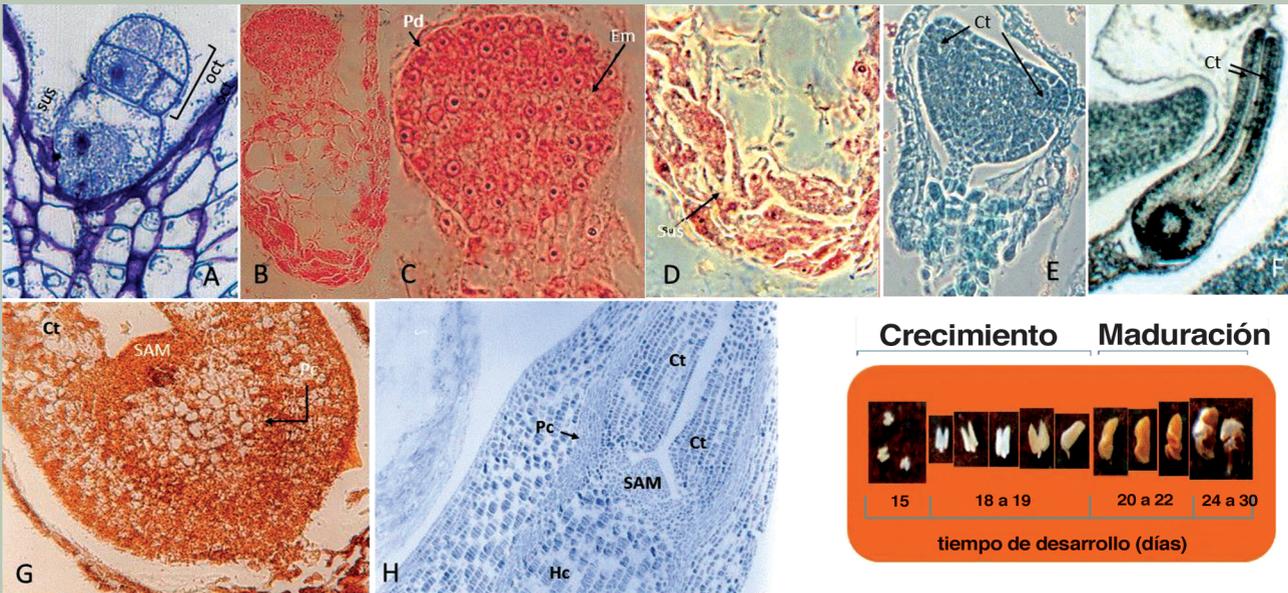


Aspectos moleculares del desarrollo de las angiospermas: *Embriogénesis y origen de los sistemas tisulares*



David Manuel Díaz Pontones

José Isaac Corona Carrillo

Aspectos moleculares del desarrollo de las angiospermas: Embriogénesis y origen de los sistemas tisulares

David Manuel Díaz Pontones

José Isaac Corona Carrillo





RECTOR GENERAL

Dr. Eduardo Abel Peñalosa Castro

SECRETARIO GENERAL

Dr. José Antonio De Los Reyes Heredia

UNIDAD IZTAPALAPA

RECTOR

Dr. Rodrigo Díaz Cruz

SECRETARIO

M. en B. E. Arturo Leopoldo Preciado López

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE C. B. S.

Dra. Sara Lucía Camargo Ricalde

COORDINADOR DE EXTENSIÓN UNIVERSITARIA

Mtro. Federico Bañuelos Bárcena

JEFE DE LA SECCIÓN DE PRODUCCIÓN EDITORIAL

Lic. Adrian Felipe Valencia Llamas

*Aspectos Moleculares del Desarrollo de las Angiospermas:
Embriogénesis y origen de los Sistemas Tisulares*

Primera edición: 2018

© UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina,
Iztapalapa, C. P. 09340, México, D. F.

