



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO  
VEGETAL**

**“CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA DE  
REGENERACIÓN DE LA RAÍZ DE *Arabidopsis thaliana*  
MEDIADO POR Cr(VI) Y LA SUBUNIDAD MED18 DEL  
COMPLEJO MEDIADOR”**

**TESIS QUE PRESENTA  
BIÓL. BRICIA RUIZ AGUILAR**

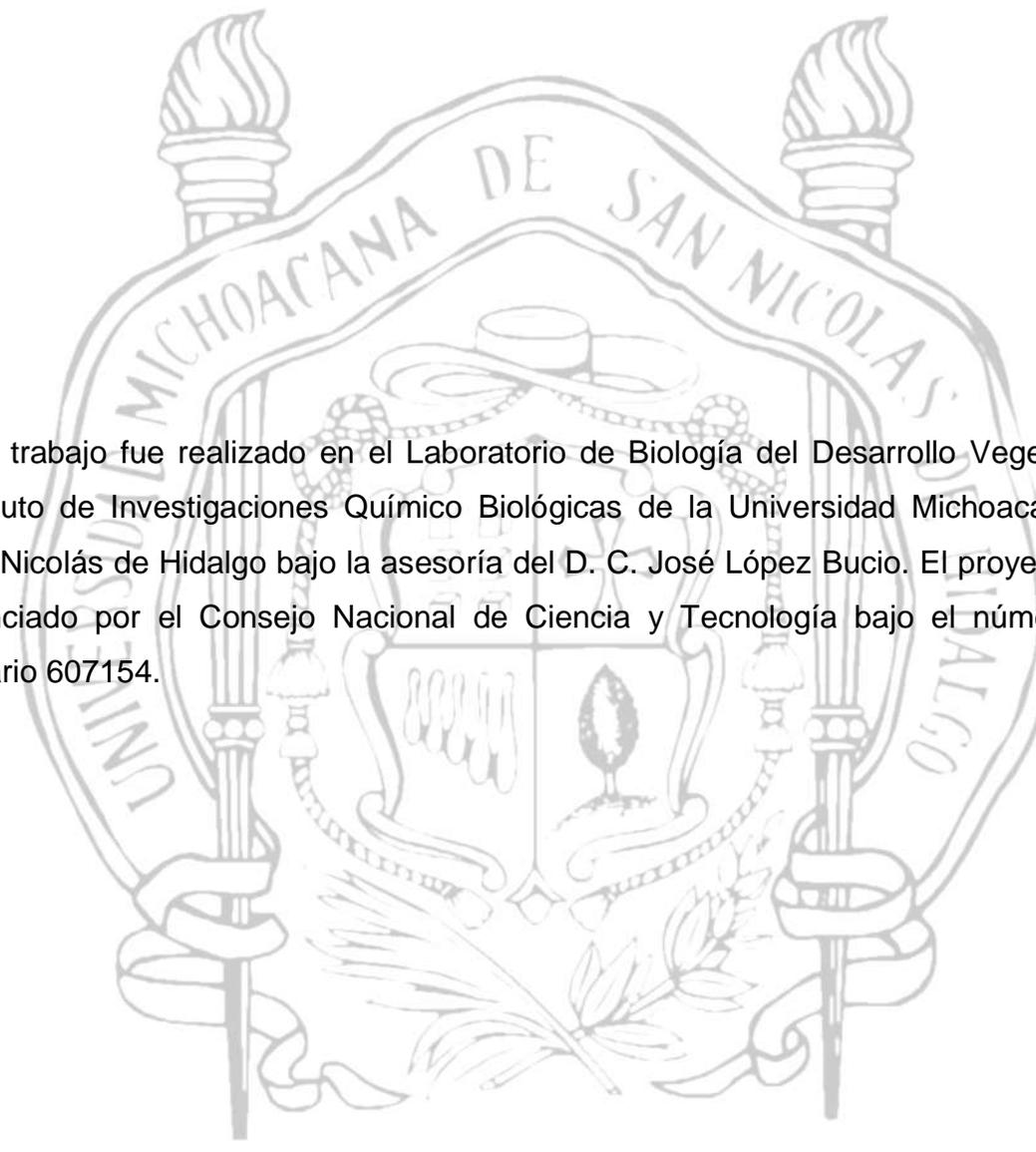
**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**DIRECTOR DE TESIS:  
D. C. JOSÉ LÓPEZ BUCIO**

**MORELIA, MICHOACÁN,  
SEPTIEMBRE 2018**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO-BIOLÓGICAS  
UMSNH**



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría del D. C. José López Bucio. El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología bajo el número de becario 607154.

## **Agradecimientos**

Al D.C. José López Bucio por el tiempo y apoyo brindado durante la realización de este trabajo de investigación.

A mis sinodales, D. C. Elda Beltrán Peña, Eduardo Valencia Cantero, Homero Reyes de la Cruz y Ernesto García Pineda por sus amables comentarios, seguimiento del trabajo y revisión del manuscrito.

Al CONACYT, por la beca de manutención 607154.

A los D.C. Javier Raya González y León Francisco Ruíz Herrera, y a mis compañeros de laboratorio por su ayuda y aportaciones a este trabajo.

A mis padres Soila e Ignacio, a mi segunda madre Triny, a mis hermanos Saúl y Gabriel, y al resto de mi familia, que sin ellos ninguno de mis logros hubieran sido posibles.

A Alexis, por todo el amor y apoyo.

A mis amigos que siempre están conmigo a la distancia.

# ÍNDICE

Resumen .....	1
Abstract.....	2
1. Introducción .....	3
2. Antecedentes .....	4
2.1. Características de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	4
2.2. Importancia del sistema radicular .....	4
2.2.1. Crecimiento y desarrollo del sistema radicular .....	6
2.3. Anatomía del sistema radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	7
2.3.1. Zona meristemática .....	8
2.3.1.1. División en el meristemo radicular.....	9
2.3.1.2. Mantenimiento del meristemo radicular .....	10
2.3.2. Zona de elongación .....	12
2.3.3. Zona de diferenciación.....	12
2.3.3.1. Formación de raíces laterales .....	12
2.3.3.2. Pelos radiculares .....	13
2.4. Participación de las auxinas en los principales procesos de crecimiento y desarrollo de <i>Arabidopsis</i> .....	13
2.4.1. Regulación de las auxinas en la división celular en el meristemo de la raíz .....	17
2.5. Daño en plantas por estrés abiótico .....	20
2.6. Antecedentes sobre la regeneración de los organismos .....	21
2.6.1. Regeneración celular en plantas.....	22
2.6.2 Regeneración de la raíz de <i>Arabidopsis</i> .....	24
2.6.3. La eliminación del meristemo activa un programa de regeneración celular.....	24

2.7. Regulación de la vía auxínica posterior a la escisión de la punta de la raíz de <i>Arabidopsis</i> .....	25
2.8. Muerte selectiva de células iniciales por estrés genotóxico.....	27
2.9. Participación de ERF115 en la regeneración de la raíz después del daño celular.....	28
2.10. Efecto del cromato en plantas.....	29
2.10.1. Mecanismo de toxicidad del cromato.....	31
2.10.2. Participación del gen <i>SLR</i> en la resistencia a cromato.....	32
2.11. Regulación del ciclo celular por daño del ADN.....	34
2.12. Características y función del complejo Mediador.....	34
2.13. <i>med18-1</i> manifiesta un programa de muerte celular en el meristemo.....	37
3. Justificación.....	38
4. Hipótesis.....	38
5. Objetivos.....	39
5.1. Objetivo general.....	39
5.2. Objetivos específicos.....	39
6. Materiales y métodos.....	40
6.1. Material biológico.....	40
6.2. Preparación de la semilla y condiciones de crecimiento.....	40
6.3. Obtención de cruzas.....	41
6.4. Compuestos químicos.....	42
6.5. Análisis histoquímico.....	42
6.6. Tinción de YP y detección de GFP.....	43
6.7. Variables analizadas.....	43
7. Resultados.....	44
8. Discusión.....	63
9. Literatura citada.....	65
10. Apéndice.....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento y desarrollo de <i>Arabidopsis</i> .....	5
Figura 2. Meristemo apical caulinar y radicular de <i>Arabidopsis</i> .....	7
Figura 3. Zonas de la raíz y estructura del nicho de células iniciales en la raíz primaria de <i>Arabidopsis</i> .....	8
Figura 4. Movimiento de SHR e interacción con SCR en la raíz primaria de <i>Arabidopsis</i> .....	11
Figura 5. Metabolismo y señalización de las auxinas en <i>Arabidopsis</i> .....	15
Figura 6. Ubicación de las diferentes proteínas PIN en el meristemo de la raíz de <i>Arabidopsis</i> .....	18
Figura 7. Regeneración en <i>Arabidopsis</i> después de la escisión de la punta de la raíz .....	26
Figura 8. Muerte selectiva de células iniciales y células hijas cercanas en el meristemo de la raíz.....	27
Figura 9. Inducción del factor transcripcional ERF115 en respuesta al daño en el ADN .....	28
Figura 10. Inhibición del crecimiento de la raíz y del follaje de <i>Arabidopsis</i> e inducción de la formación de raíces adventicias en exposición a Cr(VI) .....	31
Figura 11. Resistencia de la mutante <i>slr1-1</i> al cromato.....	33
Figura 12. Participación en la transcripción y estructura del complejo Mediador .....	36
Figura 13. Muerte celular en la mutante <i>med18-1</i> .....	37

## Resumen

Las plantas se encuentran expuestas a diferentes tipos de estrés que causan daños en sus tejidos. El estrés abiótico puede deberse a diversos factores ambientales, como la exposición a altas concentraciones de metales, sequía, salinidad, entre otros. Dichos agobios resultan en la pérdida de tejidos, que en ocasiones se pueden revertir total o parcialmente gracias a los ajustes en la expresión de genes necesarios para procesos de regeneración. Para que la transcripción de dichos genes se lleve a cabo, se requiere al complejo Mediador, que sirve de andamio entre los factores transcripcionales generales y la ARN polimerasa II.

Las mutantes de la subunidad MED18 presentan un programa de muerte celular en el meristemo de la raíz e hipersensibilidad a diferentes tipos de estrés. En este trabajo, se analizó la respuesta de las mutantes *med18-1* y *med18-2* a la exposición con Cr(VI), observando que, en concentraciones sub-letales del metal, se inhibe la longitud de la raíz primaria y se generan dos meristemas a partir de uno, los cuales terminan por formar dos raíces independientes. El proceso de formación de la doble raíz depende del factor transcripcional ERF115, de la vía de señalización de las auxinas a través de la proteína SOLITARY ROOT (SLR) y del transporte adecuado de esta fitohormona a través de los transportadores de la familia PIN.

Los resultados revelaron un programa de morfogénesis en el que la función de MED18 y la respuesta adaptativa al Cr(VI) actúan de manera sinérgica para promover la regeneración *in vivo* de la raíz de *Arabidopsis*.

**Palabras clave:** Estrés abiótico, regeneración, MED18, Cr(VI), auxinas.

## **Abstract**

Plants are exposed to different types of stress, which cause damage to their tissues. Abiotic stress can be generated by environmental factors, such as exposure to metals, drought, salinity, among others. These damages can result in the loss of tissue, and sometimes are fully or partially reversed by expression of genes required for cell regeneration. The MEDIATOR complex serves as scaffold between general transcriptional factors and RNA polymerase II.

The MED18 subunit has a program of cell death in the meristem and presents hypersensitivity to different types of stress. In this work, we analyzed the response of *med18-1* and *med18-2* mutants to Cr(VI) supplementation, and found that in sub-lethal concentrations the length of the primary root is inhibited, but two meristems are generated from a single one, which allows the formation of two independent roots. The process of formation of the double root depends on the transcriptional factor ERF115, the auxinic response factor SOLITARY ROOT (SLR) and the transport of auxin through the PIN proteins.

The results revealed a morphogenesis program in which MED18 and Cr(VI) act synergistically to promote root regeneration *in vivo* in *Arabidopsis*.

**Keywords:** Abiotic stress, regeneration, MED18, Cr(VI), auxins

## 1. Introducción

Las plantas presentan un programa de desarrollo post-embrionario que les permite modificar el fenotipo de la parte aérea y del sistema radical de acuerdo a las condiciones del medio (Bartels y Sunkar, 2005; Hu *et al.*, 2014). Existen dos tipos principales de estrés, el biótico y abiótico. El primero se debe a la interacción con otros organismos, que pueden ser insectos herbívoros o microorganismos. El estrés abiótico ocurre cuando la planta percibe cambios en el ambiente generando una respuesta adaptativa (Wang *et al.*, 2003; Aung *et al.*, 2018).

El daño en los tejidos causado por los diferentes tipos de estrés, puede inducir un programa de regeneración, que implica la regulación de la división, el crecimiento y la diferenciación celular (Sugimoto *et al.*, 2011). En este proceso participan los factores de transcripción WUSCHEL (WUS) y SHOOT MERISTEMLESS (STM), los que en explantes de tejidos presentan una sobre-expresión y cuya función es importante en la organogénesis del follaje (Xu *et al.*, 2006). Mientras que la regeneración de la raíz se relaciona con las proteínas PLETHORA (PLT), SHORT-ROOT (SHR) y SCARECROW (SCR), las cuales participan en el mantenimiento del centro quiescente (QC, por sus siglas en inglés) y también en el flujo de las auxinas al regular la transcripción de los transportadores PIN (Xu *et al.*, 2006; Sena y Birnbaum, 2010; Rosspopoff *et al.*, 2017).

Un aspecto novedoso y reciente en las investigaciones sobre el proceso de regeneración en plantas, corresponde a la identificación del factor transcripcional ETHYLENE RESPONSE FACTOR 115 (ERF115) en un programa de regeneración de la raíz de *Arabidopsis*. Para llevar a cabo dicho programa, se requiere que el QC se divida después de la exposición a agentes genotóxicos para recuperar los tejidos perdidos en la punta de la raíz primaria después de ser escindida (Heyman *et al.*, 2013; Heyman *et al.*, 2016).

Además de las proteínas ya mencionadas, en forma paralela se requiere al complejo MEDIADOR (MED), compuesto por más de 30 subunidades necesarias en la transcripción. Las mutantes de *Arabidopsis* afectadas en la subunidad MED18 presentan un programa de muerte celular en el meristemo de la raíz primaria (Raya-González *et al.*, 2018 ), por lo que es de nuestro interés investigar los mecanismos

que regulan este daño, así como los efectos del cromato [Cr(VI)], un agente genotóxico, sobre el crecimiento de la raíz primaria.

## **2. Antecedentes**

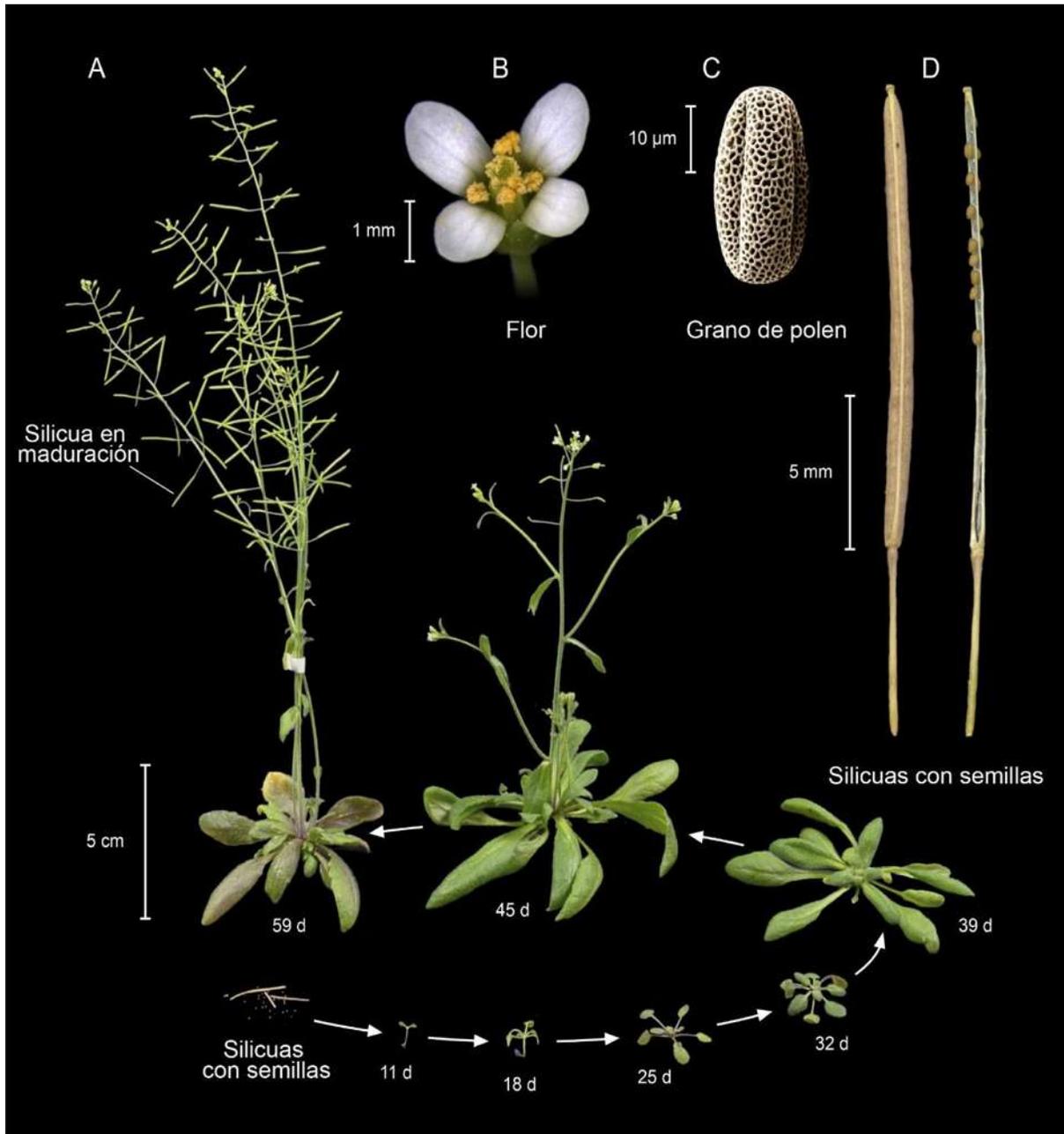
### **2.1. Características de *Arabidopsis thaliana***

*Arabidopsis thaliana* es una dicotiledónea de la familia *Brassicaceae* con distribución cosmopolita (Meyerowitz, 1987; Krämer, 2015). La planta adulta tiene una altura aproximada de 40 centímetros, consiste de una roseta con un tallo floral principal. Su fruto es una silicua, y cada una de ellas puede formar de 30 a 60 semillas (Fig. 1), viables hasta por dos años (Meyerowitz, 1987). Debido a que *Arabidopsis* presenta un ciclo de vida corto, a la gran cantidad de semillas que se obtienen de un individuo y a la estructura sencilla de su raíz, se utiliza como organismo modelo en investigaciones en biología del desarrollo, aspecto central en este trabajo .

Los estudios sobre *Arabidopsis* comenzaron a mediados del siglo XX, y en el año 2000 se reportó la secuencia completa de su genoma, que consta de 114.5 Mb/125 Mb (mega pares de bases) distribuidos en cinco cromosomas. Actualmente, existe un gran número de líneas mutantes y recursos genómicos que facilitan los estudios celulares y moleculares con *Arabidopsis*.

### **2.2. Importancia del sistema radicular**

El sistema radicular ancla las plantas al suelo, posibilita la obtención de agua y nutrientes, además sintetiza fitohormonas como las auxinas, citocininas, etileno, ácido abscísico y giberelinas (Mauseth, 2003; Eshel y Beeckman, 2013). Las raíces también sintetizan compuestos que se exudan hacia la rizósfera, por ejemplo, ácidos orgánicos y flavonoides (Walker *et al.*, 2003). Dicho sistema se conforma por una raíz primaria de la cual emergen raíces laterales y pelos radiculares. Además, puede haber formación de raíces adventicias a partir de otros órganos de la planta, como los tallos.



**Figura 1. Crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis*.** *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 en diferentes etapas de su ciclo de vida: **A)** Crecimiento a partir de una semilla. Se muestra el estado vegetativo hasta los 39 días y reproductivo a partir de los 45 días. En el día 59 se aprecia la formación de silicuas maduras. **B)** Flor. **C)** Un grano de polen y **D)** Silicuas maduras, de lado izquierdo se presenta una vaina cerrada, del derecho, una vaina abierta con semillas. Modificado de Krämer *et al.*, (2015).

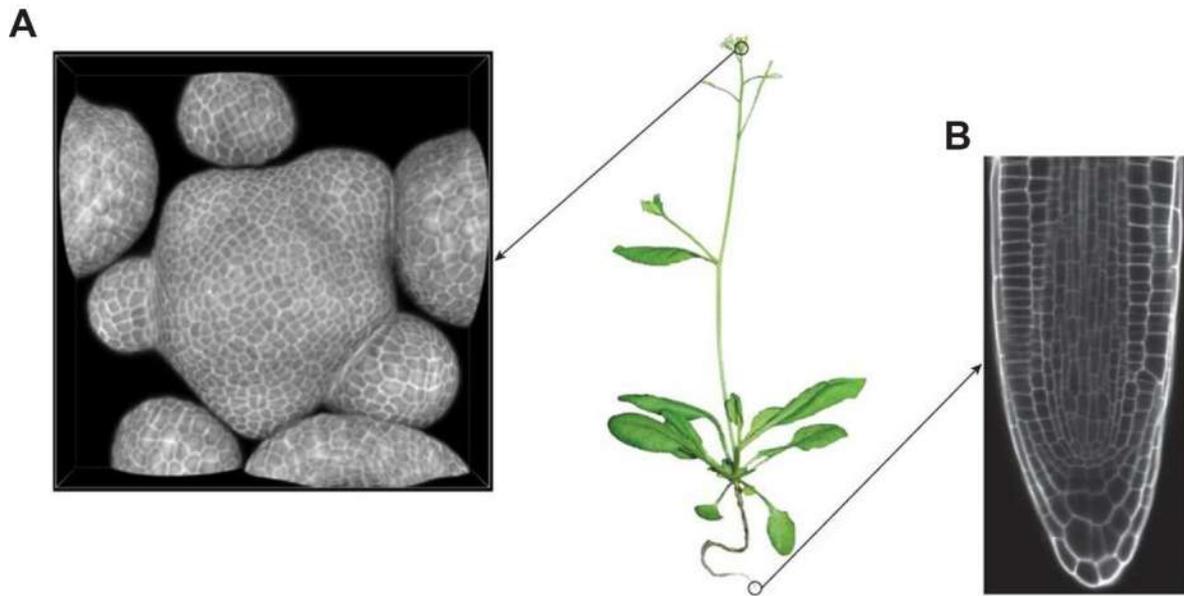
Existe una gran diversidad de raíces, por ejemplo, las de anclaje comunes en plantas epífitas. Las raíces de tipo neumatóforos que ayudan a la respiración en hábitats inundados presentan un geotropismo negativo, estas raíces las encontramos en plantas conocidas como manglares. Las raíces haustoriales presentes en plantas parásitas, penetran el tejido del hospedero con la finalidad de obtener nutrientes. Existen también las raíces tuberosas, las cuales sirven de reserva, primordialmente de carbohidratos como el almidón (López-Bucio *et al.*, 2005).

En cuanto a su origen, las raíces se dividen en dos tipos principales, fibrosas y pivotantes. La primera, típica de monocotiledóneas, es aquella en la que no se distingue la raíz primaria, presenta una gran ramificación debido a la producción de raíces laterales y adventicias. Mientras que en la raíz pivotante, a diferencia de la anterior, es larga y mantiene la dominancia apical, con ramificaciones de menor tamaño, por lo que alcanza mayor profundidad en los suelos, por ejemplo, las raíces de algunas especies de mezquites llegan a alcanzar los 100 metros de longitud (Russell *et al.*, 2013).

### **2.2.1. Crecimiento y desarrollo del sistema radicular**

Para que la germinación de la semilla ocurra tiene que finalizar el periodo de dormancia, cuando esto sucede, emerge la radícula que conformará la raíz primaria. Posteriormente, el hipocotilo crece, hay apertura de los cotiledones y se activan los meristemas. El crecimiento y desarrollo en plantas ocurre por dos meristemas principales, el apical caulinar que origina a los brotes y el apical radicular a la raíz primaria (Fig. 2), de la que emergen las raíces laterales (Bentsink y Koornneef, 2008).

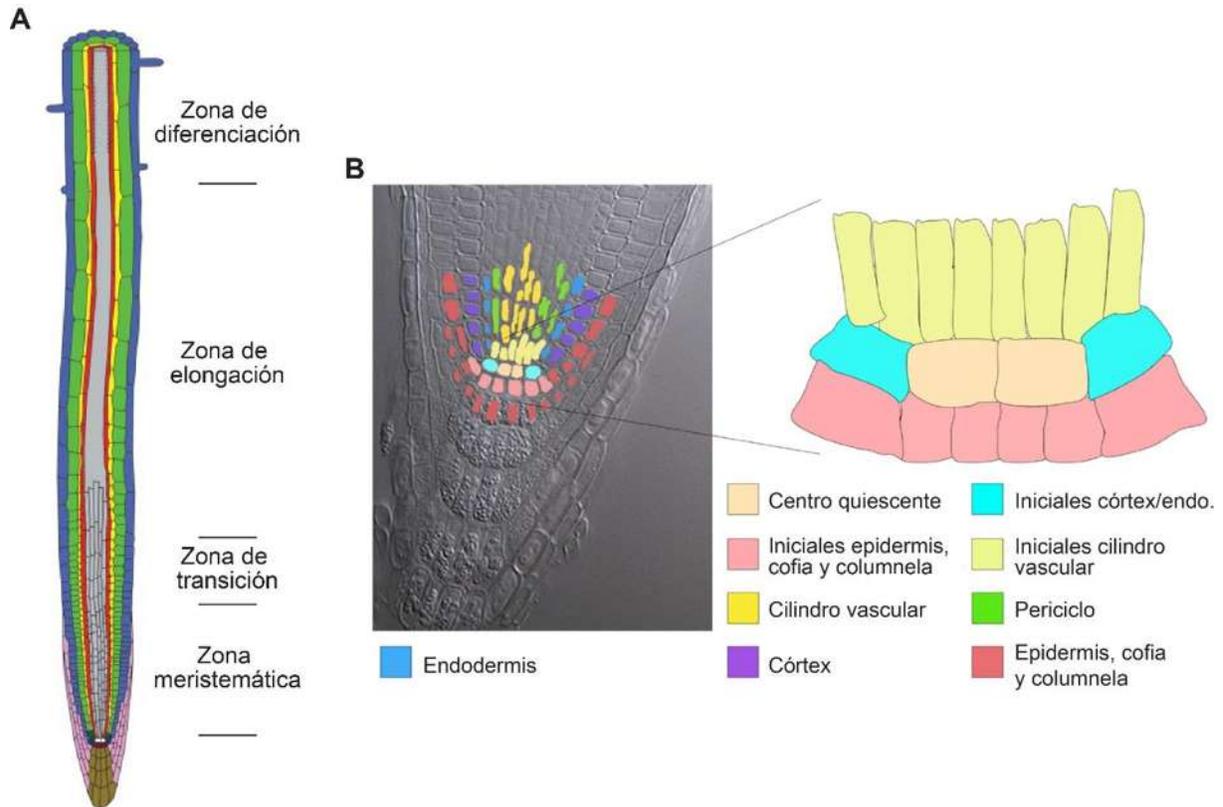
La arquitectura del sistema radicular se refiere a su “*configuración espacial*” (Lynch, 1995), la cual es modificada por un programa de desarrollo controlado genéticamente y presenta cierta plasticidad en respuesta a diversos tipos de estrés por medio de procesos como la división celular en meristemas, el crecimiento y la diferenciación (Dolan *et al.*, 1993; Lynch, 1995; Sánchez-Calderón *et al.*, 2013; Rogers y Benfey, 2015).



**Figura 2. Meristemo apical caulinar y radicular de *Arabidopsis*.** En el panel **A)** observamos el meristemo apical caulinar con sus yemas axilares que posibilitan la formación de hojas, ramas y flores y en el panel **B)** se aprecia el meristemo radicular, sitio principal de división celular para el crecimiento de la raíz. Modificado de Gaillochet y Lohmann (2015).

### **2.3. Anatomía del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana***

*A. thaliana* tiene un sistema radical pivotante, con la raíz primaria como eje principal de crecimiento, raíces laterales de distintos órdenes, pelos radiculares y puede presentar raíces adventicias. La raíz primaria se divide en tres zonas principales: la meristemática (ZM), la de elongación (ZE) y la de diferenciación (ZD) (Fig. 3A) (Dolan *et al.*, 1993). Algunos autores reconocen una zona más entre el meristemo y la zona de elongación, a la que llaman basal o de transición (Dastidar *et al.*, 2012; Ivanov y Dubrovsky, 2013). En la ZM se localizan las células del QC que guían el crecimiento y el desarrollo del sistema radical (Fig. 3B), además de producir células nuevas, las cuales al entrar a la ZE crecerán para después pasar a la ZD, en la cual ocurre la formación de raíces laterales y pelos radiculares (Fig. 3A) (Scheres *et al.*, 1994).



