaliana* mediante el programa BLAST, y se comprobó la presencia de las mutaciones (<https://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>).

Tabla 1. Cebadores y condiciones de PCR utilizados para la amplificación de los posibles genes mutados						
	Gen	Cebador	Secuencia	Programa PCR	Cantidades y concentraciones utilizadas por muestra (µl)	
Amplificación de genes candidatos	<i>CALCIUMEXCHANGER 7 (CAX7)</i>	CAX (BG)-F	TCATTACAGCGGGTCACAAAG	98°C/10 segundos 98°C/01 segundos 62°C/05 segundos 72°C/15 segundos 72°C/02 minutos 30 ciclos	Agua	12.7
		CAX (BG)-R	GCTATCTGAGCACCATCGTTG			
	<i>FITOENO SINTASA (PSY)</i>	PSY (BG)-F	TACTCAGAGACGTAGGCGAAG		Mg 50mM	0.6
		PSY (BG)-R	CAAGTCCTCGGGGTTAAAATC			
	<i>DOMINANT SUPPRESSOR OF CAMTIA 3 NUMBER 2 (DSC2)</i>	LRR (BG)-F	CAGTTTGGACGTTAACCATGGC		Buffer 10X sin Mg	2
		LRR (BG)-R	TCATCCTATCAAACACCGTTTC			
	<i>PRENILIL TRANSFERASA 1 (PRT1)</i>	PRT (BG)-F	TGGTGGTACCTTAGTCTGTTC		dNTPs 10mM	1.5
		PRT (BG)-R	ATTGTATGCGCTGCAGCAAG		Oligo F 10µM	1
	<i>LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1-6)</i>	JFS-LHP1secF3	GTTATAAACTCGGTTGTGAAAGG		Oligo R µM	1
		LHP1-PCRq-R	CGCAAGTTCGTTGATTGACAA		Taq	0.2

5.5 Genotipificación de *prt1-1*

El mutante en *PRENILIL TRANSFERASA 1*, *prt1-1* (SALKseq_088634) se encontraba en heterocigosis, por lo que se genotipificó para obtener plantas homocigotas. Para ello se sembraron 40 plantas del NASC stock center, se colectaron hojas individualmente y se extrajo el DNA de cada una de las plantas. Debido a que esta línea se obtuvo por secuenciación masiva, se amplificó la inserción en ambas direcciones, utilizando el cebador

Tabla 2. Cebadores y condiciones de PCR utilizados para genotipificar					
	Mutante		Cebador	Secuencia	Programa PCR
Genotipificación	<i>Prenilil transferasa 1 (prt 1-1)</i> SALKseq_088634	Gen endógeno	PRT (CC)-F2	GCTCGATGGAACCTCAATCCG	94°C/30 segundos 94°C/30 segundos 58°C/30 segundos 72°C/30 segundos 72°C/07 minutos 35 ciclos
			PRT (CC)-R2	CAGTAGCACGAAGAGAGTAC	
		Inserción	Lba1	TGGTTCACGTAGTGGCCATCG	94°C/30 segundos 94°C/30 segundos 58°C/30 segundos 72°C/30 segundos 72°C/07 minutos 35 ciclos
			PRT (CC)-F2	GCTCGATGGAACCTCAATCCG	
			PRT (CC)-R2	CAGTAGCACGAAGAGAGTAC	

LBA1 y dos cebadores que flanquean en sentido o antisentido. Para determinar aquellas plantas que fueran homocigotas se utilizaron dos cebadores que flanquean la inserción en el gen (tabla 2). Las amplificaciones se realizaron por PCR (agua grado molecular, buffer B 1X; MgCl₂ 1.5 mM; dNTPs 0.2 mM; cebador-F 0.25 μM; cebador-R 0.25 μM; polimerasa Taq 1U; este procedimiento se realizó con la ayuda de Eduardo Torres Flores) y 250 ng de ADN.

5.6 Pruebas de complementariedad o alelismo

Con la intención de conocer cuál de las mutaciones en el genoma de *mer* era responsable de su fenotipo, se cruzaron plantas *mer* contra los mutantes homocigotos por inserción de T-DNA de cada uno de los genes candidatos. Los cruces se hicieron emasculando las flores de las plantas *mer* que aportarían la parte femenina y fecundándolas con polen de la contra parte; para generar las siguientes líneas: *mer* x *lhp1-6*; *mer* x *dsc2*; *mer* x *psy*; *mer* x *pri1-1* y *mer* x *cax7*.

Se evaluó el fenotipo de la filial 1 (F1), ya que se esperaba una generación homogénea de raíces largas sí y solo sí el mutante por inserción de T-DNA contra el que se había cruzado se encontraba en un alelo distinto a *mer*, complementándolo. En los ensayos donde la F1 no se recuperó el fenotipo WT de la raíz, se comprobó el éxito del cruce (es decir que no fuera una autopolinización), amplificando la inserción de T-DNA de esas plantas.

5.7 Análisis celular de las raíces

5.7.1 Fijación y aclaramiento de raíces

Para poder realizar cuantificaciones celulares se fijaron raíces de plantas de seis días post-germinación (dpg) en una solución de etanol 50% ácido acético 10% durante 15 h. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua destilada, se agregó ácido peryódico 1% y se incubaron a 37°C por 40 min. Pasado ese tiempo, se enjuagaron nuevamente con agua destilada y se añadió reactivo de Schiff (metabisulfito de sodio [Na₂S₂O₃] 100 mM, HCl 0.15 N y yoduro de propidio 100μg/mL) donde reposaron por dos horas. Finalmente, se realizó un último lavado con agua destilada y las raíces se montaron en una solución de glicerol 65%

ac. v/v, DMSO 2% v/v, NaI 4.2 M y Na₂S₂O₃ 8 mM, esto permitió terminar de aclarar las raíces (Dubrovsky, *et al.*, 2009).

5.7.2 Cuantificaciones celulares

A partir de fotografías tomadas con el objetivo 40x y contraste diferencial de interferencia (DCI Normaski) en el microscopio Olympus BX60, se realizaron reconstrucciones de las raíces aclaradas por el plano medio, siguiendo una sola hilera de las células del córtex, desde la primera célula inicial hasta el primer primordio de pelo radicular.

Se midió sucesivamente cada una de las células del córtex en la misma resolución que la captura de la imagen para obtener el equivalente de pixeles a micrómetros con el software Fiji®.

El conjunto de las medidas para cada raíz (15 de cada tipo: raíces silvestres y del mutante de inserción seleccionado) se procesó con el algoritmo de cambio estructural múltiple (MSC) (Pacheco-Escobedo, *et al.*, 2016) y se estimó el tamaño del RAM y la EZ, así como el número de células del PD y TD. El número de células en la EZ se obtuvo calculando la diferencia entre el número total de células desde la primera inicial hasta el primer primordio de pelo, menos el número de células de RAM que fueron obtenidas en el programa. Adicionalmente, para conocer el tamaño de las células diferenciadas, se fotografiaron 15 células a partir de la aparición del primer primordio de pelo (células diferenciadas) y se midieron las células desde la seis hasta la 15, de 15 plantas.

5.7.3 Cinética de crecimiento

Para obtener la tasa de crecimiento ($\mu\text{m/h}$) de las raíces de plantas crecidas en placa (15 plantas silvestres y 15 plantas del mutante), se marcó el límite de crecimiento a los 5 dpv y 24 h exactas después, a los 6 dpv. Inmediato al segundo marcaje se tomó registro fotográfico y fueron medidas con Fiji®. La diferencia entre el tamaño total de la raíz y el de un día después, dividido entre 24 horas correspondió al crecimiento por hora ($\mu\text{m/h}$).

De manera paralela, se hizo una cinética de crecimiento marcando cada 24 h durante 13 días, partiendo del primer día post-germinación. Con ello se obtuvo la longitud total

alcanzada y pudo compararse contra el crecimiento silvestre. Posteriormente se utilizó el software Fiji® para medir el crecimiento diario de las raíces y se estimó el promedio y error estándar de 28 plantas WT y 22 *prt1-1*, para cada punto de la cinética.

5.7.4 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism versión 8.0.1 para Windows®; primero se empleó una prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov). Posteriormente, para datos normales se realizaron pruebas de *t*-Student de dos vías y ANOVA de una vía. Para datos que no pasaron la prueba de normalidad se utilizó Mann-Whitney.

5.8 Ensayos hormonales

Se realizaron ensayos de crecimiento con la adición de la hormona giberelina (GA₃) para indagar si podía complementarse el fenotipo de la raíz de la mutante seleccionada. Se utilizaron tres concentraciones diferentes: 50, 75 y 100 μM, según lo reportado para ver cambios en el tamaño de hipocótilos (Frankland, *et al.* 1960; Cowling, *et al.* 1998 y Collet, *et al.* 2000), que se añadieron a placas de medio MS 0.2X previa esterilización. Los cambios se cuantificaron a los 5 dpg.

5.9 Análisis de expresión por RT-PCR semicuantitativa

Se colectaron 60 raíces de plantas silvestres y de la mutante por inserción de T-DNA, respectivamente, a los 5 dpg. El material se congeló en nitrógeno líquido y se extrajo el RNA con el kit de ZYMO Research® según el protocolo del proveedor. El RNA se recuperó en agua miliQ esterilizada.

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó a partir de 2 μg de RNA mediante la enzima reverso-transcriptasa SuperScript III (Invitrogen) y 1 μl del cebador dT-adapt (GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT) 10 μM, con el protocolo del proveedor, y se amplificó por PCR de punto final utilizando los mismos

reactivos que para la genotipificación. Los cebadores y condiciones de PCR se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Cebadores y condiciones de PCR utilizados para el análisis de expresión				
	Gen	Cebador	Secuencia	Programa PCR
Amplificación de tubulina	Tubulina	TubF	CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTA	94°C/02 minutos 94°C/30 segundos 62°C/30 segundos 72°C/30 segundos 72°C/07 minutos 25 ciclos
		TubR	TCACCTTCTTCATCCGAGTT	
Análisis de expresión	<i>PRENILILTRANSFERASAI (PRT 1-1)</i> SALKseq_088634	PRT1 (CC)-F2	GCTCGATGGAACTCAATCCG	94°C/02 minutos 94°C/30 segundos 62°C/45 segundos 72°C/02 minutos 72°C/07 minutos 25 ciclos
		PRT (BG)-R	ATTGTATGCGCTGCGAGCAAG	

5.10 Análisis filogenéticos

Con la intención de conocer la relación y función del gen seleccionado como responsable del fenotipo de los mutantes, se realizaron análisis de similitud de la secuencia aminoacídica con la herramienta de BLAST del Instituto Bioinformático Europeo (EMBL-EBI; <https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/>), los resultados fueron analizados con el programa de alineamiento de secuencias múltiples (MAFFT; <https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>), cuyos resultados fueron reconstruidos en FigTree v.1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

La búsqueda de dominios proteicos y sitios funcionales se realizó con ayuda del software en línea PROSITE (<https://prosite.expasy.org>) y se analizó la estructura secundaria en Jpred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>) (Drozdetskiy, *et al.*, 2015) y la estructura terciaria predicha (Universidad de Basel, BIOZENTRUM, <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9FFI4>)

Finalmente, el análisis de similitud entre AT5G17270 y AT5G37130 fue realizado con la herramienta EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

6. RESULTADOS

6.1 Secuenciación de los posibles genes responsables del fenotipo de *mer*

Cuando se secuenció el genoma de *mer* para obtener el locus responsable del fenotipo de raíz mediana, no se pudo obtener un sólo gen, sino que se encontraron mutaciones en cinco genes cercanos (García-Ponce, comunicación personal). Para corroborar la existencia de dichos cambios, se amplificaron los fragmentos de DNA del mutante *mer* que contuviera las mutaciones (figura 9) y fueron secuenciados individualmente (ver anexo 2). Con ello, se comprobó la existencia de las mutaciones, aunque en algunos casos no estaban exactamente en el lugar predicho por la secuenciación masiva (tabla 4).

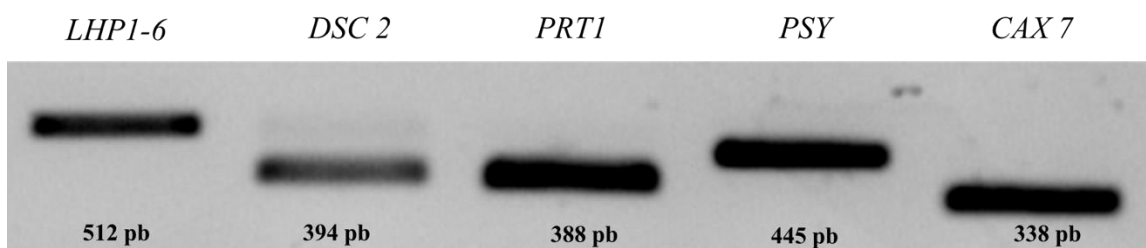


Figura 9. Amplificación de los cinco fragmentos de los posibles genes responsables del fenotipo de *mer*. Debajo de cada uno se encuentra el tamaño de la banda.

Tabla 4. Descripción de los cambios encontrados en los posibles genes responsables del fenotipo de *mer*

Gen	Base WT	Cambio en <i>mer</i>	Sito de la base	Codón WT (aminoácido)	Codón mutante (aminoácido)	Número del aminoácido en la proteína
<i>CAX7</i> AT5G17860	C	T	1385	TCT (serina)	TTT (fenilalanina)	452
<i>PSY</i> AT5G17230	C	T	1863	ACC (treonina)	GTC (valina)	342
<i>DSC2</i> AT5G18370	C	T	1929	ACT (treonina)	ATT (isoleucina)	588
<i>PRT</i> AT5G17270	G	A	3526	TGG (triptófano)	TGA (término)	549
<i>LHP1-6</i> AT5g17690	G	A	965	GCC (alanina)	ACC (treonina)	136

Por lo tanto, los cinco genes fueron considerados como posibles responsables del fenotipo.