ISBN: 978-607-28-1214-7

Impreso en México / Printed in Mexico

Índice

Introducción.....	1
Capítulo I. Nichos celulares y células totipotenciales.....	5
Capítulo II. Desarrollo del cigoto hasta el embrión globular.....	9
A. Regulación en el cigoto, reestablecimiento de la polaridad y desarrollo del proembrión.....	15
B. Regulación del proembrión: flujo de auxinas y la regulación de la frontera.....	24
C. Especificación de la protodermis.....	27
Capítulo III. Desarrollo del embrión globular.....	31
A. La Auxina como un regulador de importancia en la determinación estructural del embrión.....	33
B. Desarrollo de la etapa de embrión globular: especificación del dominio apical vs basal.....	38
C. Desarrollo de la etapa de embrión globular: especificación del meristemo apical de tallo.....	41
Capítulo IV. Del embrión globular al embrión corazón: el ápice del embrión y establecimiento de la polaridad abaxial-adaxial en el primordio.....	55
Capítulo V. Fronteras de fronteras en el meristemo apical.....	63
Capítulo VI. Especificación del tejido vascular.....	67
Capítulo VII. Iniciación y actividad del procambium vascular durante la germinación al establecimiento de la plántula.....	77
Lecturas sugeridas.....	86
Referencias.....	87

Figuras:

Figura 1. Desarrollo de un organismo multicelular y renovación de los tejidos.....	6
Figura 2. Desarrollo embrionario de <i>Ipomoea purpurea</i> L. (Roth).....	11
Figura 3. Establecimiento de la polaridad durante la embriogénesis temprana, regulación del alargamiento y división asimétrica del cigoto.....	18
Figura 4. Desarrollo del linaje celular apical y basal.....	22
Figura 5. Especificación del protodermo, el suspensor y la frontera en el proembrión de <i>Arabidopsis</i>	23
Figura 6. Transporte de auxina y respuesta en el proembrión.....	27
Figura 7. Desarrollo del linaje celular protodérmico.....	32
Figura 8. Especificación de los dominios celulares en el Embrión Globular..	36
Figura 9. Estructura del ápice en el hipocotilo/tallo.....	44
Figura 10. Esquema de la red de regulación génica del meristemo apical del tallo.....	51
Figura 11. Patrón en la expresión génica en el dominio apical en el embrión globular de <i>Arabidopsis</i>	56
Figura 12. Función de <i>AGO1</i> , <i>ZLL</i> y los miRNA165/166 en la embriogénesis..	58
Figura 13. Participación de los genes <i>CUPSHAPE COTYLEDON</i> , <i>KNOX</i> y las auxinas en el establecimiento del patrón apical del embrión de <i>Arabidopsis</i>	64
Figura 14. Regulación y especificación del tejido vascular.....	72
Figura 15. Iniciación y formación de las células procambiales.....	76
Figura 16. Desarrollo embrionario y la especificación de los tejidos.....	83
Tabla 1. Familia de genes <i>WOX</i>	21
Tabla 2. Genes que regulan las células madre vasculares.....	78

Introducción

Las plantas terrestres se caracterizan por un estilo de vida sedentario, lo cual implica una serie de mecanismos adaptativos que les permita no únicamente sobrevivir a las condiciones ambientales fluctuantes que pueden ser dañinas, sino además, crecer y generar estructuras reproductoras que les permitan mantener a la población y en ciertos casos invadir nuevos nichos. Entre las adaptaciones adquiridas por las plantas terrestres, entre ellas las angiospermas, se encuentra la capacidad de poseer en la etapa adulta nichos celulares o meristemos en que las células posean una totipotencialidad, lo cual es clave para su éxito. A partir de la regulación de la proliferación y diferenciación de los meristemos se producen los diferentes tejidos y con ello la capacidad de producir nuevos órganos con estructuras complejas que les permitan dar respuestas a diversas condiciones ambientales.