**Figura 3. Zonas de la raíz y estructura del nicho de células iniciales en la raíz primaria de *Arabidopsis*.** A) Zonas de la raíz primaria de *Arabidopsis*. B) La imagen izquierda representa la punta de la raíz primaria de *Arabidopsis*, marcando el nicho de células iniciales (NCI) y las células hijas más cercanas. A la derecha se presenta un acercamiento del NCI en donde se muestra en diferente color cada tejido. Modificado de Ubeda-Tomás *et al.*, (2012) y Azpeitia *et al.*, (2013).

### 2.3.1. Zona meristemática

En la parte más distal del ápice de la raíz primaria encontramos la ZM. Debido a la alta actividad mitótica de ésta zona, se producen las células nuevas que conforman la raíz (Ivanov y Dubrovsky, 2013). En la ZM se encuentra el nicho de células iniciales (NCI) formado por el QC, un centro organizador que mantiene el estado indiferenciado de las células iniciales que lo rodean (Fig. 3B) (Van den Berg *et al.*, 1997).

El QC en *Arabidopsis* está formado por cuatro células con una baja actividad mitótica, que se encuentran en contacto directo con cada una de las células iniciales

de la raíz. Al dividirse una célula inicial, el QC mantiene a la célula proximal como inicial y a la distal como célula hija, la cual se dividirá varias veces hasta su diferenciación, dando lugar a cada linaje de los tejidos (Fig. 3) (Dolan *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 1994; Van den Berg *et al.*, 1995; Van den Berg *et al.*, 1997; Nawy *et al.*, 2005). El QC es de suma importancia, ya que funge como el centro de señalización del NCI, que a su vez reprime la diferenciación de las células proliferativas que lo rodean. Además, se sabe que si una célula inicial se pierde, alguna del QC se dividirá para reemplazarla (Kidner *et al.*, 2000; Cruz-Ramírez *et al.*, 2013).

### **2.3.1.1. División en el meristemo radicular**

Una de las principales funciones de la zona meristemática es la generación de células mediante el proceso de la mitosis a través del ciclo celular. Éste se divide en cuatro fases: G1 (G de gap en inglés), S [síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN)], G2 (G de gap en inglés) y M (mitosis). A las fases G1, S y G2 se les llama interfase. Existen dos puntos de control importantes en el ciclo celular, uno en la transición de G1 a S y otro de G2 a M (Gutierrez, 2009). Estos puntos de control se regulan por los complejos formados por las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK por sus siglas en inglés) y las ciclinas, mismas que permiten la continuación o el arresto del ciclo celular. En el primer control participan las CDK tipo A (CDKA), y en el segundo las tipo A y B (CDKB). La actividad de las CDKA depende de su unión con las ciclinas A y D y las CDKB con las ciclinas A y B (Mironov *et al.*, 1999). Las concentraciones de las ciclinas varían según la fase del ciclo en la que presentan una actividad reguladora, así que su aparición y desaparición depende de la expresión del gen que las codifica y de la degradación de la proteína, respectivamente. Una alta concentración de las ciclinas correspondientes a cada punto de control, permite a la célula transitar de G1 a S y de G2 a M (De Veylder *et al.*, 2007; Gutierrez, 2009).

### 2.3.1.2. Mantenimiento del meristemo radicular

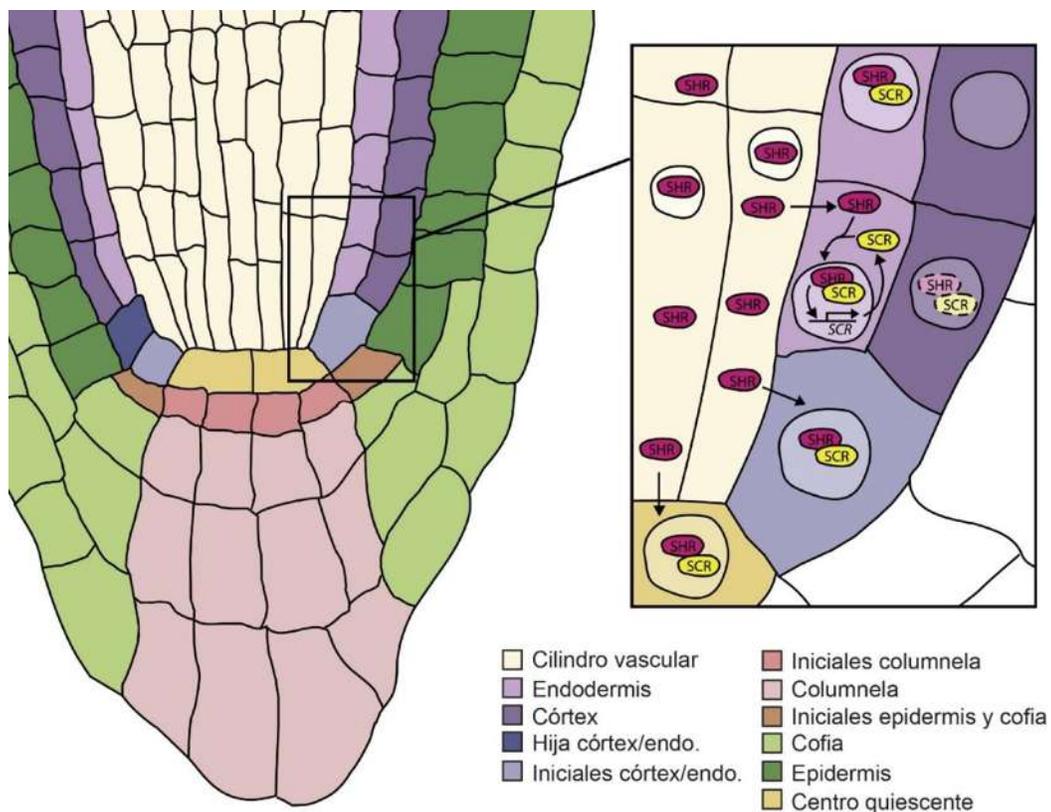
La pérdida del QC conduce a la formación de un nuevo centro organizador, lo que indica que la posición dentro del NCI está determinada por su ubicación en vez de depender del linaje celular (Van den Berg *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2006; Sena *et al.*, 2009). Desde el estado embrionario, las auxinas actúan como reguladores importantes para la formación del QC. En el meristemo de la raíz el máximo de las auxinas está ligado con el posicionamiento del QC, debido al transporte de éstas célula a célula desde la parte aérea y a la producción local en el ápice (Blilou *et al.*, 2005; Grieneisen *et al.*, 2007).

En el QC se expresa el factor transcripcional *WOX5* (*WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN5*), que regula negativamente a la *CYCD3;3* lo que evita la división de estas células y de este modo promueve su estado indiferenciado. *WOX5* además migra a las células iniciales de la columnela y evita así su diferenciación (Forzani *et al.*, 2014). La pérdida de función de este factor afecta al QC y resulta en la diferenciación de las células iniciales de la columnela. Debido a que en la mutante *wox5* no se pierde totalmente el meristemo y la raíz sigue creciendo, se sugiere que la expresión de algún otro gen redundante mantiene la identidad de las células iniciales. Dicho gen podría ser *WOX7*, su homólogo más cercano (Nardmann y Werr, 2007; Sarkar *et al.*, 2007; Gallagher, 2013).

Los factores transcripcionales *SHR* (*SHORT-ROOT*) y *SCR* (*SCARECROW*), pertenecientes a la familia *GRAS* (*GIBBERELLIN-INSENSITIVE, REPRESSOR of ga1-3, SCARECROW*), participan en el mantenimiento del meristemo. *SHR* se expresa en el cilindro vascular, desde donde se moviliza al QC y a las células iniciales del córtex y endodermis donde interacciona con *SCR* (Fig. 4). El complejo *SHR-SCR* promueve la expresión de *WOX5* en el QC y de la ciclina D6 (*CYCD6*) en las células hijas de las iniciales del córtex y endodermis y promueve también las divisiones asimétricas, para así formar estos tejidos (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Helariutta *et al.*, 2000). *SHR* es requerido por sí solo para la especificación de la endodermis (Nakajima *et al.*, 2001).

Dentro de la familia de los factores transcripcionales con dominio AP2 se encuentran *PLT1* (*PLETHORA 1*) y *PLT2* (*PLETHORA 2*), los cuales, además de ser esenciales

en el mantenimiento del nicho de células iniciales, regulan la división celular y su expresión está relacionada con el máximo de auxinas establecido en el meristemo de la raíz (Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007). Las proteínas PLT se relacionan con las auxinas al regular la división celular en el meristemo de la raíz y modulan la polarización de los transportadores PIN. A su vez, estos transportadores regulan la expresión de los genes *PLT* (Aida *et al.*, 2004; Blilou *et al.*, 2005; Takatsuka y Umeda, 2014).



**Figura 4. Movimiento de SHR e interacción con SCR en la raíz primaria de *Arabidopsis*.** La proteína SHR se moviliza de las células del cilindro vascular al QC y a las células iniciales del córtex y la endodermis, donde interacciona con SCR, lo cual permite la división periclinal de las células iniciales. En las células hijas del córtex, el complejo SHR-SCR promueve la expresión de SCR. Se muestra en diferente color cada tejido celular. Modificado de Abrash y Bergmann (2009).

### **2.3.2. Zona de elongación**

Más allá del meristemo, con dirección a la base de la raíz primaria se localiza la ZE, la cual es de fácil distinción ya que las células que pasan a ésta zona crecen polarmente aumentando su longitud hasta 20 veces su tamaño inicial (Ivanov y Dubrovsky, 2013). Cuando la punta de la raíz se encuentra frente a una barrera mecánica, la ZE es la primera en presentar modificaciones para solucionar el problema. Debido a esto, los núcleos de las células en la ZE son impulsados hacia las paredes por el crecimiento de la vacuola central (Verbelen *et al.*, 2006).

### **2.3.3. Zona de diferenciación**

Por último, más próxima a la parte basal de la raíz, está la zona de diferenciación, en la cual las células adquieren su forma y función final. El inicio de esta zona se puede identificar y diferenciar de la zona anterior a simple vista, ya que es donde encontramos las raíces laterales y pelos radiculares (Dolan *et al.*, 1993).

#### **2.3.3.1. Formación de raíces laterales**

Las raíces laterales derivan de células del periciclo, las cuales entran en división en la ZD cuando se va a formar una nueva raíz (Dolan *et al.*, 1993; Dubrovsky *et al.*, 2000). Se llama pre-iniciación al definirse el destino celular de las células fundadoras. El inicio de la división de las células fundadoras del periciclo depende del flujo de auxinas, proveniente del ápice de la raíz y de los brotes. El primer cambio que se puede observar es la migración de sus núcleos hacia la pared celular que las separa, seguido de las primeras divisiones anticlinales (Laskowski y Ten Tusscher, 2017; Moller *et al.*, 2017). Divisiones anticlinales y periclinales adicionales forman el domo de lo que será el primordio de la raíz lateral, el cual eventualmente emergerá y formará una raíz lateral, a la que se le considerará como tal cuando presente actividad mitótica en su meristemo (Peret *et al.*, 2009). La anatomía de las raíces laterales es similar a la de la raíz primaria, pero con una mayor variabilidad en el número de filas de cada línea celular (Dolan *et al.*, 1993).

### **2.3.3.2. Pelos radiculares**

Los pelos radiculares ayudan a la planta al anclaje y a la adquisición de nutrientes, por lo que cumplen una importante función adaptativa. Estas estructuras provienen de células epidérmicas llamadas tricoblastos, localizadas en posición *H* (del Inglés *hair cell*) sobre dos células corticales adyacentes. Las células que no forman pelos son los atricoblastos, que se encuentran en posición *N* (del Inglés *non hair cell*), sobre la pared celular de una sola célula del córtex (Dolan *et al.*, 1993; Galway *et al.*, 1994). Dicha posición y diferenciación celular de pelos radiculares se puede encontrar en monocotiledóneas y sólo en algunas familias del orden *Capparales*, como la familia *Brassicaceae*, a la que pertenece *Arabidopsis* (Cormack, 1947; Dolan y Costa, 2001). En *Arabidopsis* los pelos radiculares tienen un crecimiento rápido, de alrededor de 1  $\mu\text{m}$  por minuto y pueden llegar a medir 1 mm o más (Grierson y Schiefelbein, 2002).

## **2.4. Participación de las auxinas en los principales procesos de crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis***

Las plantas, por su estilo de vida sésil, requieren una continua renovación de células junto con un balance entre proliferación, crecimiento y diferenciación. Estos procesos son regulados por fitohormonas que en algunos casos actúan directamente sobre genes implicados en el ciclo celular (Michniewicz *et al.*, 2007; Gutierrez, 2009). La primera fitohormona descubierta hace ya casi un siglo fue una auxina (Thimann y Koepfli, 1935).

Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales relacionadas con el crecimiento y desarrollo mediante la regulación de la expresión génica. Están implicadas de manera directa o indirecta en la división celular, en la organización de meristemas, en la formación del QC en el embrión (Hardtke y Berleth, 1998; Hamann *et al.*, 2002), en el fototropismo, en la interacción con otras vías de señalización hormonal e incluso en la interacción con organismos patógenos y benéficos (Thimann y Koepfli, 1935; Mockaitis y Estelle, 2008; Vert y Chory, 2011; Boivin *et al.*, 2016; Weijers *et al.*, 2018).

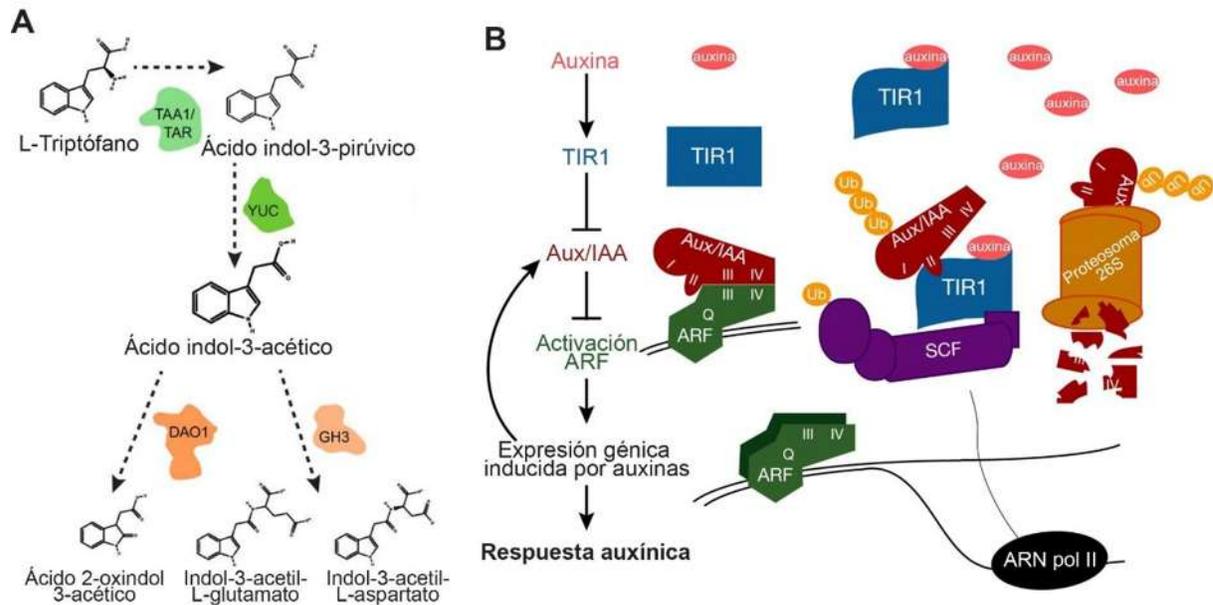
Las auxinas participan en la mayoría de los procesos del desarrollo y esto conlleva a una estricta regulación de su síntesis, conjugación y degradación. Existen dos vías principales en la biosíntesis de estas fitohormonas, una que depende del triptófano y otra independiente a éste, en la que se obtiene ácido-indol-3-acético (AIA) a partir del ácido indol-3-pirúvico. Sin embargo, el principal precursor del AIA es el triptófano. Este aminoácido es modificado por las enzimas TAA1/TAR (TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1/TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED) y YUC (YUCCA) para obtener como resultado el AIA, la auxina más abundante en las plantas (Fig. 5A) (Woodward y Bartel, 2005; Mashiguchi *et al.*, 2011). Existen otras auxinas como el ácido indol-3-butírico y el ácido 4-cloroindol-3-acético, además del ácido fenilacético que no presenta el anillo indol en su estructura química. Los niveles de auxinas en las células son regulados al cambiar el AIA a ácido 2-oxindol 3-acético o conjugarlo con los aminoácidos glutamato o aspartato (Fig. 5A) (Vernoux y Robert, 2017).

Las auxinas son producidas por órganos jóvenes como el meristemo apical, hojas emergentes y semillas en desarrollo, sin embargo, también se sintetizan en las raíces, específicamente en la zona meristemática y en los primordios de las raíces laterales (Ljung *et al.*, 2001; Ljung *et al.*, 2005; Michniewicz *et al.*, 2007).

Las plantas responden tempranamente a cambios en los niveles de las auxinas. Orquestando esta respuesta se han descrito cuatro familias de genes: *Aux/IAA* (*Auxin/INDOLE-3-ACETIC ACID*), *ARF* (*AUXIN RESPONSE FACTOR*), *SAUR* (*small auxin upregulated RNAs*), y la familia *GH3* (*auxin-responsive Gretchen Hagen3*). Se han reportado 29 proteínas represoras *Aux/IAA* en *Arabidopsis thaliana* (Overvoorde *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2018), aunque los genes codificantes fueron identificados por primera vez en la soya (*Glycine max*) y en el chícharo (*Pisum sativum*) (Walker y Key, 1982; Theologis *et al.*, 1985).

Las proteínas *Aux/IAA* son moléculas de vida corta, en los genes de esta familia se conservan las secuencias que codifican para cuatro dominios (dominio I, II, III y IV) con regiones intermedias variables. El dominio I le confiere la actividad represiva a la proteína, mientras que el II la inestabilidad (Tiwari *et al.*, 2004). Los dominios III y IV permiten la dimerización con otras proteínas *Aux/IAA* y *ARF* (Ulmasov *et al.*, 1997;

Ouellet *et al.*, 2001). Cuando se presentan niveles bajos o ausencia de auxinas, las proteínas Aux/IAA se unen a las ARF, inhibiendo así la transcripción de los genes blanco de estos factores de transcripción (Fig. 5B) (Abel y Theologis, 1996; Yang *et al.*, 2004).



**Figura 5. Metabolismo y señalización de las auxinas en *Arabidopsis*.** **A)** Vía del metabolismo de las auxinas, en donde se obtiene ácido indol-3-acético (AIA) a partir del triptófano, con la participación de las enzimas TAA1/TAR y YUC. **B)** En concentraciones bajas de auxinas, los Aux/IAA se encuentran unidos a los ARF, inhibiendo su actividad. Cuando las auxinas se encuentran en niveles altos se unen al receptor TIR1, éste último interacciona con los Aux/IAA y el complejo SCF marca por medio de ubiquitinación a los Aux/IAA para su degradación por el proteosoma 26S. Esto resulta en la liberación de los factores transcripcionales ARF y el inicio de la transcripción de genes de respuesta a las auxinas. Modificado de Vernoux y Robert (2017) y Woodward y Bartel (2005).

En el caso contrario, cuando se tienen niveles altos de auxinas, las proteínas Aux/IAA interactúan con los receptores TIR/AFB (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN) que forman parte del complejo SCF, el cual es conformado también por las proteínas ASK1, CUL1, y RBX1. Este complejo ubiquitina a los represores Aux/IAA que posteriormente son degradados

por el proteosoma 26S. De esta manera quedan libres las proteínas ARF, lo que permite que se unan a los promotores de los genes de respuesta a auxinas para que se lleve a cabo su transcripción (Fig. 5B) (Weijers *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2007; Parry *et al.*, 2009).

Las auxinas inducen la expresión de varios genes de la familia *Aux/IAA* (Abel *et al.*, 1995; Overvoorde *et al.*, 2005), lo que sugiere la importancia de estas proteínas como reguladores de la transcripción. Se han descrito varias mutantes de ganancia de función de diferentes miembros de esta familia, entre ellos la mutación en el gen *SOLITARY-ROOT/IAA14*, la cual no presenta formación de raíces laterales debido a un bloqueo de la división celular en las células del periciclo. Además, la mutación altera la formación de pelos radiculares y la respuesta al gravitropismo en la raíz y en el hipocotilo. Interesantemente, este fenotipo no puede ser revertido con la aplicación de auxinas exógenas, lo que sugiere una regulación específica en la señalización de las auxinas (Fukaki *et al.*, 2002).

A partir de los sitios donde se sintetizan las auxinas, estas son transportadas a tejidos distantes a través de dos tipos de transporte: un transporte rápido (no polar), que ocurre a través del floema y un transporte polar, de célula a célula (Davies, 2010). El transporte polar se divide a su vez en dos: a larga distancia, donde recorre toda la planta y, a corta distancia, donde se desplaza a tejidos específicos. Este último está estrictamente controlado, es específico, requiere energía y es sensible a inhibidores como el ácido N-1-naftilftalámico (NPA) y el ácido 2,3,5-triyodobenzoico (TIBA) (Michniewicz *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2010).

El transporte polar de auxinas se lleva a cabo gracias a transportadores localizados en la membrana plasmática, aunado a diferencias del pH que afectan el estado iónico del AIA. En el apoplasto, el AIA se encuentra protonado debido a que el pH es aproximadamente de 5.5 y en forma aniónica en el simplasto a un pH de 7.0. La membrana plasmática es permeable al AIA protonado sin carga e impermeable a la forma aniónica, este cambio de pH permite que el AIA quede dentro del citosol. Los transportadores encargados de la entrada del AIA a las células incluyen a AUX/LAX (AUXIN1/LIKE-AUX1) y las proteínas que llevan a cabo la salida de las auxinas son los transportadores PIN. Se han identificado ocho genes pertenecientes a este

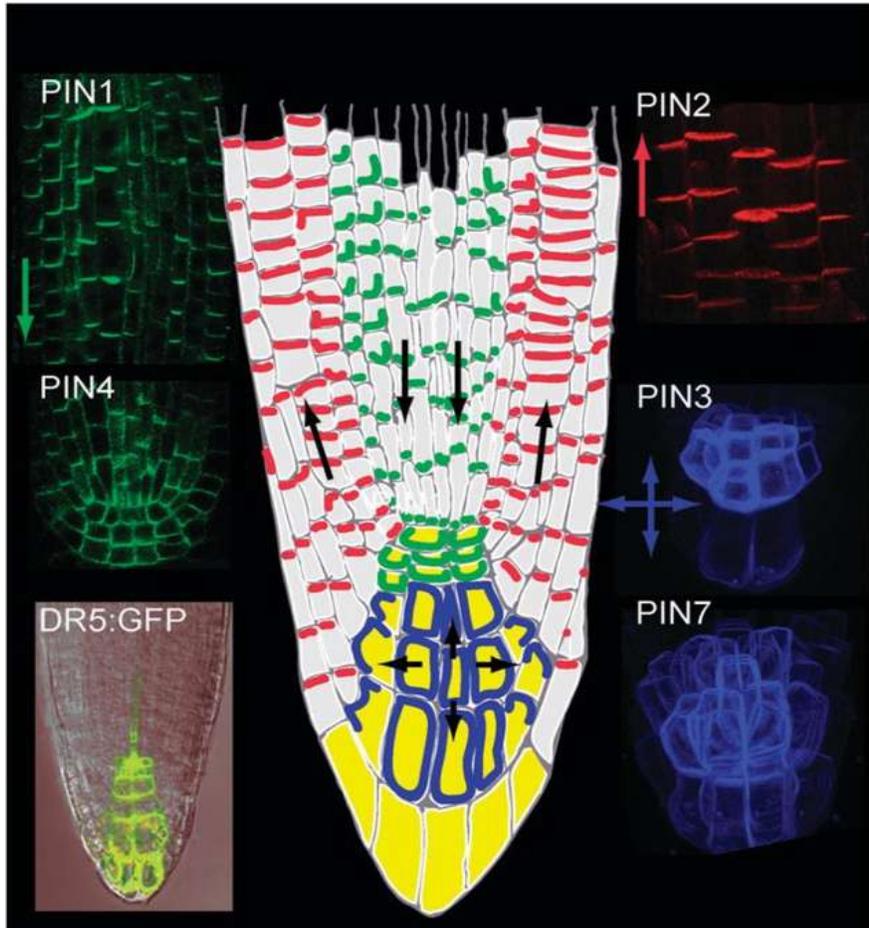
último tipo de transportadores en *Arabidopsis* y las proteínas codificadas se encuentran distribuidas asimétricamente en la membrana (Fig. 6). Existe un tercer tipo de transportadores de auxinas, que pertenecen a la subclase B de las proteínas ABC, las cuales participan en la salida de las auxinas a través de la membrana plasmática y en el tonoplasto y a diferencia de los transportadores PIN, los ABC no presentan una distribución asimétrica (Russell *et al.*, 2013).

#### **2.4.1. Regulación de las auxinas en la división celular en el meristemo de la raíz**

Se ha reportado la participación de las auxinas en la iniciación y posicionamiento de órganos como hojas, flores y raíces laterales (Reinhardt *et al.*, 2000; Benková *et al.*, 2003). Las auxinas están presentes desde la embriogénesis y mediante una línea reportera de respuesta a auxinas se ha observado una ubicación específica diferencial en cada estado embrionario. En este mismo estudio se determinó cómo las células del embrión adoptaban su polaridad para establecer un eje basal-apical y este proceso depende de un gradiente hormonal. Lo anterior resulta en la formación de dos meristemos, uno que dará origen a la parte aérea (SAM; por sus siglas en inglés) y otro a la raíz primaria de la planta (RAM; por sus siglas en inglés) (Friml *et al.*, 2003). La localización polarizada de las proteínas PIN en la raíz de *Arabidopsis* determina, en parte, la formación del gradiente auxínico. Esta localización puede variar en respuesta al desarrollo de la planta y por cambios en el ambiente (Wabnik *et al.*, 2011). El gradiente auxínico, a su vez, es necesario para el mantenimiento de la identidad celular en las células donde se encuentra y en células adyacentes, además, se requiere para la división y expansión celular (Sabatini *et al.*, 1999; Blilou *et al.*, 2005; Grieneisen *et al.*, 2007).

Las proteínas PIN determinan la velocidad y la dirección del transporte de las auxinas en la raíz y son tejido-específicas (Petrášek *et al.*, 2006; Wiśniewska *et al.*, 2006). PIN1 se localiza en la parte inferior de las membranas de las células de la vasculatura, lo que permite un transporte acropétalo; PIN2 en la parte superior de las células marcando un transporte basipétalo en células de la epidermis. A PIN3 y PIN7 las encontramos en las células de la columnela y a diferencia de PIN1 y PIN2, su

distribución no es polarizada. PIN4 al igual que PIN1 dirige un transporte acropétalo (Fig. 6) (Wabnik *et al.*, 2011).



**Figura 6. Ubicación de las diferentes proteínas PIN en el meristemo de la raíz de *Arabidopsis*.** PIN1 y PIN4 se representan en color verde, PIN2 en rojo y PIN3 y PIN7 en azul. Las flechas indican la dirección del flujo de las auxinas. La imagen en la esquina inferior izquierda muestra los niveles de las auxinas en la punta de la raíz primaria. Figura adaptada de Wabnik *et al.*, (2011).

En 1995 se propuso que la proteína ABP1 (*Auxin binding protein 1*) podría funcionar como receptor de auxinas (Hertel, 1995). Esto se descartó en investigaciones posteriores donde se demostró, gracias al estudio de distintas líneas de pérdida de

función, que *ABP1* no era necesario para la señalización auxínica ni para el desarrollo normal de *Arabidopsis* (Strader y Zhao, 2016). Debido a lo anterior, se ha sugerido que las proteínas PIN podrían funcionar como receptores de las auxinas, dado que su presencia está directamente relacionada con los gradientes y los eventos de señalización subsecuentes (Strader y Zhao, 2016).

En los primeros reportes en *Arabidopsis* de inducción de la división celular en el meristemo de la raíz por las auxinas, se aplicó auxina exógena y se observó un mayor índice de división celular. Está descrito que las auxinas promueven la expresión del gen *CDKA;1* que codifica para una ciclina (Hemerly *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 1994; Doerner *et al.*, 1996) y también que regulan la expresión de *CYCB1* y *CYCA2* (Roudier *et al.*, 2003; Hartig y Beck, 2006). Además, se descubrió que varios genes que codifican para estas ciclinas contienen elementos de respuesta a auxinas (AuxREs) (Hu *et al.*, 2003).