6.1 Evaluación del fenotipo de las líneas mutantes por inserción de T-DNA

Una vez que se corroboró que las mutaciones estaban presentes en *mer*, se trabajó con mutantes de inserción de T-DNA en dichos genes para evaluar si alguno de ellos presentaba

un fenotipo similar a *mer*. Cuatro de los mutantes utilizados eran homocigotos y todos presentaron un fenotipo de raíz larga: *psy* y *lhp1-6* crecen de forma similar a la raíz silvestre, mientras que *cax7* y *dsc2* tienen una raíz un poco más larga (anexo 3). Cabe decir que no necesariamente tendrían que coincidir los fenotipos, ya que con excepción de *PRT1* en *mer*, donde la mutación produce un codón de término, todas las demás producen cambios del aminoácido y se comparó con mutantes de T-DNA, que se esperaba que no fueran funcionales. El mutante *prt1-1* era el único en estado de heterocigosis, por lo que se genotipificó una población de 40 plantas para obtener la línea homocigota (figura 10).

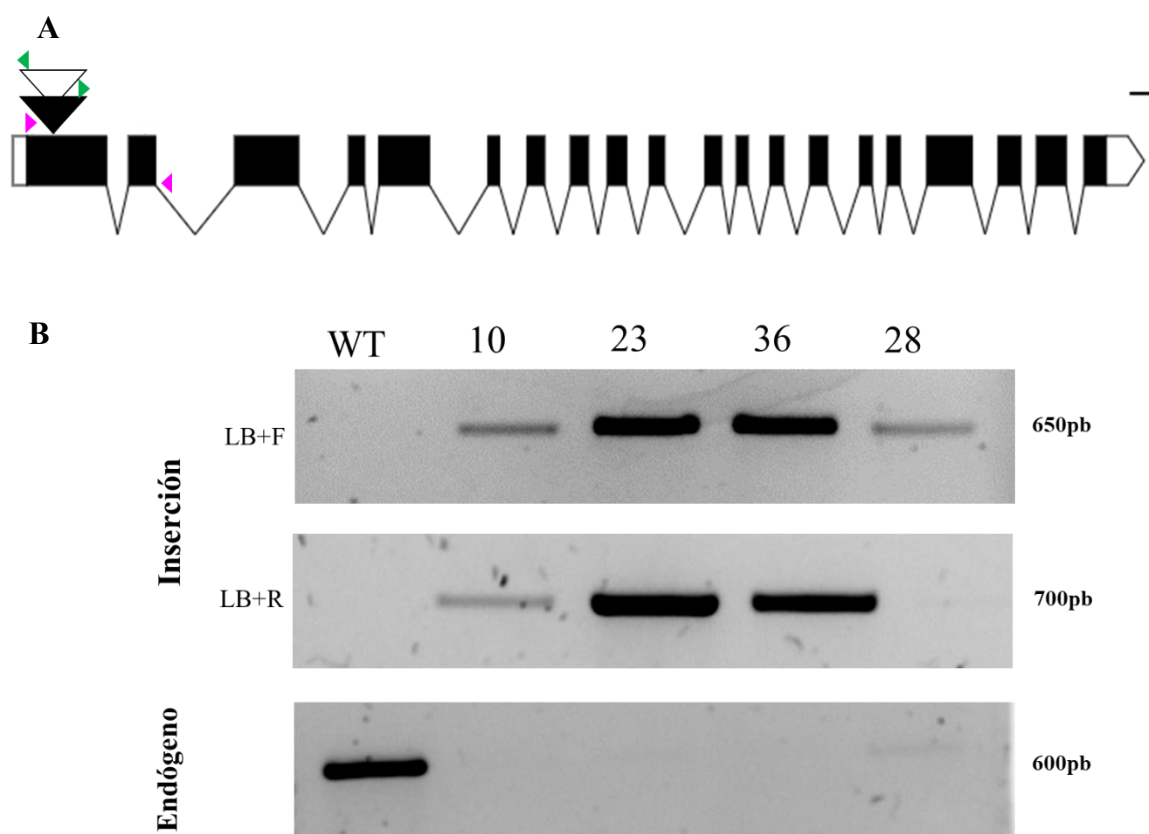


Figura 10. Genotipificación de *prt1-1*. **A.** modelo del gen donde se muestra el sitio de la inserción (triángulos negro y blanco), orientación del cebador LBA1 (flecha verde) y los oligonucleótidos que la flanquean (rosa). **B.** Se muestra la genotipificación de las cuatro plantas seleccionada de la línea SALKseq_088634. Arriba se muestra la amplificación de la inserción del T-DNA en ambos sentidos y abajo la amplificación del gen endógeno, que sólo fue evidente en las plantas silvestres, demostrando que las plantas seleccionadas son homocigotas. Para el resto de los experimentos se utilizó la planta 36.

Se obtuvieron cuatro plantas homocigotas (10, 23, 28 y 36), para la línea *prt1-1* (SALKseq_088634) que, al parecer, tienen dos inserciones: una en sentido y otra en antisentido (figura 10), ya que se obtuvieron amplificaciones en ambas direcciones (exceptuando la planta 28) para las inserciones del T-DNA. Esto no es de extrañar en este tipo de líneas de mutantes. En ninguna de las cuatro plantas amplificó el gen endógeno, lo que confirma que estas se encuentran en estado de homocigosis.

Todas las plantas F3, hijas de la planta 36, presentaron un fenotipo de raíz de tamaño mediano y no mostraron afectaciones evidentes en la parte aérea. Más importante aún, este fenotipo es idéntico al de *mer* (figura 11).

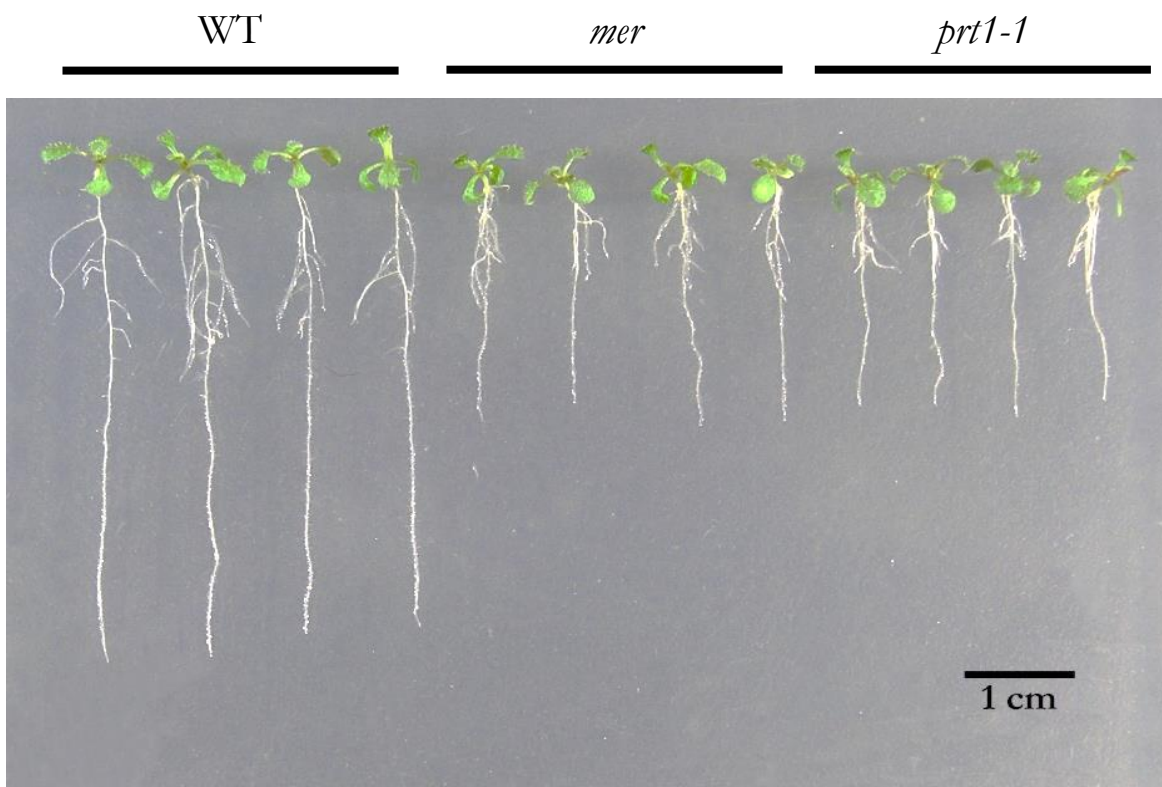


Figura 11. Comparación de los mutantes *mer* y *prt1-1* con las plantas silvestres (WT). Plantas de cinco dpg.

6.1.1 Análisis de complementariedad

Para establecer que la mutación en *PRT1* es el responsable del fenotipo de raíz corta, observado tanto en *mer* como en la línea de T-DNA, se realizaron pruebas de complementariedad. En estos ensayos se espera que, si las mutaciones son alélicas, el fenotipo de la F1 no cambie, pero si están en genes diferentes y son mutaciones recesivas, entonces la planta en su estado heterocigoto F1 recuperará la raíz a un tamaño silvestre.

En el caso de *mer x prt1-1* (T-DNA), la F1 presentó raíces ligeramente más largas con respecto a los parentales, pero más cortas que las plantas silvestres (figura 12). Esto podría indicar que las mutaciones son alélicas, pero que ambos parentales producen cierta cantidad de proteína que permite su función parcial. Otra posibilidad, es que existan otras mutaciones ligadas al fenotipo en cualquiera de los alelos que se supriman con el cruce, o que las plantas F1 presentaron una mayor vigorosidad y se desarrollaron más rápidamente que los mutantes independientes.

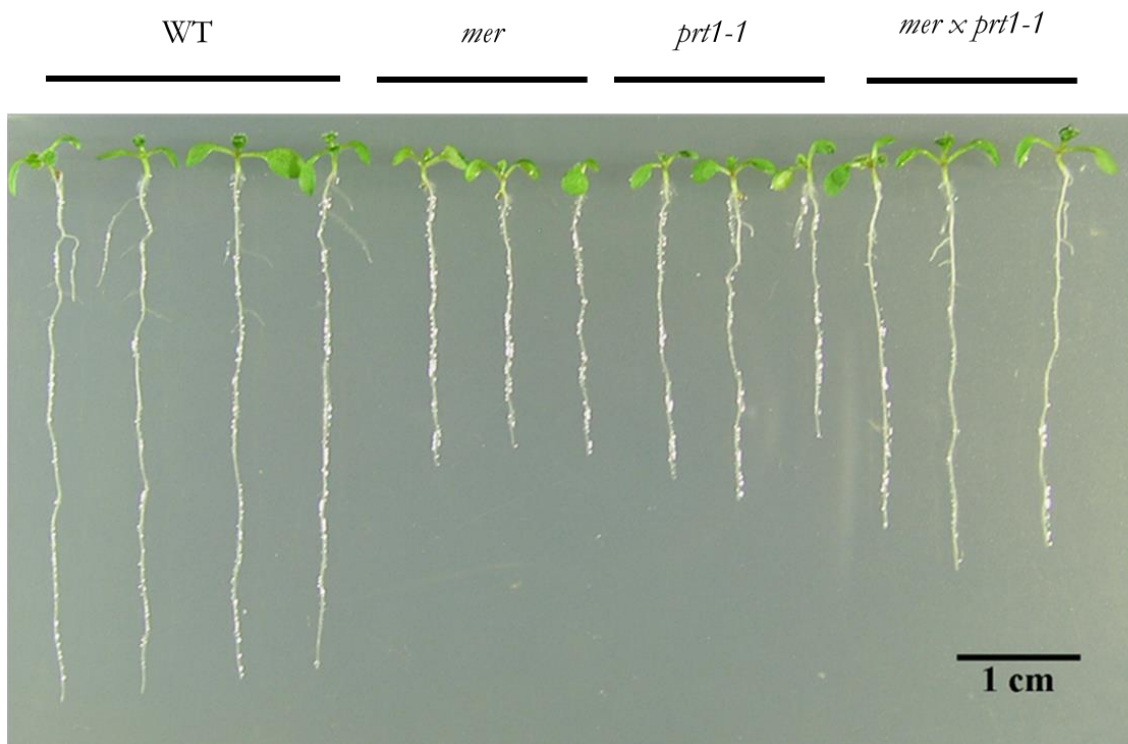


Figura 12. Comparación de los mutantes *mer*, *prt1-1* y *mer x prt1-1* con las plantas silvestres (WT). Plantas de cinco dpd.

Para corroborar que alguna de las otras mutaciones en *mer* no aportara al fenotipo se realizaron los cruces de *mer* con *cax7*, *psy*, *dsc2* y *lhp1-6*. En todos los casos, la raíz de las plantas F1 mostraron un fenotipo más parecido al mutante por inserción de T-DNA, que a *mer* (figura 13). Un caso interesante fue la F1 de *mer* x *cax7*, donde las raíces fueron un poco más largas que *cax7*, el cual, a su vez, tiene una raíz más larga que las plantas silvestres.