La fase esporofítica de una planta, pasa por tres etapas de desarrollo: la embriogénesis, el desarrollo vegetativo en que se generan órganos como las raíces, los tallos y las hojas; y la etapa en que se desarrollan las estructuras reproductivas. La etapa de la embriogénesis, en la que el cigoto ($2n$) formado por la fecundación de la ovocélula o célula huevo ($1n$) por una de las dos células espermáticas ($1n$) proveniente del tubo polínico, se transforma en un embrión en que se encuentran en forma rudimentaria los órganos vegetativos sin que se hayan desarrollado completamente. La embriogénesis a su vez, puede ser dividida en tres fases, la primera de ellas denominada de división celular, el cigoto da origen a las diferentes formas proembrionarias que conducen a la formación de un embrión globular en el que se establece el polo apical-basal de la futura planta con una simetría radial. Con la formación de diferentes dominios en el embrión se establecerán las células iniciales o fundadoras de los tres sistemas tisulares: dérmico, fundamental o de crecimiento y vascular. El establecimiento de los primordios de los cotiledones genera el paso de una simetría radial a una bilateral que se da en el embrión corazón. A esta fase inicial le siguen una fase de crecimiento del embrión, seguida de la maduración en que se acumulan sustancias de reserva y el caso de las semillas ortodoxas se pasa a una fase final en que se adquieren los mecanismos de tolerancia desecación que le permiten a la

semilla entrar en un estado de latencia y sobrevivir en el banco de semillas por un periodo largo mientras pasan las condiciones adversas a la germinación y crecimiento.

Posterior a la germinación, en la transición del embrión a la plántula con el desarrollo vegetativo, se empiezan a diferenciar los tejidos y conformar los órganos, los cuales crecen y generan una planta. El metabolismo primario en esta fase depende de las sustancias de reserva almacenadas en los cotiledones y/o en el endospermo, las cuales fueron acumuladas en estas estructuras durante la fase final o maduración del desarrollo de la semilla. La plántula posee un desarrollo de tipo indeterminado, en que se generan los órganos de la futura planta a través de las células predestinadas en el embrión. De este desarrollo se produce un sistema radicular estructural y funcional para la absorción de agua y nutrimentos por la raíz. Las sustancias que se absorben y transforman *in situ* en la raíz son translocadas a través del tallo a las hojas. En el desarrollo de las hojas se generan varios tipos celulares, entre ellos el clorénquima, mediante el cual se realiza la fotosíntesis y permite pasar de un metabolismo heterótrofo a un metabolismo autótrofo, momento en que se considera que se establece la planta.

La planta prosigue su crecimiento hasta la creación de un organismo adulto. Durante esta fase, se establece una proporción en el tamaño del sistema radicular, la cantidad de hojas y la dimensión adecuada del tallo para darle soporte a estas últimas. Existe por lo tanto, un balance entre la capacidad de absorción de agua-nutrientes y la capacidad fotosintética. De esa forma, hay una relación en la cantidad de sustancias translocadas entre la raíz y las hojas a través del tallo, con una direccionalidad en el transporte del agua-nutrientes y de moléculas que sintetiza la raíz como fitohormonas hacia el vástago, y de sustancias elaboradas como sacarosa, aminoácidos, fitohormonas y moléculas de señalización en dirección inversa desde las hojas y tallo a la raíz. Los productos de la fotosíntesis son utilizados para el crecimiento y desarrollo, parte para establecer mecanismos de defensa ante el estrés abiótico y/o biótico; y en caso de tener un excedente, los productos de la fotosíntesis, dependiendo de la especie, se acumulan en diferentes órganos, como la raíz o en el tallo, como es el caso de los bulbos de las cebollas, los tubérculos de la papas o las raíces tuberosas de los camotes, transformándose en órganos especializados de acumulación de reservas.

Cuando la planta ha llegado a la madurez y las condiciones ambientales son adecuadas, se realiza la transformación de la fase vegetativa a la fase reproductiva, en que se establecen los meristemas de inflorescencia y/o floral, con la generación de la flor y con ella las estructuras reproductoras (Fornara *et. al.*, 2010; Penfield, 2008; Simpson y Dean, 2000; Strasser *et. al.*, 2009).