Las ciclinas y las CDK forman dímeros que participan en la regulación de la progresión del ciclo celular de la fase G1 a S y de G2 a M (Takatsuka y Umeda, 2014). Durante la transición de G1 a S, justo antes de la duplicación del ADN, encontramos a los factores transcripcionales E2F, de los cuales se han descrito ocho en el genoma de *Arabidopsis*. La proteína RBR (RETINOBLASTOMA-RELATED) se une a los factores E2F y así queda inhibida su actividad. Para liberar a E2F una CDK unida a una ciclina, tiene que fosforilar a RBR y de esta forma los factores transcripcionales E2F pueden llevar a cabo su función e inducir la expresión de los genes necesarios para la transición de G1 a S (Yao *et al.*, 2018). Específicamente, el factor E2FB presenta una mayor estabilidad en presencia de auxinas, lo que sugiere nuevamente una regulación directa sobre el ciclo celular (Xie *et al.*, 1996; Nakagami *et al.*, 1999).

Aparte de la regulación directa de las auxinas sobre el ciclo celular, también se han descrito cambios en factores de transcripción implicados en el mantenimiento del nicho de células iniciales de la raíz. Por ejemplo, una inhibición del transporte de auxinas por la aplicación del inhibidor NPA genera una expresión ectópica de *WOX5* (Ding y Friml, 2010).

La proteína RBR es el ortólogo de la proteína retinoblastoma en mamíferos (RB), la cual secuestra a los factores de transcripción E2F (Xie *et al.*, 1996). Por otra parte, RBR es necesaria para el mantenimiento de las células iniciales del meristemo de la raíz, ya que una reducción en su expresión conlleva a la formación de más células iniciales y una sobreexpresión resulta en la pérdida de éstas células (Wildwater *et al.*, 2005). Debido a que el complejo CDK/ciclina fosforila e inactiva a RBR, que a su vez está influenciado por las auxinas, esto podría ser un mecanismo para mantener la población de células iniciales y de este modo la viabilidad y mantenimiento del nicho de células iniciales (Takatsuka y Umeda, 2014).

## **2.5. Daño en plantas por estrés abiótico**

Las plantas han desarrollado diversos mecanismos para enfrentar diferentes tipos de estrés ambiental, ya que cuentan con un programa de desarrollo post-embrionario plástico que les permite modificar el fenotipo de la parte aérea y del sistema radicular de acuerdo a las condiciones del medio (Bartels y Sunkar, 2005; Hu *et al.*, 2014). Existen dos diferentes tipos principales de estrés, el biótico y abiótico. El primero se debe a interacción con otros organismos, que pueden ser parásitos o patógenos. El estrés abiótico ocurre cuando se perciben cambios ambientales, generando una respuesta adaptativa ante la sequía, el calor, la salinidad, la desnutrición, la presencia de metales, la luz ultravioleta, etc. (Russell *et al.*, 2013). La combinación de estos puede exacerbar el daño que cada uno de ellos ocasiona por separado.

La carencia de macronutrientes como el fósforo, el cual es adquirido por las raíces en su forma inorgánica ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), es un ejemplo de estrés abiótico (Bloom *et al.*, 1985; Holford, 1997; Williamson *et al.*, 2001; López-Bucio *et al.*, 2002). No sólo la falta de nutrientes representa un problema para las plantas, algunos metales como el cobre (Cu), zinc (Zn) y níquel (Ni), los cuales son micronutrientes esenciales, en concentraciones elevadas son tóxicos (Kovalchuk *et al.*, 2001; Munzuroglu y Geckil, 2002). Otros metales no esenciales también causan estrés y su toxicidad varía dependiendo de la concentración y del estado de oxidación (Gichner *et al.*, 2006).

El daño al ADN por estrés abiótico puede deberse indirectamente al incremento de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). Se ha observado que después de un estrés

biótico o abiótico se presenta una inducción rápida y transitoria de ERO, causando la oxidación de macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos. Dicho estrés puede mantenerse por una exposición prolongada, lo que es perjudicial para las células y en general para el organismo (Richards *et al.*, 1998; Keunen *et al.*, 2011).

## **2.6. Antecedentes sobre la regeneración de los organismos**

Los organismos multicelulares están expuestos constantemente a daño mecánico o al ataque de depredadores que generan pérdidas de extremidades. Dichos órganos pueden ser regenerados parcial o completamente dependiendo del organismo, ya sea un animal o una planta. La regeneración es un proceso de restauración que ocurre de manera continua, ya que por este medio se reparan las células, tejidos y órganos cuya funcionalidad es necesaria durante las diferentes transiciones del desarrollo y permite completar el ciclo de vida de los organismos (Birnbaum y Sanchez-Alvarado, 2008).

Los primeros estudios de regeneración en animales se llevaron a cabo en metazoarios. Abraham Trembley (1740), investigó especímenes de *Hydra* (Lenhoff *et al.*, 1986; Bernat y Pasqual., 2013), Peter Simon Pallas estudió este proceso en planarias (Pallas *et al.*, 1766), dos años más tarde, Lazzaro Spallanzani publicó un artículo sobre la regeneración en larvas de anfibios y en salamandras (Spallanzani, 1769; Alvarado Sánchez, 2000). Actualmente se utilizan varias especies para investigar la regeneración en animales, como la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el pez cebra (*Danio rerio*), y la rana *Xenopus laevis*, además de pollos y ratones (Alvarado Sánchez, 2000).

Uno de los animales que ha recibido mayor atención por su alto nivel regenerativo es el ajolote (*Ambystoma mexicanum*), anfibio endémico de México. En un estudio reciente sobre su genoma, se determinó que genes relacionados con la formación de las extremidades en la embriogénesis, como los genes homeóticos *HoxA*, presentan más repeticiones y un mayor tamaño en comparación con sus genes ortólogos en humanos y ranas. Además, se observó una inducción positiva a nivel de transcripción de otros genes importantes en la regeneración como *Ly6* (Nowoshilow *et al.*, 2018). Los proteínas homeóticas (Hox) son un tipo de factores

transcripcionales de gran importancia en el desarrollo y en la determinación de la identidad celular y de órganos. Los genes que codifican para estas proteínas conservan una secuencia llamada “*homebox*”. Genes relacionados con los genes *Hox*, implicados con la identidad de los órganos, son llamados genes homeóticos, por ejemplo, los genes *WUS* y *WOX5* (Russell *et al.*, 2013).

La familia de genes a la que pertenece *Ly6* tiene una importante participación en diversas funciones descritas en humano y ratón, como: en la proliferación celular, en la migración, en interacciones célula – célula, en la maduración de células del sistema inmune, en la activación de macrófagos y en la producción de citocinas (Loughner *et al.*, 2016).

A través del tiempo la comparación de la regeneración entre animales y plantas no tardó en aparecer. La *Hydra* que estudió Trembley había sido previamente descrita como planta por Anton van Leeuwenhoek, hasta que Trembley observó que su comportamiento era más parecido al de un animal. Para su sorpresa, después de cortarla por la mitad, la *Hydra* podía regenerarse al igual que las plantas (Bernat y Pasqual., 2013), las cuales se caracterizan por su alto potencial organogénico. La regeneración no se restringe a los metazoarios y a las plantas, en el hongo *Trichoderma atroviride* se ha descrito la recuperación de los tejidos de hifas al ser dañadas por un corte (Hernández-Onate *et al.*, 2012).

Mediante el cultivo de tejidos a partir de células somáticas diferenciadas de plantas, se han podido generar organismos completos. Esto se logró bajo condiciones apropiadas, como un balance de nutrientes y de las hormonas vegetales auxinas y citocininas (Skoog y Miller, 1957; Cary *et al.*, 2002; Birnbaum y Sanchez-Alvarado, 2008; Rosspopoff *et al.*, 2017). Así comenzó el estudio de la regeneración en plantas.

### **2.6.1. Regeneración celular en plantas**

Las plantas están expuestas a diferentes tipos de estrés que deterioran sus tejidos. El ataque de microorganismos causantes de enfermedades como hongos y bacterias, la depredación por insectos o herbívoros y el daño causado por el viento, la lluvia y el granizo comprometen su sobrevivencia. De igual forma, se ven

afectadas por la exposición a sequía, salinidad, altas concentraciones de metales, entre otros tipos de estrés. Todo esto afecta al sistema radicular, el cual es esencial para el funcionamiento del organismo debido a su función en la captación de agua y nutrientes.

Los primeros estudios de regeneración de tejidos en plantas se realizaron con explantes a partir de los cuales se inducía la formación de una masa de células llamada "callo", que podía generar un organismo completo. En un principio, se creía que las células del callo generado tenían que pasar por un proceso de *desdiferenciación* para entrar en división celular y posteriormente diferenciarse en los futuros tejidos del organismo. Estudios más recientes han demostrado que esta organogénesis *de novo* ocurre a partir de células perivasculares que no sufren el proceso de desdiferenciación. En efecto, dicho proceso es más parecido al desarrollo de un primordio de raíz lateral. Esto se demostró al analizar los transcritos presentados en los callos, los cuales fueron similares a los que se presentan durante la iniciación de las raíces laterales. Esta organogénesis *de novo* es un posible reminiscente de los procesos que ocurren en el meristemo apical de la raíz (Rosspopoff *et al.*, 2017). También se ha descrito que un primordio de raíz lateral puede desarrollar una raíz o un meristemo apical de brote si se expone a concentraciones altas de auxinas o citocininas. Lo anterior ocurre en una ventana específica del desarrollo de los primordios de raíces laterales. Actualmente se investigan los estadios por los que pasan las células al regenerar tejidos. Se ha sugerido que dichos cambios en el desarrollo se llevan a cabo mediante un proceso de *transdiferenciación*, que implica un cambio de un tipo celular a otro sin pasar por el proceso de desdiferenciación (Sugimoto *et al.*, 2011; Rosspopoff *et al.*, 2017).

En animales se ha utilizado recientemente el término *metaplasia*, que se refiere al cambio de un tipo celular a otro y que incluye además de la *transdiferenciación*, la conversión de células madre o totipotentes a tejidos diferenciados. Éste término se aplicó a nivel celular, aunque en el cáncer en humanos se refiere a un excesivo crecimiento de una masa de células (Tosh y Slack, 2002).

### **2.6.2 Regeneración de la raíz de *Arabidopsis***

Las plantas manifiestan respuestas altamente flexibles que les permiten modificar el fenotipo del follaje y del sistema radicular de acuerdo a la condiciones del medio (Bartels y Sunkar, 2005; Hu *et al.*, 2014). Cuando hay pérdida de partes del organismo, hay recuperación parcial o total de éstas. Si se eliminan los meristemos aéreos o radicales, éstos se recuperan en pocos días. Cuando no se pueden restablecer estos meristemos, se generan órganos *de novo*, como brotes axilares y raíces laterales (Shimizu-Sato y Mori, 2001; Sena *et al.*, 2009). Por ejemplo, si se corta una raíz primaria en la zona de diferenciación, lo que se obtiene es la formación de una o varias raíces laterales cercanas al área del corte. Si se presentan heridas en los tallos, éstas pueden ser reparadas en caso de ser incisiones pequeñas (Aloni *et al.*, 2006; Bellini *et al.*, 2014; Ikeuchi *et al.*, 2016).

Además, en *Arabidopsis*, diferentes tipos de estrés ocasionan que las células iniciales del meristemo de la raíz mueran selectivamente, ante esto se ha descrito que si una célula inicial se pierde, alguna del QC se dividirá para reemplazarla (Kidner *et al.*, 2000; Fulcher y Sablowski, 2009; Heyman *et al.*, 2013). Previamente al proceso de división que ocurre para reemplazar a las células dañadas, existe una señalización que implica la inducción de la expresión de *WOX5*, *PLT3*, *PLT5* y *PLT7*, además de *SCR* y *SHR* (Heyman *et al.*, 2016).

### **2.6.3. La eliminación del meristemo activa un programa de regeneración celular**

Sena y col. (2009) describieron un programa novedoso de regeneración que ocurre en tiempos posteriores a la escisión de la punta de la raíz primaria de *A. thaliana*. Los autores reportaron la regeneración completa de la punta de la raíz a los 4 días post-corte (dpc) (Fig. 7). Un estudio más detallado mostró que a las 24 horas post-corte (hpc) algunos genes clave para el mantenimiento del nicho de células iniciales ya habían iniciado su expresión. Los genes expresados correspondían al factor transcripcional *WOX5* y a los transportadores *PIN*, además de observarse divisiones en todos los tejidos cercanos al área del corte y el reinicio de la formación del máximo de auxinas en la punta de la raíz (Sena *et al.*, 2009). Con esta información,

los investigadores demostraron que no se requiere el nicho de células iniciales para regenerar completamente la punta de la raíz. Lo que si se requiere son mecanismos de re-especificación celular, por ejemplo, el cambio de identidad de células cercanas al corte y la presencia de doble identidad celular (Sena *et al.*, 2009).

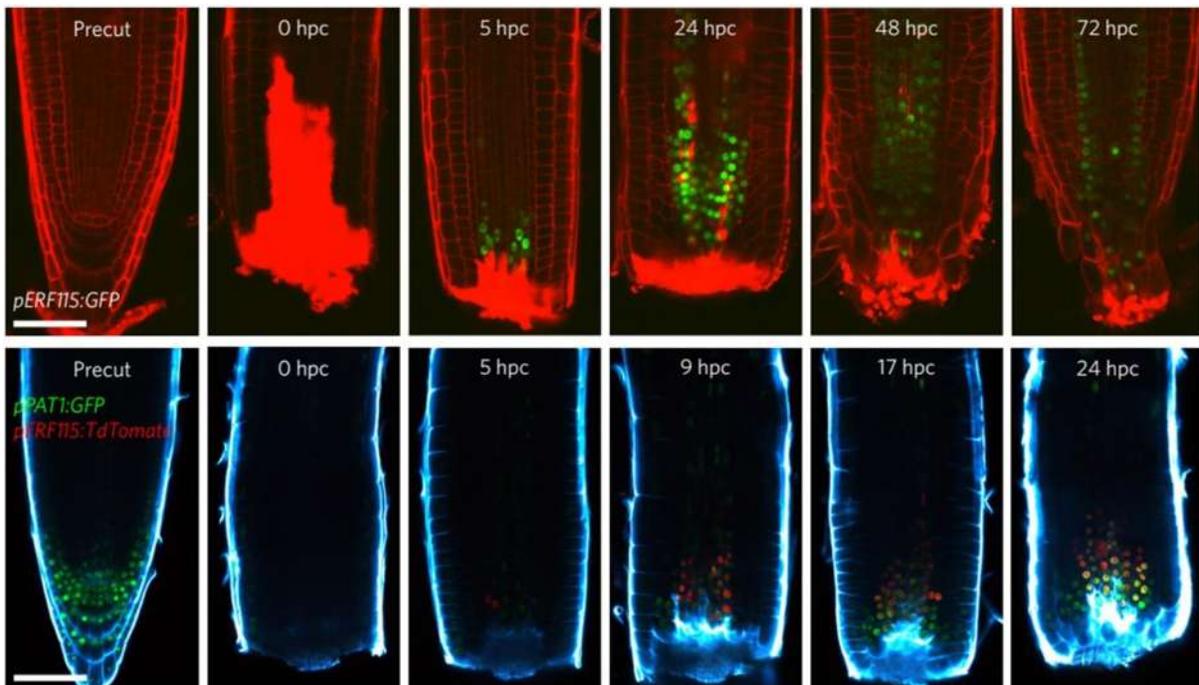
En estudios posteriores se evaluó con más detalle, mediante el uso de líneas marcadoras, el inicio de la expresión génica después del corte del meristemo de la raíz. Se describió que el re-establecimiento de las líneas celulares recapitula un desarrollo embrionario, al observarse de las 3 a las 16 hpc hay una sobre-regulación de genes y células con una identidad mixta. Se observó la existencia de células con identidad de QC y al mismo tiempo de columnela, algo similar a lo que ocurre en el meristemo basal y en la hipófisis del embrión (Efroni *et al.*, 2016).

Heyman y col. (2016) describieron la inducción de dos genes no reportados antes en el proceso de regeneración después del corte de la punta de la raíz. Estos genes fueron *ERF115* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR 115*) y *PAT1* (*PHYTOCHROME A SIGNAL TRANSDUCTION 1*), el primero pertenece a la familia de factores transcripcionales de respuesta a etileno (ERF), aunque la proteína para la que codifica no está específicamente relacionada con la percepción o señalización de dicha fitohormona (Heyman *et al.*, 2013). El segundo es *PAT1*, pertenece a la familia GRAS y fue identificado por estudios de interacciones moleculares. La participación de *PAT1* en la regeneración se confirmó mediante la fusión del promotor del gen con la secuencia codificante del gen reportero de la proteína verde fluorescente (y sus variantes) y su expresión co-localizó con la de *ERF115*, que antecede a la regeneración del tejido (Fig. 7). Por otra parte, las líneas mutantes *ERF115<sup>SRDX</sup>* y *pat1* carecen de la capacidad de regeneración anteriormente mencionada, lo que permitió concluir que el complejo ERF115-PAT1 es crucial para la recuperación del meristemo de la raíz en respuesta a un estrés ambiental (Heyman *et al.*, 2016).

## **2.7. Regulación de la vía auxínica posterior a la escisión de la punta de la raíz de *Arabidopsis***

En el estudio donde se corta la punta de la raíz de *Arabidopsis*, se evaluó la expresión de los transportadores PIN mediante líneas reporteras y se observó una

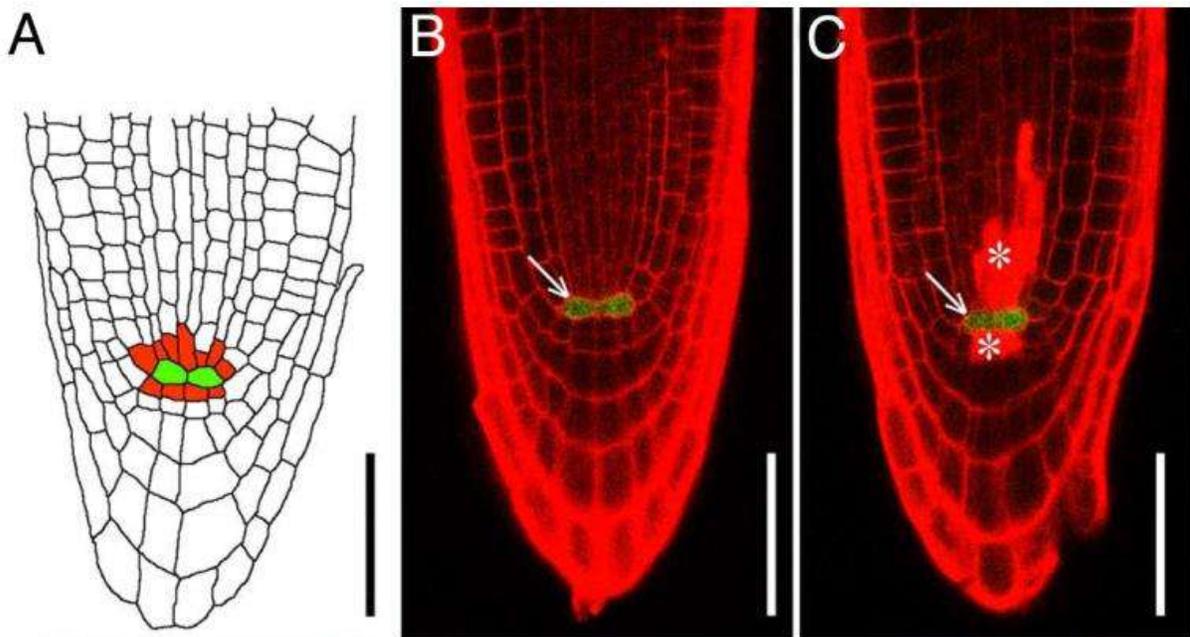
inducción clara de estos marcadores a las 24 hpc. Dicha inducción se relaciona directamente con el reinicio de la formación del máximo de auxinas en el tejido regenerado. Esto sugiere que es necesario el establecimiento del gradiente de auxinas para que ocurra correctamente el proceso de regeneración de la raíz. La participación de las auxinas se confirmó mediante la aplicación del inhibidor del transporte de auxinas NPA, con lo que se afectó la re-especificación celular que permite la recuperación de los tejidos (Sena *et al.*, 2009).



**Figura 7. Regeneración en *Arabidopsis* después de la escisión de la punta de la raíz.** El panel superior muestra a una raíz antes del corte, en el momento del corte y a diferentes horas post-corte (hpc), la regeneración está completa a las 72 hpc y se acompaña de una máxima expresión de *ERF115:GFP* mostrado en verde a las 24 hpc. En el panel inferior se muestra el corte y la recuperación a diferentes horas y la expresión de *ERF115:TdTomato* en rojo y de *PAT1:GFP* en verde. El color amarillo indica una co-localización de estas dos proteínas. Modificado de Heyman *et al.*, (2016).

## 2.8. Muerte selectiva de células iniciales por estrés genotóxico

Las células totipotentes en animales tienen una alta sensibilidad a agentes que dañan el ADN, usualmente causan muerte celular programada o apoptosis, esto se ha explicado como un proceso adaptativo que evita la acumulación de mutaciones (Rich *et al.*, 2000; Schumacher *et al.*, 2001). Al exponer a *Arabidopsis* a drogas como zeocina, bleomicina y a luz UV, se indujeron rupturas de la doble cadena del ADN, lo que causó una muerte específica de las células iniciales del meristemo de la raíz, así como de las células hijas cercanas (Fig. 8). La muerte celular también afectó el QC, dando lugar a una diferenciación prematura e inhibición del crecimiento (Fulcher y Sablowski, 2009).

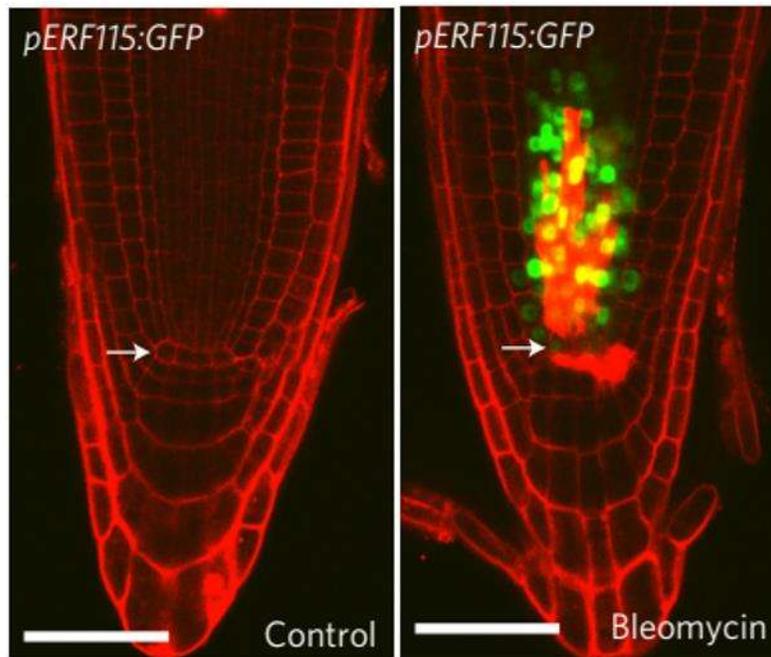


**Figura 8. Muerte selectiva de células iniciales y células hijas cercanas en el meristemo de la raíz.** En el panel **A)** observamos la estructura de la punta de la raíz de *Arabidopsis*. En rojo están marcadas las células iniciales y en verde las células del QC, que en las siguientes imágenes representan la expresión de *WOX5:GFP* marcado con una flecha. En el panel **B)** se presenta una raíz en condiciones controles, y en el **C)** una raíz expuesta a bleomicina, las células en rojo son las células muertas. Modificado de Fulcher y Sablowski (2009).

## 2.9. Participación de ERF115 en la regeneración de la raíz después del daño celular

Heyman y col. (2016) observaron que, después de la exposición a drogas que dañan la estructura del ADN, se induce la muerte de células iniciales del tejido vascular, además de la expresión del factor transcripcional ERF115 en las células vecinas al sitio de daño (Fig. 9).

En las plantas silvestres (ecotipo Col-0), se observó, tras la muerte celular inducida con bleomicina, una ampliación del dominio de expresión de WOX5 en etapas tempranas. Mientras que en la mutante *ERF115<sup>SRDX</sup>*, carente del factor ERF115, falla el restablecimiento del QC y muestra una continua inducción de muerte celular incluso después de retirar la droga del medio de cultivo (Heyman *et al.*, 2013; Heyman *et al.*, 2016).



**Figura 9. Inducción del factor transcripcional ERF115 en respuesta al daño en el ADN.** En la primera imagen se muestra la raíz de *Arabidopsis* en condiciones adecuadas de crecimiento, en la segunda la expresión de *ERF115:GFP* en verde y en rojo las células muertas debido a la exposición a bleomicina. La flecha marca el QC. Modificado de Heyman *et al.*, (2016).

## 2.10. Efecto del cromato en plantas

Entre los factores abióticos que generan estrés y daño en las plantas están los metales. El cromo (Cr) es un metal en transición, es el séptimo elemento más abundante en la corteza terrestre, podemos encontrarlo en aire, agua y suelos. Esta contaminación se debe a la actividad industrial y al consumo de productos que lo contienen: se utiliza en aleaciones, en el curtido de cuero, en colorantes y pinturas, etc. (Mohan y Pittman, 2006; Gomes *et al.*, 2017). El Cr existe comúnmente como oxianión trivalente [Cr(III)] o hexavalente [Cr(VI)], ya que las demás formas de oxidación intermedias son inestables (Kotaš y Stasicka, 2000; Zayed y Terry, 2003). El Cr(VI) es más tóxico para los seres vivos debido a que presenta mayor solubilidad que el Cr(III), y se asocia con el oxígeno formando oxianiones de cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) o dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) (Becquer *et al.*, 2003).

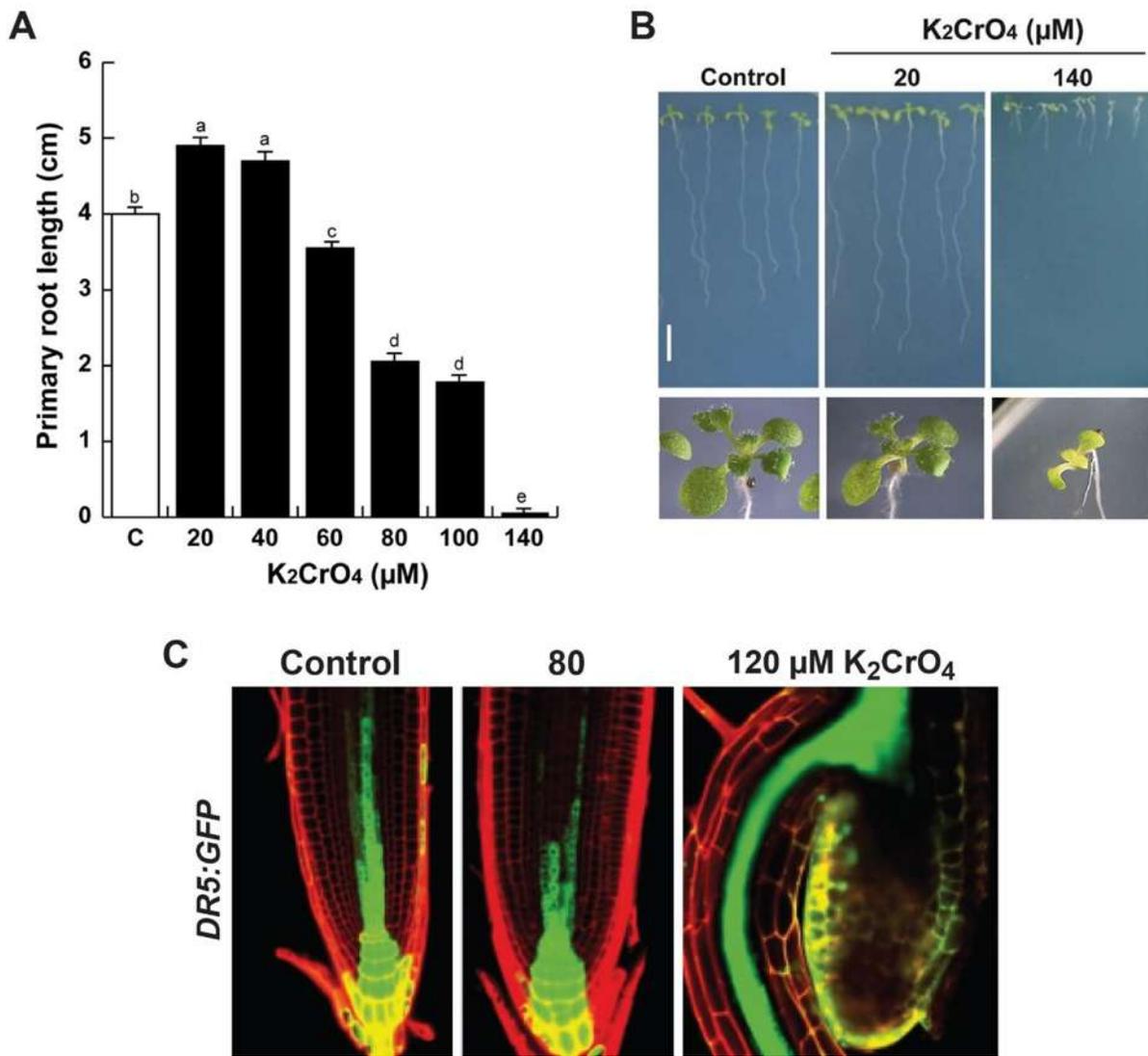
El cromato es un elemento no esencial para las plantas y en suelos contaminados afecta el crecimiento de hojas y raíces, lo que reduce la productividad de los cultivos (Cervantes *et al.*, 2001; Shanker *et al.*, 2005). Dicha toxicidad depende inicialmente de su forma química, ya que esto determina su absorción y translocación. Hasta la fecha, no se han descrito transportadores específicos para alguna de las formas del Cr en plantas, pero se ha reportado que el Cr(VI) puede ingresar a través de permeasas de aniones esenciales como las del sulfato. Además, el hierro (Fe), azufre (S) y fósforo (P), compiten con el Cr(VI) durante su entrada a las células (Wallace *et al.*, 1976; Cervantes *et al.*, 2001; Shanker *et al.*, 2005). El Cr(VI) requiere energía metabólica para entrar a la planta, a diferencia del Cr(III) que ingresa pasivamente y es retenido en sitios de intercambio catiónico en la membrana celular (Zayed *et al.*, 1998; Becquer *et al.*, 2003; Marschner, 2012).