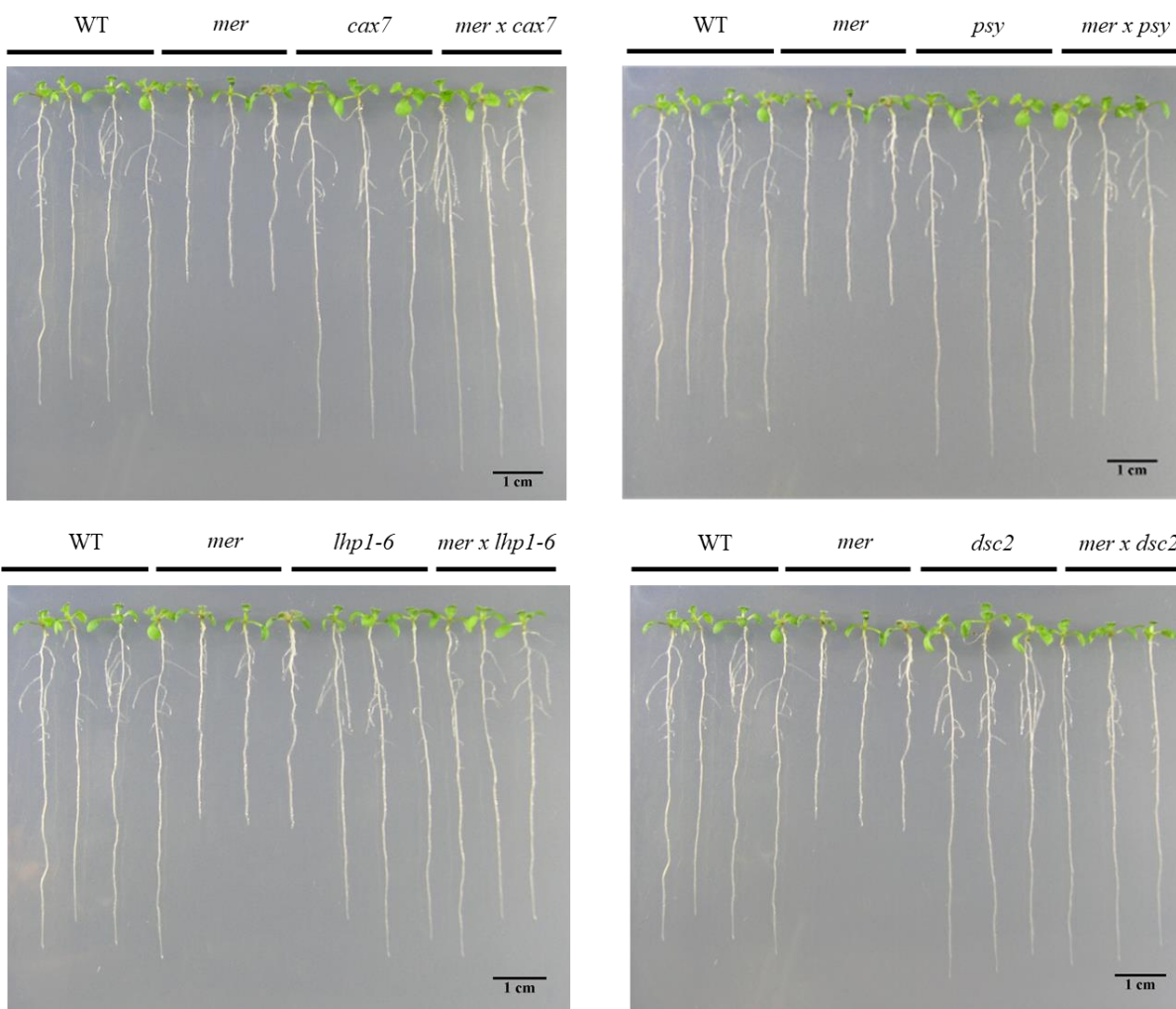


Figura 13. Análisis del fenotipo de las F1 al cruzar *mer* con *psy*, *cax7*, *dsc2* y *lhp1-6* respecto a los parentales.

6.2 Cuantificación celular de la raíz de *prt1-1*

Dado el fenotipo macroscópico de la raíz observado en el mutante *prt1-1* y el resultado de las cruces con *mer*, se consideró que *PRT1* es el gen responsable de los fenotipos en ambos

alelos (figuras 11 y 12). Sin embargo, era importante establecer que la causa del fenotipo de la raíz en *prt1-1* es debido a afectaciones en la elongación celular, al igual que sucede en *mer*. Para esto, primero se realizó el análisis del crecimiento de la raíz de *prt1-1*.

Como se observa en la figura 14, la longitud total de la raíz (figura 14A), la tasa de crecimiento por hora (figura 14B) y la cinética de crecimiento a partir del día uno post-germinación (figura 14C), indican que las raíces de *prt1-1* son significativamente más pequeñas y crecen más lentamente durante su desarrollo con respecto a las plantas silvestres.

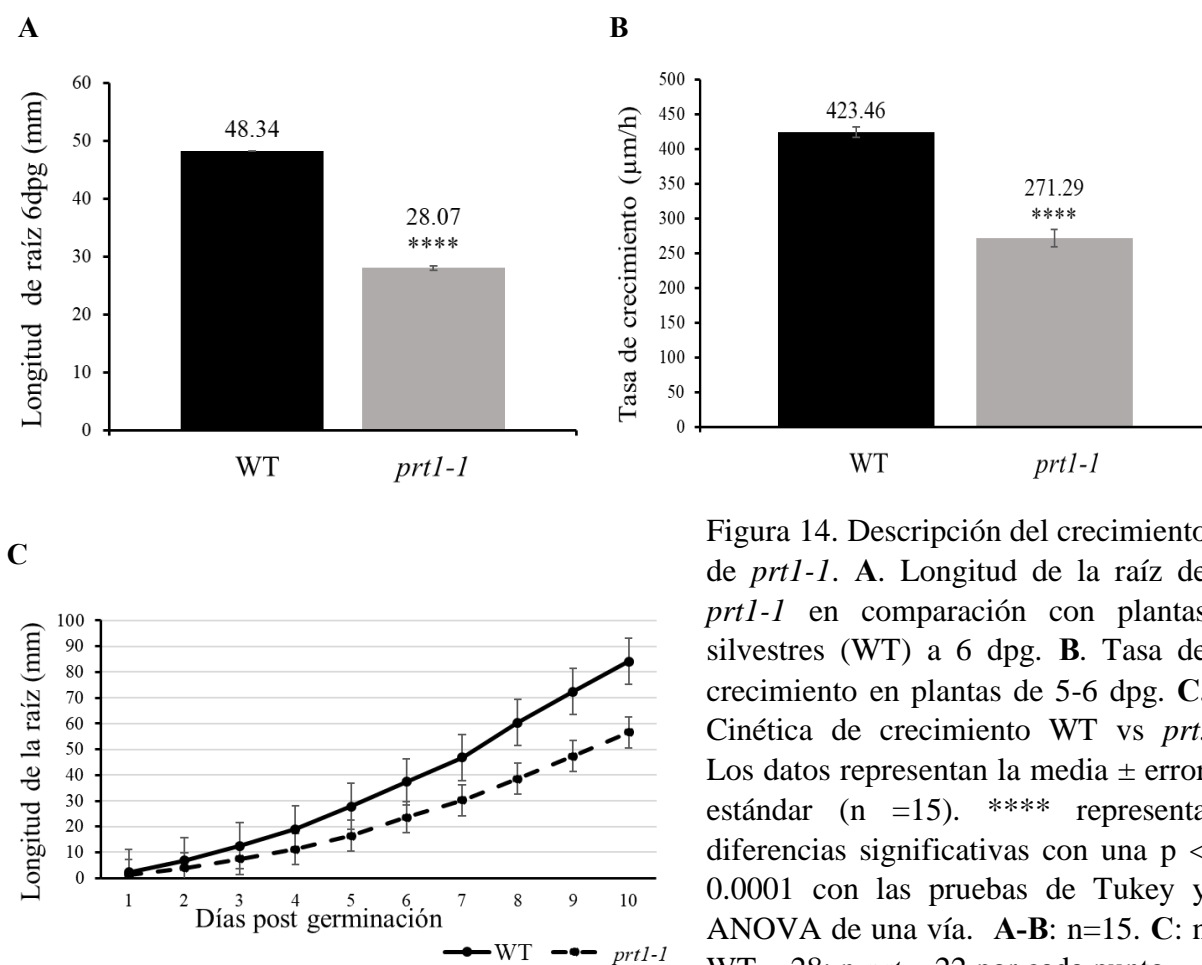


Figura 14. Descripción del crecimiento de *prt1-1*. **A.** Longitud de la raíz de *prt1-1* en comparación con plantas silvestres (WT) a 6 dpg. **B.** Tasa de crecimiento en plantas de 5-6 dpg. **C.** Cinética de crecimiento WT vs *prt*. Los datos representan la media \pm error estándar ($n = 15$). **** representa diferencias significativas con una $p < 0.0001$ con las pruebas de Tukey y ANOVA de una vía. **A-B:** $n=15$. **C:** n WT = 28; n *prt* = 22 por cada punto.

Posteriormente se realizaron las cuantificaciones celulares de los distintos dominios de la raíz. La zona meristemática (RAM), considerando PD y TD no mostraron diferencias significativas en el tamaño (figura 15A, B y C), ni en el número de células (figura 15D, E y F) entre las plantas silvestres y *prt1-1*.

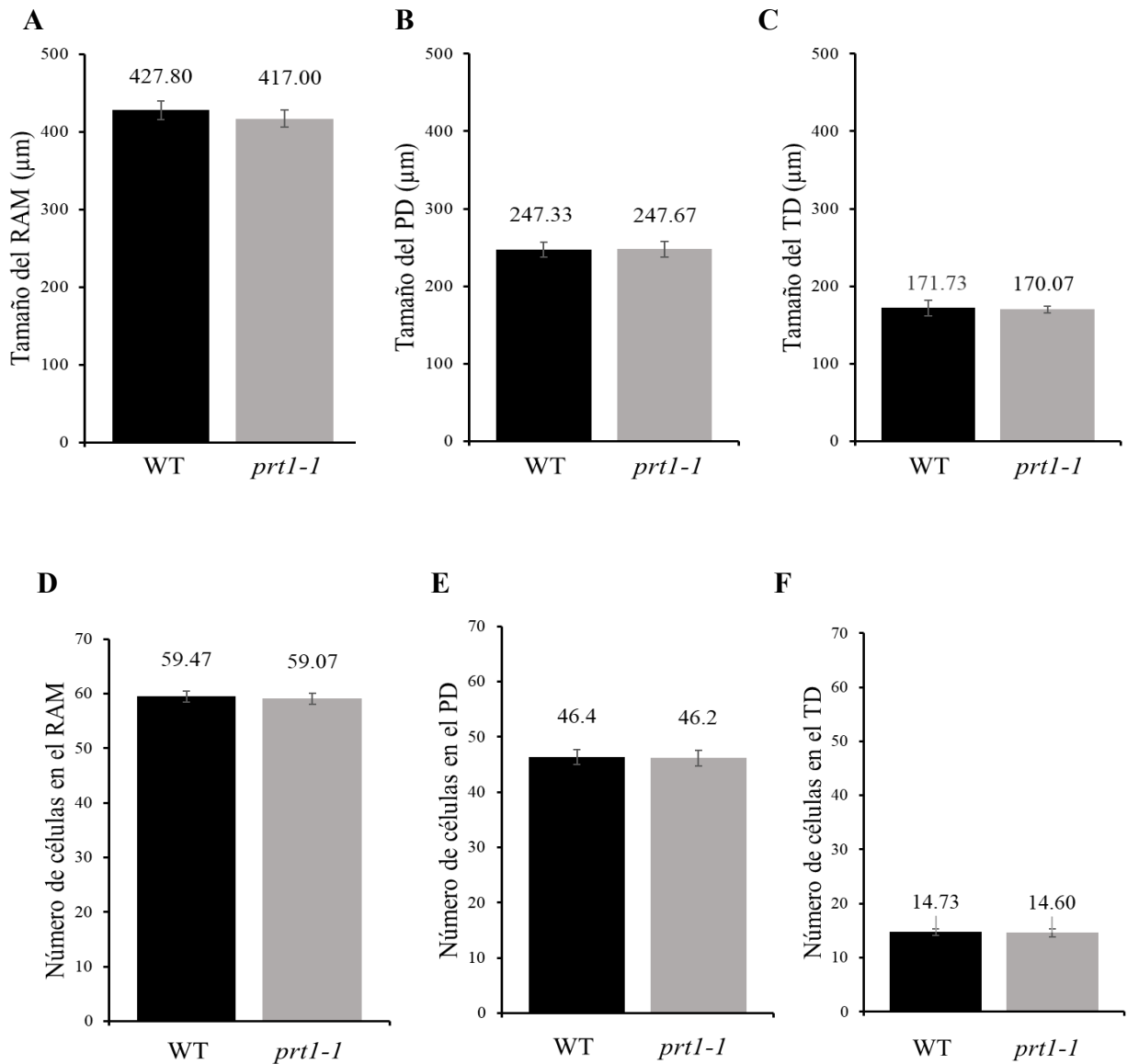


Figura 15. La zona meristemática de la raíz *prt1-1* es igual al de las plantas silvestres. El tamaño (A, B y C) y el número de células (D, E y F) del RAM, el PD y TD respectivamente, no cambia significativamente entre plantas silvestres y plantas *prt1-1* en plantas de 6 dpv. Los datos representan la media \pm error estándar (n =15). **** representa diferencias significativas con una $p < 0.0001$ con las pruebas de Tukey y ANOVA de una vía.

Esto demuestra que el proceso de proliferación celular no está afectado en la mutante *prt1-1*, tal como observó Dimas (2018) en las raíces de *mer*.

Sin embargo, al analizar el tamaño de la EZ en el mutante se encontró que está reducida con respecto al WT (figura 16A), mientras que el número de células permanece sin diferencias significativas (figura 16B), lo que sugiere que esta mutación únicamente está

afectando el proceso de elongación celular y no el tiempo que tardan en transitar las células de una zona a otra.