Por lo tanto en el desarrollo de la planta, están involucrados tres procesos: la diferenciación en que se da la expresión restringida del genoma a dominios celulares particulares con el establecimiento diferencial de identidad tisular; la morfogénesis en que se adquiere la forma de la planta, y el crecimiento que es irreversible y es inicialmente acompañado por la expansión celular. El presente libro aborda el origen ontogenético de los tres sistemas tisulares que se encuentran en las angiospermas: el sistema tisular dérmico, el sistema tisular de crecimiento o fundamental y el sistema tisular vascular, los cuales se determinan o especifican durante la primera fase de la embriogénesis. Posteriormente en otros libros de la serie se abordará la diferenciación y el desarrollo de estos tres sistemas tisulares para dar origen a los órganos vegetativos: raíz, tallo y hoja. En este libro los conceptos en el origen y desarrollo de los sistemas tisulares se encuentran asociados a la regulación de la expresión génica, que provocan el compromiso celular y que se traduce en un proceso morfogénico que se da desde la fecundación hasta el establecimiento de los polos apical basal, la simetría de radial a bilateral y el establecimiento de las tres estirpes celulares que darán origen a los tres sistemas tisulares.

**Capítulo I.
Nichos celulares y células
totipotenciales**

Para entender la morfogénesis de los tejidos y los órganos de una planta, es importante conocer los principios celulares básicos, que determinan la diversidad de formas, estructuras, y funciones.

Los factores que especifican las características intrínsecas que definen la forma y dirección del crecimiento, están dados por la frecuencia, la orientación y posición del plano de las divisiones celulares y la dirección en la expansión celular.

La división de una célula madre genera dos células hijas, las cuales si provienen de una división simétrica presentarán propiedades similares; en caso de provenir de divisiones asimétricas, presentarán tamaños y propiedades diferentes.

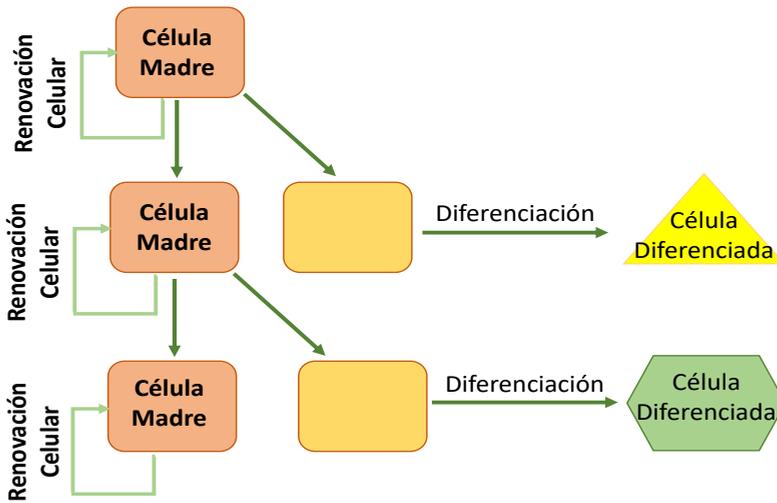


Figura 1. Desarrollo de un organismo multicelular, y renovación de los tejidos.

El crecimiento y la diferenciación se da por la adición de nuevas células a las ya existentes; la manutención funcional del órgano ocurre por el reemplazamiento de las células viejas no-funcionales por células nuevas. Para mantener el crecimiento y/o la renovación se mantiene un grupo de células totipotenciales, denominadas células madre o iniciales (Fig. 1). En plantas, las células iniciales o madre y sus propiedades permiten generar nuevos órganos, lo cual ocurre constantemente durante el ciclo de vida de la plan-