En estudios en cultivos se encontró una mayor acumulación de Cr en plantas crecidas con Cr(VI) que con Cr(III) y su transporte preferencialmente se llevó a cabo por el xilema. En *Vigna radiata*, el Cr(VI) se encontró en una concentración 80 veces mayor en las raíces que en los brotes (Skeffington *et al.*, 1976; Zayed *et al.*, 1998; Shanker *et al.*, 2004). El transporte del Cr desde la raíz hacia el follaje es bajo debido a su inmovilización en las vacuolas y esto se ha sugerido como un probable mecanismo para evadir la toxicidad del metal (Shanker *et al.*, 2004). Tanto el Cr(III)

como el Cr(VI) atraviesan la endodermis a través del simplasto, donde podría ocurrir la reducción del Cr(VI) a Cr(III), después de lo cual es retenido en el córtex de la raíz. La reducción ocurre a pesar de que las angiospermas carecen aparentemente de enzimas reductoras para el cromato (Shanker *et al.*, 2005).

Debido a su toxicidad, el Cr(VI) impacta negativamente en la mayoría de los procesos fisiológicos en diversas especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas, incluyendo la germinación (Zeid, 2001), el crecimiento del follaje (Anderson *et al.*, 1973; Barceló *et al.*, 1986; Sharma y Sharma, 1993; Karunyal *et al.*, 1994; Barton *et al.*, 2000) y el desarrollo de las raíces (Panda y Patra, 2000; Tang *et al.*, 2007). Todos estos cambios resultan en una disminución en el rendimiento y en la producción de materia seca (Biacs *et al.*, 1995; Vajpayee *et al.*, 2000). A nivel bioquímico, el Cr(VI) altera la fotosíntesis al inhibir el transporte de electrones, disminuye el potencial hídrico y afecta la nutrición mineral al reducir la captación de iones esenciales de los principales macronutrientes, como el nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), hierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), zinc (Zn), cobre (Cu), calcio (Ca) y boro (B). El Cr(VI) también inhibe la actividad enzimática, lo que resulta en la disminución de la producción de fitoquelatinas y el incremento de la producción de ERO (Panda y Choudhury, 2005; Shanker *et al.*, 2005).

Se ha utilizado cromato de potasio ( $K_2CrO_4$ ) como fuente de Cr(VI) para evaluar los efectos tóxicos de este metal en *Arabidopsis thaliana*. En concentraciones bajas (20 - 40  $\mu M$ ) se encontró una estimulación del crecimiento de la raíz y de la biomasa del brote (Fig. 10 A y B). En concentraciones sub-letales (60  $\mu M$ ) inhibió el crecimiento de la raíz primaria, el peso fresco, el contenido de clorofila y la formación de raíces laterales, pero indujo una mayor formación de las raíces adventicias (Fig. 10C). En la concentración más elevada de cromato que se evaluó (140  $\mu M$ ), se observó una inhibición total del crecimiento de la raíz primaria (Fig. 10B): se pierde el meristemo, se arresta la división celular y se promueve la diferenciación (Martinez-Trujillo *et al.*, 2014; López-Bucio *et al.*, 2015)



**Figura 10. Inhibición del crecimiento de la raíz y del follaje de *Arabidopsis* e inducción de la formación de raíces adventicias en exposición a Cr(VI).** **A)** Inhibición del crecimiento de la raíz primaria en concentraciones crecientes de K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>. **B)** Imagen representativa de plantas mostrando clorosis en altas concentraciones de cromato. **C)** Formación de raíces laterales cercanas a la punta de la raíz primaria en exposición a 120 µm Cr(VI). Modificado de Martínez-Trujillo *et al.*, 2014 (A y B), López-Bucio *et al.*, 2015 (C).

### 2.10.1. Mecanismo de toxicidad del cromato

Los efectos negativos del cromato en los organismos y en específico en las plantas, se atribuyen al incremento de las ERO, las cuales son productos del metabolismo

cuando la planta se encuentra bajo estrés. La acumulación de estas especies presenta problemas en el organismo cuando las concentraciones superan la capacidad de la célula para contrarrestarlas mediante los sistemas de detoxificación. Las ERO son cualquier derivado de oxígeno que sea más reactivo que una molécula de oxígeno ( $O_2$ ) por sí misma (Foyer y Noctor, 2009; Mittler, 2017; Mhamdi y Van Breusegem, 2018).

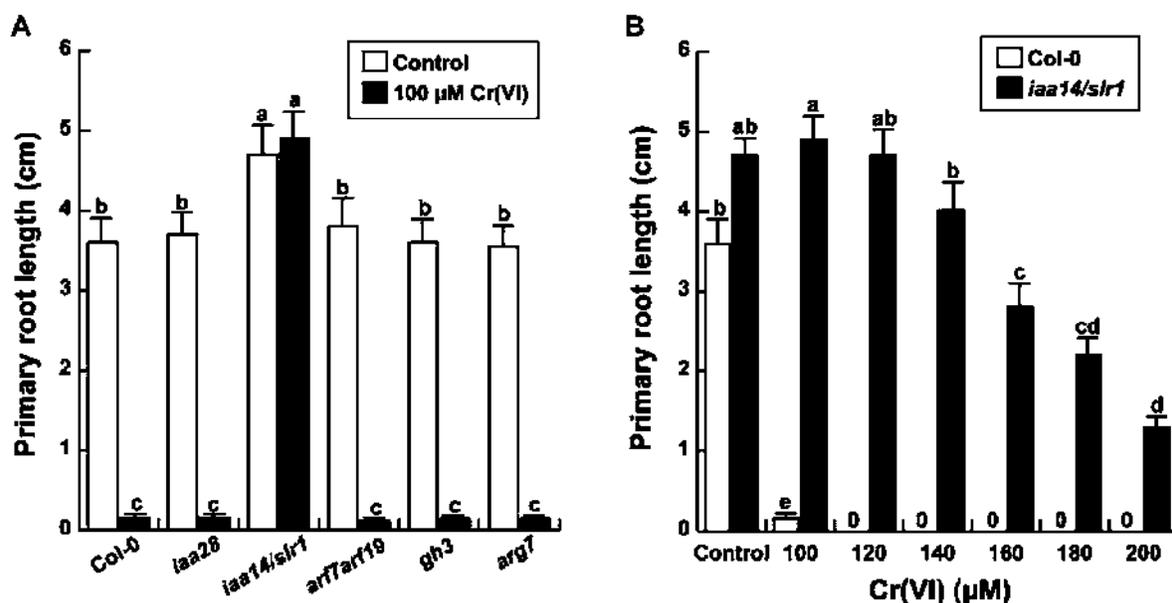
Está reportado que los metales inducen los niveles de las ERO, esto es resultado de reacciones Haber – Weiss y Fenton, las cuales son catalizadas por los metales o bien, por alteraciones en el metabolismo. Como consecuencia de las reacciones antes mencionadas, se producen radicales hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) a partir de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y superóxido ( $O_2^\cdot$ ). Cada especie reactiva interacciona con diferentes moléculas, el radical superóxido interacciona con proteínas Fe-S. El  $H_2O_2$  reacciona con proteínas hemo y con las proteínas en general al atacar a las cisteínas y metioninas, además interacciona con el ADN. Los radicales hidroxilo pueden reaccionar con todas las biomoléculas, como el ADN, ARN (ácido ribonucleico), lípidos y proteínas (Mittler, 2017; Mhamdi y Van Breusegem, 2018; Waszczak *et al.*, 2018). En un estudio realizado en la planta del chícharo (*Pisum sativum*), se comprobó que el Cr(VI) genera daño en el ADN, arresto del ciclo celular en la transición G2/M y poliploidización (Rodríguez *et al.*, 2011).

### **2.10.2. Participación del gen *SLR* en la resistencia a cromato**

Los factores bióticos y abióticos afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas y modifican la biosíntesis, el transporte y la sensibilidad de los tejidos a diferentes hormonas vegetales. Las auxinas participan en la mayoría de los procesos morfogénéticos a través de su percepción por el receptor TIR1 y proteínas relacionadas (Malamy, 2005; Shibasaki *et al.*, 2009; López-Bucio *et al.*, 2015). La familia de genes *Aux/IAA* representan un punto importante en la regulación de las respuestas dependientes de auxinas. Mediante un estudio de genética reversa, se seleccionaron plantas con problemas en el gravitropismo y carentes de raíces laterales; así se llegó a la identificación del gen *SLR*, que codifica para la proteína IAA14, miembro de la familia de los represores *Aux/IAA* (Fukaki *et al.*, 2002). La

línea mutante de *SLR* es de tipo ganancia de función, debido a que la mutación es en el dominio II y se pierde la inestabilidad conferida por éste. La mutante *slr1-1* presenta una disminución de la respuesta genética inducida por auxinas y bloquea las primeras divisiones de células del periciclo (Fukaki *et al.*, 2002).

En un estudio previo, donde se analizaron varias líneas mutantes de genes de la vía auxínica, sólo la mutante *slr1-1* presentó resistencia al cromato de potasio, el cual no afectó el crecimiento de la raíz primaria, incluso en concentraciones que inhiben completamente el crecimiento de la raíz primaria en las plantas silvestres (Fig. 11). Con estos datos los autores mostraron que IAA14/SLR actúa como represor del crecimiento de la raíz primaria y de la formación de raíces adventicias en presencia de altas concentraciones de Cr(VI) (López-Bucio *et al.*, 2015).



**Figura 11. Resistencia de la mutante *slr1-1* al cromato.** A) Longitud de la raíz primaria de mutantes de la vía auxínica ante la exposición a 100 μM de cromato. B) Longitud de la raíz primaria de *slr1-1* en diferentes concentraciones del metal. Modificado de López-Bucio *et al.*, (2015).

## **2.11. Regulación del ciclo celular por daño del ADN**

La tolerancia de las plantas a algún tipo de estrés depende de la eficacia de la respuesta. Un menor número de células en el meristemo es precedido por una disminución en la actividad mitótica, que a su vez se presenta por el arresto del ciclo celular. Los tejidos reaccionan ante el daño generado en el ADN y establecen una respuesta para minimizar la lesión, sin embargo, existen diferencias en los mecanismos de reparación entre los procariontes y eucariontes y a su vez entre los diferentes reinos de éste último dominio.

Como parte de la respuesta inicial de la planta al daño del ADN, está la activación de las cinasas ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) y ATR (*ATM and RAD3-related*). ATR se activa por rupturas persistentes de cadena sencilla del ADN, mientras que ATM se activa por el rompimiento de cadena doble. Con la activación de las vías de reparación dependientes de ATM y ATR, ocurre la detención del ciclo celular o la inducción de la muerte celular programada o apoptosis (Heyman *et al.*, 2013; Eekhout *et al.*, 2017).

La regulación del ciclo celular depende de señalización río arriba de los puntos de control mencionados antes. Las fitohormonas como las auxinas o citocininas son parte de esta señalización, específicamente en la progresión de la fase G1 y la transición de G1 a S, ya que regulan positivamente a las CDK y a las ciclinas (Gutierrez, 2009). Cuando las plantas se encuentran bajo estrés, las ERO aumentan, así las proteínas CKI (inhibidoras de cinasas dependientes de ciclinas) como SMR5 y SMR7 (*Siamese-related*) detienen el ciclo celular debido a la oxidación del ADN por ERO. SMR5 arresta el ciclo celular en plantas con cloroplastos disfuncionales. Con esto se evidencia que el control del ciclo celular puede estar mediado de forma importante por mecanismos de respuesta a diferentes tipos de estrés (Hudik *et al.*, 2014; Yi *et al.*, 2014; Polyn *et al.*, 2015).

## **2.12. Características y función del complejo Mediador**

El complejo Mediador está conservado en los eucariontes y cumple una función de anclaje o andamiaje para que se lleve a cabo el proceso de transcripción, ya que interacciona con factores transcripcionales generales y a su vez con la ARN

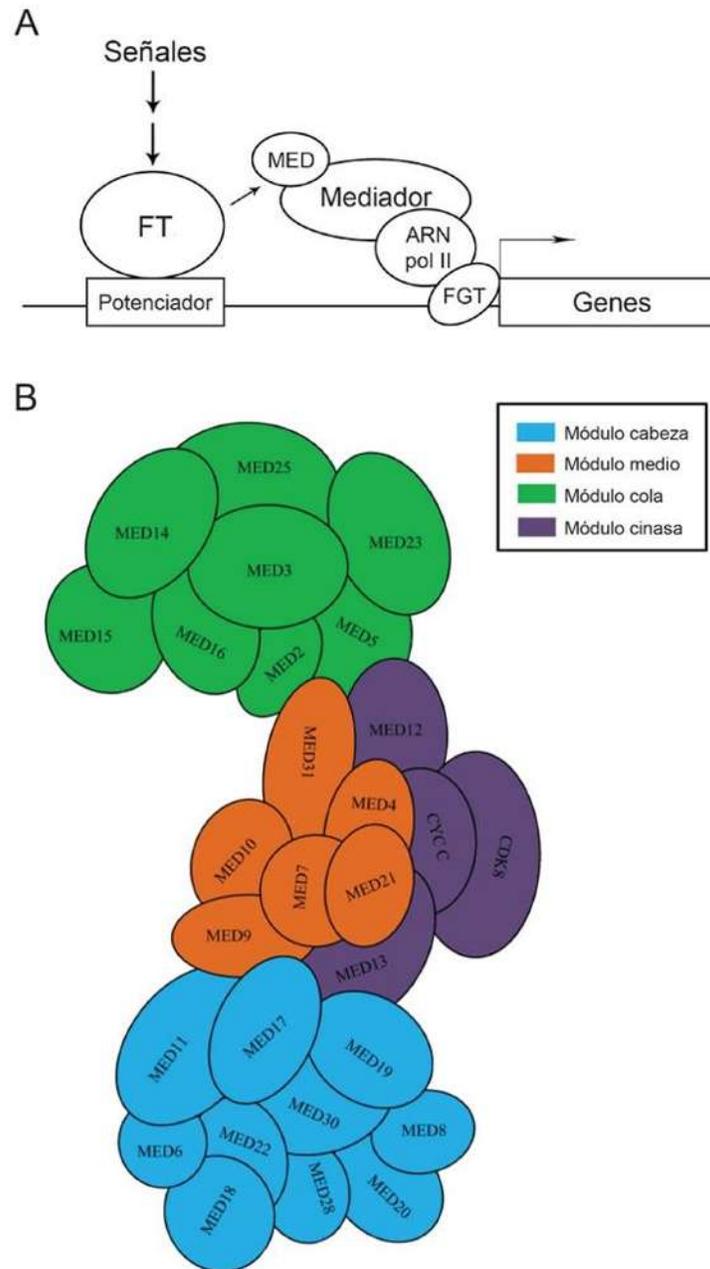
polimerasa II (Yang *et al.*, 2016). Las proteínas principales que participan en la transcripción son la ARN polimerasa II, factores generales de transcripción, activadores que actúan en *trans*, represores y el complejo Mediador (Fig. 12). Este último fue descubierto por primera vez en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y su estructura es ubicua en los organismos multicelulares (Fig. 12) (Bourbon *et al.*, 2004; Bourbon y Henri-Marc., 2008; Kidd *et al.*, 2011).

Se ha descrito la participación de las subunidades MED en diversos procesos de crecimiento y desarrollo, así como en la señalización hormonal y en la respuesta a diferentes tipos de estrés (Imasaki *et al.*, 2011; Kidd *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2016). MED18 modula la respuesta de las plantas ante heridas, infección por hongos y ante el ataque de bacterias necrotróficas, regulando la expresión de *PTR3*, gen de respuesta al estrés biótico. Debido a la relación de MED18 con la sensibilidad a patógenos, se analizaron líneas mutantes de esta subunidad en tratamientos con fitohormonas que regulan la respuesta a estrés biótico. La mutante *med18-1* presentó insensibilidad al ácido abscísico (ABA, por sus siglas en inglés), debido en parte a que los niveles de expresión de *ABI4* y *ABI5* (*ABA insensitive 4,5*) son bajos en esta mutante. *ABI4* y *ABI5* pertenecen a la familia de factores transcripcionales tipo cierre de leucina y se demostró que MED18 regula directamente la transcripción de *ABI5* (Lai *et al.*, 2014).

MED18 interacciona con NUP85 (NUCLEOPORIN 85), una nucleoporina que pertenece al complejo de poros nucleares y que está relacionada con el estrés abiótico y el ABA. Las mutantes de estas dos proteínas presentan sensibilidad al estrés causado por ABA y por cloruro de sodio (NaCl). Además de MED18, NUP85 es necesaria para la inducción de la expresión de *ABI5*, lo que indica que a través de la vía del ABA estas proteínas regulan la respuesta al estrés abiótico (Lai *et al.*, 2014).

Zheng y col. (2013) reportaron que las mutantes *med18-1* y *med18-2* presentan diversas variaciones fenotípicas, lo que sugiere la participación de MED18 en varios programas de desarrollo. Hasta ahora, la mayoría de los reportes que existen sobre MED18 se relacionan con estrés biótico y con regulación del crecimiento del follaje,

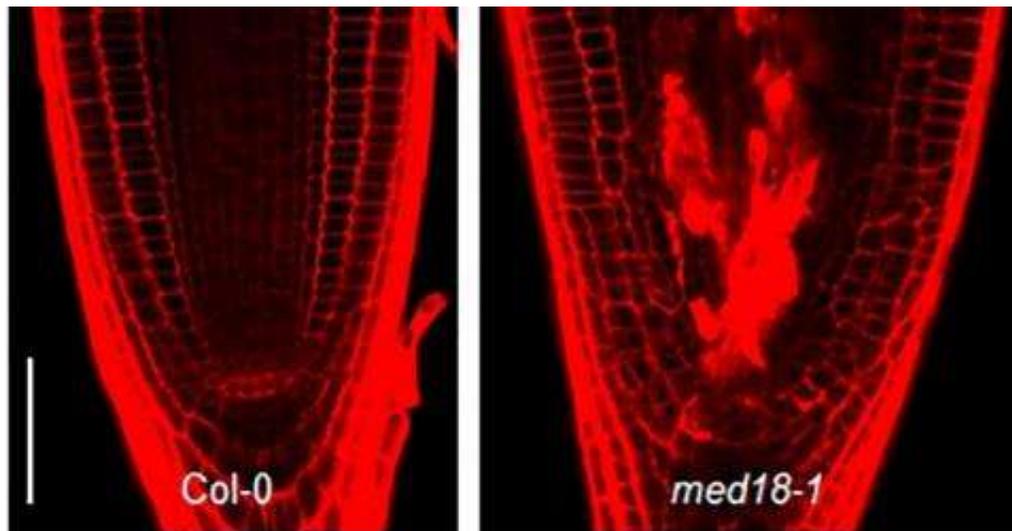
por lo que resulta de enorme interés dilucidar su participación durante la organogénesis de la raíz.



**Figura 12. Participación en la transcripción y estructura del complejo Mediador. A)** Participación del complejo mediador en la transcripción, interactuando con factores transcripcionales (FT) y a su vez con la ARN polimerasa II, ésta se une con los factores generales de transcripción (FGT) para que se lleve a cabo la transcripción de los genes. **B)** Estructura: subunidades descritas del complejo mediador en *Arabidopsis thaliana*. Modificado de Yang *et al.*, (2016), Subhasis y Jitendra (2015).

### 2.13. *med18-1* manifiesta un programa de muerte celular en el meristemo

En un estudio de nuestro grupo de trabajo sobre el papel de MED18 en la biología de *Arabidopsis*, se analizó la raíz de la mutante *med18-1*, encontrándose que las células iniciales del meristemo radicular presentan un programa de muerte celular estable y heredable (Fig. 13). Este fenotipo se intensifica al adicionar compuestos que generan daños en el ADN, por ejemplo, el cisplatino (Raya-González *et al.*, 2018)



**Figura 13. Muerte celular en la mutante *med18-1*.** En la imagen izquierda se muestra la raíz primaria de una planta de la línea silvestre Col-0 y a la derecha de la mutante *med18-1*, mostrando en rojo la penetración del colorante vital yoduro de propidio en las células muertas (Modificado de Raya-González *et al.*, 2018).

### **3. Justificación**

Las plantas han desarrollado mecanismos para regenerar tejidos perdidos o dañados. En la raíz de *Arabidopsis*, la eliminación del meristemo o el tratamiento con agentes genotóxicos activan un programa de muerte celular y al mismo tiempo, se induce la regeneración de la punta de la raíz. La mutación de MED18 induce un programa de muerte celular que podría conducir a una mayor sensibilidad al cromato, en tanto que sus efectos sobre el programa de regeneración se desconocen. Dilucidar la interacción de MED18 con otros elementos genéticos que se activan para la reparación de tejidos es un aspecto de gran relevancia para entender el funcionamiento de las plantas en su ambiente natural.

### **4. Hipótesis**

MED18 participa en una ruta de señalización mediada por cromato que controla la regeneración celular a través del transporte de auxinas y la expresión de los factores ERF115 y SLR.

## **5. Objetivos**

### **5.1. Objetivo general**

Caracterizar la participación de MED18 en la respuesta de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* a cromato y su impacto en la respuesta auxínica y en la vía de regeneración celular dependiente de ERF115.

### **5.2. Objetivos específicos**

I. Evaluar la participación de MED18 en la tolerancia de la raíz a cromato, la integridad del centro quiescente y el nicho de células iniciales de la raíz de *A. thaliana*.

II. Analizar la relación entre la toxicidad por cromato y la respuesta auxínica con la regeneración celular en el meristemo de la raíz primaria.

III. Determinar la participación de MED18, ERF115 y SLR en la respuesta a cromato y la regeneración celular.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1. Material biológico

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo silvestre Columbia 0 (Col-0), así como de las líneas transgénicas *CycB1:GUS* (Colón-Carmona *et al.*, 1999), *DR5:GUS* (Ulmasov *et al.*, 1997), *DR5:GFP* (Ottenschläger *et al.*, 2003), *pPIN1::PIN1-GFP* (Benková *et al.*, 2003), *pPIN2::PIN2-GFP* (Blilou *et al.*, 2005), *WOX5:GFP* (Ding y Friml, 2010), *pERF115:GUS-GFP* (Heyman *et al.*, 2016), y las líneas mutantes *med18-1* (SAIL\_889\_C08) y *med18-2* (SAIL\_889\_C08) (Zheng *et al.*, 2013), y *slr1-1* (Fukaki *et al.*, 2002). Se realizaron cruces de la mutante *med18-1* con las líneas marcadoras mencionadas previamente, también se realizó la cruce para obtener la doble mutante *med18-1 slr1-1*.

### 6.2. Preparación de la semilla y condiciones de crecimiento

Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 95% (v/v) durante 5 minutos y cloro comercial al 20% (v/v) por 7 minutos. Posteriormente se realizaron cinco enjuagues con agua destilada estéril y se incubaron por 48 horas a 4 °C. Las semillas fueron germinadas en cajas de Petri de plástico (100 X 15 mm) que contenían medio MS 0.2X con 1.0% de agar (Murashige y Skoog, 1962) y medio suplementado (después de la esterilización) con diferentes concentraciones de cromato de potasio ( $K_2CrO_4$ ) como fuente de Cr(VI) o con ácido naftil-ftalámico (NPA). El medio de cultivo se preparó con sales MS al 0.2X (0.9 g/L) de PhytoTechnology, con sacarosa al 6%, se ajustó el pH a 7 y se agregó fitoagar PhytoTechnology (10 g/L).

En el experimento de transferencia designamos tiempo 1 (T1) para las plantas a los 4 días después de la germinación (ddg). En ese momento, las plántulas se transfirieron a los diferentes tratamientos con o sin cromato (60  $\mu$ M). Los tratamientos fueron los siguientes: -Cr(VI) a -Cr(VI), -Cr(VI) a +Cr(VI), +Cr(VI) a -Cr(VI) y +Cr(VI) a +Cr(VI). Las plántulas al igual que en el T1, fueron analizadas en el tiempo 2 (T2), que fue a los 8 ddg. Se sembraron las semillas en las placas y se colocaron verticalmente en un ángulo de 65° para permitir el crecimiento de la raíz a lo largo de la superficie del medio. Las placas se colocaron en una cámara de

crecimiento (Percival Scientific AR-95L) con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, con una intensidad de luz de  $>200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ , a una temperatura de 22°C.

### 6.3. Obtención de cruzas

Las líneas marcadoras mencionadas anteriormente fueron movilizadas a la planta mutante *med18-1* mediante cruzas, utilizando el polen de las plantas transgénicas para fecundar al estigma de las flores de la mutante *med18-1*. Las semillas del fruto (silicua) obtenido de la crusa fueron almacenadas y denominadas como generación filial 1 (F1). Las semillas F1 fueron lavadas y sembradas en medio MS 0.2X y las plántulas con fenotipo silvestre fueron seleccionadas. Las plántulas F1 fueron transferidas a suelo y crecidas en cámara de crecimiento Percival AR66L hasta la obtención de semillas en generación F2 por eventos de autopolinización. Las semillas F2 fueron lavadas y sembradas en medio de selección (MS 0.2X suplementado con 200  $\mu\text{M}$  de BASTA) y analizadas para identificar a las plántulas mutantes por medio del fenotipo y de la resistencia a BASTA correspondiente a *med18-1*. Adicionalmente, las plántulas F2 seleccionadas fueron suspendidas en agua desionizada y montadas sobre un portaobjetos para observar la expresión del marcador con el microscopio confocal Olympus FV1000. Las plántulas se transfirieron a suelo y se dejaron crecer hasta obtener semillas de la tercera generación (F3), de las cuales, el 100% de las semillas producen plántulas con fenotipo mutante y el marcador. Las semillas F3 se utilizaron para la realización de los experimentos presentados en este trabajo.

Para la obtención de la doble mutante *med18-1 slr1-1* se usaron líneas mutantes homocigotas, el fondo mutante *slr1-1* se cruzó con *med18-1*. Se utilizó el polen *slr1-1* para fertilizar el estigma de las flores de la mutante *med18-1*. Las semillas F1 se lavaron y se sembraron en medio MS 0.2X y se seleccionaron las plántulas con fenotipo dominante (*slr1-1*). Las plántulas F1 seleccionadas se transfirieron a suelo y se cultivaron hasta que se obtuvo la generación F2 mediante procesos de autopolinización. Las semillas F2 se lavaron, se sembraron en medio de selección (MS 0.2X suplementado con 200  $\mu\text{M}$  de BASTA) y se analizaron para seleccionar las

plántulas mutantes por medio del fenotipo dominante (*slr1-1*) y la resistencia a BASTA. Posteriormente, las plántulas se transfirieron a suelo y se cultivaron hasta obtener semillas F3. Éstas semillas F3 siguieron segregando, pero las dobles mutantes pudieron ser seleccionados por el fenotipo de raíz de *slr1-1* caracterizado por la ausencia de pelos radiculares y raíces laterales y por la presencia de muerte celular debido a la mutación de *med18-1*. El efecto de la doble mutación resultó en un fenotipo combinado.

#### **6.4. Compuestos químicos**

El yoduro de propidio (YP), el ácido 1-N-naftilftalámico (NPA), el cromato de potasio ( $K_2CrO_4$ ) y el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido (X-Gluc) se compraron en la casa comercial Sigma-Aldrich. Se disolvieron en agua (YP,  $K_2CrO_4$ ) o dimetilsulfóxido (DMSO) (NPA, X-Gluc). En los tratamientos control, los disolventes se aplicaron en cantidades iguales a las presentes en la mayor concentración de cada compuesto probado.