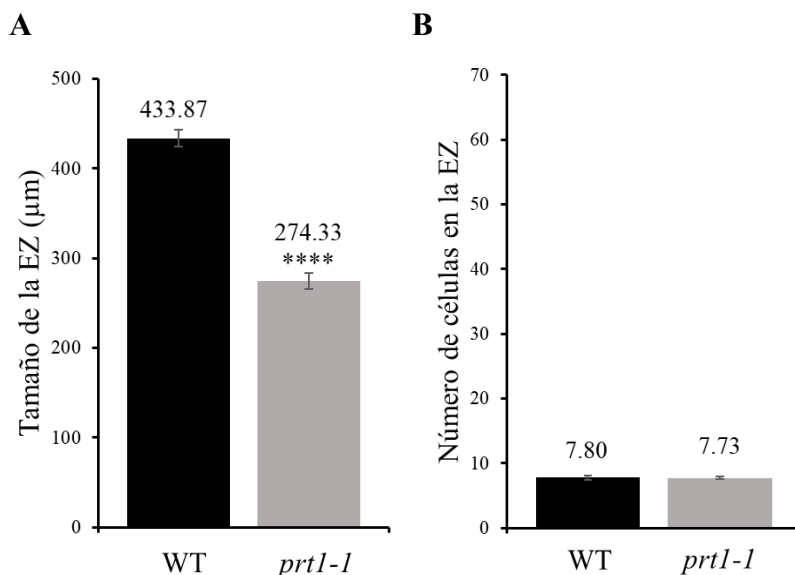


Figura 16. Las células de la EZ de *prt1-1* son más pequeñas que las de las plantas silvestres. (A) El tamaño de la EZ es menor en *prt1-1* vs el WT, aunque el número de células (B) es similar en ambos en plantas de 6 dpq. Los datos representan la media \pm error estándar (n =15). **** representa diferencias significativas con una $p < 0.0001$ con las pruebas de Tukey y ANOVA de una vía.

Asimismo, se observó que la longitud de las células del córtex completamente alargadas de la zona de diferenciación es de menor tamaño con respecto a las silvestres (figura 17).

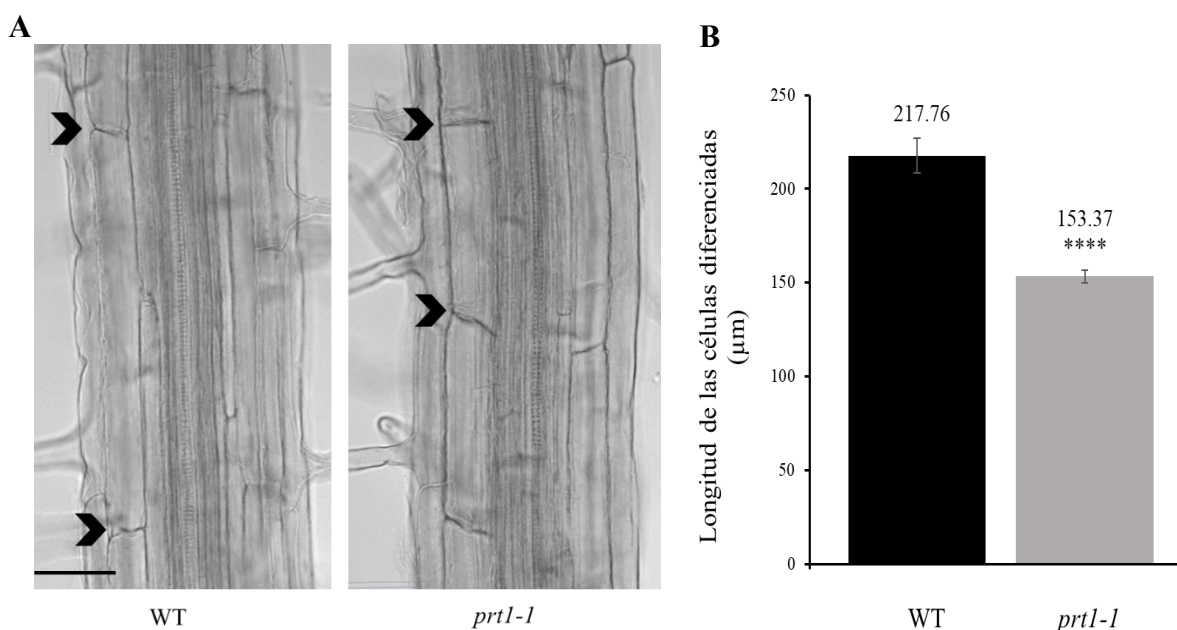


Figura 17. Las células del córtex completamente elongadas son significativamente más pequeñas en *prt1-1*. **A.** Células de la zona de diferenciación del WT (izquierda) y *prt1-1* (derecha). En ambos casos las puntas de flecha señalan los límites de una célula. **B.** Longitud de las células diferenciadas en plantas de 6 dpv. Los datos representan la media \pm error estándar (n =15). **** representa diferencias significativas con una $p < 0.0001$ con las pruebas de Tukey y ANOVA de una vía.

En conjunto, la descripción de la raíz y el análisis celular permiten inferir que el tamaño reducido de la raíz de *prt1-1* se debe a que las células no se elongan como las células silvestres; consecuentemente, se ve afectado el tamaño final de las células diferenciadas.

6.3 Análisis de acumulación del mensajero de *PRT1* en el mutante *prt1-1*

PRT1 es un mensajero muy grande, de 2970 pb. El T-DNA de la línea *prt1-1* (SALKseq_088634) se encuentra en el primer exón. Para el análisis de la acumulación del mensajero se utilizaron los cebadores de la tabla 3, que se encuentran en el primer y doceavo exón, respectivamente.

El mensajero de *PRT1* se acumula poco en las raíces silvestres y, aunque es evidente su disminución en el mutante, no llega a ser nulo (figura 18). Sin embargo, puesto que el fenotipo del mutante *prt1-1* es igual al de *mer*, que tiene un codón de término, es factible que la proteína que se llega a sintetizar en ambos mutantes no sea funcional.

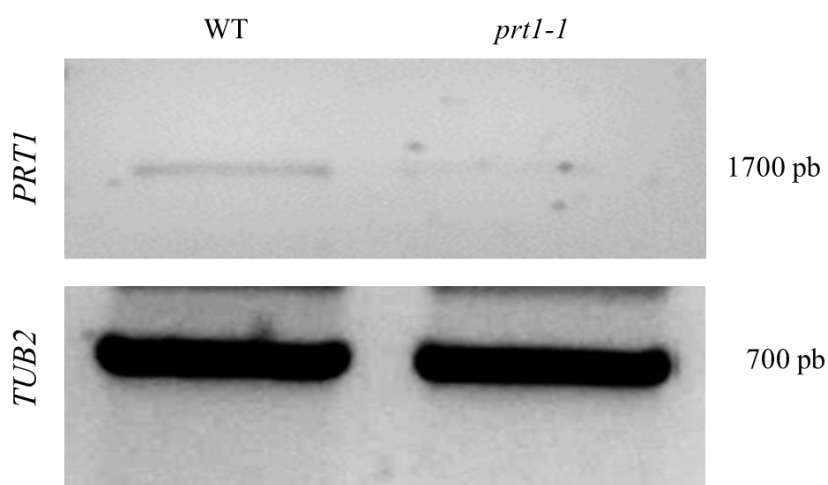


Figura 18. La acumulación de *PRT1* se encuentra disminuida en *prt1-1* con respecto a la planta WT. Análisis por RT-PCR en raíces de 7 dpv en donde se utilizó la tubulina 2 como control de carga.

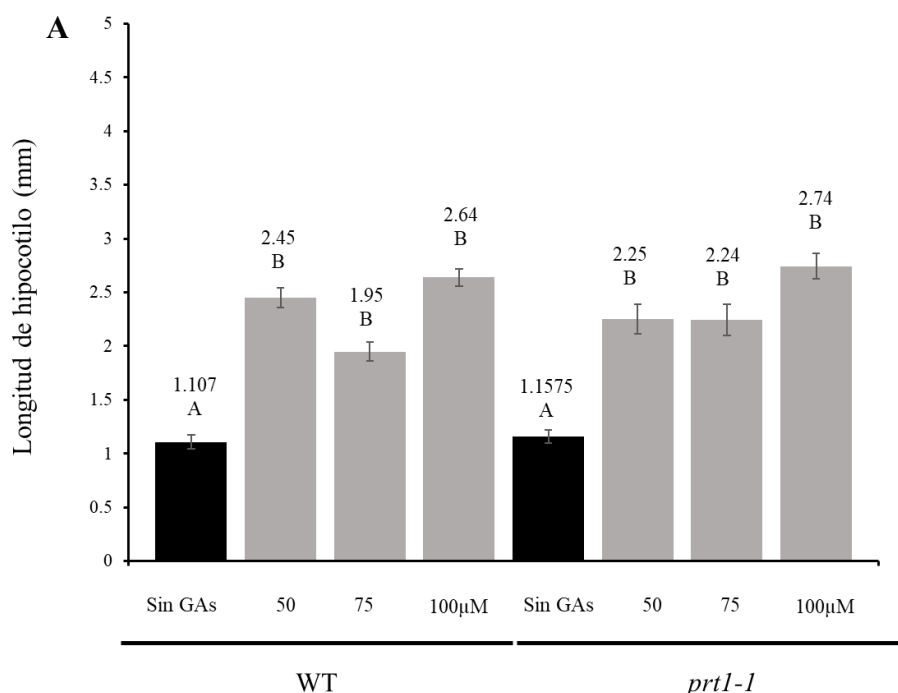
6.4 Efecto de la adición de giberelinas al mutante *prt1-1*

La elongación celular es un proceso multifactorial en el que las hormonas tienen un papel de regulación importante. Con intención de conocer si las GAs complementaban, al menos parcialmente, el fenotipo del mutante *prt1-1*, y para comenzar a indagar la función celular de PRT se adicionó esta hormona.

Se realizaron ensayos de crecimiento de las plantas silvestres y mutantes en medio MS 0.2X adicionando diferentes concentraciones de GA₃, las cuales, se ha demostrado que inducen la elongación celular en hipocótilos (Frankland *et al.*, 1960; Cowling, *et al.*, 1998; Collet, *et al.*, 2000) y en las células de la epidermis de la raíz (Ubeda, *et al.*, 2008; Ubeda, *et al.*, 2009).

El tamaño de los hipocótilos de las plantas silvestres y mutantes se incrementó desde la concentración más baja utilizada (50 μM) de GA₃ (figura 19A), lo que demostró su efecto en la elongación. Sin embargo, ninguna de las concentraciones utilizadas de GA₃ indujeron el crecimiento de la raíz en plantas silvestres o mutantes, ni se complementó el crecimiento de las raíces de *prt1-1* (figura 19B).

Esto indica que el fenotipo de la raíz del mutante *prt1-1*, no se debe a que tenga una menor cantidad de GAs.



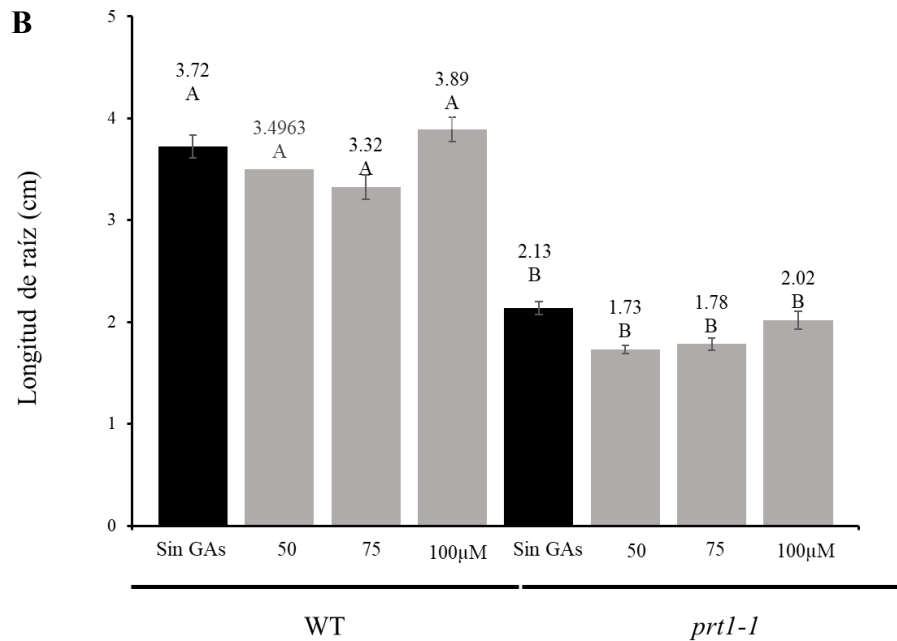


Figura 19. La adición de giberelinas no complementa el crecimiento de la raíz de *prt1-1*. **A.** Tres concentraciones de GA₃ (50, 75 y 100 μM) promovieron un aumento en la longitud de los hipocótilos, en plantas WT y el mutante. **B.** Las adición de GA₃ no tuvo efecto en la longitud de las raíces de ambos genotipos, en plantas de 6 dpv. Los datos representan la media ± error estándar y las diferencias estadísticas significativas obtenidas con las pruebas Tukey y ANOVA de una vía, a una p < 0.0001 se denotan con letras (n =10-12 plantas para los tratamientos y 32 para los controles). .