ta (Weigel y Jurgens, 2002). Las células madre se dividen, dando dos células hijas, una de las cuales se conserva para mantener al grupo de células totipotenciales, mientras que la otra célula hija puede ser inducida para comprometerse y diferenciarse en los diferentes tipos celulares de un tejido. Las células totipotenciales se encuentran en compartimentos especiales denominados nichos celulares o meristemas, los cuales están distribuidos en diferentes zonas o regiones de la planta y poseen diferentes propiedades. Dentro del meristemo, pueden existir diferentes dominios con propiedades diferenciales; la zona central, el centro de organización o centro quiescente, contiene células que mantienen y organizan al meristemo, con ciclos celulares muy largos, por ello, se dividen pocas veces y son un reservorio celular, en donde se mantiene la identidad meristemática (Scheres, 2007). Rodeando a este dominio, se encuentran células con ciclos celulares un poco más cortos, las cuales mantienen realmente en funcionamiento al meristemo. Parte de las células producto de la división celular son desplazadas y entran al tercer dominio del meristemo, estas células son altamente proliferativas, están de tránsito y con su producción se aumenta constantemente el número de células, en este tercer dominio las células entran en una fase de compromiso/diferenciación después de varias rondas de división (Scheres, 2007). En el desarrollo temprano de una planta, se distinguen dos tipos de meristemas, situados en los extremos apical y basal del embrión, que darán al meristemo apical de tallo y el apical de la raíz. Posteriormente en el desarrollo, la plántula genera otros meristemas laterales, a partir de los cuales se generarán órganos como hojas, flores o raíces laterales (Duclercq *et. al.*, 2011).

Las propiedades de las células son únicas y están asociadas al compromiso que adquieran, lo cual dará una especificación tisular particular. Así, los factores que determinan el destino celular están controlados por dos procesos en forma coordinada en espacio y tiempo:

- a) La comunicación a distancias cortas entre una célula y otra. La comunicación celular se da por pequeñas moléculas móviles que funcionan como señales, las cuales se difunden a través de comunicaciones intracelulares como los plasmodesmos o bien las señales son exportadas a través de la membrana plasmática ya sea por un proceso de difusión, o a través de canales y/o transportadores

o por medio de la secreción, y una vez en el apoplasto pueden difundir a las células vecinas e interactuar en la superficie de la membrana o con receptores internos y generar una segunda señal.

- b) La comunicación a grandes distancias. Se establece a través de señales que viajan grandes distancias a través del tejido vascular, entre las señales involucradas se encuentran las fitohormonas, los RNA largos no codificantes, péptidos, entre otras, al ser dirigidos al tejido blanco, interactúan con receptores, generando la señal secundaria.

La morfogénesis en las plantas es un proceso controlado a nivel transcripcional, en que cada una de las células involucradas censa la concentración de señales en su microambiente y modula la expresión de diferentes genes.

Durante el desarrollo, varios nichos de células totipotenciales son establecidos, estos nichos celulares conforman a los meristemos, durante el desarrollo embrionario se generan *de novo* (Fig. 1). En las angiospermas se establecen en la fase del embrión globular y se mantienen durante toda la vida y sirven para generar nuevos órganos en la planta adulta (Weigel y Jürgens, 2002). Por lo anterior, el patrón básico del cuerpo de una planta es establecido durante la embriogénesis. En las plantas con semilla, este plan corporal ha sido descrito como la sobreposición de dos patrones: una simetría radial a bilateral y la formación del eje apical-basal.