#### **6.5. Análisis histoquímico**

Las líneas *CycB1;1:GUS*, *med18-1/CycB1;1:GUS*, *DR5:GUS*, *med18-1/ DR5:GUS*, *pERF115:GUS-GFP* y *med18-1/ pERF115:GUS-GFP* se transfirieron a cajas de microtítulo con X-Gluc al 0.1% (5bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucoronido) en amortiguador de fosfatos ( $NaH_2PO_4$   $Na_2HPO_4$ , 0.1 M, pH 7) y se incubaron por 6 horas a 37 °C. Posteriormente, se retiró la solución de X-Gluc y las plantas fueron clarificadas con una solución de HCl 0.24 N en metanol al 20% (v/v) durante 60 minutos a 62 °C, después la solución se removió y se agregó NaOH al 7% (v/v) en metanol al 60% (v/v) por 25 minutos a temperatura ambiente. La solución fue retirada y el tejido se deshidrató con tratamientos de etanol al 40, 20 y 10% (v/v) por 20 minutos cada uno. Una vez retirado el etanol al 10%, se adicionó glicerol al 50% (v/v) y se colocaron en portaobjetos para su análisis mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC; por sus siglas en inglés) en un microscopio Leica DM 5500 B.

## 6.6. Tinción de YP y detección de GFP

Para el análisis de las líneas transgénicas *DR5:GFP*, *pPIN1::PIN1-GFP*, *pPIN2::PIN2-GFP*, *WOX5:GFP* y *pERF115:GUS-GFP* y las cruces obtenidas con *med18-1* se tomaron las plantas y las raíces fueron suspendidas en YP al 0.1% (v/v) sobre un portaobjetos y finalmente se analizaron en un microscopio confocal Olympus Fluo-View FV1000-PME. Para la detección de la fluorescencia de GFP se utilizó una longitud de onda de excitación de 488 nm y el registro de un haz de 509 nm, para el YP se utilizó la longitud de onda de 568 nm para la excitación y una ventana de emisión de 585-610 nm.

## 6.7. Variables analizadas

Se analizó el crecimiento de la raíz primaria en las diferentes concentraciones utilizadas de  $K_2CrO_4$ , se tomaron fotos de la punta de las raíces en un microscopio estereoscópico (Leica MZ6/L2) en el objetivo 1.6X. Todos los datos obtenidos de los experimentos fueron analizados estadísticamente con el software STATISTICA 10 (Statsoft, 2010), aplicándoles análisis de varianza, ANOVA de una vía y pruebas de significancia de Tukey con una  $P < 0.05$ . Los grupos estadísticamente diferentes se representan con letras o un asterisco en la parte superior de las barras y del error estándar en las gráficas.

## 7. Resultados

Los resultados corresponden a un artículo en proceso de envío.

*Classification:* Biological Sciences, Plant Biology.

*Title:* Pluripotent cell re-specification triggers regeneration of the root apical meristem in *Arabidopsis*.

*Short title:* Metaplasia and root meristem duplication.

*Authors:* Bricia Ruiz Aguilar<sup>1</sup>, *et al.*

*Author affiliation:*

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B3, Ciudad Universitaria; 58030, Morelia, Michoacán, México

*\*Corresponding author:*

José López-Bucio. E-mail: [jbucio@umich.mx](mailto:jbucio@umich.mx).

*Keywords:* Regeneration, root development, stem cell niche, auxins, chromate.

## **Abstract**

Plants are continuously exposed to biotic or abiotic stress, which impose a strong adaptive pressure. Here, we show that in *Arabidopsis thaliana*, mutation of the MED18 subunit of the MEDIATOR complex causes oversensitivity of primary roots to chromate [Cr(VI)], an environmental pollutant. Noteworthy, reduced primary root growth of *med18* mutants correlates with spontaneous death of initial cells, which following Cr(VI) exposure activates a regeneration program that duplicates the meristem and produces twin roots. The quiescent center gene marker *WOX5* and the regeneration factor *ERF115* were induced in a MED18 and chromate-dependent manner during de novo organ formation and the root duplication events required auxin redistribution and signaling within the parent root tip. Our results indicate that MED18 and chromate act synergistically to activate a metaplasia-like developmental program, in which pools of root meristem cells proliferate to produce more stem cells that act to duplicate a whole organ *in vivo*.

## **Main text**

Plants can regenerate cells, tissues and organs during development or in response to injury (1, 2). The root provides support and is critical for water and nutrient uptake and accounts for soil exploration through the activity of its apical meristem (RAM), which produces the different tissues and enables growth. The root stem cell niche is comprised of the quiescent center (QC) a group of low mitotically active cells that instruct a pool of initial cells to divide and controls their undifferentiated status (2). Root initial cells are particularly sensitive to environmental stimuli that cause DNA damage and/or to mutagenic factors (3), and thus represent an important checkpoint for cell death or regeneration.

The reconfiguration of a plant tissue lost by injury may proceed through ubiquitous cellular programs not so different to animals, for example, recovery of excised root tip of *Arabidopsis* is similar to animal limb regeneration, in that a lost part of the body can be replaced via transdifferentiation or metaplasia, in which stem cells of one

tissue proliferate to produce more stem cells that act as progenitors of novel tissues (5, 6, 7). In *Arabidopsis thaliana*, both root tip regeneration and adaptation to genotoxic stress involve the ETHYLENE RESPONSE FACTOR 115 (ERF115), which triggers cell division and replenishes the initial cell pool (8, 9). Currently, the molecular aspects orchestrating the conversion of one cell type into a different one and its relationship with regeneration remains as major question in biology.

Plant phase transitions and adaptation to stress is fine-tuned at the transcriptional level, since the amount and type of the proteins responsible of the phenotype may tightly depend upon the RNA messenger that is produced in a tissue, developmental stage or in response to stimuli (10). The Mediator (MED) complex plays a critical role in gene expression promoting transcription initiation and elongation (10). The MED18 subunit is a multifunctional protein involved in plant immunity, flowering time and responses to hormones through interactions with distinct transcription factors (11). MED18 mutation decreases primary root growth and triggers spontaneous and genetically stable cell death in proto-vascular root stem cells, which correlates with oversensitivity to DNA damaging factors and induces ERF115 expression (12).

Chromate [Cr(VI)] is a toxic pollutant that accumulates in the soil due to anthropogenic activities, which represses plant growth and photosynthesis (13). In *Arabidopsis thaliana*, the reconfiguration of root architecture that accounts for enhanced Cr(VI) tolerance is mediated by auxin redistribution from primary to lateral and adventitious roots in a process involving IAA14/SOLITARY ROOT and meristem identity genes (14, 15). Here, we show that MED18 and Cr(VI) synergistically orchestrate a whole root meristem regeneration program that triggers organ duplication *in vivo*.

Cr(VI) toxicity inhibits *Arabidopsis* primary root growth by affecting cell cycle progression and causing differentiation of root meristem initials (14, 15). Comparison of primary root growth between WT and *med18-1* mutants indicated an increased sensitivity of the mutants to Cr(VI) (**Fig. 1a**). Unexpectedly, the growth repression observed under mild (60  $\mu$ M) Cr(VI) concentrations could not be related to the progression of cell death or RAM determination, but instead to the formation of two

primary root tips with apparently normal phenotypes (**Fig. 1b, c**). This developmental readjustment could never been observed in WT (Col-0) seedlings exposed to a wide range of mild or highly growth repressing Cr(VI) concentrations (**Fig. 1, Figs. S1 and S2**) or in previous analysis of the *Arabidopsis* primary root growth response to Cr(VI) (14-15), but instead was confirmed in *med18-2* seedlings that are defective in a second MED18 allele (**Fig. S3**). These data indicate that MED18 plays a critical role in normal root meristem functioning, likely acting to repress whole organ duplication, a process that is synergistically influenced by Cr(VI).

Root tip regeneration has been observed following excision of root initials, which indicates that cell replenishment during this program does not require a functional stem cell niche but instead, adjacent tissue cells are re-specified to have QC and initial cell identities through ERF115 and thus represents an excellent marker for cellular re-specification (6, 7, 8, 9). Comparison of the root tip regeneration potential in WT and *med18-1* mutants expressing ERF115 show similar responses, having both genotypes the capacity to restore the missing QC, initials and columella cell layers in comparable times, in this case however, ERF115 showed much higher expression in *med18-1* seedlings than in the WT that correlate with the formation of wider root tips (**Fig. S4**). After root tip excision, the formation of twin roots could not be observed in *med18-1* mutants, which indicates that it arises specifically by the responses triggered by Cr(VI) and that the cell death program of *med18-1* initials did not interfere with root tip regeneration after cutting.

The homeobox gene *WUSCHEL RELATED HOMEBOX 5* (*WOX5*) is specifically expressed in the QC and controls both stem cell niche maintenance and root regeneration competence (16, 17, 18). To assess whether roots arising from de novo organogenesis following treatment of *med18* mutants with Cr(VI) and to identify the molecular players during the duplication program, the *WOX5* and *ERF115* expression was monitored in WT and *med18-1* seedlings treated with 60  $\mu$ M Cr(VI). The QC specific gene construct *pWOX5:ERGFP* was expressed in a wider domain by day 2 and later locates into two lateral poles and in 1 to 2 cell domains by the time the twin roots were formed, it gradually localizes into the QC domains of each root tip (**Fig. 2a, Fig. S1**). *pERF115:GUS-GFP* was specifically expressed in QC cells of WT

seedlings treated with Cr(VI) (**Fig. 2b**), according to its role in promoting QC division after genotoxic stress or cell damage (9, 10). In *med18* seedlings, ERF115 was expressed in cells adjacent to death areas, as revealed by vital staining using propidium iodide and its over-induction occurred in response to chromate in contrast to WT plants, in which no cell death or ERF115 activation was evident (**Fig. 2b**). Thus, MED18 and chromate synergistically drive a metaplasia-like organogenesis program that correlates with WOX5 and ERF115 re-localization.

Auxin-responsive gene expression orchestrates early tissue patterning and stem cell niche formation during root tip regeneration (6). Moreover, primary root growth inhibition by Cr(VI) was tightly related to auxin transport and signaling, and could be blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene in *Arabidopsis* (14, 15), suggesting that at least in part, an integral auxin homeostasis machinery drives root adaptation to chromate (12, 13). *DR5:GFP*, *pPIN1::PIN1-GFP* and *pPIN2::PIN2-GFP* levels in root tips of WT and *med18-1* mutants exposed to Cr(VI) showed that meristem duplication correlates with altered local auxin response and distribution within the primary root tip (**Fig. 2c-e**; **Fig. S2**). Particularly, PIN2 detection demonstrates external cell layer re-specification from internal tissues as root meristem duplication progresses (**Fig. 2e**).

Pharmacological and genetic strategies were employed to define how MED18 and Cr(VI) coordinate the cell re-specification program that triggers root meristem duplication. First, the effect of auxin transport inhibitor NPA was tested in WT and *med18-1* mutants expressing *CYCB1;1:GUS*. Whereas *med18* seedlings showed the formation of twin roots when exposed to Cr(VI), it was blocked by NPA treatment, but in this case an exacerbated *CYCB1;1:GUS* and *DR5:GUS* expression yielded a much wider root with greater meristem, indicating that NPA did not interfere with cell replenishment, but just with tissue patterning that directs root duplication and separation (**Fig. 3a**, **Fig. S5**). Next, a *med18-1 slr1* double mutant was generated, and its root meristem response to Cr(VI) was compared to the WT and *med18-1* and *slr1* single mutants. The data show that the Cr(VI) stimulated root meristem duplication of *med18-1* seedlings was absent in *slr1* and *med18-1 slr1* double

mutants (**Fig. 3b**), indicating that a gain-of-function of this protein interferes with double root formation.

Primary root growth is a strong sink for sugars, which are indispensable for auxin biosynthesis (19, 20, 21). The growth of the primary root was compromised after the formation of twin roots in *med18* mutants treated with Cr(VI) and prolonged exposure yielded triplet roots (**Fig. 1, Fig. S6**). To assess whether the newly formed roots could grow and develop normally, *Arabidopsis* WT (Col-0), and *med18-1* seedlings were germinated and grown for 4 days on agar-solidified 0.2x MS medium with or without Cr(VI) and then transferred to fresh plates with the following treatments, -Cr(VI) to -Cr(VI), -Cr(VI) to +Cr(VI), +Cr(VI) to -Cr(VI), and +Cr(VI) to +Cr(VI). As expected, initial exposure to Cr(VI) strongly repressed primary root growth in *med18-1* mutants (**Fig. 4a**, T1), which were engaged in root meristem duplication. After transfer to medium lacking Cr(VI), the two newly meristems separated each other and slowly resumed growth (**Fig. 4a**, T2). At this stage, the new meristems were indistinguishable each other, manifested cell death in vasculature initials and expressed *pPIN1::PIN1-GFP* at similar levels (**Fig. 4b, c**). These data indicate that the roots synergistically regenerated by MED18 loss of function and Cr(VI) are fully competent to grow.

Conversion of one cell type to another occurs via trans-differentiation. Cell re-specification includes metaplasia, a rare but widespread developmental program in metazoans, in which stem cells of one tissue proliferate to produce more stem cells that act as progenitors of novel tissues (5), this process is highly promising in cellular therapy and organ regeneration, but the genetic mechanisms underpinning the cell re-specification program remain largely unknown (22, 23). Regeneration is widespread in multicellular organisms, including fungi (24), animals (25) and plants (1). Trans-differentiation enables cells to proliferate and replace the missing parts of the body, in which cell replenishment usually starts after injury, wounding or upon exposure to genotoxic stress (4). This report provides compelling evidence that whole organ duplication *in vivo* is possible in plants, which involves the action of two stimuli acting in concert, the loss-of-function of MED18, which also acts as a repressor of

cell death in root meristem initials, and Cr(VI) an environmental pollutant. It is possible that the cell death occurring in meristem initials activates an ERF115-dependent signaling mechanism, since this regeneration factor is induced by cell damage and genotoxic stress (8, 9).

The MED complex is ubiquitous to plants and animals, where it regulates transcription, but important differences in its mode of action are evident. In animals, disruption of MED causes death at an early developmental stage (26), whereas in plants, MED subunits have both distinct and overlapping roles (20, 21). The exacerbation of WOX5 and ERF115 expression in *med18-1* mutants treated with Cr(VI) and the correlation with auxin-related gene expression, as well as the interference of the auxin transport inhibitor NPA or mutation of SLR, directly links auxin sensing and redistribution with a cryptic, whole organ regeneration pathway not previously reported. Currently, how Cr(VI) acts to promote de novo organ formation is unknown, but it may influence metabolism (27) or DNA integrity (28), which are sensed by cells to change their phenotypes via transdifferentiation.

## Funding

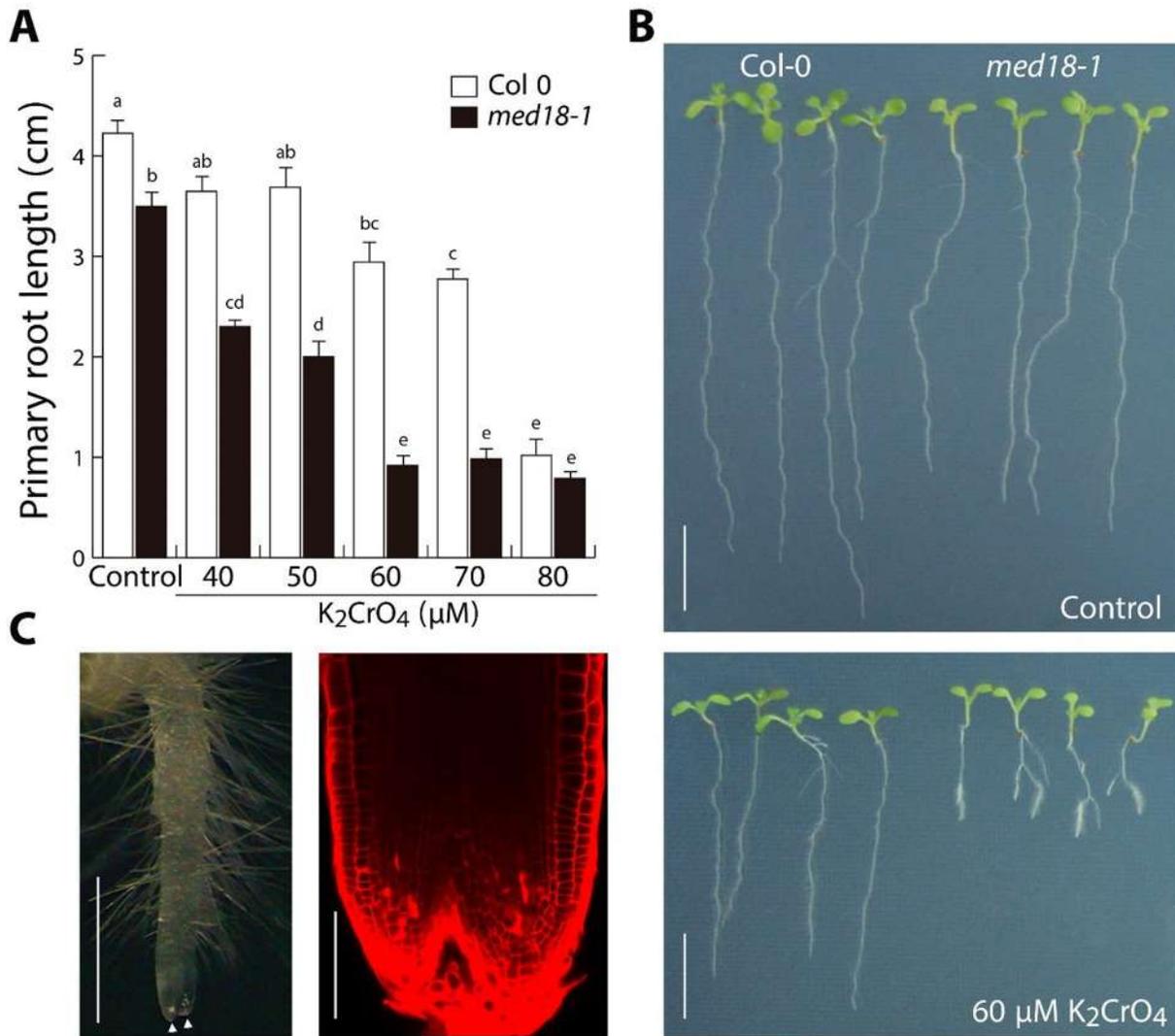
This work was financially supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México, Grant No. 177775 and the Consejo de la Investigación Científica UMSNH (CIC 2.26) to J.L-B. B.R-A is indebted to CONACYT for a Master in Science degree fellowship. We appreciate the kind support by Drs. Alfredo Cruz Ramírez and Lieven de Veylder for donation of seed materials and Prof. Bonnie Bartel and Luis Herrera Estrella for critical review of this manuscript.

## References

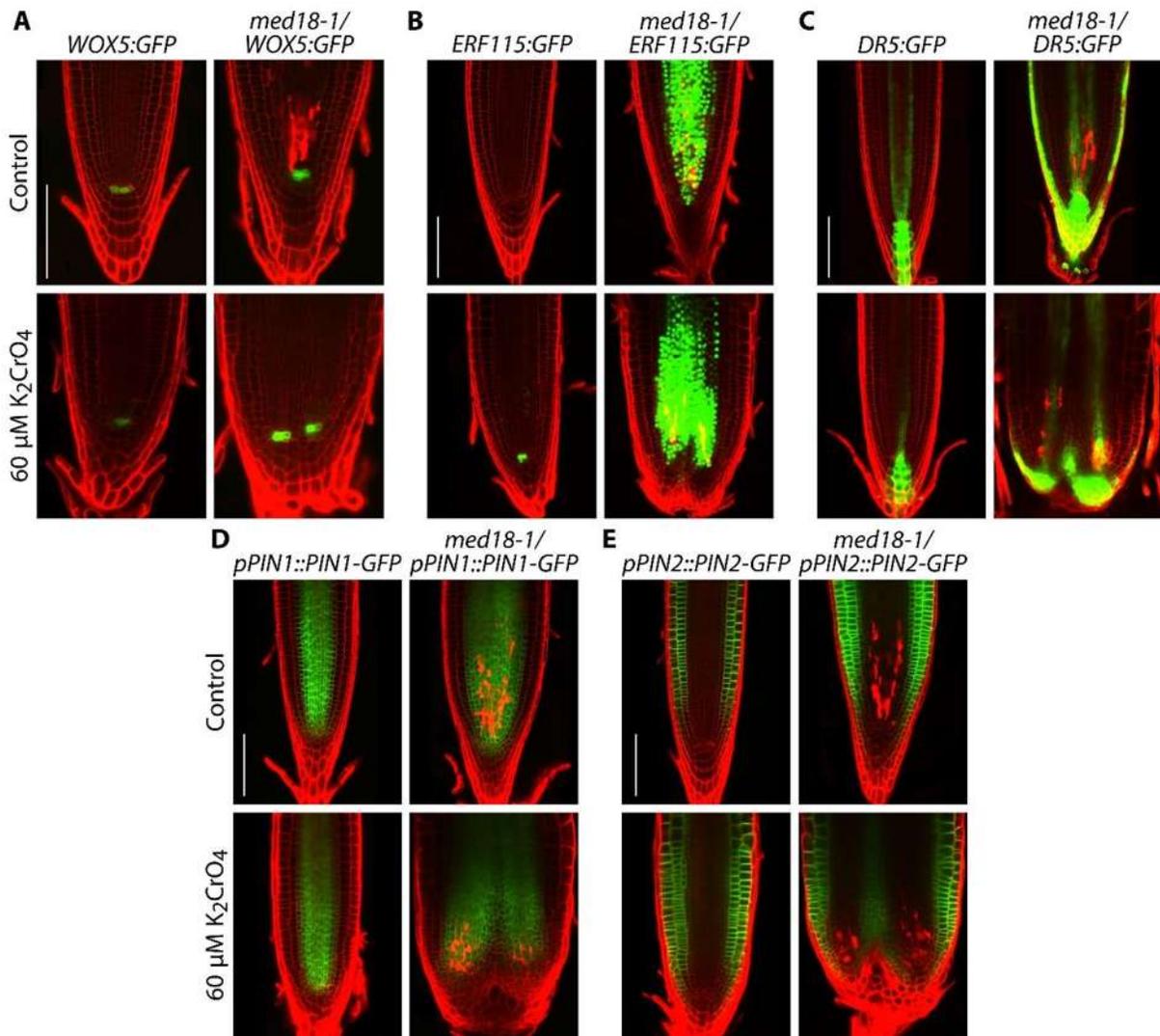
1. M. Ikeuchi, Y. Ogawa, A. Iwase, K. Sugimoto, *Development* **143**, 1442-1451 (2016).
2. Y. L. Sang, Z. J. Cheng, X. S. Zhang, *New Phytol.* **21**, 1334-1339 (2018).
3. N. Fulcher, R. Sablowski, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 20985-20988 (2009).

4. K. Sugimoto, S. P. Gordon, E. M. Meyerowitz, *Trends Cell Biol.* **21**, 212-218 (2011).
5. D. Tosh, J. M. Slack, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 187-194 (2002).
6. G. Sena, X. Wang, H. Liu, H. Hofhuis, K. D. Birnbaum, *Nature* **457**, 1150-1154 (2009).
7. I. Efroni *et al.*, *Cell* **165**, 1721-1733 (2016).
8. J. Heyman *et al.*, *Science* **342**, 860-863 (2013).
9. J. Heyman *et al.*, *Nature Plants* **2**, 16165 (2016).
10. B. L. Allen, D. J. Taatjes, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 155-166 (2015).
11. Z. Lai, *et al.*, *Nature Communications* **5**, 3064 (2014).
12. J. Raya-González *et al.*, *Plant J.* Under revision (2018).
13. M. Martínez-Trujillo *et al.*, *Plant Mol Biol.* **86**, 35-50 (2014).
14. J. López-Bucio *et al.*, *Biometals* **28**, 353-365 (2015).
15. F. Hernández-Madrugal *et al.*, *Plant Growth Regul.* doi.org/10.1007/s10725-018-0425-1 (2018).
16. L. Pi *et al.*, *Dev. Cell* **33**, 576-588 (2015).
17. J. Xu *et al.*, *Science* **311**, 385-388 (2006).
18. A. K. Sarkar *et al.*, *Nature* **446**, 811-814 (2007).
19. Y. Xiong *et al.*, *Nature* **496**, 181–186 (2013).
20. J. Raya-González *et al.*, *Plant Mol. Biol.* **95**, 141-156 (2017).
21. J. Raya-González, R. Ortiz-Castro, L. F. Ruíz-Herrera, K. Kazan, J. López-Bucio, *Plant Physiology* **165**, 880-894 (2014).
22. I. de Lázaro, K. Kostarelos, *Stem Cell Rev.* **12**, 129-139 (2016).

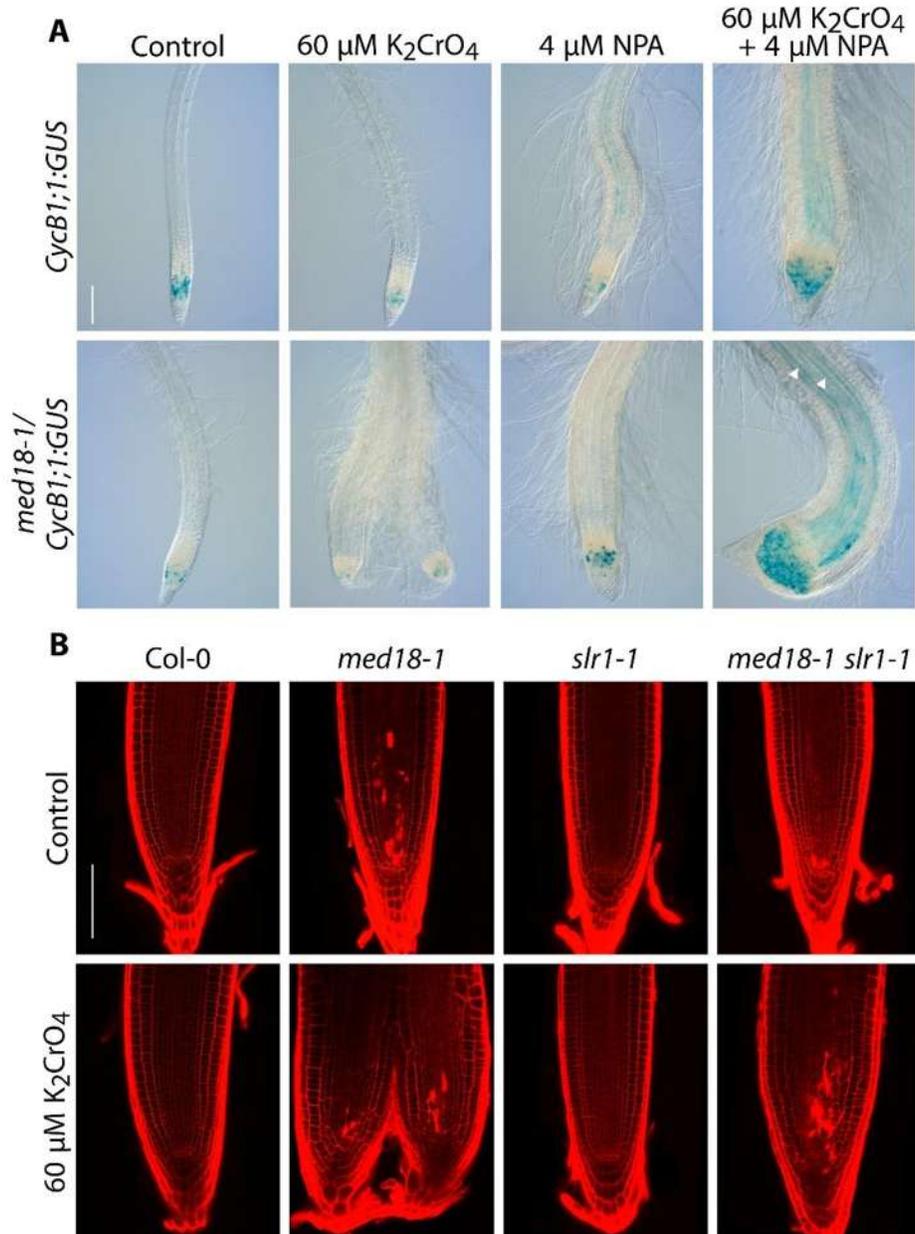
23. A. Xu, L. Cheng, *Front. Med.* **10**, 152-165 (2016).
24. M. Hernández-Oñate, E. U. Esquivel-Naranjo, A. Mendoza-Mendoza, A. Stewart, A. Herrera-Estrella, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 14918-14923 (2012).
25. E. Tanaka, P. W. Reddien, *Dev Cell* **21**, 172-185 (2011).
26. J. W. Yin, G. Wang, *Development* **141**, 977-987 (2014).
27. J. Bai *et al.*, *Scientific Reports* **5**, 15606 (2015).
28. Z. DeLoughery, M. W. Luczak, S. Ortega-Atienza, A. Zhitkovich, *Toxicol. Sci.* **143**, 54-63 (2015).