6.5 Análisis de similitud de la proteína PRT1

El gen *PRT1* (AT5G17270) de *A. thaliana* codifica para una proteína perteneciente a la superfamilia de la prenilil-transferasas, según como está anotado en la base de datos del TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>). Esta familia de proteínas se subdivide en tres grandes grupos: las geranil-geranil transferasas tipo I, las geranil-geranil transferasas tipo II o Rab y las farnesil-transferasas (Maurer-Stroh, *et al.*, 2003). Ya que era de interés conocer a qué subgrupo pertenecía, se realizaron alineamientos de secuencia aminoacídica con el programa de BLAST, pero no se encontró similitud con alguno de estos subgrupos.

Sorpresivamente, como puede observarse en la figura 20A, la proteína PRT pertenece a un clado hermano de la superfamilia de proteínas con el dominio tetratricopéptido 27 (tetratricopeptide repeat-like superfamily protein; TRP) en diferentes organismos, como:

Saccharomyces cerevisiae, *Schizosaccharomyces* sp., *Dictyostelium* sp., *Caenorhabditis elegans*, *Gallus*, *Mus musculus*, *Bos Taurus*, *Homo sapiens* y *Pongo abelii*, pero no se encontraron similitudes con otros miembros de *A. thaliana*, con excepción de una proteína homóloga anotada con el identificador AT5G37130, que codifica para una proteína de función desconocida y con la que tiene una similitud de 88.4%. Aunado a ello, no se encontraron dominios de prenilación en la proteína, sino solo los correspondientes a repeticiones del tipo TPR (figura 20B) contenidas en un dominio de la proteína.

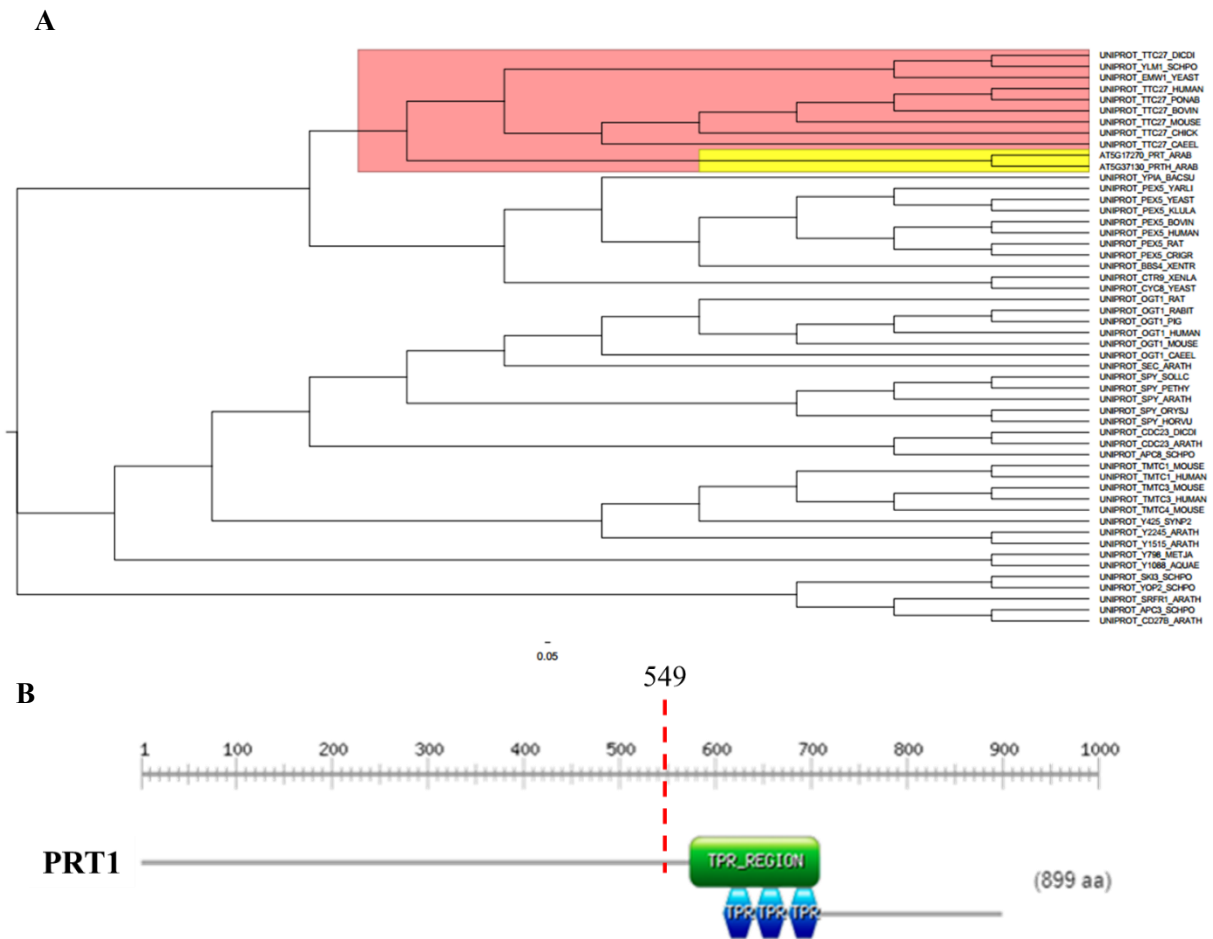


Figura 20. Análisis filogenético y dominios de la secuencia aminoacídica de PRT1. **A.** Árbol filogenético de PRT1 (AT5G17270_PRT_ARAB), obtenido mediante el programa BLAST/MAFFT. En rosa se muestra el clado de TPR 27 de diferentes especies y en amarillo se resalta la proteína de interés (AT5G17270_PRT_ARAB) y su proteína homóloga en Arabidopsis (AT5G37130_PRTH_ARAB). **B.** Dominio de la proteína que contiene las repeticiones de tetratricopéptidos a partir del aminoácido en la posición 560. El codón de término en *mer* se localiza en el aminoácido 549, por lo que la proteína truncada que se genera no contiene dicho dominio.

El análisis de la secuencia aminoacídica predice una estructura secundaria de repeticiones de α -hélices (figura 21A), que coincide con lo descrito para las repeticiones en tándem de TPR (Sikorski, *et al.*, 1990; Cortajarena y Regan, 2006; Sharma y Pandey; 2016). Igualmente, se pudo obtener un modelo tridimensional (figura 21B) con base en 5udl.1, una proteína inducida por interferón con repeticiones tetratricopeptídicas (Universidad de Basel, BIOZENTRUM, <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9FFI4>).

En este momento no es posible descartar que las proteínas codificadas por estos loci tengan, adicionalmente, la actividad de prenilil-transferasa. Si ese es el caso, constituirían una nueva familia diferente a las descritas hasta el momento. Otra posibilidad, es que se encuentre mal anotada en las bases de datos.

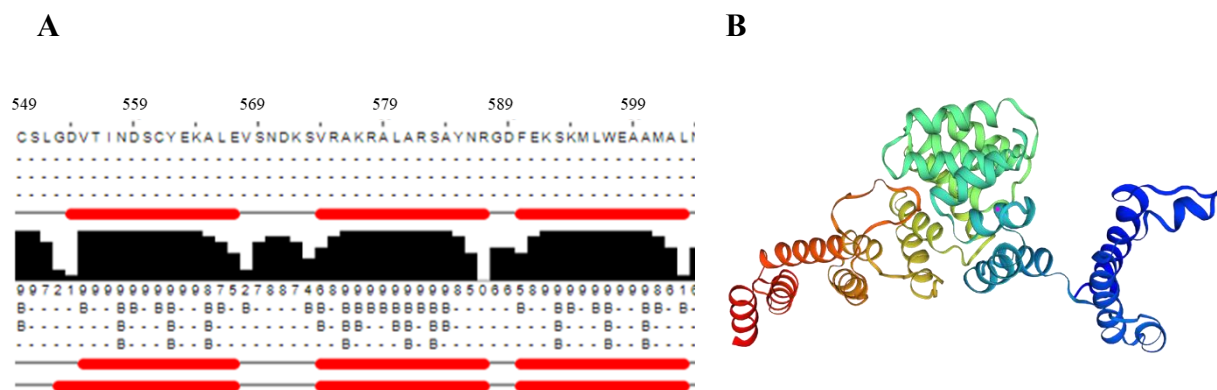


Figura 21. Predicción de la estructura de PRT1. **A.** Estructura secundaria, donde destacan las repeticiones de α -hélices (barras rojas), que coincide con lo descrito para las repeticiones en tándem de TPR (Sikorski, *et al.*, 1990; Cortajarena y Regan, 2006; Sharma y Pandey; 2016). Se muestra únicamente un fragmento, del aminoácido 549 al 599; Análisis realizado con Jpred4. **B.** Estructura tridimensional para PRT1. Con un punto rosa se señala la posición aminoacídica 549, que corresponde al sitio de la mutación en *mer*.

7. DISCUSIÓN

7.1 PRT1 pertenece al grupo de los tetratricopéptidos

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se considera que el locus AT5G17270 corresponde al gen responsable del fenotipo observado en *mer*, así como en el alelo por inserción de T-DNA que se denominó *prt1-1* (SALK_088634). Según lo anotado

en la base de datos del TAIR, este gen codifica para un miembro de la superfamilia de proteínas PRENILIL-TRANSFERASA (PRT). La prenilación de las proteínas involucra la unión de un isoprenoide farnesil (C15) o geranyl-geranyl (C20) a un residuo de cisteína en el extremo C-terminal de una proteína mediante un enlace tioéter (Clarke, 1992; Zhang y Casey, 1996). Esta modificación postraduccional promueve la interacción proteína-membrana y muchas veces la interacción proteína-proteína (Johnson, *et al.*, 2005).

Se conocen tres tipos de proteínas preniltransferasas (PTs) que catalizan la prenilación proteica en plantas: 1) las farnesil-transferasas (PFT) heterodimérica, que consiste en una subunidad α y una β y transfiere un grupo farnesil desde un farnesil-pirofosfato a proteínas con un motivo C-terminal CaaX (donde “C” corresponde a una cisteína; “a” es cualquier aminoácido alifático y “X” es una metionina, alanina, glutamina, serina o cisteína); 2) las proteínas geranylgeranyl-transferasa heterodimérica tipo I (PGGT1), que solo se diferencia de PFT en la subunidad β , transfiere un grupo geranylgeranyl desde un geranylgeranyl-pirofosfato a proteínas con motivo CaaX, donde “X” siempre es una leucina, y 3) las proteína geranylgeranyl-transferasa heterotrimérica tipo II (PGGT2), cuyas subunidades α y β son distintas a PGGT1 y PFT y además necesitan de una proteína accesoria Rab. PGGT2 transfiere un grupo geranylgeranyl desde GGPP a los sustratos de la proteína Rab (Casey y Seabra, 1996).

En el análisis filogenético y de dominios que realizamos no fue posible encontrar dominios que agruparan a PRT como parte de las preniltransferasas. Sin embargo, se encontró un dominio tetratricopéptido, el cual consiste en repeticiones degeneradas en tándem, comúnmente encontradas en proteínas de diversas familias en *A. thaliana* y otros organismos (D'Andrea y Regan, 2003). Igualmente, los datos de la estructura proteica inferida con la secuencia aminoacídica apoyan que se trata de un miembro de esta familia.

Una razón por la cual PRT puede aparecer como una prenil-transferasa es que, efectivamente, las subunidades α de las prenil transferasas consisten en repeticiones de tetratricopéptidos (Blatch, *et al.*, 1999; Maurer-Stroh, *et al.*, 2003), pero estos resultados indican una mayor similitud con una proteína del grupo TRP 27 en *Dictyostelium discoideum* (aunque no hay más información disponible), seguida de otras especies de organismos, donde solo se incluye a su homólogo AT5G37130 en *A. thaliana*.

Las repeticiones TPR están presentes en proteínas de todas las especies y se caracterizan por mediar interacciones proteicas. En plantas se han relacionado con la respuesta al estrés y la señalización hormonal, entre otros aspectos (D'Andrea y Regan, 2003; Sharma y Pandey, 2016). El motivo consta de aproximadamente 34 aminoácidos y se encuentra en diferente número de repeticiones en tándem, desde tres hasta 16 (Lamb et al. 1995; D'Andrea y Regan 2003).

Dos ejemplos de proteínas con dominios TPR en *Arabidopsis* son: ETHYLENE-OVERPRODUCER1 (ETO1), que actúa como regulador negativo de la biosíntesis de etileno al inhibir a la enzima ACC sintasa (ACS5). ETO contiene un dominio TPR que se une a ACS5 para dirigirla a degradación por el proteosoma (Yoshida, *et al.*, 2005); y SPINDLY (SPY), una proteína que actúa como un regulador negativo de la señalización de giberelinas que es independiente de las proteínas DELLA y que, a su vez, actúa como regulador positivo de la señalización de citoquininas, siendo importante en la interlocución entre estas hormonas (Sharma, *et al.*, 2016). SPY también lleva a cabo sus funciones a través de su dominio TPR, aunque no se conoce exactamente el mecanismo de acción (Greenboim-Wainberg, *et al.*, 2005).

Se puede decir, entonces, que la proteína codificada por el locus AT5G17270 es de tipo TPR y está involucrada en la elongación de las células de la raíz, aunque no es posible descartar que participe en otros procesos. Por ejemplo, durante un mapeo para la búsqueda de microsatélites (SSRs, por sus siglas en inglés) en *Brassica juncea* realizaron un ensayo de correspondencia con identificadores de *Arabidopsis thaliana*, donde identificaron cuatro genes de función desconocida, entre ellos el locus AT5G17270, que se asoció con regulación y desarrollo floral (Dhaka, *et al.*, 2017).

7.2 El mutante *prt1-1* tiene afectaciones en el proceso de elongación celular

El crecimiento de la raíz es producto de la constante división mitótica en el RAM (proliferación) y del aumento en el tamaño de las células (expansión) que llegan a la EZ y el inicio de la DZ.