Capítulo II.
Desarrollo del cigoto hasta
el embrión globular

El desarrollo de una semilla en las angiospermas puede dividirse en tres fases de acuerdo a la morfología, cambios en peso fresco e indicadores bioquímicos (Díaz-Pontones *et. al.*, 2009). La embriogénesis se inicia con la doble fecundación, en donde una célula espermática fecunda a la ovocélula o célula huevo, mientras la otra célula espermática fecunda a la célula central. El proceso posterior a la doble fecundación puede dividirse en tres fases: la inicial o división en la que se generan un embrión, en la que se establece el eje apical-basal y se pasa de una simetría radial a bilateral; la cual es seguida por una fase de expansión de las estructuras establecidas en la fase anterior y la tercera o fase de maduración, en donde ocurre la maduración de las estructuras y con ello el depósito de sustancias de reserva (Fig. 2). En la parte final de la maduración se da la fase de maduración tardía en la que la semilla se deshidrata, el proceso se da una vez que se han almacenado las sustancias de reserva o bien, se sobrepone en la parte terminal de almacenamiento, mecanismo que depende de la especie (Leprice *et. al.*, 2016). En esta fase terminal se adquieren los mecanismos de tolerancia a la desecación y la semilla entra en un estado de latencia, a este tipo de semillas se les denomina ortodoxas. Sin embargo existe otro grupo de semillas, las recalcitrantes, las cuales pasan de la fase de maduración y una vez adquirida las características morfológicas y depósito las sustancias de reserva, son dispersadas e inmediatamente germinan, estas semillas no pasan por una fase de deshidratación y no toleran una desecación por debajo de un valor crítico entre 20 a 35% (Bonner y Bozo, 1987). Por lo que, originalmente las semillas eran clasificadas en dos grupos distintos de acuerdo a su respuesta en el almacenamiento: ortodoxas y recalcitrantes (Robert, 1973). Más recientemente, se han descrito semillas que se encuentran en una fase intermedia entre las ortodoxas y las recalcitrantes a las que se les ha denominado semillas intermedias, ellas pueden resistir una deshidratación considerable sin llegar a poseer el grado de tolerancia de una semilla ortodoxa, lo que implica que sobreviven a periodos cortos de desecación (Ellis *et. al.*, 1990). Esto establece un continuo entre las semillas en un extremo que son tolerantes a la desecación hasta el otro extremo en que semillas son dispersadas con un alto contenido de humedad y no pasan por una etapa de deshidratación severa (Benjak y Pammenter, 1997, 2004; Kermode y Finch-Savage, 2002).

Arabidopsis posee una semilla ortodoxa, en que el desarrollo embrionario pasa por las tres fases antes descritas, con una fase de maduración en que la mayor parte del tiempo comprende la acumulación de sustancias de reserva y que en su parte terminal se sobreponen con la maduración tardía, con un periodo muy corto en que se adquiere la tolerancia a la desecación.

La fase inicial o de división en la embriogénesis de esta especie, pasa por tres etapas: la proembrionaria, la del embrión globular a corazón, y la de embriogénesis tardía en que se genera el embrión torpeda, el cual se expande y se da inicio a la fase de expansión, para finalizar con el embrión cotiledonar, rico en sustancias de reserva en la fase de maduración.