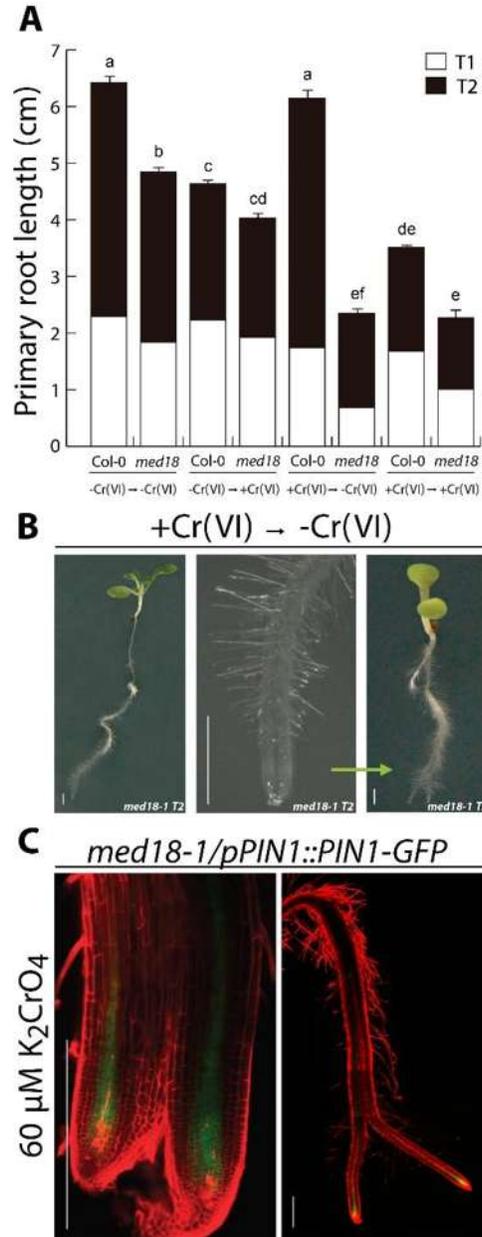
**Figure 1. MED18 loss-of-function causes Cr(VI) oversensitivity and induces primary root meristem duplication.** Wild-type (Col-0) and *med18-1* seedlings were grown for 7 d on agar-solidified 0.2X MS medium supplemented with different concentrations of chromate [K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>/Cr(VI)]. (A) Primary root length. (B) Representative photographs of WT and *med18-1* seedlings grown side by side in standard growth conditions, or supplemented with 60 μM Cr(VI). (C) Root tips from *med18-1* seedlings exposed to 60 μM Cr(VI), stained with propidium iodide (PI) and visualized by confocal microscopy. Note that Cr(VI) activates root meristem duplication and the formation of two independent root tips [arrowheads in (C)] in *med18* mutants. Bars represent means ± SE from 30 seedlings analyzed. Different letters indicate means that differ statistically at  $P < 0.05$ . The experiment was repeated three times with similar results. Scale bar = 1 cm in (b), 1 mm, and 100 μm in (C).



**Figure 2. Chromate- induced root meristem duplication in *med18-1* mutants causes cell respecification.** Seven-day-old WT and *med18-1* seedlings harboring *WOX5::GFP* (A), *ERF115::GFP* (B), *DR5::GFP* (C), *pPIN1::PIN1-GFP* (D) and *pPIN2::PIN2-GFP* were germinated and grown in 0.2X MS medium with or without 60  $\mu\text{M}$  Cr(VI). Arabidopsis root tips were stained with propidium iodide and visualized by confocal microscopy. Note that Cr(VI) in *med18* mutants induces two independent domains, for QC, cell regeneration, auxin sensing and transport gene expression. The experiment was repeated three times with similar results. Scale bar= 100  $\mu\text{m}$ .

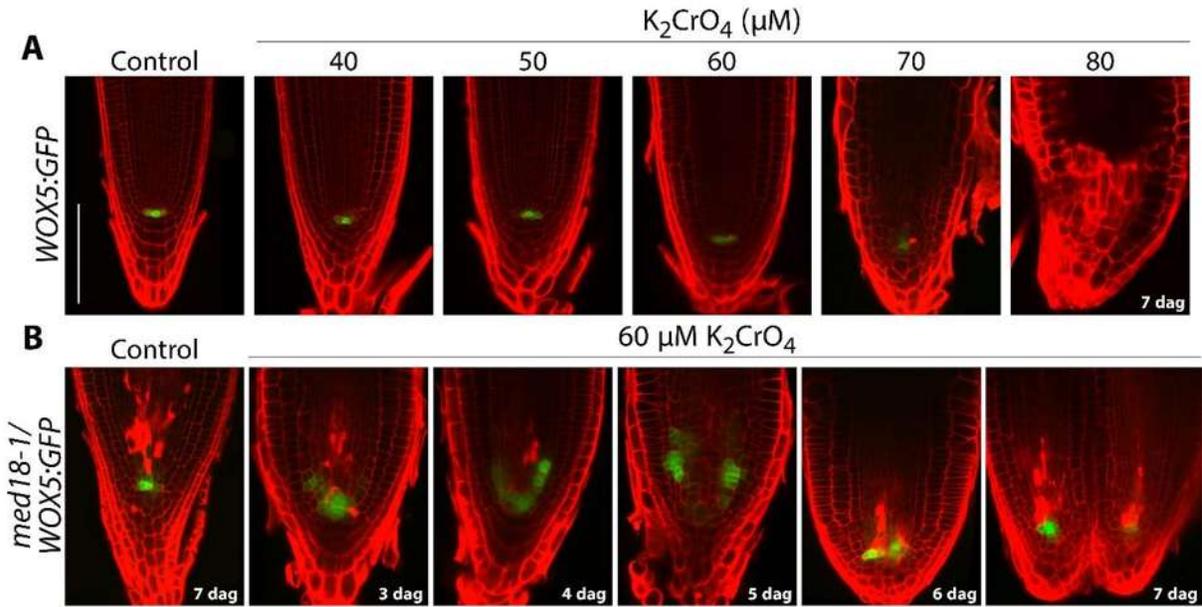


**Figure 3. Duplication of primary root meristems involves auxin transport and signaling.** (A) Arabidopsis WT and *med18-1* seedlings harboring *CycB1;1:GUS* were germinated and grown for 7 d on 0.2X MS medium supplemented with 60  $\mu\text{M}$  Cr(VI), 4  $\mu\text{M}$  NPA, and 60  $\mu\text{M}$  Cr(VI) plus 60  $\mu\text{M}$  NPA. (B) Arabidopsis root tips from WT (Col-0), *med18-1* and *slr1-1* single mutants and *med18-1 slr1-1* double mutants were germinated and grown for 7 d on 0.2X MS medium supplemented with or without 60  $\mu\text{M}$  Cr(VI). Note that blocking auxin transport by NPA or affecting auxin signaling via *SLR* mutation in *med18* background inhibits root meristem duplication. Photographs show representative individuals of at least 20 root tips visualized by Nomarski optics (A) or stained with PI and analyzed by confocal microscopy. The experiment was repeated three times with similar results. Scale bar= 200  $\mu\text{m}$  in (A) and 100  $\mu\text{m}$  in (B).

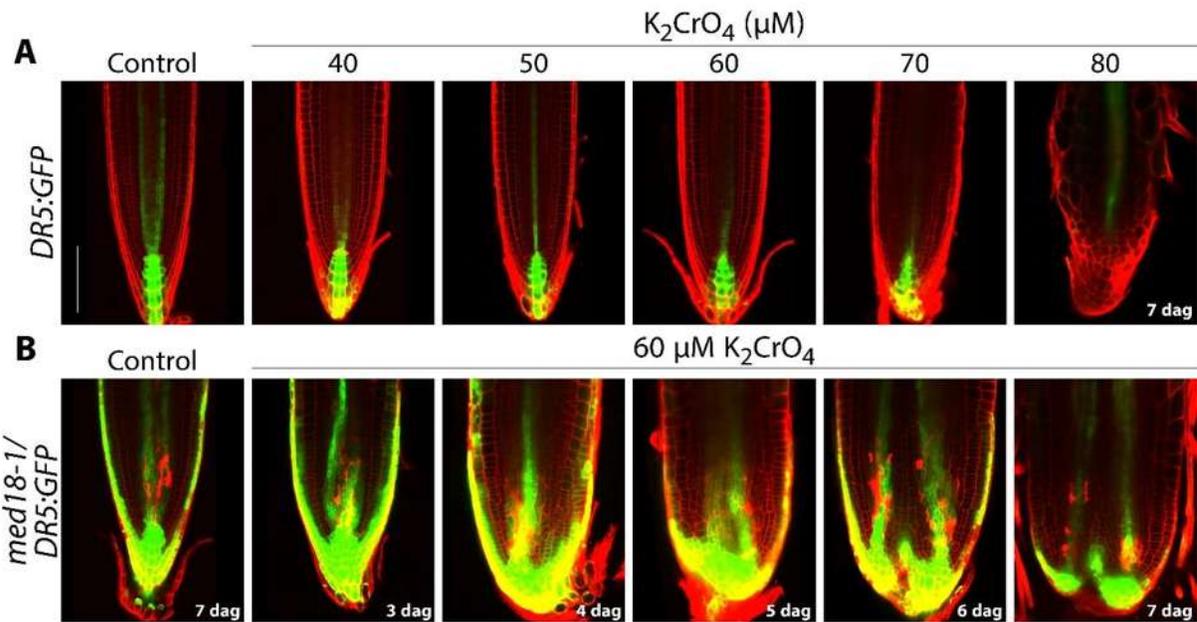


**Figure 4. Root meristem duplication triggers formation of twin roots with full growth potential.**

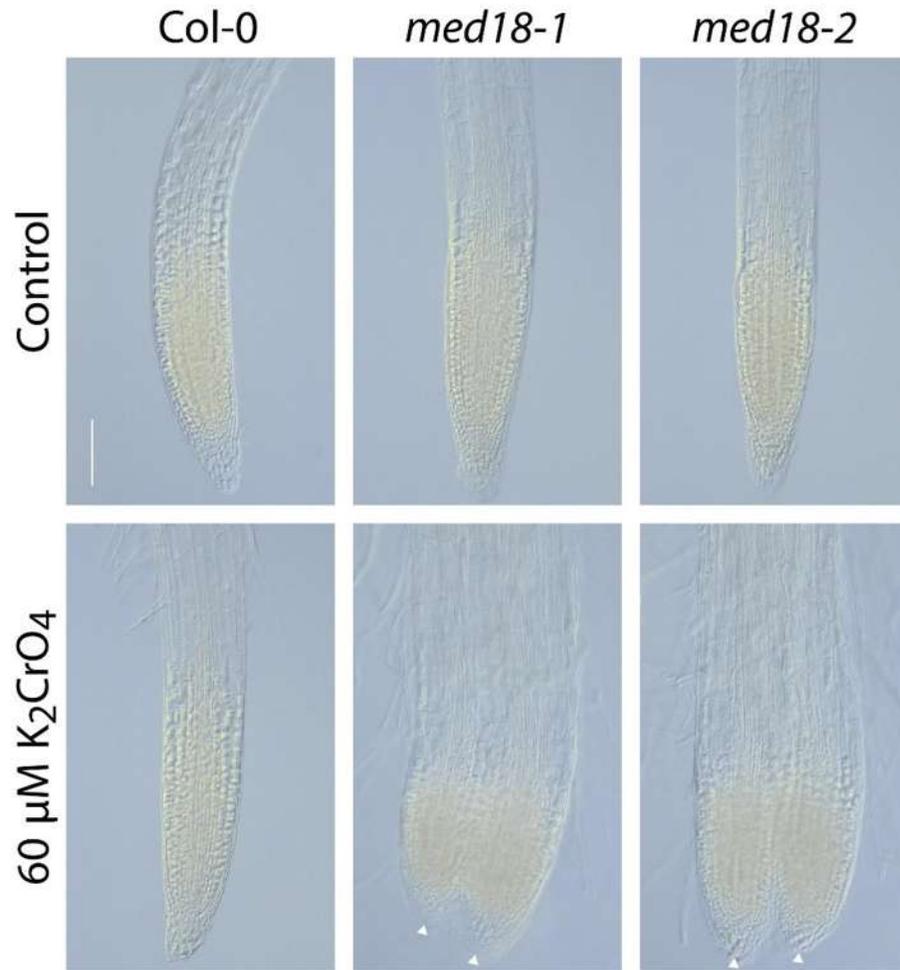
(A) Four-day-old (T1) WT (Col-0) and *med18-1* seedlings germinated and grown in 0.2X MS medium with or without 60  $\mu$ M Cr(VI) were transferred to fresh media and grown side by side for 4 additional days (T2). (A) Primary root growth previously to transfer (T1) and after transfer (T2) in response to reciprocal treatments; -Cr(VI) to -Cr(VI), -Cr(VI) to +Cr(VI), +Cr(VI) to -Cr(VI) and +Cr(VI) to +Cr(VI). (B) Photographs of *med18-1* seedlings grown in +Cr(VI) condition and after twin root formation, seedlings were transferred to fresh media without Cr(VI) and analyzed 2 days later. (C) *med18-1* roots at the same stage as in (B), expressing *pPIN1::PIN1-GFP*. Note that the newly formed roots can grow independently, even when they share the same parental origin. Bars represent the means  $\pm$  SE from 15 seedlings and different letters are used to indicate statistical difference at  $P < 0.05$ . -Cr(VI) = 0  $\mu$ M and +Cr(VI) = 60  $\mu$ M. The experiment was repeated two times with similar results. Scale bar = 1 mm in (b) and 200  $\mu$ m in (c).



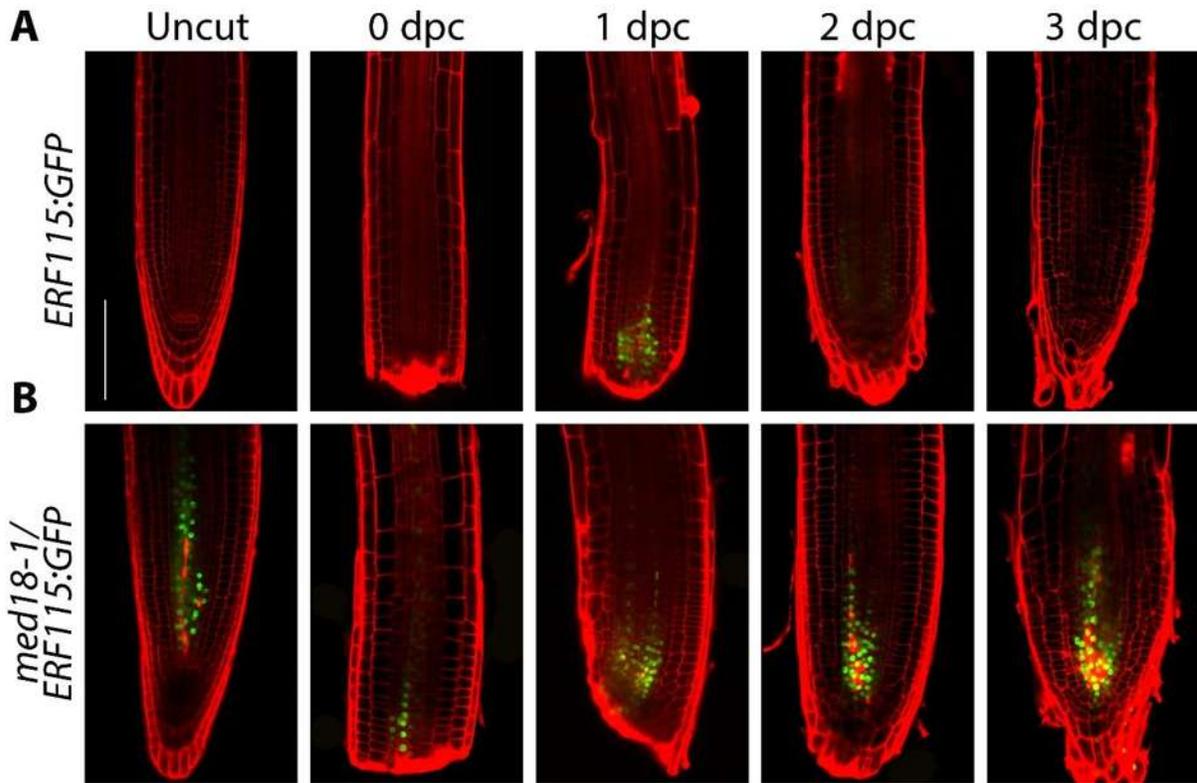
**Supplementary figure 1. Development of two quiescent center (QC) domains during duplication of the primary root meristem.** (A) Seven-day-old WT seedlings harboring *WOX5:GFP* were germinated and grown for 7 d on 0.2X MS medium supplemented with several Cr(VI) concentrations. (B) Kinetic analysis of the effect of Cr(VI) in *med18-1* seedlings expressing *WOX5:GFP*. Note that Cr(VI) in WT plants repress *WOX5* expression which leads to meristem exhaustion, whereas in *med18-1* mutants Cr(VI) activates QC division and separation for twin meristem formation. Photographs show representative individuals of at least 20 root tips stained with PI and analyzed by confocal microscopy. The experiment was repeated three times with similar results. Scale bar= 100  $\mu m$ .



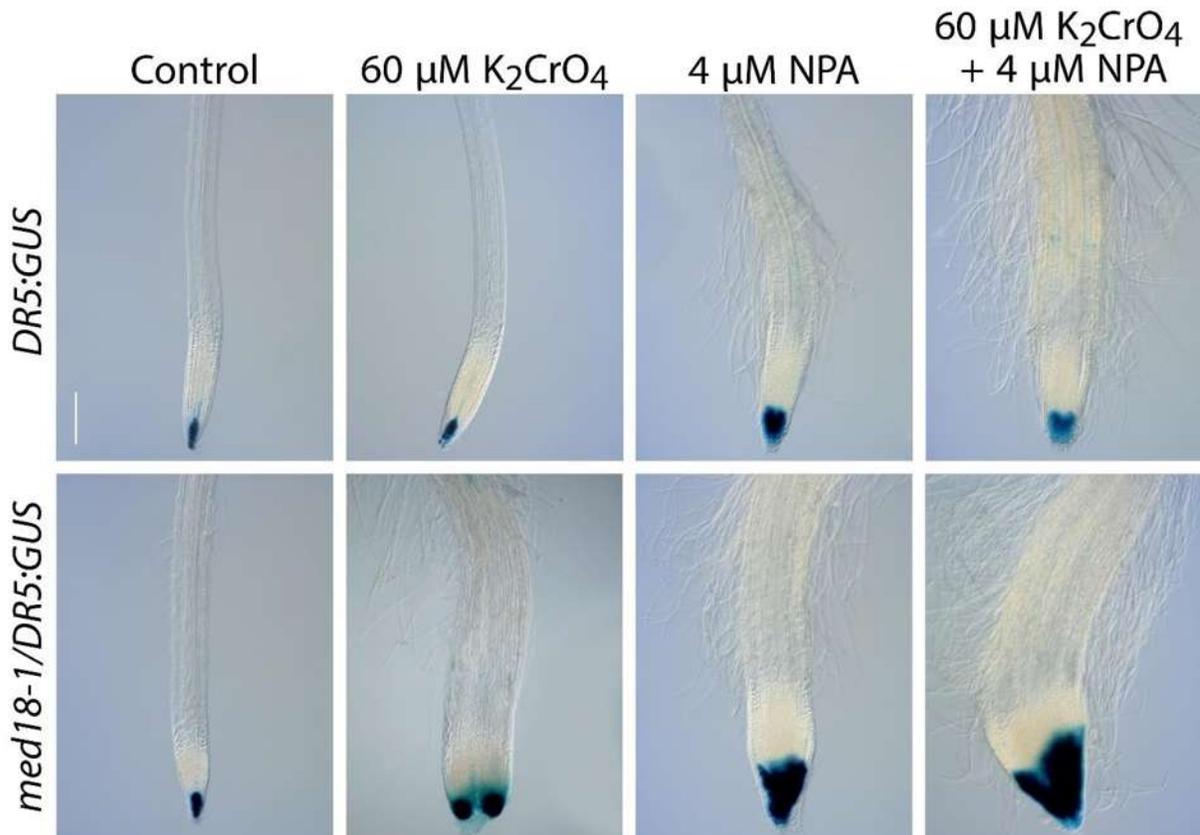
**Supplementary figure 2. Changes in auxin response and distribution during primary root meristem duplication.** (A) Seven-day-old WT seedlings harboring the auxin-inducible gene marker *DR5:GFP* were germinated and grown on 0.2X MS medium supplemented with several Cr(VI) concentrations. (B) Kinetic analysis of the root meristem response to Cr(VI) in *med18-1* seedlings expressing *DR5:GFP*. Note that Cr(VI) in the WT repress *DR5:GFP* expression in a dose-dependent manner, whereas in *med18-1* roots it increases auxin response and distribution at the margins of the root tip. Photographs show representative individuals of at least 20 root tips stained with PI and analyzed by confocal microscopy. The experiment was repeated three times with similar results. Scale bar= 100  $\mu m$ .



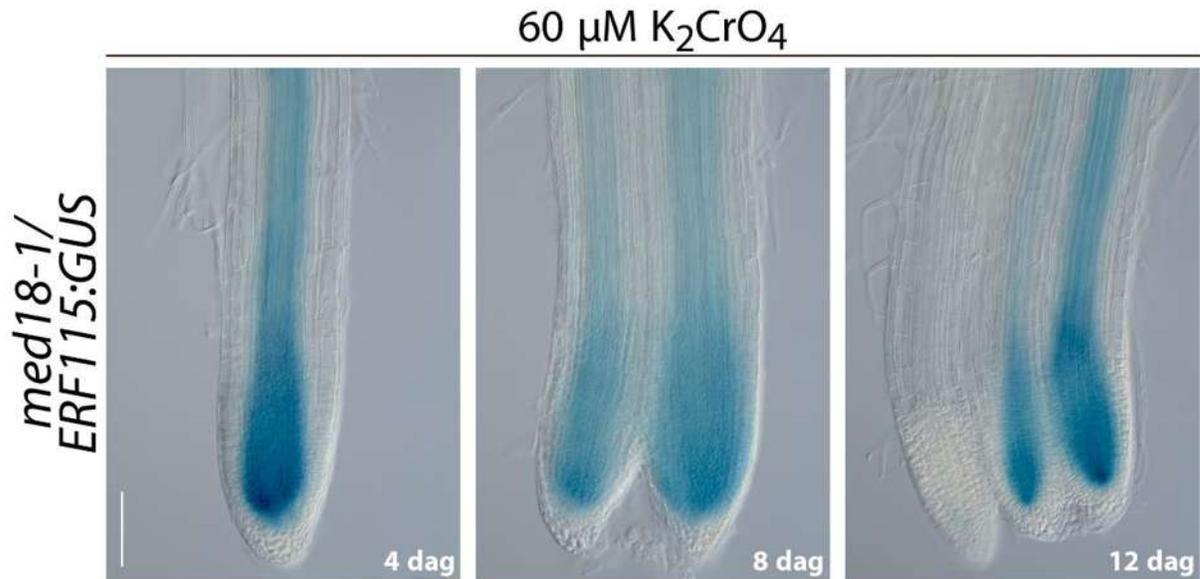
**Supplementary figure 3. Cr(VI) induces root duplication in Arabidopsis mutants defective on two *med18* alleles.** WT (Col-0), *med18-1* and *med18-2* Arabidopsis seedlings were germinated and grown for 7 d on 0.2X MS medium supplemented with 60 μM Cr(VI). Representative roots were cleared and the root tips photographed using the Nomarski optics in a Leica DM5000-B microscope. Arrowheads show the formation of twin root tips from the same parental root. The experiment was repeated two times with similar results (n=20). Scale bar= 100 μm.



**Supplementary figure 4. MED18 loss-of-function does not compromise root tip regeneration after cutting.** Arabidopsis root tips uncut or after excision shows the expression of *ERF115:GFP* in WT (A) and *med18-1* (B) mutants during tissue recovery (dpc, days post cut). Photographs show representative individuals of at least 20 root tips stained with PI and analyzed by confocal microscopy. Note that cell death caused by injury is not sufficient to trigger root meristem duplication in *med18-1* mutants. The experiment was repeated three times with similar results. Scale bar= 100  $\mu$ m.



**Supplementary figure 5. Auxin transport inhibition blocks root tip duplication.** *DR5:GUS* and *med18-1/DR5:GUS* seedlings were grown over the surface of 0.2X MS agar plates supplied with 60  $\mu\text{M}$  Cr(VI), 4  $\mu\text{M}$  NPA or 60  $\mu\text{M}$  Cr(VI) plus 4  $\mu\text{M}$  NPA and 7 dag seedlings were stained for GUS activity. Note that NPA treatment increases root tip width but blocks root meristem duplication induced by Cr(VI) in *med18-1* roots. Photographs show representative individuals of at least 20 roots and analyzed by Nomarski optics in a Leica DM5000-B microscope. The experiment was repeated three times with similar results. Scale bar= 200  $\mu\text{m}$ .



**Supplementary figure 6. Triple root formation in *med18-1* mutants grown in medium supplied with Cr(VI).** Arabidopsis *med18-1* seedlings expressing *ERF115:GUS* were grown in medium supplemented with 60  $\mu$ M Cr(VI) and analyzed at 4, 8 and 12 days after germination. Note that Cr(VI) is able to induce up three root meristems in *med18-1* seedlings. Photographs show representative individuals of at least 10 seedlings stained with X-Gluc and analyzed by Nomarski optics in a Leica DM5000-B microscope. The experiment was repeated three times with similar results. Scale bar= 100  $\mu$ m.

## 8. Discusión

La exposición de las plantas a diferentes tipos de estrés es limitante para el correcto crecimiento y desarrollo de éstas, ya que como organismos sésiles han tenido que adaptarse a cualquier cambio que presente una amenaza. En caso de perder algún órgano o tejido, tienen que ser recuperados a través de procesos que aún no son entendidos completamente a nivel molecular.

La conversión de un tipo celular a otro ocurre debido a un proceso llamado *transdiferenciación*. La re-especificación incluye metaplasia, un programa encontrado ampliamente en metazoarios, en los cuales, las células madre de un tejido proliferan para producir más células madre que actúan como progenitoras de tejidos nuevos (Tosh y Slack, 2002). Este proceso es altamente prometedor en terapias celulares y en la regeneración de órganos, pero los mecanismos genéticos implicados en el programa de re-especificación celular permanecen desconocidos (de Lazaro y Kostarelos, 2016; Xu y Cheng, 2016).

La regeneración la podemos encontrar en una amplia variedad de organismos multicelulares: en hongos (Hernández-Onate *et al.*, 2012), en animales (Tanaka y Reddien, 2011) y en plantas (Ikeuchi *et al.*, 2016). La transdiferenciación permite a las células proliferar y reemplazar las partes del cuerpo perdidas, en las cuales la recuperación suele iniciar después de un daño mecánico o por exposición a estrés genotóxico (Sugimoto *et al.*, 2011). Este trabajo da evidencia de la existencia de un proceso de duplicación completa de un órgano *in vivo* en plantas (Fig. 1, 2 y S1 del escrito del artículo integrado), el cual involucra la participación de dos estímulos: la pérdida de la función de MED18, que actúa como represor negativo de la muerte celular en el meristemo de la raíz (Raya-González *et al.*, 2018 ) y del Cr(VI), un contaminante ambiental. Al utilizar una segunda mutante del gen *MED18*, confirmamos que la respuesta observada se debe a la pérdida de función de la subunidad 18 del complejo Mediador (Fig. S3).

Es posible que la muerte celular que se tiene en las células iniciales del NCI en la mutante *med18-1* active un mecanismo de señalización dependiente de ERF115. Esto debido a que este factor de regeneración es inducido por daño y estrés genotóxico (Fig. 2 y S6) (Heyman *et al.*, 2013; Heyman *et al.*, 2016).

El complejo mediador está conservado en los eucariontes. Desde plantas a animales se ha descrito que éste complejo regula la transcripción, pero existen diferencias importantes en el modo de acción de cada subunidad. La disrupción de MED en animales causa la muerte en un estado temprano del desarrollo (Yin y Wang, 2014), mientras que en plantas las subunidades MED cumplen funciones diferentes y redundantes (Raya-Gonzalez *et al.*, 2014; Raya-Gonzalez *et al.*, 2017).

En la mutante *med18-1* encontramos exacerbada la expresión de WOX5 y ERF115 al exponer las plántulas a Cr(VI) (Fig. 2 y S1). Lo anterior se correlaciona con cambios en la respuesta auxínica (línea reportera *DR5:GFP*) (Fig. S2), así como con el uso del inhibidor del transporte de las auxinas NPA o la mutación de SLR (Fig. 3 y S5). Al utilizar el NPA se perdió totalmente la formación, o al menos, la separación de la doble raíz. Mientras que al exponer a la doble mutante *med18-1 slr1-1* a cromato, se observó una inhibición del 70% la formación de la doble raíz, a diferencia de un 100% observado con el NPA. Esto sugiere una participación importante de las auxinas y que son necesarias otras vías de señalización para la duplicación de las raíces. Esto une directamente la percepción y la distribución de las auxinas con un sistema de regeneración de la raíz que no ha sido descrito antes. Actualmente se desconoce cómo el Cr(VI) promueve la formación de un órgano *de novo*, pero podría estar relacionado con el metabolismo (Bai *et al.*, 2015), o con la integridad del ADN (Rodriguez *et al.*, 2011; DeLoughery *et al.*, 2015).