Existen muchos mutantes que exhiben raíz corta, pero esa diferencia en la longitud muchas veces involucra cambios en la producción de células meristemáticas, lo que afecta la elongación celular posiblemente por una diferenciación temprana, como sucede en el mutante *short root (shr)* (Benfey, *et al.*, 1993; Helariutta, *et al.*, 2000), la adenilato quinasa 6 (*aak6*) (Slovak, *et al.*, 2020) y los mutantes en MADS-box *xaantal1* y 2 (*xal1* y *xal2*) (Tapia-López, *et al.*, 2008; Garay-Arroyo, *et al.*, 2013).

También se han encontrado mutantes afectados en la EZ y DZ, en donde la diferencia en el tamaño celular es debida por afectaciones en el citoesqueleto, lo que repercute en la organización de las microfibrillas de celulosa, generando crecimiento celular isotrópico. Ejemplos de estos son: *bull-1* (Catterou, *et al.*, 2001), *bot1* (Bichet, *et al.*, 2001) y *cob* (Benfey *et al.*, 1993; Roudier, *et al.*, 2005). Igualmente, *prc1* desarrolla una raíz más corta con células hinchadas en la EZ, lo que sugiere un defecto en el alargamiento celular (Desnos, *et al.*, 1996).

Asimismo, las hormonas repercuten en la expansión celular al modular al citoesqueleto, al menos en parte. Mutantes en BRs como *bul 1-1*, *dwf 7-3*, *ste1-4*, son defectuosos en la expresión de α -tubulina y la organización cortical, por lo que generan raíces con crecimiento deformado y patrón isotrópico (Catterou, *et al.*, 2001a, Catterou, *et al.*, 2001b). Por otra parte, es interesante que mutantes en la síntesis o señalización de las giberelinas como *ga-1* y *gai*, respectivamente, son plantas enanas sólo en la parte aérea, mientras que mutantes de respuesta constitutiva como *spy* exhiben fenotipos elongados, lo que también está relacionado a la organización de los MTs en las células de la epidermis (Fujino, *et al.*, 1995, Wenzel y Wasteneys, 2000). Por lo tanto, es posible que la regulación del citoesqueleto de tubulina sea tejido específico y que las hormonas actúen de forma diferencial en la regulación de la expansión celular en hojas e hipocótilos, con respecto a la raíz.

Por otro lado, defectos en la distensión de la membrana promovida por auxinas también puede generar problemas en la elongación celular, aunque resulta difícil separar este efecto del que tienen sobre la proliferación (De Smet, *et al.*, 2015).

En este trabajo se confirmó, mediante cuantificaciones celulares que la raíz de *prt1-1*, con un fenotipo de raíz más corta que las plantas silvestres, es casi idéntico al de *mer*. Cabe decir que, en este caso, ambos alelos son comparables ya que tanto *mer* como *prt1-1* generan,

en principio, proteínas no funcionales: en *mer* se genera un codón de término y en *prt1-1* se tiene una inserción de T-DNA en el primer exón.

Después del análisis celular que se llevó a cabo, se puede decir que la diferencia en el tamaño de la raíz de *mer* y de *prt1-1* se debe a la falta de una completa elongación de las células en la EZ que repercute en el tamaño final de las células en la DZ. Sin embargo, no parece haber similitud entre *prt1-1* y los mutantes antes descritos, dado que en todos esos casos se observa una reducción en el tamaño del meristemo, aun cuando la afectación es debida a problemas con el arreglo de las microfibrillas de celulosa.

Asimismo, en todas las raíces analizadas se observó crecimiento anisotrópico en la EZ y DZ. En *mer* se analizó el citoesqueleto de actina, pero no se encontraron diferencias con respecto al de las plantas silvestres (Dimas, 2018). En este caso, será necesario analizar el arreglo de los MTs en *prt1-1* para establecer si tiene alguna participación en el fenotipo.

En lo referente a la señalización hormonal, el ensayo con GAs no complementó el fenotipo de *prt1-1*, pero sí mostró efecto en la parte aérea. Esto permite concluir que el mutante sí responde a la hormona y que el problema de la elongación de la raíz no es debido a la falta de las GAs, ni a su señalización, ya que los hipocótilos lograron alargarse de igual forma que los de las plantas silvestres. De hecho, mutaciones en GAs exhiben fenotipos de RAM reducido y enanismo en la parte aérea (Fu y Harberd, 2003; Ubeda, *et al.*, 2008; Ubeda, *et al.*, 2009), que no se observaron en nuestros mutantes. Aun así, existe la posibilidad de que otras hormonas que también participan en la elongación celular, como las auxinas, estén afectadas en estos mutantes e, igualmente, se tendrían que realizar ensayos adicionándolas para poder responder a esta hipótesis.

Dado que no hay evidencia de otros mutantes con daño exclusivo de la EZ (con excepción de *cob*, cuyo fenotipo es debido al crecimiento isotrópico), otra posibilidad es que los mutantes *mer* y *prt1-1* puedan tener afectado el endociclo de las células de la zona de elongación y diferenciación. Las plantas mutantes en endociclo generalmente exhiben una disminución en la ploidía y reducción en el tamaño de los órganos. Las plantas *FIZZY-RELATED1/2* (*fzr2-1* y *fzr2-2*) tienen un fenotipo aparentemente silvestre en *A. thaliana*, pero desarrollan tricomas más cortos y una reducción de dos veces la ploidía con respecto al WT (Larson-Rabin, *et al.*, 2009). Asimismo, Larson-Rabin, *et al.* (2009) hallaron que la superficie adaxial de las hojas también disminuyó y mostraron menor porcentaje de

endorreplicación en *fzr 2-1*. Concordantemente, la sobreexpresión de *FZR2* generó raíces deformes, más gruesas que las plantas silvestres y el incremento en el tamaño de la raíz se correlacionó con el aumento en el tamaño nuclear (Larson-Rabin, *et al.*, 2009). Plantas mutantes de los ortólogos de *FZR* (*Drosophila*), *CCS5A* y *CSS52AB* mostraron, endorreplicación reducida en *Mendicago trucatula* (Cebolla, *et al.*, 1999). Dado que es posible que el tamaño de las células en la EZ y DZ en *mer* y *pri1-1* se deba a problemas en el ciclo celular, sería necesario utilizar un marcador que evidencie este proceso para corroborar esta hipótesis.

Finalmente, acerca del fenotipo de *mer*, es importante mencionar que las cruas con *pri1-1* complementaron parcialmente el fenotipo, por lo que existe la posibilidad de que los mutantes tengan cierta cantidad de proteína funcional, o bien, que alguna de las otras mutaciones en los genes aledaños de *mer* esté contribuyendo con el fenotipo la raíz corta. Esto último significaría que *pri1-1* también tiene otras mutaciones, puesto que su fenotipo es idéntico al de *mer*, lo cual resulta poco probable.

Con este trabajo, se concluye la primera etapa de una larga línea de investigación en el que finalmente se determinó la identidad de un gen que ahora sabemos participa en la elongación celular de la raíz de *A. thaliana*; y permite el inicio de una nueva etapa, en el que se intentará establecer cuál es su función.

8. CONCLUSIONES

- ✦ Con este trabajo se demostró que el gen anotado como una *PRENILIL TRANSFERASA* (AT5G17270) es el gen responsable del fenotipo observado en la raíz de *mer* y *pri1-1*.
- ✦ El mutante *pri1-1* tiene afectado el proceso de elongación celular específicamente en la raíz de la planta y éste no se debe a la falta de GAs, ni a su señalización.
- ✦ La proteína PRT1 podría tener como función la dimerización con otras proteínas, debido a la presencia de un dominio de tetratricopéptidos.

9. PERSPECTIVAS

- ❖ Conocer la función de la proteína como prenil-transferasa o su participación en la unión con otras proteínas implicadas en el desarrollo de la raíz.
- ❖ Probar si las auxinas o el citoesqueleto de tubulina se encuentran alterados en los alelos *mer* y *prt1-1*.
- ❖ Conocer el patrón de expresión de *CCS52A1:GFP* en *mer* y *prt1-1* como marcador de endorreplicación en la zona de elongación de la raíz.
- ❖ Complementar al mutante *prt1-1* con la expresión del gen silvestre para asegurar que esta es la única proteína implicada en el fenotipo de su raíz.
- ❖ Genotipificar y analizar la raíz del mutante en el gen homólogo AT5G37130 (*prt2*) de *A. thaliana*.

10. LITERATURA CITADA

- Abad, U. (2009). Identificación de mutantes supresoras y potenciadoras de un mutante de citoesqueleto con respuesta trópica alterada. *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., y Genschik, P. (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis. *Current biology*, 19(14), 1188-1193.
- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C. y Scheres, B. (2004). The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell*, 119(1), 109-120.
- Araki, S., Ito, M., Soyano, T., Nishihama, R., y Machida, Y. (2004). Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32979-32988.
- Barbez, E., Dünser, K., Gaidora, A., Lendl, T., y Busch, W. (2017). Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(24), E4884-E4893.

- Bayer, M., y Jürgens, G. (2016). Frühe Embryonalentwicklung von Arabidopsis Early embryogenesis of Arabidopsis. *Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie*
- Benfey, P. N., Linstead, P. J., Roberts, K., Schiefelbein, J. W., Hauser, M. T., y Aeschbacher, R. A. (1993). Root development in Arabidopsis: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development*, 119(1), 57-70.
- Benková, E., y Hejácíko, J. (2009). Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant molecular biology*, 69(4), 383.
- Bennett, T., y Scheres, B. (2010). Root development—two meristems for the price of one? In Current topics in developmental biology. *Academic Press*. Vol. 91, 67-102.
- Bichet, A., Desnos, T., Turner, S., Grandjean, O. y Höfte, H. (2001). BOTERO1 is required for normal orientation of cortical microtubules and anisotropic cell expansion in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 25(2), 137-148.
- Blatch, G. L., y Lässle, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interaction. *Bioessays*, 21(11), 932-939.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., y Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature*, 433(7021), 39.
- Boudolf, V., Barróco, R., de Almeida Engler, J., Verkest, A., Beeckman, T., Naudts, M., y De Veylder, L. (2004). B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, 16(4), 945-955.
- Boudolf, V., Lammens, T., Boruc, J., Van Leene, J., Van Den Daele, H., Maes, S. y De Jaeger, G. (2009). CDKB1; 1 forms a functional complex with CYCA2; 3 to suppress endocycle onset. *Plant physiology*, 150(3), 1482-1493.
- Brady, S. M., Orlando, D. A., Lee, J. Y., Wang, J. Y., Koch, J., Dinneny, J. R., y Benfey, P. N. (2007). A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science*, 318(5851), 801-806.
- Breuer, C., Ishida, T., y Sugimoto, K. (2010). Developmental control of endocycles and cell growth in plants. *Current opinion in plant biology*, 13(6), 654-660.

- Bringmann, M., Li, E., Sampathkumar, A., Kocabek, T., Hauser, M. T., y Persson, S. (2012). POM-POM2/cellulose synthase interacting1 is essential for the functional association of cellulose synthase and microtubules in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(1), 163-177.
- Casey, P. J., y Seabra, M. C. (1996). Protein prenyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 271(10), 5289-5292.
- Catterou, M., Dubois, F., Schaller, H., Aubanelle, L., Vilcot, B., Sangwan-Norreel, B. S., y Sangwan, R. S. (2001a). Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in Arabidopsis thaliana. II. Effects of brassinosteroids on microtubules and cell elongation in the bull mutant. *Planta*, 212(5-6), 673-683.
- Catterou, M., Dubois, F., Schaller, H., Aubanelle, L., Vilcot, B., Sangwan-Norreel, B. S., y Sangwan, R. S. (2001b). Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in Arabidopsis thaliana. I. Molecular, cellular and physiological characterization of the Arabidopsis bull mutant, defective in the? 7-sterol-C5-desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *Planta*, 212(5-6), 659-672.
- Cebolla, A., Vinardell, J. M., Kiss, E., Olah, B., Roudier, F., Kondorosi, A., y Kondorosi, E. (1999). The mitotic inhibitor ccs52 is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *The EMBO Journal*, 18(16), 4476-4484.
- Chebli, Y., y Geitmann, A. (2017). Cellular growth in plants requires regulation of cell wall biochemistry. *Current opinion in cell biology*, 44, 28-35.
- Clarke, S. (1992). Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annual review of biochemistry*, 61(1), 355-386.
- Cleland, R., y Houghton, P. M. (1971). The effect of auxin on stress relaxation in isolated Avena coleoptiles. *Plant physiology*, 47(6), 812-815.
- Collett, C. E., Harberd, N. P., y Leyser, O. (2000). Hormonal interactions in the control of Arabidopsis hypocotyl elongation. *Plant physiology*, 124(2), 553-562.
- Cortajarena, A. L., y Regan, L. (2006). Ligand binding by TPR domains. *Protein. Science*, 15(5), 1193-1198.
- Cosgrove, D. J. (2018). Diffuse growth of plant cell walls. *Plant Physiology*, 176(1), 16-27.
- Cowling, R. J., Kamiya, Y., Seto, H., y Harberd, N. P. (1998). Gibberellin dose-response regulation of GA4 gene transcript levels in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 117(4), 1195-1203.

- D'Andrea, L. D., y Regan, L. (2003). TPR proteins: the versatile helix. *Trends in biochemical sciences*, 28(12), 655-662.
- De Keijzer, J., Mulder, B. M., y Janson, M. E. (2014). Microtubule networks for plant cell division. *Systems and synthetic biology*, 8(3), 187-194
- De Smet, I., Signora, L., Beeckman, T., Inzé, D., Foyer, C. H., y Zhang, H. (2003). An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 33(3), 543-
- De Smet, S., Cuypers, A., Vangronsveld, J., y Remans, T. (2015). Gene networks involved in hormonal control of root development in Arabidopsis thaliana: a framework for studying its disturbance by metal stress. *International journal of molecular sciences*, 16(8), 19195-19224.
- De Veylder, L., Larkin, J. C., y Schnittger, A. (2011). Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. *Trends in plant science*, 16(11), 624-634.
- Desnos, T., Orbovic, V., Bellini, C., Kronenberger, J., Caboche, M., Traas, J., y Hofte, H. (1996). Procuste1 mutants identify two distinct genetic pathways controlling hypocotyl cell elongation, respectively in dark-and light-grown Arabidopsis seedlings. *Development*, 122(2), 683-693.
- Dhaka, N., Mukhopadhyay, A., Paritosh, K., Gupta, V., Pental, D., y Pradhan, A. K. (2017). Identification of genic SSRs and construction of a SSR-based linkage map in Brassica juncea. *Euphytica*, 213(1), 15.
- Dimas, U. 2018. Análisis celular de la raíz del mutante medium-size root (mer) de Arabidopsis thaliana. *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Ding, Z., y Friml, J. (2010). Auxin regulates distal stem cell differentiation in Arabidopsis roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 12046-12051.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., y Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development*, 119(1), 71-84.
- Du, M., Spalding, E. P., y Gray, W. M. (2020). Rapid Auxin-Mediated Cell Expansion. *Annual Review of Plant Biology*, 71.

- Dünser, K., Gupta, S., Herger, A., Feraru, M. I., Ringli, C., y Kleine-Vehn, J. (2019). Extracellular matrix sensing by FERONIA and Leucine-Rich Repeat Extensins controls vacuolar expansion during cellular elongation in *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO journal*, 38(7).
- Fagard, M., Desnos, T., Desprez, T., Goubet, F., Refregier, G., Mouille, G., y Höfte, H. (2000). PROCUSTE1 encodes a cellulose synthase required for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of *Arabidopsis*. *The plant cell*, 12(12), 2409-2423.
- Fayant, P, Girlanda O, Chebli Y, Aubin CE, Villemure I, Geitmann A (2010) Finite element model of polar growth in pollen tubes. *Plant Cell* 22: 2579–2593.
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F. y Schäfer, E. (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*, 451(7177), 475-479.
- Frankland, B., y Wareing, P. F. (1960). Effect of gibberellic acid on hypocotyl growth of lettuce seedlings. *Nature*, 185(4708), 255-256.
- Fu, X., y Harberd, N. P. (2003). Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature*, 421(6924), 740-743.
- Fujino, K., Koda, Y., y Kikuta, Y. (1995). Reorientation of cortical microtubules in the sub-apical region during tuberization in single-node stem segments of potato in culture. *Plant and cell physiology*, 36(5), 891-895.
- Galbraith, D. W., Harkins, K. R., y Knapp, S. (1991). Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 96(3), 985-989.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., y Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, 282(5397), 2226-2230.
- Garay-Arroyo, A., de la Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E. R., y Gutiérrez, C. (2014). La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de *Arabidopsis Thaliana*. *Revista de educación bioquímica*, 33(1), 13-22.
- Garay-Arroyo, A., De La Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Azpeitia, E., y Álvarez-Buylla, E. R. (2012). Hormone symphony during root growth and development. *Developmental dynamics*, 241(12), 1867-1885.

- Garay-Arroyo, A., Ortiz-Moreno, E., de la Paz Sánchez, M., Murphy, A. S., García-Ponce, B., Marsch-Martínez, N. y Dubrovsky, J. G. (2013). The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during Arabidopsis root development by regulating PIN expression. *The EMBO journal*, 32(21), 2884-2895.
- Goh, T., Toyokura, K., Wells, D. M., Swarup, K., Yamamoto, M., Mimura, T. y Guyomarc'h, S. (2016). Quiescent center initiation in the Arabidopsis lateral root primordia is dependent on the SCARECROW transcription factor. *Development*, 143(18), 3363-3371.
- Greenboim-Wainberg, Y., Maymon, I., Borochoy, R., Alvarez, J., Olszewski, N., Ori, N. y Weiss, D. (2005). Cross talk between gibberellin and cytokinin: the Arabidopsis GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling. *The Plant Cell*, 17(1), 92-102.
- Grieneisen, V. A., Xu, J., Marée, A. F., Hogeweg, P., y Scheres, B. (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature*, 449(7165), 1008.
- Hager, A. (2003). Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *Journal of plant research*, 116(6), 483-505.
- Hauser, M. T., Morikami, A., y Benfey, P. N. (1995). Conditional root expansion mutants of Arabidopsis. *Development*, 121(4), 1237-1252.
- Hejátko, J., y Hakoshima, T. (2018). Plant structural biology: hormonal regulations. *Springer*.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G. y Benfey, P. N. (2000). The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell*, 101(5), 555-567.
- Higaki, T., Sano, T., y Hasezawa, S. (2007). Actin microfilament dynamics and actin side-binding proteins in plants. *Current opinion in plant biology*, 10(6), 549-556.
- Hocq, L., Pelloux, J., y Lefebvre, V. (2017). Connecting homogalacturonan-type pectin remodeling to acid growth. *Trends in Plant Science*, 22(1), 20-29.
- Horn, R., Yi, K., Menand, B., Pernas-Ochoa, M., Takeda, S., Walker, T., y Dolan, L. (2018). Root epidermal development in Arabidopsis. *Annual Plant Reviews*. 64-82.
- Inada, N. (2017). Plant actin depolymerizing factor: actin microfilament disassembly and more. *Journal of plant research*, 130(2), 227-238.

- Ioio, R. D., Linhares, F. S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., y Sabatini, S. (2007). Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology*, 17(8), 678-682.
- Ioio, R. D., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M. T. y Sabatini, S. (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 322(5906), 1380-1384.
- Ishida, T., Adachi, S., Yoshimura, M., Shimizu, K., Umeda, M., y Sugimoto, K. (2010). Auxin modulates the transition from the mitotic cycle to the endocycle in Arabidopsis. *Development*, 137(1), 63-71.
- Ishida, T., Fujiwara, S., Miura, K., Stacey, N., Yoshimura, M., Schneider, K. y Sugimoto, K. (2009). SUMO E3 ligase HIGH PLOIDY2 regulates endocycle onset and meristem maintenance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(8), 2284-2297.
- Ivanov, V. B., y Dubrovsky, J. G. (2013). Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends in Plant Science*, 18(5), 237-243.
- Johnson, C. D., Chary, S. N., Chernoff, E. A., Zeng, Q., Running, M. P., y Crowell, D. N. (2005). Protein geranylgeranyltransferase I is involved in specific aspects of abscisic acid and auxin signaling in Arabidopsis. *Plant physiology*, 139(2), 722-733.
- Kamura, T., Hara, T., Kotoshiba, S., Yada, M., Ishida, N., Imaki, H. y Nakayama, K. I. (2003). Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), 10231-10236.
- Kasili, R., Walker, J. D., Simmons, L. A., Zhou, J., De Veylder, L., y Larkin, J. C. (2010). SIAMESE cooperates with the CDH1-like protein CCS52A1 to establish endoreplication in Arabidopsis thaliana trichomes. *Genetics*, 185(1), 257-268.
- Lamb, J. R., Tugendreich, S., y Hieter, P. (1995). Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends in biochemical sciences*, 20(7), 257-259.
- Landrein, B., y Hamant, O. (2013). How mechanical stress controls microtubule behavior and morphogenesis in plants: history, experiments and revisited theories. *The Plant Journal*, 75(2), 324-338.
- Lanza, M., Garcia-Ponce, B., Castrillo, G., Catarecha, P., Sauer, M., Rodriguez-Serrano, M. y Sandalio, L. M. (2012). Role of actin cytoskeleton in brassinosteroid signaling and in its integration with the auxin response in plants. *Developmental cell*, 22(6), 1275-

- Larson-Rabin, Z., Li, Z., Masson, P. H., y Day, C. D. (2009). FZR2/CCS52A1 expression is a determinant of endoreduplication and cell expansion in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 149(2), 874-884.
- Lee, H. O., Davidson, J. M., y Duronio, R. J. (2009). Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes y development*, 23(21), 2461-2477.
- Li, J., Arieti, R., y Staiger, C. J. (2014). Actin filament dynamics and their role in plant cell expansion. *Plant Cell Wall Patterning and Cell Shape*, 127-62.
- Lin, Z., Ho, C. W., y Grierson, D. (2009). AtTRP1 encodes a novel TPR protein that interacts with the ethylene receptor ERS1 and modulates development in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 60(13), 3697-3714.
- Liu, B. (2011). The Plant Cytoskeleton. *Advances in plant biology*.
- Mansfield, S. G., y Briarty, L. G. (1991). Early embryogenesis in Arabidopsis thaliana. II. The developing embryo. *Canadian journal of botany*, 69(3), 461-476.
- Maurer-Stroh, S., Washietl, S., y Eisenhaber, F. (2003). Protein prenyltransferases. *Genome biology*, 4(4), 212.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D. M., y Cosgrove, D. J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell*, 4(11), 1425-1433.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M., y Kakimoto, T. (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal*, 37(1), 128-138.
- Morohashi, K., Zhao, M., Yang, M., Read, B., Lloyd, A., Lamb, R., y Grotewold, E. (2007). Participation of the Arabidopsis bHLH factor GL3 in trichome initiation regulatory events. *Plant physiology*, 145(3), 736-746.
- Moubayidin, L., Perilli, S., Ioio, R. D., Di Mambro, R., Costantino, P., y Sabatini, S. (2010). The rate of cell differentiation controls the Arabidopsis root meristem growth phase. *Current Biology*, 20(12), 1138-1143.
- Muraro, D., Wilson, M., y Bennett, M. J. (2011). Root development: cytokinin transport matters, too! *Current Biology*, 21(11), R423-R425.
- Nishitani, K., y Vissenberg, K. (2006). Roles of the XTH protein family in the expanding cell. In *The expanding cell*. Springer. 89-116.

- Orr, R. G., Cheng, X., Vidali, L., y Bezanilla, M. (2020). Orchestrating cell morphology from the inside out—using polarized cell expansion in plants as a model. *Current opinion in cell biology*, 62, 46-53.
- Pacheco-Escobedo, M., Ivanov VB, Ransom-Rodríguez I, Arriaga-Mejía G, Ávila H, Baklanov IA, Pimentel A, Corkidi G, Doerner P, Dubrovsky JG, Álvarez-Buylla ER, Garay-Arroyo A. 2016. Longitudinal zonation pattern in Arabidopsis root tip defined by a multiple structural change algorithm. *Annals of Botany* 118: 763–776.
- Pacifici, E., Polverari, L., y Sabatini, S. (2015). Plant hormone cross-talk: the pivot of root growth. *Journal of experimental botany*, 66(4), 1113-1121.
- Petricka, J. J., Winter, C. M., y Benfey, P. N. (2012). Control of Arabidopsis root development. *Annual review of plant biology*, 63, 563-590.
- Pysh, L. D., Wysocka-Diller, J. W., Camilleri, C., Bouchez, D., y Benfey, P. N. (1999). The GRAS gene family in Arabidopsis: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *The Plant Journal*, 18(1), 111-119.
- Rayle, D. L., y Cleland, R. (1970). Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiology*, 46(2), 250-253.
- Roudier, F., Fernandez, A. G., Fujita, M., Himmelspach, R., Borner, G. H., Schindelman, G. y Benfey, P. N. (2005). COBRA, an Arabidopsis extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation. *The Plant Cell*, 17(6), 1749-1763.
- Scheres, B., Benfey, P., y Dolan, L. (2002). Root development. The Arabidopsis book. *American Society of Plant Biologists*, 1.
- Scheres, B., Di Laurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M. T., Janmaat, K., Weisbeek, P., y Benfey, P. N. (1995). Mutations affecting the radial organisation of the Arabidopsis root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development*, 121(1), 53-62.
- Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C., y Weisbeek, P. (1994). Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials. *Development*, 120(9), 2475-2487.
- Sedbrook, J. C., y Kaloriti, D. (2008). Microtubules, MAPs and plant directional cell expansion. *Trends in plant science*, 13(6), 303-310.

- Sharma, M., y Pandey, G. K. (2016). Expansion and function of repeat domain proteins during stress and development in plants. *Frontiers in plant science*, 6, 1218.
- Shu, Z., Row, S., y Deng, W. M. (2018). Endoreplication: the good, the bad, and the ugly. *Trends in cell biology*, 28(6), 465-474.
- Sikorski, R. S., Boguski, M. S., Goebel, M., y Hieter, P. (1990). A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell*, 60(2), 307-317.
- Slovak, R., Setzer, C., Roiuk, M., Bertels, J., Göschl, C., Jandrasits, K., y Busch, W. (2020). Ribosome assembly factor Adenylate Kinase 6 maintains cell proliferation and cell size homeostasis during root growth. *New Phytologist*, 225(5), 2064-2076.
- Somssich, M., Khan, G. A., y Persson, S. (2016). Cell Wall heterogeneity in root development of Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 7, 1242.
- Stepanova, A. N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L. M., Xie, D. Y., Doležal, K. y Alonso, J. M. (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell*, 133(1), 177-191.
- Sugimoto, K., Williamson, R. E., y Wasteneys, G. O. (2000). New techniques enable comparative analysis of microtubule orientation, wall texture, and growth rate in intact roots of Arabidopsis. *Plant physiology*, 124(4), 1493-1506.
- Szymanski, D., y Staiger, C. J. (2018). The actin cytoskeleton: functional arrays for cytoplasmic organization and cell shape control. *Plant physiology*, 176(1), 106-118.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2010). Cell walls: structure, biogenesis, and expansion. *Plant physiology*. *Sinauer Associates, Sunderland*, 327, 423-460.
- Takehara S., Ueguchi-Tanaka M. (2018) Gibberellin. In: Hejátko J., Hakoshima T. (eds) *Plant Structural Biology: Hormonal Regulations*. *Springer*
- Tapia-López, R., García-Ponce, B., Dubrovsky, J. G., Garay-Arroyo, A., Pérez-Ruíz, R. V., Kim, S. H., ... y Alvarez-Buylla, E. R. (2008). An AGAMOUS-related MADS-box gene, XAL1 (AGL12), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in Arabidopsis. *Plant physiology*, 146(3), 1182-1192.
- Ubeda, S., Beemster, G. T., y Bennett, M. J. (2012). Hormonal regulation of root growth: integrating local activities into global behaviour. *Trends in plant science*, 17(6), 326-331.