## 9. Literatura citada

- Abel S, Nguyen MD, Theologis A** (1995) The *PS-IAA4/5*-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *J. Mol. Biol.* **251**: 533-549
- Abel S, Theologis A** (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* **111**: 9-17
- Abrash EB, Bergmann DC** (2009) Asymmetric cell divisions: a view from plant development. *Dev. Cell* **16**: 783-796
- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen VM, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh Y, Amasino R, Scheres B** (2004) The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis root* stem cell niche. *Cell* **119**: 109-120
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI** (2006) Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann. Bot.* **97**: 883-893
- Alvarado Sánchez A** (2000) Regeneration in the metazoans: why does it happen? *BioEssays* **22**: 578-590
- Anderson AJ, Meyer DR, Mayer FK** (1973) Heavy metal toxicities: Levels of nickel, cobalt and chromium in the soil and plants associated with visual symptoms and variation in growth of an oat crop. *Aust. J. Agric. Res.* **24**: 557-571
- Aung K, Jiang Y, He SY** (2018) The role of water in plant–microbe interactions. *Plant J.* **93**: 771-780
- Azpeitia E, Weinstein N, Benítez M, Mendoza L, Alvarez-Buylla E** (2013) Finding missing interactions of the *Arabidopsis thaliana* root stem cell niche gene regulatory network. *Front. Plant. Sci.* **4**: 110
- Bai J, Xun P, Morris S, Jacobs DR, Liu K, He K** (2015) Chromium exposure and incidence of metabolic syndrome among American young adults over a 23-year follow-up: the CARDIA trace element study. *Sci. Rep.* **5**: 15606
- Barceló J, Poschenrieder C, Guns EB** (1986) Water relations of chromium VI treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender) under both normal and water stress conditions. *J. Exp. Bot.* **37**: 178-187
- Bartels D, Sunkar R** (2005) Drought and salt tolerance in plants. *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.* **24**: 23-58
- Barton LL, Johnson GV, O'Nan AG, Wagener BM** (2000) Inhibition of ferric chelate reductase in alfalfa roots by cobalt, nickel, chromium, and copper. *J. Plant. Nutr.* **23**: 1833-1845
- Becquer T, Quantin C, Sicot M, Boudot JP** (2003) Chromium availability in ultramafic soils from New Caledonia. *Sci. Total. Environ.* **301**: 251-261
- Bellini C, Pacurar DI, Perrone I** (2014) Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**: 639-666

- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J** (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**: 591-602
- Bentsink L, Koornneef M** (2008) Seed dormancy and germination. *Arabidopsis Book / ASPB* **6**: e0119
- Bernat, Pasqual.** (2013) Trembley's polyp. The «animal-plant» that changed 18th century biology. *Metode Sci. Stud. J.* **3**
- Biacs PA, Daood HG, Kadar I** (1995) Effect of Mo, Se, Zn, and Cr treatments on the yield, element concentration, and carotenoid content of carrot. *J. Agric. Food. Chem.* **43**: 589-591
- Birnbaum KD, Sanchez-Alvarado A** (2008) Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. *Cell* **132**: 697-710
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B** (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**: 39-44
- Bloom A, J, Chapin FS, Mooney HA** (1985) Resource limitation in plants-an economic analogy. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **16**: 363-392
- Boivin S, Fonouni-Farde C, Frugier F** (2016) How auxin and cytokinin phytohormones modulate root microbe interactions. *Front. Plant. Sci.* **7**: 1240
- Bourbon, Henri-Marc.** (2008) Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex. *Nucleic Acids Res.* **36**: 3993-4008
- Bourbon H, Aguilera A, Ansari AZ, Asturias FJ, Berk AJ, Bjorklund S, Blackwell TK, Borggreffe T, Carey M, Carlson M, Conaway JW, Conaway RC, Emmons SW, Fondell JD, Freedman LP, Fukasawa T, Gustafsson CM, Han M, He X, Herman PK, Hinnebusch AG, Holmberg S, Holstege FC, Jaehning JA, Kim Y, Kuras L, Leutz A, Lis JT, Meisterernest M, Naar AM, Nasmyth K, Parvin JD, Ptashne M, Reinberg D, Ronne H, Sadowski I, Sakurai H, Sipiczki M, Sternberg PW, Stillman DJ, Strich R, Struhl K, Svejstrup JQ, Tuck S, Winston F, Roeder RG, Kornberg RD** (2004) A unified nomenclature for protein subunits of Mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA Polymerase II. *Mol. Cell* **14**: 553-557
- Cary AJ, Che P, Howell SH** (2002) Developmental events and shoot apical meristem gene expression patterns during shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **32**: 867-877
- Cervantes C, Campos-García J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzmán JC, Moreno-Sánchez R** (2001) Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 335-347
- Colón-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P** (1999) Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* **20**: 503-508
- Cormack RGH** (1947) A comparative study of developing epidermal cells in white mustard and tomato roots. *Am. J. Bot.* **34**: 310-314

- Cruz-Ramírez A, Díaz-Triviño S, Wachsman G, Du Y, Arteága-Vázquez M, Zhang H, Benjamins R, Blilou I, Neef AB, Chandler V, Scheres B** (2013) A SCARECROW-RETINOBLASTOMA protein network controls protective quiescence in the *Arabidopsis* root stem cell organizer. *PLOS Biol.* **11**: e1001724
- Dastidar MG, Jouannet V, Maizel A** (2012) Root branching: mechanisms, robustness, and plasticity. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **1**: 329-343
- Davies PJ** (2010) *Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Springer. Dordrecht, Países Bajos.
- De Lazaro I, Kostarelos K** (2016) Engineering cell fate for tissue regeneration by *in vivo* transdifferentiation. *Stem Cell Rev.* **12**: 129-139
- De Veylder L, Beeckman T, Inze D** (2007) The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 655-665
- De Loughery Z, Luczak MW, Ortega-Atienza S, Zhitkovich A** (2015) DNA double-strand breaks by Cr(VI) are targeted to euchromatin and cause ATR-dependent phosphorylation of histone H2AX and its ubiquitination. *Toxicol. Sci.* **143**: 54-63
- Di Laurenzio L, Wsocka-Diller J, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn MG, Feldmann KA, Benfey PN** (1996) The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* **86**: 423-433
- Ding Z, Friml J** (2010) Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 12046-12051
- Doerner P, Jorgensen JE, You R, Steppuhn J, Lamb C** (1996) Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* **380**: 520-523
- Dolan L, Costa S** (2001) Evolution and genetics of root hair stripes in the root epidermis. *J. Exp. Bot.* **52**: 413-417
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B** (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71-84
- Dubrovsky JG, Doerner PW, Colon-Carmona A, Rost TL** (2000) Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **124**: 1648-1657
- Eekhout T, Larsen P, De Veylder L** (2017) Modification of DNA checkpoints to confer aluminum tolerance. *Trends Plant Sci.* **22**: 102-105
- Efroni I, Mello A, Nawy T, Ip P, Rahni R, DelRose N, Powers A, Satija R, Birnbaum KD** (2016) Root regeneration triggers an embryo-like sequence guided by hormonal interactions. *Cell* **165**: 1721-1733
- Eshel A, Beeckman T** (2013) *Plant roots, the hidden half.* CRC Press. Nueva York, E.U.A.
- Ferreira PC, Hemerly AS, Engler JD, van Montagu M, Engler G, Inze D** (1994) Developmental expression of the *Arabidopsis* cyclin gene *cyc1At*. *Plant Cell* **6**: 1763-1774
- Forzani C, Aichinger E, Sornay E, Willemsen V, Laux T, Dewitte W, Murray JAH** (2014) *WOX5* suppresses CYCLIN D activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Curr. Biol.* **24**: 1939-1944

- Foyer CH, Noctor G** (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox. Signal* **11**: 861-905
- Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jürgens G** (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**: 147-153
- Fukaki H, Tameda S, Masuda H, Tasaka M** (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *Plant J.* **29**: 153-168
- Fulcher N, Sablowski R** (2009) Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **49**: 20984-20988
- Gaillochet C, Lohmann JU** (2015) The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. *Development* **142**: 2237-2249
- Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, Willemsen V, Blilou I, Heidstra R, Scheres B** (2007) PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* **449**: 1053-1057
- Galway ME, Masucci JD, Lloyd AM, Walbot V, Davis RW, Schiefelbein JW** (1994) The *TTG* gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Dev. Biol.* **166**: 740-754
- Gallagher KL** (2013) Cellular patterning of the root meristem: genes and signals. En: *Plant roots, the hidden half*. CRC Press. Nueva York, E. U. A.
- Gichner T, Patková Z, Száková J, Demnerová K** (2006) Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **65**: 420-426
- Gomes MA, Hauser-Davis RA, Suzuki MS, Vitória AP** (2017) Plant chromium uptake and transport, physiological effects and recent advances in molecular investigations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **140**: 55-64
- Grieneisen VA, Xu J, Marée AFM, Hogeweg P, Scheres B** (2007) Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**: 1008–1013
- Grierson C, Schiefelbein J** (2002) Root hairs. *Arabidopsis Book* 1: e0060
- Gutierrez C** (2009) The *Arabidopsis* cell division cycle. *Arabidopsis Book / ASPB* 7: e0120
- Hamann T, Benkova E, Bäurle, I, Kientz M, Jürgens G** (2002) The *Arabidopsis* *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting *MONOPTEROS*-mediated embryo patterning. *Genes & Dev.* **16**: 1610-1615
- Hardtke CS, Berleth T** (1998) The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J.* **17**: 1405-1411
- Hartig K, Beck E** (2006) Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biol.* **8**: 389-396
- Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser M, Benfey PN** (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* **101**: 555-567

- Hemerly AS, Ferreira P, de Almeida Engler J, Van Montagu M, Engler G, Inzé D** (1993) *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* **5**: 1711-1723
- Hernández-Onate MA, Esquivel-Naranjo EU, Mendoza-Mendoza A, Stewart A, Herrera-Estrella AH** (2012) An injury-response mechanism conserved across kingdoms determines entry of the fungus *Trichoderma atroviride* into development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 14918-14923
- Hertel R** (1995) Auxin binding protein 1 is a red herring. *J. Exp. Bot.* **46**: 461-462
- Heyman J, Cools T, Canher B, Shavialenka S, Traas J, Vercauteren I, Van den Daele H, Persiau G, De Jaeger G, Sugimoto K** (2016) The heterodimeric transcription factor complex ERF115-PAT1 grants regeneration competence. *Nat Plants.* **2**: 16165
- Heyman J, Cools T, Vandenbussche F, Heyndrickx KS, Van Leene J, Vercauteren I, Vanderauwera S, Vandepoele K, De Jaeger G, Van Der Straeten D, De Veylder L** (2013) ERF115 controls root quiescent center cell division and stem cell replenishment. *Science* **342**: 860-863
- Holford ICR** (1997) Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Aust. J. Soil Res.* **35**: 227-240
- Hu J, Zhang Y, Wang J, Zhou Y** (2014) Glycerol affects root development through regulation of multiple pathways in *Arabidopsis*. *PLOS ONE* **9**: e86269
- Hu Y, Xie Q, Chua NH** (2003) The *Arabidopsis* auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size. *Plant Cell* **15**: 1951-1961
- Hudik E, Yoshioka Y, Domenichini S, Bourge M, Soubigout-Taconnat L, Mazubert C, Yi D, Bujaldon S, Hayashi H, De Veylder L, Bergounioux C, Benhamed M, Raynaud C** (2014) Chloroplast dysfunction causes multiple defects in cell cycle progression in the *Arabidopsis* crumpled leaf mutant. *Plant Physiol.* **166**: 152-167
- Ikeuchi M, Ogawa Y, Iwase A, Sugimoto K** (2016) Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development* **143**: 1442-1451
- Imasaki T, Calero G, Cai G, Tsai K, Yamada K, Cardelli F, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Berger I, Kornberg GL, Asturias FJ, Kornberg RD, Takagi Y** (2011) Architecture of the Mediator head module. *Nature* **475**: 240-243
- Ivanov VB, Dubrovsky JG** (2013) Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends Plant Sci.* **18**: 237-243
- Karunyal S, Renuga G, Kailash P** (1994) Effects of tannery effluent on seed germination, leaf area, biomass and mineral content of some plants. *Bioresour. Technol.* **47**: 215-218
- Keunen E, Remans T, Bohler S, Vangronsveld J, Cuypers A** (2011) Metal-induced oxidative stress and plant mitochondria. *Int. J. Mol. Sci.* **12**: 6894-6918
- Kidd BN, Cahill DM, Manners JM, Schenk PM, Kazan K** (2011) Diverse roles of the Mediator complex in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**: 741-748

- Kidner C, Sundaresan V, Roberts K, Dolan L** (2000) Clonal analysis of the *Arabidopsis* root confirms that position, not lineage, determines cell fate. *Planta* **211**: 191-199
- Kotaś J, Stasicka Z** (2000) Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ. Pollut.* **107**: 263-283
- Kovalchuk O, Titov V, Hohn B, Kovalchuk I** (2001) A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment. *Nat. Biotechnol.* **19**: 568-572
- Krämer U** (2015) Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife* **4**: e06100
- Lai Z, Schluttenhofer CM, Bhide K, Shreve J, Thimmapuram J, Lee SY, Yun D, Mengiste T** (2014) MED18 interaction with distinct transcription factors regulates multiple plant functions. *Nat Commun.* **5**: 3064
- Laskowski M, Ten Tusscher KH** (2017) Periodic lateral root priming: what makes it tick? *Plant Cell.* **29**: 432-444
- Lenhoff SG, Lenhoff HM, A. T** (1986) Hydra and the birth of experimental biology, 1744: Abraham Trembley's Memoirs concerning the natural history of a type of freshwater polyp with arms shaped like horns. Boxwood Press.
- Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* **28**: 465-474
- Ljung K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J, Sandberg G** (2005) Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* **17**: 1090-1104
- López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Calderón L, Nieto-Jacobo MF, Simpson J, Herrera-Estrella L** (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol.* **129**: 244-256
- López-Bucio J, Ortiz-Castro R, Ruíz-Herrera LF, Juárez C, Hernández-Madrigal F, Carreón-Abud Y, Martínez-Trujillo M** (2015) Chromate induces adventitious root formation via auxin signalling and *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene function in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals* **28**: 353-365
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Pérez-Torres A, Ramírez-Pimentel JG, Sánchez-Calderón L, Herrera-Estrella L** (2005) Root Architecture. En: *Plant architecture and its manipulation*. Annu. Plant Rev. CRC Press
- Loughner CL, Bruford EA, McAndrews MS, Delp EE, Swamynathan S, Swamynathan SK** (2016) Organization, evolution and functions of the human and mouse *Ly6/uPAR* family genes. *Hum. Genomics* **10**: 10
- Luo J, Zhou J, Zhang J** (2018) Aux/IAA gene family in plants: molecular structure, regulation, and function. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: 259
- Lynch J** (1995) Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol.* **109**: 7-13
- Malamy JE** (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ.* **28**: 67-77

- Marschner P** (2012) Mineral nutrition of higher plants. In P Marschner, ed, Marschner's mineral nutrition of higher plants. Academic Press. San Diego, California, E. U. A.
- Martinez-Trujillo M, Mendez-Bravo A, Ortiz-Castro R, Hernandez-Madrigal F, Ibarra-Laclette E, Ruiz-Herrera LF, Long TA, Cervantes C, Herrera-Estrella L, Lopez-Bucio J** (2014) Chromate alters root system architecture and activates expression of genes involved in iron homeostasis and signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **86**: 35-50
- Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M, Hanada A, Yaeno T, Shirasu K, Yao H, McSteen P, Zhao Y, Hayashi K, Kamiya Y, Kasahara H** (2011) The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 18512-18517
- Mauseth JD** (2003) Botany: an introduction to plant biology. Jones and Bartlett Publishers
- Meyerowitz EM** (1987) *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Genet.* **21**: 93-111
- Mhamdi A, Van Breusegem F** (2018) Reactive oxygen species in plant development. *Development* **145**
- Michniewicz M, Brewer PB, Friml J** (2007) Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *Arabidopsis Book / ASPB* **5**: e0108
- Mironov V, De Veylder L, Van Montagu M, Inzé D** (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants—the nexus. *Plant Cell* **11**: 509-521
- Mittler R** (2017) ROS are good. *Trends Plant Sci.* **22**: 11-19
- Mockaitis K, Estelle M** (2008) Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **24**: 55-80
- Mohan D, Pittman CU** (2006) Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water. *J. Hazard Mater.* **137**: 762-811
- Moller BK, Xuan W, Beeckman T** (2017) Dynamic control of lateral root positioning. *Curr. Opin. Plant Biol.* **35**: 1-7
- Morris DA, Friml J, Zařimalová E** (2010) The transport of auxins. En: *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* Springer. Dordrecht, Países Bajos.
- Munzuroglu O, Geckil H** (2002) Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **43**: 203-213
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio. assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497
- Nakagami H, Sekine M, Murakami H, Shinmyo A** (1999) Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclinD *in vitro*. *Plant J.* **18**: 243-252
- Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN** (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* **413**: 307-311
- Nardmann J, Werr W** (2007) The evolution of plant regulatory networks: what *Arabidopsis* cannot say for itself. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 653-659

- Nawy T, Lee J-Y, Colinas J, Wang JY, Thongrod SC, Malamy JE, Birnbaum K, Benfey PN** (2005) Transcriptional profile of the *Arabidopsis* root quiescent center. *Plant Cell* **17**: 1908-1925
- Nowoshilow S, Schloissnig S, Fei J, Dahl A, Pang AWC, Pippel M, Winkler S, Hastie AR, Young G, Roscito JG, Falcon F, Knapp D, Powell S, Cruz A, Cao H, Habermann B, Hiller M, Tanaka EM, Myers EW** (2018) The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature* **554**: 50-55
- Ottenschläger I, Wolff P, Wolverton C, Bhalerao RP, Sandberg G, Ishikawa H, Evans M, Palme K** (2003) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 2987-2991
- Ouellet F, Overvoorde PJ, Theologis A** (2001) IAA17/AXR3: biochemical insight into an auxin mutant phenotype. *Plant Cell* **13**: 829-841
- Overvoorde PJ, Okushima Y, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Liu A, Onodera C, Quach H, Smith A, Yu G, Theologis A** (2005) Functional genomic analysis of the *AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID* gene family members in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **17**: 3282-3300
- Pallas PS, Bylaert JJ, Fokke S, Kauke JF, Milsan, Muys R, Schouman A** (1766) *Miscellanea zoologica : quibus novae imprimis atque obscurae animalium species describuntur et observationibus iconibusque illustrantur.* Apud Petrum van Cleef, Hagae Comitum.
- Panda SK, Choudhury S** (2005) Chromium stress in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* **17**: 95-102
- Panda SK, Patra HK** (2000) Nitrate and ammonium ions effect on the chromium toxicity in developing wheat seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. India. Section B, Biological Sciences* **70**: 75-80
- Parry G, Calderon-Villalobos LI, Prigge M, Peret B, Dharmasiri S, Itoh H, Lechner E, Gray WM, Bennett M, Estelle M** (2009) Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 22540-22545
- Peret B, De Rybel B, Casimiro I, Benkova E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ** (2009) *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* **14**: 399-408
- Petrášek J, Mravec J, Bouchard R, Blakeslee JJ, Abas M, Seifertová D, Wiśniewska J, Tadele Z, Kubeš M, Čovanová M, Dhonukshe P, Skúpa P, Benková E, Perry L, Křeček P, Lee OR, Fink GR, Geisler M, Murphy AS, Luschnig C, Zažímalová E, Friml J** (2006) PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* **312**: 914-918
- Polyn S, Willems A, De Veylder L** (2015) Cell cycle entry, maintenance, and exit during plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **23**: 1-7
- Raya-Gonzalez J, López-Bucio JS, Prado-Rodriguez JC, Ruiz-Herrera LF, Guevara-Garcia AA, Lopez-Bucio J** (2017) The MEDIATOR genes *MED12* and *MED13* control *Arabidopsis* root system configuration influencing sugar and auxin responses. *Plant Mol. Biol.* **95**: 141-156
- Raya-González J, Oropeza-Aburto A, López-Bucio JS, Guevara-García AA, De Veylder L, López-Bucio J, Herrera-Estrella L** (2018) MEDIATOR 18 influences *Arabidopsis* root architecture,

- represses auxin signaling and is a critical factor for cell viability in root meristems. En revisión. *Plant J.*
- Raya-Gonzalez J, Ortiz-Castro R, Ruiz-Herrera LF, Kazan K, López-Bucio J** (2014) PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME1/MEDIATOR25 regulates lateral root formation via auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **165**: 880-894
- Reinhardt D, Mandel T, Kuhlemeier C** (2000) Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* **12**: 507-518
- Rich T, Allen RL, Wyllie AH** (2000) Defying death after DNA damage. *Nature* **407**: 777-783
- Richards KD, Schott EJ, Sharma YK, Davis KR, Gardner RC** (1998) Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **116**: 409-418
- Rodriguez E, Azevedo R, Fernandes P, Santos C** (2011) Cr(VI) induces DNA damage, cell cycle arrest and polyploidization: a flow cytometric and comet assay study in *Pisum sativum*. *Chem. Res. Toxicol.* **24**: 1040-1047
- Rogers ED, Benfey PN** (2015) Regulation of plant root system architecture: implications for crop advancement. *Curr. Opin. Biotechnol.* **32**: 93-98
- Rosspopoff O, Chelysheva L, Saffar J, Lecorgne L, Gey D, Caillieux E, Colot V, Roudier F, Hilson P, Berthomé R, Da Costa M, Rech P** (2017) Direct conversion of root primordium into shoot meristem relies on timing of stem cell niche development. *Development* **144**:1187-1200
- Roudier F, Fedorova E, Lebris M, Lecomte P, Györgyey J, Vaubert D, Horvath G, Abad P, Kondorosi A, Kondorosi E** (2003) The Medicago species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs. *Plant Physiol.* **131**: 1091-1103
- Russell LJ, Helen O, Howard T, Susan W** (2013) The molecular life of plants. Wiley-Blackwell.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, Scheres B** (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **99**: 463-472
- Sánchez-Calderón L, Ibarra-Cortés ME, I. Z-J** (2013) Root development and abiotic stress adaptation. En *Abiotic stress - Plant responses and applications in agriculture*. IntechOpen
- Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, Lenhard M, Hashimoto T, Nakajima K, Scheres B, Heidstra R, Laux T** (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**: 811-814
- Scheres B, Wolkenfelt H, Willemsen V, Terlouw M, Lawson E, Dean C, Weisbeek P** (1994) Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* **120**: 2475-2487
- Schumacher B, Hofmann K, Boulton S, Gartner A** (2001) The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Curr. Biol.* **11**: 1722-1727
- Sena G, Birnbaum KD** (2010) Built to rebuild: in search of organizing principles in plant regeneration. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**: 460-465

- Sena G, Wang X, Liu H-Y, Hofhuis H, Birnbaum KD** (2009) Organ regeneration does not require a functional stem cell niche in plants. *Nature* **457**: 1150–1153
- Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S** (2005) Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* **31**: 739-753
- Shanker AK, Djanaguiraman M, Sudhagar R, Chandrashekar CN, Pathmanabhan G** (2004) Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek. cv CO 4) roots. *Plant Sci.* **166**: 1035-1043
- Sharma DC, Sharma CP** (1993) Chromium uptake and its effects on growth and biological yield of wheat. *Cereal Res. Commun.* **21**: 317-322
- Shibasaki K, Uemura M, Tsurumi S, Rahman A** (2009) Auxin response in *Arabidopsis* under cold stress: underlying molecular mechanisms. *Plant Cell* **21**: 3823-3838
- Shimizu-Sato S, Mori H** (2001) Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiol.* **127**: 1405-1413
- Skeffington RA, Shewry PR, Peterson PJ** (1976) Chromium uptake and transport in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* **132**: 209-214
- Skoog F, Miller CO** (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **11**: 118-130
- Spallanzani L** (1769) Prodrómo di un' opera da imprimersi sopra le riproduzioni animali (An essay on animal reproduction). En: Modena: Nella Stamperia di Giovanni Montanari. T. Becket & DeHondt. Londres.
- Strader LC, Zhao Y** (2016) Auxin perception and downstream events. *Curr. Opin. Plant Biol.* **33**: 8-14
- Sugimoto K, Gordon SP, Meyerowitz EM** (2011) Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol.* **21**: 212-218
- Takatsuka H, Umeda M** (2014) Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *J. Exp. Bot.* **65**: 2633-2643
- Tan X, Calderon-Villalobos LIA, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M, Zheng N** (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**:640-645
- Tanaka EM, Reddien PW** (2011) The cellular basis for animal regeneration. *Dev. Cell* **21**: 172-185
- Tang S, Wilke B, R. Brooks R** (2007) Heavy-metal uptake by metal-tolerant *Elsholtzia haichowensis* and *Commelina communis* from China. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **32**: 895-905
- Theologis A, Huynh TV, Davis RW** (1985) Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. *J. Mol. Biol.* **183**: 53-68
- Thimann KV, Koepfli JB** (1935) Identity of the growth-promoting and root-forming substances of plants. *Nature* **135**: 101–102
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ** (2004) Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* **16**: 533-543
- Tosh D, Slack JM** (2002) How cells change their phenotype. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**: 187-194

- Ubeda-Tomás S, Beemster GTS, Bennett MJ** (2012) Hormonal regulation of root growth: integrating local activities into global behaviour. *Trends Plant Sci.* **17**: 326-331
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**: 1963-1971
- Vajpayee P, Tripathi RD, Rai UN, Ali MB, Singh SN** (2000) Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere* **41**: 1075-1082
- Van den Berg C, Willemsen V, Hage W, Weisbeek P, Scheres B** (1995) Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature* **378**: 62-65
- Van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B** (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* **390**: 287-289
- Verbelen J, De Cnodder T, Le J, Vissenberg K, 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 Signal Behav.* **1**: 296-304
- Vernoux T, Robert S** (2017) Auxin 2016: a burst of auxin in the warm south of China. *Development* **144**: 533-540
- Vert G, Chory J** (2011) Crosstalk in cellular signaling: background noise or the real thing? *Dev. Cell* **21**: 985-991
- Wabnik K, Govaerts W, Friml J, Kleine-Vehn J** (2011) Feedback models for polarized auxin transport: an emerging trend. *Mol. Biosyst.* **7**: 2352-2359
- Walker JC, Key JL** (1982) Isolation of cloned cDNAs to auxin-responsive poly(A) RNAs of elongating soybean hypocotyl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**: 7185-7189
- Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM** (2003) Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* **132**: 44-51
- Wallace A, Soufi SM, Cha JW, Romney EM** (1976) Some effects of chromium toxicity on bush bean plants grown in soil. *Plant Soil* **44**: 471-473
- Wang W, Vinocur B, Altman A** (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1-14
- Waszczak C, Carmody M, Kangasjarvi J** (2018) Reactive oxygen species in plant signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**: 209-236
- Weijers D, Benkova E, Jäger KE, Schlereth A, Hamann T, Kientz M, Wilmoth JC, Reed JW, Jürgens G** (2005) Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO J.* **24**: 1874-1885
- Weijers D, Nemhauser J, Yang Z** (2018) Auxin: small molecule, big impact. *J. Exp. Bot.* **69**: 133-136
- Wildwater M, Campilho A, Perez-Perez JM, Heidstra R, Bliilou I, Korthout H, Chatterjee J, Mariconti L, Gruissem W, Scheres B** (2005) The *RETINOBLASTOMA-RELATED* gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots. *Cell* **123**: 1337-1349

- Williamson LC, Ribrioux SPCP, Fitter AH, Leyser HMO** (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**: 875-882
- Wiśniewska J, Xu J, Seifertová D, Brewer PB, Růžicka K, Blilou I, Rouquié D, Benková E, Scheres B, Friml J** (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* **312**: 883-883
- Woodward AW, Bartel B** (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* **95**: 707-735
- Xie Q, Sanz-Burgos AP, Hannon GJ, Gutiérrez C** (1996) Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J.* **15**: 4900-4908
- Xu A, Cheng L** (2016) Chemical transdifferentiation: closer to regenerative medicine. *Front. Med.* **10**: 152-165
- Xu J, Hofhuis H, Heidstra R, Sauer M, Friml J, Scheres B** (2006) A molecular framework for plant regeneration. *Science* **311**: 385-388
- Yang X, Lee S, So JH, Dharmasiri S, Dharmasiri N, Ge L, Jensen C, Hangarter R, Hobbie L, Estelle M** (2004) The IAA1 protein is encoded by *AXR5* and is a substrate of SCF(TIR1). *Plant J.* **40**: 772-782
- Yang Y, Li L, Qu L** (2016) Plant Mediator complex and its critical functions in transcription regulation. *J. Integr. Plant Biol.* **58**: 106-118
- Yao X, Yang H, Zhu Y, Xue J, Wang T, Song T, Yang Z, Wang S** (2018) The canonical E2Fs are required for germline development in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* **9**: 638
- Yi D, Alvim Kamei CL, Cools T, Vanderauwera S, Takahashi N, Okushima Y, Eekhout T, Yoshiyama KO, Larkin J, Van den Daele H, Conklin P, Britt A, Umeda M, De Veylder L** (2014) The *Arabidopsis* SIAMESE-RELATED cyclin-dependent kinase inhibitors SMR5 and SMR7 regulate the DNA damage checkpoint in response to reactive oxygen species. *Plant Cell* **26**: 296-309
- Yin JW, Wang G** (2014) The Mediator complex: a master coordinator of transcription and cell lineage development. *Development* **141**: 977-987
- Zayed A, Lytle CM, Qian J, Terry N** (1998) Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. *Planta* **206**: 293-299
- Zayed AM, Terry N** (2003) Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant Soil* **249**: 139-156
- Zeid IM** (2001) Responses of *Phaseolus vulgaris* to chromium and cobalt treatments. *Biol. Plantarum* **44**: 111-115
- Zheng Z, Guan H, Leal F, Grey PH, Oppenheimer DG** (2013) Mediator Subunit18 controls flowering time and floral organ identity in *Arabidopsis*. *PLOS ONE* **8**: e53924

## 10. Apéndice

Biológicas, Julio 2017, 19(1): 8–13



# La regeneración celular en las plantas

Bricia Ruiz Aguilar, Andrés Larios Contreras, Elda Beltrán Peña, José López Bucio<sup>✉</sup>

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

### Resumen

Las plantas están expuestas a diferentes tipos de estrés que deterioran sus tejidos. El ataque de microorganismos causantes de enfermedades como hongos y bacterias, la depredación por insectos y/o herbívoros, y el daño causado por el viento, la lluvia y el granizo comprometen la sobrevivencia. Por otra parte, la exposición a concentraciones altas de metales, la sequía y la salinidad afectan a la raíz, que es esencial para el funcionamiento del organismo por su papel en la captación de agua y nutrientes. La regeneración es un proceso de restauración que ocurre de manera permanente, ya que por este medio, se reparan las células, tejidos y órganos cuya funcionalidad es necesaria durante las diferentes transiciones del desarrollo y permite completar el ciclo de vida. En este trabajo se discuten los procesos celulares y mecanismos de señalización que posibilitan la regeneración en las plantas.