- Ubeda, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G. T., Bhalerao, R., Swarup, R., y Bennett, M. J. (2009). Gibberellin signaling in the endodermis controls Arabidopsis root meristem size. *Current Biology*, 19(14), 1194-1199.
- Ubeda, S., Swarup, R., Coates, J., Swarup, K., Laplaze, L., Beemster, G. T., y Bennett, M. J. (2008). Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nature cell biology*, 10(5), 625.
- Vanstraelen, M., Baloban, M., Da Ines, O., Cultrone, A., Lammens, T., Boudolf, V. y Kondorosi, E. (2009). APC/CCCS52A complexes control meristem maintenance in the Arabidopsis root. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(28), 11806-11811.
- Verbelen, J. P., Cnodder, T. D., Le, J., Vissenberg, K., y Baluška, F. (2006). The root apex of Arabidopsis thaliana consists of four distinct zones of growth activities: meristematic zone, transition zone, fast elongation zone and growth terminating zone. *Plant signaling y behavior*, 1(6), 296-304.
- Walker, J. D., Oppenheimer, D. G., Concienne, J., y Larkin, J. C. (2000). SIAMESE, a gene controlling the endoreduplication cell cycle in Arabidopsis thaliana trichomes. *Development*, 127(18), 3931-3940.
- Wenzel, C., y Wasteneys, G. (2000). Gibberellin-dependent changes in cortical microtubule orientation in developing epidermal cells of barley leaves. Kinematic and cytological studies on a gibberellin-responsive dwarf mutant, M489. *Universidad Nacional de Australia*.
- Woodward, A. W., y Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of botany*, 95(5), 707-735.
- Yanagisawa M, Desyatova AS, Belteton SA, Mallery EL, Turner JA, Szymanski DB (2015) Patterning mechanisms of cytoskeletal and cell wall systems during leaf trichome morphogenesis. *Nature Plants*. 1: 15014
- Yoshida, H., Nagata, M., Saito, K., Wang, K. L., y Ecker, J. R. (2005). Arabidopsis ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases. *BMC Plant Biology*, 5(1), 14.
- Yoshizumi, T., Tsumoto, Y., Takiguchi, T., Nagata, N., Yamamoto, Y. Y., Kawashima, M. y Matsui, M. (2006). Increased level of polyplody1, a conserved repressor of

CYCLINA2 transcription, controls endoreduplication in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 18(10), 2452-2468.

Zhang, F. L., y Casey, P. J. (1996). Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annual review of biochemistry*, 65(1), 241-269.

Zhang, Z., Zhang, Y., Tan, H., Wang, Y., Li, G., Liang, W. y Zhang, D. (2011). RICE MORPHOLOGY DETERMINANT encodes the type II formin FH5 and regulates rice morphogenesis. *The Plant Cell*, 23(2), 681-700.

Zhu, L., Zhang, Y., Kang, E., Xu, Q., Wang, M., Rui, Y. y Fu, Y. (2013). MAP18 regulates the direction of pollen tube growth in Arabidopsis by modulating F-actin organization. *The Plant Cell*, 25(3), 851-867.

Zielke, N., Edgar, B. A., y DePamphilis, M. L. (2013). Endoreplication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(1).

11. ANEXOS

11.1 Anexo 1. Modelo de los genes mutados por inserción de T-DNA en las líneas de plantas utilizadas

Esquema de los cinco genes candidatos en donde el triángulo indica el sitio de inserción del T-DNA, la flecha muestra la dirección de la secuencia flanqueante al cebador LB. La barra representa 100 pb.

1. *like-Heterochromatin Protein 1 (lhp1-6; SALK_011762)*



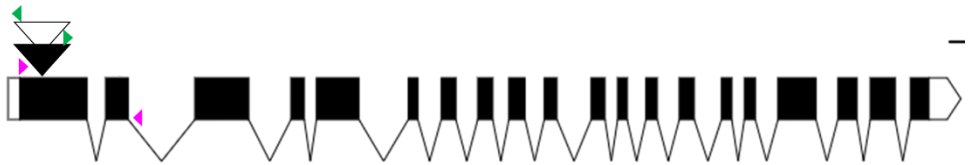
2. *dominant suppressor of CAMTA3 number 2 (dsc2 / tir-nbs-lrr; SALK_200331C)*



3. *fitoeno sintasa* (*psy*; SALK_054288C)



4. *prenilil transferasa 1* (*prt1-1*; SALKseq_088634)



5. *calcium interchange 7* (*cax7*; SALK_143741.56.00)



11.2 Anexo 2. Fragmentos secuenciados de los posibles genes candidatos causales de las mutaciones de *mer*.

En amarillo, se muestran los cebadores utilizados y en verde, el cambio de base encontrado.

Las letras azules indican intrones, mientras que las negras, exones.

1. Calcium exchanger 7 (AT5G17860).

TCATTACAGCGGGTCACAAAGAAACCTAATCTTGACATAAATATCCGGATCTATCGGGCTAAT
 CGTCGGTATCTTAGCTTACTTGACGACAGAAAAATCACATCCGCCGAAGAAATCTCATTAGT
 TTGGCTTCTAGGAGGCTTCACGATGAGTGTGACATGGACATACATGATAGCACAAAGAGCTAGT
 CTCATTGTTAATATCCTTAGGTAATATCTTTGGTATAAGCCCATCCGTGCTAGGACTAACCGT
 CCTAGCTTGGGGAAATTCTTAGGCGATCTTATCGCGAATGTGACCGTGGCGTTTCACGGAGG
 CAACGATGGTGCTCAGATAGC

2. Fitoeno sintasa (AT5G17230).

TACTCAGAGACGTAGGCGAAGAgtgagtcttttatatatattttaaatagagccttggtttctt
gattcacatatctcacttaaaccggttcttgattcacatgcttcttttaaccggttct
tgattcacatatctctcttaaattgggttttggttctcactatcagTGCAGAAAGAGGAAGGGT
TATCTGCCTCAGGATGAATTGGCTCAGGCTGGTCTTTCAGATGAAGACATATTCGTCGGAAAA
GTAAGTATAAATGGAGAACTTCATGAAAATGCAGCTTAAACGAGCAAGAATGTTCTTCGAC
GAAGCTGAGAAAGGCGTCACCGAGCTCAGTGCCGCTAGCAGATGGCCTgtaagtgtctctaaa
aactcttcagccgcaagtttaccgtttacttatttcttttggatcgattttaaccccgagga
cttg

3. Dominant suppressor of CAMTA 3 (AT5G18370).

CAGTTTGGACGTTAACCATGGCTTTGAAGTCTTGAGCAATAAGTCTCTCATATCTACAGATATG
GGACTCGTACGGATGCATTCTTTGCTTCAACAAC TAGGTGTTGACATTGTCCGTAAACAATCTA
TTGGAGAGCCTGAAAAACGTCAGTTTTTAGTTGACGTTAATGAGATTTCTGATGTTATCACCGA
CAATACAgtaagtatatttacagttgtctctttcctttctaataattgtttggctattaactaaa
tcataattaataactcttgatatttcttgctttggacataccttagGGCATTTGGGACTATTCT
AGGCATAATGCTTCATGTCTCTAAGATCGAGGATGTATTAGTTATAGAA GAAACGGTGTGGAT
AGGATGA

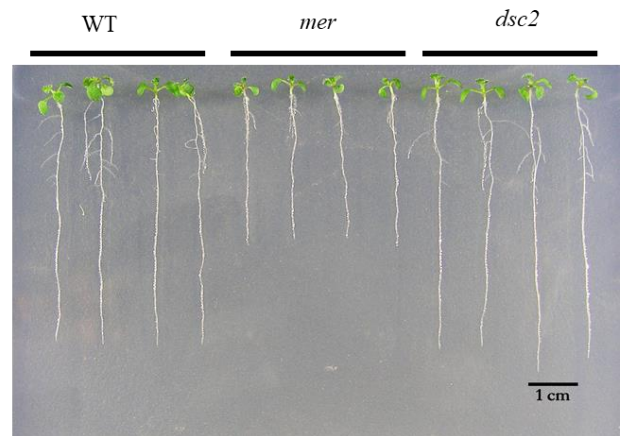
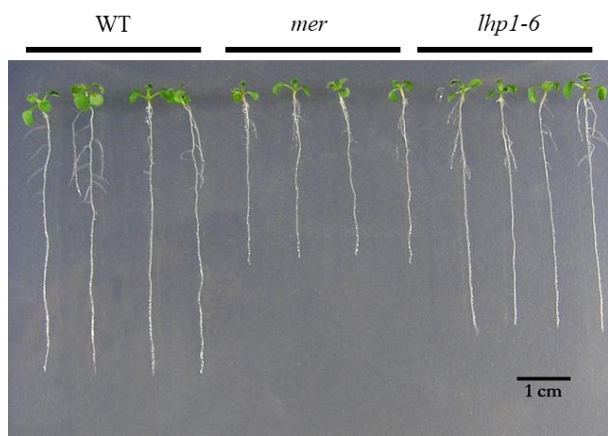
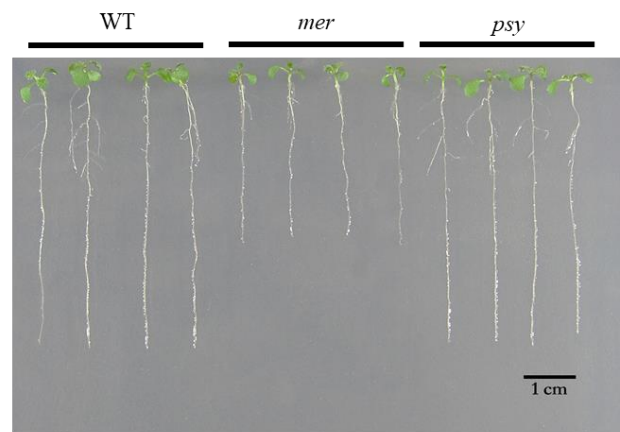
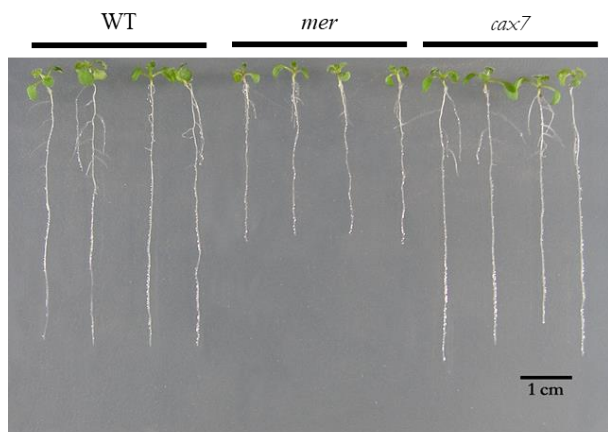
4. Like-Heterochromatin protein 1 (AT5g17690).

gttataaactcggttgtgaaagGCGCGATGGCTGAAACTACCAACACATGGGAGCCTTTAGA
GAATCTCCAGTCTATTGCTGATGTTATAGATGCCTTTGAGGGAAAGgtaagtaaatggaatctta
tataaaagttttgtgatacttttgaattgattgtttcatggattttcttggttaaatgtatgga
tttgctttcttgtttcatatgtttcaagTTTGAAGCCAGGAAAGCCTGGTAGGAAACGGAAGC
GCAAATATGCAGGTCCTCATTCTCAGATGAAGAAGAAGCAACGTTTAACATCTACATCACATGA
TGCTACTGAGAAATCTGACTCTTCTACGTCTCTCAACAACCTTAGCCTTCTGACATTCCTGAT
CCACTAGACCTAAGCGGTTTCGAGTCTATTAAATAGAGATGTGGAAGCGAAGAATGCTTATGTAT
CCAACCAAGTTGAAGCCAACAGTGGGAGTGTGGGATGGCC CGACAAGTTCGTTTGATTGACAA

5. Prenilil-transferasa 1 (AT5G17270).

tggtgggtacccttagtctgttcctttctgtgtttatatcttaattaataaatcactgtgaagt
gccataattatctgctgtgaacgtacgcttaatcttattataagcagatatttctttaagcttt
gtatatacagagaaagttattatggatccgatcgttaaattaatgtgatgataaatattgg
tttcagATGTTCACTTGGTGTGTTACTATAAATGATTCCTGTTATGAAAAAGCCTGGAAGTT
TCAAATGATAAGTCAGTTCGTGCTAAGgtagtttgagacagaaaactgaaaaatcttttatgtt
cttctctttagtccatgctctaattatcttcatcttgcagCGCGCTCTTGCTCGCAGCGCATA
CAAT

11.3 Anexo 3. Fenotipo de cuatro de las líneas mutantes utilizadas



Fenotipo de las líneas mutantes *cax7*, *psy*, *dsc2*, *lhp1-6* en comparación con *mer* y las plantas silvestres. Se muestran plántulas de 5 dpg.