**Palabras clave:** Agobio ambiental, regeneración de tejidos, *Arabidopsis thaliana*, follaje, raíz.

### Abstract

Plants as sessile organisms are exposed to different types of stress, which often damage whole tissues. The attack by microorganisms, such as bacteria and fungi, as well as depredation by insects and herbivores, or damage by rain, grain and hail compromises surveillance. On the other hand, exposure to high concentrations of metals, drought, or salinity, affects the root, which is essential for plant functioning due to its role in water and nutrient acquisition. Regeneration is the process of cell, tissue and organ restoration that takes place under normal circumstances, but especially under environmental challenges, where mitotically competent cells receive a signal to recover affected tissues, allowing the plant continuing with the developmental and life cycle transitions. In this work, the cellular processes and signaling mechanisms underlying the regeneration in plants are discussed.

**Key words:** Environmental stress, tissue regeneration, *Arabidopsis thaliana*, shoot, root.

### Introducción

Las plantas manifiestan un programa de desarrollo post-embriionario altamente flexible, que les permite modificar el fenotipo del follaje y del sistema radical de acuerdo a las condiciones del medio (Bartels y Sunkar, 2005; Hu *et al.*, 2014). Existen dos tipos principales de estrés, que comprometen la viabilidad de los vegetales, el estrés biótico y abiótico. El primero ocurre por la interacción con otros organismos, como insectos herbívoros o microorganismos. El estrés abiótico ocurre cuando la planta percibe cambios en la temperatura, propiedades del suelo como pH, disponibilidad de nutrientes y agua, y se produce una respuesta adaptativa.

El daño en los tejidos causado por los diferentes tipos de agobio, puede inducir el programa de regeneración, lo que implica una regulación hormonal sobre la división, el crecimiento y la diferenciación celular (Sugimoto *et al.*, 2011). En este proceso, participan factores de transcripción como WUSCHEL (WUS) y SHOOT MERISTEMLESS (STM), que juegan un papel importante en la organogénesis del follaje, mientras que en la regeneración de la raíz se relaciona a las proteínas PLETHORA (PLT), SHORT ROOT (SHR), y SCARECROW (SCR) (Xu *et al.*, 2006; Rosspopoff *et al.*, 2017).

### Estrés biótico

#### Microorganismos patógenos

Comúnmente, se reconocen diferentes tipos de interacciones entre los seres vivos, Bary (1879) definió la simbiosis como "la convivencia benéfica entre organismos diferentes", mientras que en el parasitismo

un solo organismo prolifera a expensas de otro(s). Existe una amplia variedad de microorganismos que establecen relaciones con las plantas, entre ellos, algunas bacterias, hongos, oomicetos y nematodos que pueden causar enfermedades. Las bacterias entran a las plantas a través de heridas o aperturas naturales, como los estomas, que se localizan en la epidermis de las hojas, como en el caso de *Pseudomonas syringae*, la cual infecta una amplia variedad de especies, provocando desde manchas necróticas hasta la muerte (Melotto *et al.*, 2006).

Entre los hongos y oomicetos se encuentran patógenos biotróficos o necrótrofos de gran importancia agrícola, debido al daño que causan en la raíz. Los biotrófos dependen de las células vivas del hospedero para obtener su alimento, mientras que los necrótrofos, causan la muerte de los tejidos debido a la liberación de enzimas y toxinas. Por ejemplo, *Fusarium oxysporum* y *Verticillium dahliae*, ocasionan la marchitez y una muerte temprana de la planta (Raaijmakers *et al.*, 2009). Por otra parte, algunos nematodos parasitan la raíz formando agallas que comprometen la captación de agua y nutrientes (Perry y Moens, 2006; Raaijmakers *et al.*, 2009).

La infección por un patógeno vegetal puede ser detectada gracias al sistema de defensa en el que se perciben moléculas secretadas o componentes estructurales de las células (MAMPs o PAMPs; por sus siglas en inglés) como la flagelina, un componente de los flagelos bacterianos, a través de los receptores de reconocimiento (PRRs). Otras sustancias efectoras, interaccionan con las proteínas de la familia NB-LRR (Nucleotide Binding site plus Leucine-Rich Repeat), codificadas por los genes denominados *R*, activando así una resistencia contra los patógenos (Dangl y Jones, 2001; Jones y Dangl, 2006; Henry *et al.*, 2013). Las moléculas que son secretadas por los microorganismos

✉ Dr. José López Bucio, jlbucio@umich.mx, joselopezbucio@yahoo.com.mx

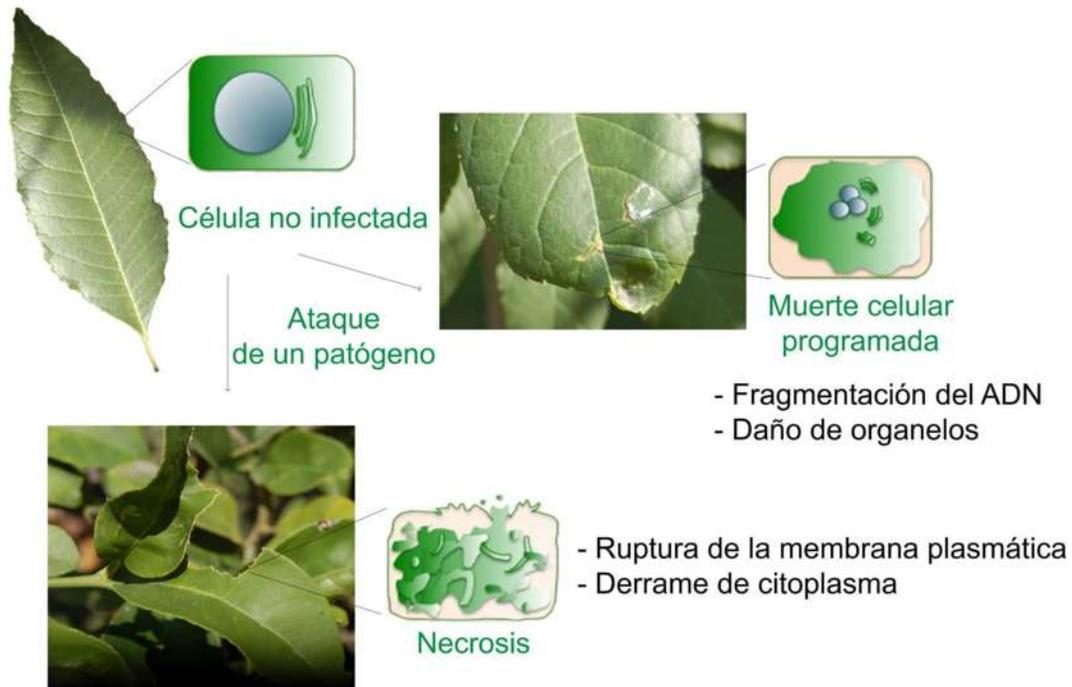
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio A-1, CP 58030 Morelia, Michoacán, México.

y percibidas por el hospedero, como los inhibidores de enzimas, las proteínas pequeñas ricas en cisteína y las de la familia RXLR, pueden afectar el metabolismo de la planta y disminuir las respuestas de defensa (Henry *et al.*, 2013; Bhat y Shanaz, 2014).

Los vegetales reaccionan ante la infección por un patógeno mediante la lisis de las células de la epidermis para evitar la proliferación y diseminación del microorganismo (Mittler *et al.*, 1997; Ashida *et al.*, 2011). El proceso de Muerte Celular Programada (PCD; por sus siglas en inglés), análogo al programa de apoptosis en animales, implica la participación de enzimas con función parecida a las caspasas (Mittler *et al.*, 1997; Reape y McCabe, 2008). El hongo *Fusarium verticillioides* y el oomiceto *Hyaloperonospora arabidopsidis* inducen PCD en *Arabidopsis* (Dickman y Figueiredo, 2013). Otro tipo de muerte celular, que se puede manifestar es la necrosis, que comprende un daño rápido y masivo en los tejidos vegetales, como el que se manifiesta durante la infección por *Botrytis cinerea* o por el daño a las hojas causado por insectos y herbívoros (Figura 1) (Reape y McCabe, 2008; Dickman y Figueiredo, 2013).

**Daños por herbivoría**

En una co-evolución constante, las plantas han desarrollado mecanismos para defenderse del daño causado por herbívoros, ya sea mediante el reconocimiento de moléculas extrañas o de compuestos estructurales de las células dañadas. Algunos grupos representativos de insectos herbívoros son: Lepidóptera (larvas de mariposas y polillas), Díptera (larvas de moscas), Coleóptera (escarabajos), Hemíptera (áfidos) e Himenóptera (hormigas) (Pentzold *et al.*, 2014). De forma directa, las plantas pueden protegerse mediante la formación de pelos radicales, tricomas, espinas, engrosamiento de las hojas, o mediante la síntesis de terpenoides, alcaloides, antocianinas, fenoles y quinonas, que son tóxicas e inhiben la depredación (War *et al.*, 2012). También se liberan volátiles que atraen a otros organismos con función antagónica, que a su vez atacan a los herbívoros. Estos mecanismos de defensa pueden ser constitutivos o inducirse después de un daño, lo que confiere resistencia a los vegetales, evitando así ataques posteriores (War *et al.*, 2012). Un ejemplo de respuesta inducida es la síntesis de enzimas hidrolíticas como quitinasas, glucanasas



**Figura 1. El agobio ambiental y la muerte celular.** Diversos tipos de estrés como la herbivoría, el ataque de un patógeno o la exposición de las hojas al viento, la lluvia o el granizo pueden inducir la muerte celular programada (apoptosis), o la necrosis de los tejidos, comprometiendo la sobrevivencia del organismo. La fragmentación del ADN, o la liberación de componentes celulares promueven el proceso de regeneración para reemplazar los tejidos dañados.

y lisozimas que degradan a los polímeros de la pared celular de los patógenos (Freeman, 2008). Mientras que un mecanismo constitutivo de las plantas, involucra la producción de alcaloides para defenderse de hongos e insectos, como la cafeína, presente en *Coffea arabica*, *Camellia sinensis* y *Theobroma cacao*.

### Estrés abiótico

El estrés abiótico se manifiesta ante la sequía, calor, salinidad, estrés nutricional, por metales, luz ultravioleta, etc. La combinación de varios de los factores antes mencionados, puede exacerbar el daño producido por cada uno de ellos (Mittler, 2006). Por ejemplo, la toxicidad por los metales en los organismos varía según la concentración y el estado de oxidación de sus iones. Se ha descrito el daño al ADN en plantas que crecen en suelos contaminados por Al, Cd, Cu, Pb, y Zn (Gichner *et al.*, 2006), que puede ser directo o indirecto debido al incremento de Especies Reactivas de Oxígeno (ERÓs), causantes de estrés oxidativo (Bailey-Serres y Mittler, 2006; Sharma *et al.*, 2012). En esta situación, se induce la expresión de los genes que codifican para enzimas antioxidantes, entre las que se encuentran la superóxido dismutasa, la catalasa y la guaiacol peroxidasa (Sharma *et al.*, 2012).

El daño al ADN activa vías de reparación dependientes de las proteínas ATM (ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED) y de ATR (ATM- AND RAD3-RELATED), importantes para la regulación del ciclo celular (Heyman *et al.*, 2013; Eekhout *et al.*, 2017). La vía ATM activa la expresión de una gran cantidad de genes, entre ellos los que codifican para las proteínas inhibidoras de cinasas dependientes de ciclina, como la SMR5 y la SMR7 (SIAMESE-RELATED 5, 7), las cuales detienen el ciclo celular (Culligan *et al.*, 2006; Hudík *et al.*, 2014; Yi *et al.*, 2014; Polyn *et al.*, 2015; Waterworth *et al.*, 2016).

### Regeneración de tejidos

Los estudios de regeneración de tejidos en plantas iniciaron hace más de 200 años, cuando Henri-Louis Duhamel du Monceau observó una formación espontánea de "callo", término que se refiere a una masa celular indiferenciada (Ikeuchi *et al.*, 2013). Hermann Vöchting (1878) publicó un trabajo donde describió cortes transversales de tejidos que podían dar lugar a brotes o a raíces como una reacción al daño mecánico. Reehinger (1893), observó la formación de plantas completas a partir de brotes de tallos o raíces, trabajos que sentaron las bases del cultivo de tejidos *in vitro*, en el que se utilizan fitoreguladores como auxinas y citoquininas para reprogramar los procesos de crecimiento, desarrollo y diferenciación (Bhojwani y Razdan, 1996).

En los tejidos indiferenciados, como callos, o en el periciclo, tejido interno de la raíz a partir del cual se forman las raíces laterales, se expresan genes

con funciones similares (Rosspopoff *et al.*, 2017). Esto ha planteado la posibilidad de que durante la organogénesis, se pueda controlar la producción de raíces o follaje, modulando los niveles de auxinas y de citoquininas, aspectos independientes al origen de los explantes (Sugimoto *et al.*, 2011; Rosspopoff *et al.*, 2017). Actualmente, se continúa con las investigaciones para tratar de entender los estadios por los que transcurren las células al regenerarse los tejidos, como la transdiferenciación, proceso en el que un tejido produce células proliferativas que se diferencian en un tejido distinto (**Figura 2**) (Sugimoto *et al.*, 2011; Rosspopoff *et al.*, 2017).

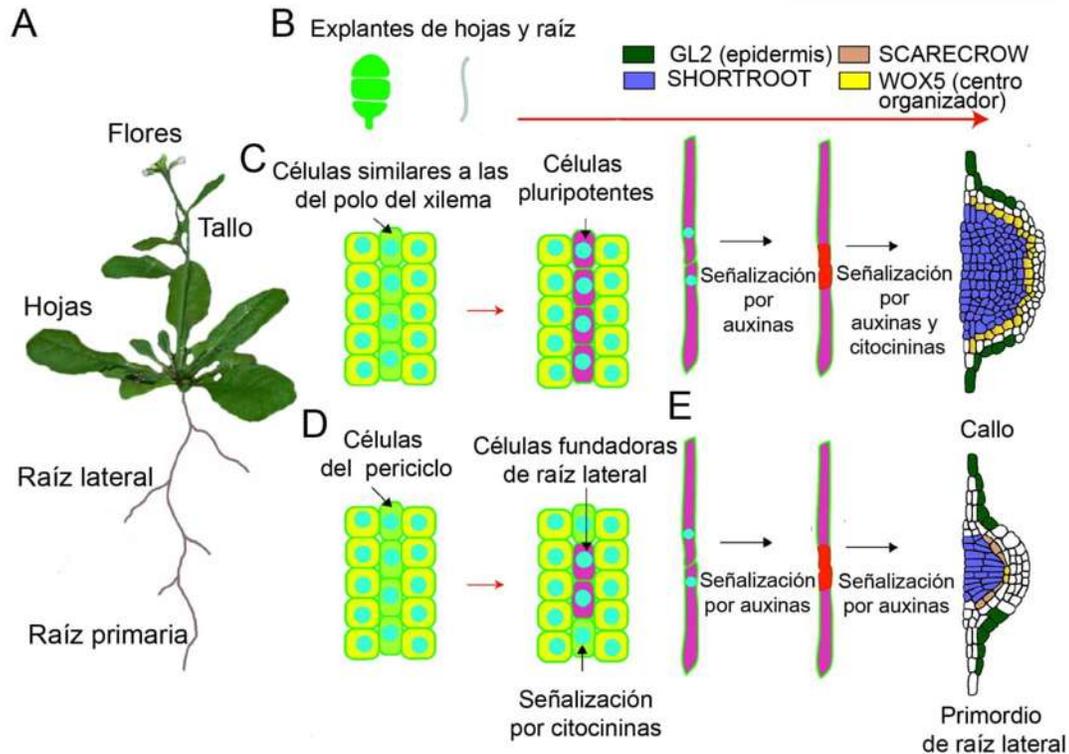
El tejido proliferativo por excelencia en la raíz es el meristemo, en donde se localiza al centro quiescente (QC; por sus siglas en inglés). El QC está formado por cuatro células con baja actividad mitótica, que están en contacto directo con todas y cada una de las células iniciales de la raíz. Al dividirse una célula progenitora, el QC mantendrá a la célula proximal a él como inicial y a la distal como célula hija, la cual posteriormente, se dividirá varias veces más hasta diferenciarse, dando lugar a un linaje celular específico (van den Berg *et al.*, 1997). En *Arabidopsis*, el daño al ADN induce la división del QC para reemplazar a las células que sufrieron apoptosis o necrosis (Kidner *et al.*, 2000; Heyman *et al.*, 2013), mediante un proceso que implica la expresión de los factores de transcripción *WOX5*, *PLT3*, *PLT5* y *PLT7*. *SCR* y *SHR* (Heyman *et al.*, 2016).

### Factores de regeneración en la raíz

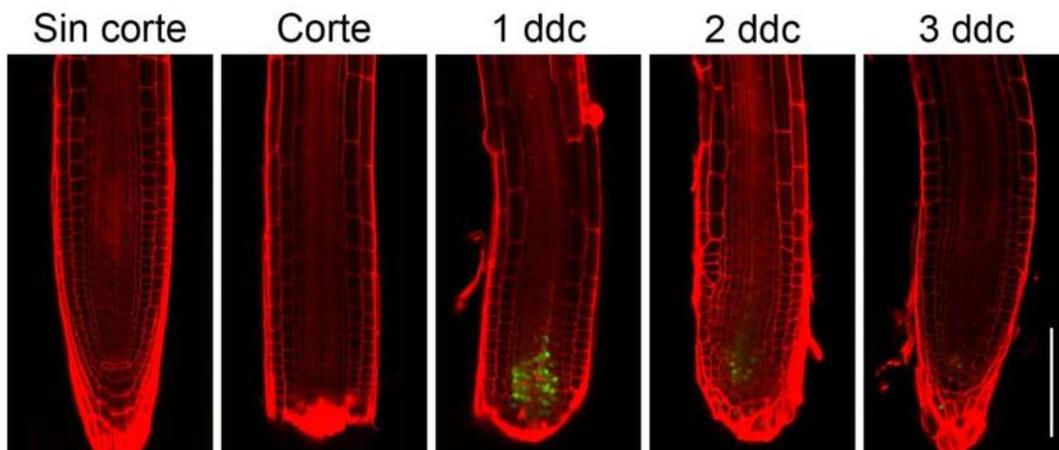
Heyman y col. (2013) observaron que con la exposición de la raíz a fármacos como la bleomicina, que causan daño al ADN, se induce la muerte celular en el meristemo, lo que induce la acumulación de la proteína ETHYLENE RESPONSE FACTOR115 (ERF115) (Heyman *et al.*, 2013). Estudios de interacciones moleculares condujeron a la identificación del factor PHYTOCHROME A SIGNAL TRANSDUCTION1 (PAT1) perteneciente a la familia SCARECROW (GRAS), que forma dímeros con ERF115. Los investigadores realizaron un experimento donde escindieron la punta de la raíz de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan los promotores de los genes ERF115 y PAT1 fusionados al gen reportero de la proteína verde fluorescente, observando una colocalización que antecede a la regeneración del tejido (**Figura 3**). Por otra parte, las líneas mutantes *erf115* y *pat1* carecen de la capacidad de regeneración anteriormente mencionada, lo que permitió concluir que el complejo ERF115-PAT1 es crucial para la recuperación del meristemo de la raíz en respuesta a un agobio ambiental (Heyman *et al.*, 2016).

### Conclusiones

Las plantas han desarrollado mecanismos para recuperarse del daño causado por la exposición a factores bióticos y abióticos, que posibilitan su



**Figura 2. Similitud en la formación de un callo y la organogénesis de la raíz lateral.** **A)** Esquema de una planta de *Arabidopsis* donde se muestran los diferentes órganos primarios. **B)** Los explantes de tejidos vegetales *in vitro* producen células pluripotentes que se dividen para formar un callo **C)** o una raíz lateral. **E)** La iniciación de la raíz lateral ocurre mediante divisiones asimétricas reguladas por el factor transcripcional ALF4 y la señalización de auxinas. Divisiones subsiguientes crean un primordio con la morfología mostrada y la expresión de los reguladores del desarrollo de la raíz *SHORTROOT*, *SCARECROW*, *WUSCHEL RELATED HOMEBOX 5 (WOX5)*, y *GLABRA2 (GL2)*. Figura modificada de Perianez-Rodríguez *et al.*, (2014).



**Figura 3. Regeneración del ápice de la raíz de *Arabidopsis*.** Imágenes de una raíz de *Arabidopsis*, en el momento del corte, y al primer, segundo y tercer día después del corte (ddc). La regeneración va acompañada por la expresión del marcador *ERF115:GUS/GFP* (en color verde) en el día 1. Fotos tomadas por microscopía confocal. n=20. Barra de escala 100 µm.

adaptación y sobrevivencia. Algunos genes y proteínas, como los factores ERF115 y PAT1 desempeñan una función clave para restaurar el tejido ante las alteraciones del material genético, a través de la activación de un grupo de células en el meristemo radicular. El estudio de *Arabidopsis thaliana*, por su ciclo de vida corto y la disponibilidad de germoplasma, representa un modelo de creciente importancia para el entendimiento de los programas de muerte y regeneración celular en eucariontes, aspectos relevantes en la agricultura y la medicina, por su impacto en la regeneración y cultivo *in vitro* de órganos. La identificación de nuevos genes que participan en el programa de regeneración, permitirá esclarecer que tan diferente es este proceso en relación a otros organismos como los invertebrados y las salamandras, que manifiestan una alta capacidad para recuperar los apéndices dañados.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento de las investigaciones en el área de la regeneración celular.

### Referencias

Ashida H, Mimuro H, Ogawa M, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, Sasakawa C (2011) Cell death and infection: A double-edged sword for host and pathogen survival. *J. Cell Biol.* 195: 931-942

Bailey-Serres J, Mittler R (2006) The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* 141: 311-311

Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24: 23-58

Bhat BS, Shanaz E (2014) Effectors-role in host-pathogen interaction. *J. Agr. Env. Sci.* 3: 265-285

Bhojwani SS, Razdan M.K (1996) Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Vol 5. 1st Ed. Elsevier Science

Culligan KM, Robertson CE, Foreman J, Doerner P, Britt AB (2006) ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J.* 48: 947-961

Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833

Dickman MB, de Figueiredo P (2013) Death be not proud: Cell death control in plant fungal interactions. *PLoS Pathogens* 9:e1003542

Eekhout T, Larsen P, de Veylder L (2017) Modification of DNA checkpoints to confer aluminum tolerance. *Trends Plant Sci.* 22: 102-105

Freeman BC, Beattie GA (2008) An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *Plant Pathology and Microbiology Publications.*

Gichner T, Patková Z, Száková J, Demnerová K (2006) Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 65: 420-426

Henry E, Yadeta KA, Coker G (2013) Recognition of bacterial plant pathogens: local, systemic and transgenerational

immunity. *New Phytol.* 199: 908-915

Heyman J, Cools T, Canher B, Shavialenka S, Traas J, Vercauteren I, Van den Daele H, Persiau G, De Jaeger G, Sugimoto K (2016) The heterodimeric transcription factor complex ERF115-PAT1 grants regeneration competence. *Nat. Plants* 2: 16165

Heyman J, Cools T, Vandenbussche F, Heyndrickx K.S, Van Leene J, Vercauteren I, Vanderauwera S, Vandepoelle K, De Jaeger G, Van Der Straeten D, de Veylder L (2013) ERF115 controls root quiescent center cell division and stem cell replenishment. *Science* 342: 860-863

Hu J, Zhang Y, Wang J, Zhou Y (2014) Glycerol affects root development through regulation of multiple pathways in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 9: e86269

Hudik E, Yoshioka Y, Domenichini S, Bourge M, Soubigout-Tacconat L, Mazubert C, Yi D, Bujaldon S, Hayashi H, De Veylder L, Bergounioux C, Benhamed M, Raynaud C (2014) Chloroplast dysfunction causes multiple defects in cell cycle progression in the *Arabidopsis* crumpled leaf mutant. *Plant Physiol.* 166: 152-167

Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A (2013) Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* 25: 3159-3173

Jones JD, Dangl J.L (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329

Kidner C, Sundaresan V, Roberts K, Dolan L (2000) Clonal analysis of the *Arabidopsis* root confirms that position, not lineage, determines cell fate. *Planta* 211: 191-199

Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969-980

Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* 11: 15-19

Mittler R, Simon L, Lam E (1997) Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *J. Cell Sci.* 110: 1333-1344

Pentzold S, Zagrobelny M, Roelsgaard PS, M Iler BL, Bak S (2014) The multiple strategies of an insect herbivore to overcome plant cyanogenic glucoside defence. *PLOS ONE* 9: e91337

Perianez-Rodríguez J, Manzano C, Moreno-Risueno MA (2014) Post-embryonic organogenesis and plant regeneration from tissues: two sides of the same coin? *Front. Plant Sci.* 5: 219

Perry RN, Moens M (2006) Plant nematology. *CABI Book*

Polyn S, Willems A, De Veylder L (2015) Cell cycle entry, maintenance, and exit during plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 23: 1-7

Raaijmakers J.M, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moënné-Loccoz Y (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321: 341-361

Reape TJ, McCabe PF (2008) Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytol.* 180: 13-26

Rosspopoff O, Chelysheva L, Saffar J, Lecorgne L, Gey D, Caillieux E, Colot V, Roudier F, Hilson P, Berthomé R, Da Costa M, Rech P (2017) Direct conversion of root primordium into shoot meristem relies on timing of stem

- cell niche development. *Development* 44:1187-1200
- Sharma P, Jha AB, Dubey R.S, Pessaraki M** (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012: 1-26
- Sugimoto K, Gordon SP, Meyerowitz EM** (2011) Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol.* 21: 212-218
- Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM** (2010) Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev. Cell.* 18: 463-471
- van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P y Scheres B** (1997) Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* 390: 287-289
- War AR, Paulraj MG, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B, Ignacimuthu S, Sharma HC** (2012) Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* 7: 1306-1320
- Waterworth W.M, Footitt S, Bray CM, Finch-Savage WE, West CE** (2016) DNA damage checkpoint kinase ATM regulates germination and maintains genome stability in seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 113: 9647-9652
- Xu J, Hofhuis H, Heidstra R, Sauer M, Friml J, Scheres B** (2006) A molecular framework for plant regeneration. *Science* 311: 385-388
- Yi D, Alvim Kamei CL, Cools T, Vanderauwera S, Takahashi N, Okushima Y, Eekhout T, Yoshiyama K.O, Larkin J, Van den Daele H, Conklin P, Britt A, Umeda M, De Veylder L** (2014) The Arabidopsis SIAMESE-RELATED cyclin-dependent kinase inhibitors SMR5 and SMR7 regulate the DNA damage checkpoint in response to reactive oxygen species. *Plant Cell* 26: 296-309