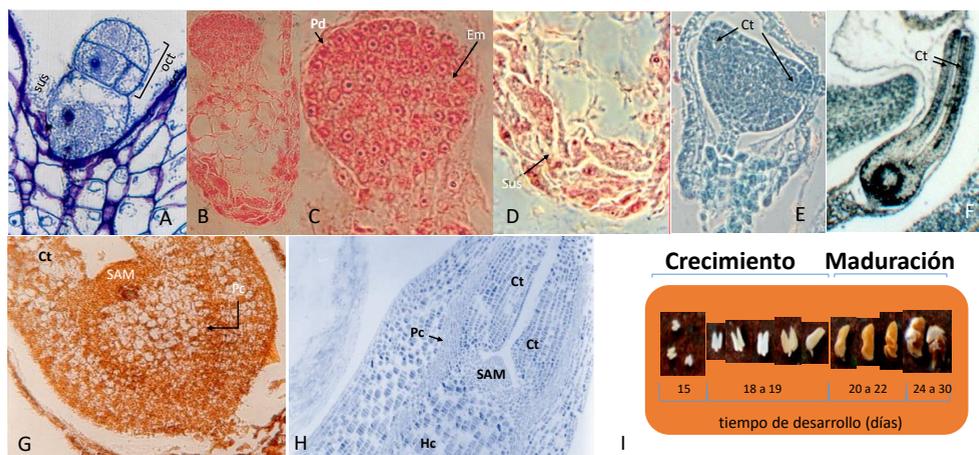


Figura 2. Desarrollo embrionario de *Ipomoea purpurea* L. (Roth). **A**, proembrión octante, la célula basal se encuentra en una fase de división desfasada con respecto a la célula apical. **B-D**, embrión globular; **B**, embrión globular con un gran suspensor en la parte inferior; **C**, acercamiento del embrión globular, en que se muestra la protodermis, embrión que conserva la simetría radial; **D**, acercamiento del suspensor en la etapa de embrión globular, (se observa el tamaño de las células); **E**, embrión corazón, en él se observan los primordios de los cotiledones y entre ellos se define el dominio del meristemo apical de tallo, con el establecimiento de los dominios de los cotiledones se pasa de una simetría radial a una bilateral; en esta etapa se definen los dominios de los meristemas apical de tallo y apical de raíz, éste último en la base del embrión, y con ello se establece el eje apical-basal. **F y G**, embrión torpeda, con esta etapa se inicia la fase de crecimiento del embrión, y se observa la ubicación del procambium, que define el futuro tejido vascular, en este embrión son evidentes los cotiledones y entre ellos el apice del hipocotilo con el meristemo apical de tallo;

H, embrión cotiledonar; **I**, Comparación en el desarrollo de embrión en la segunda y tercera fase del desarrollo, entre los 13 días hasta los 19 días el embrión se encuentra en la fase de crecimiento; a partir de los 20 día postantesis se inicia la última fase en que se maduran las estructuras y con ello la acumulación con sustancias de reserva. Símbolos: Ct, cotiledón; Em; embrión; oct, proembrión octante; Pc; procambium; Pd, protodermis; SAM, meristemo apical de tallo; Sus, suspensor.

En *Arabidopsis*, antes de la fecundación, la ovocélula posee una polaridad, con el núcleo localizado en la región apical de la célula. Inmediatamente posterior a la fecundación, el cigoto disminuye de tamaño y se pierde esta polarización y el núcleo diploide se encuentra en el centro del cigoto. El cigoto debe de alargarse tres veces con respecto al tamaño inicial antes de que se dividida, previo al alargamiento se debe de reestablecer la polaridad celular. Una vez alcanzado el tamaño final, el cigoto se divide en forma asimétrica, generando dos células de diferente tamaño y contenido celular. En el extremo apical se produce una célula pequeña, mientras que en extremo basal se forma una célula grande con una gran vacuola central. La célula basal se divide simétricamente y genera el suspensor. Por su parte, la célula apical, se divide en la misma dirección varias veces en forma simétrica, para posteriormente cambiar el plano de división, generando un proembrión con un grupo de células superiores e inferiores, denominado proembrión octante. A partir de esta fase de desarrollo, se establece un plano de división diagonal, con una capa de células externas o protodermicas, denominado dermatógeno, generando una simetría radial, en donde se dan varios ciclos de divisiones simétricas en el plano radial, lo cual originará posteriormente al tejido dérmico. La continua división en el promebrión provoca el origen de un embrión globular temprano, en él se especifica al primer grupo de células internas, que son las que generarán al tejido vascular, por una serie de divisiones asimétricas estas células centrales darán origen al tejido de crecimiento o fundamental hacia el exterior, mientras que las más internas darán origen al tejido vascular. En esta etapa de embrión globular temprano, en el extremo apical del suspensor se define a la célula hipofisiaria, la cual colinda con las células de la parte basal de embrión. Conforme transcurre el desarrollo, se realiza la transición de embrión globular temprano a globular tardío, la división asimétrica de la hipófisis forma una pequeña célula en forma de lente, denominada célula lenticular,

esta célula será la célula fundadora y organizará al centro quiescente de meristemo apical radicular de la futura raíz embrionaria en etapas posteriores.

Para que este proceso sea armónico, debe de establecerse una comunicación entre célula y célula mediante un intercambio de señales, las cuales se perciben por receptores específicos intracelulares o en la superficie de la membrana plasmática de la célula blanco, que a su vez induce a las vías de señalamiento requeridas. Estudios ultraestructurales en *Arabidopsis* y soya muestran que la comunicación celular por un transporte simplástico a través de los plasmodesmos está modulado, en que se pasa de una fase de alta comunicación a una en que el tráfico a través de los plasmodesmos está restringido a dominios específicos. Así el proembrión se encuentra comunicado a través de estas estructuras con el suspensor, pero no existe plasmodesmos con el endospermo en formación (Dute *et. al.*, 1989; Mansfield y Briarty, 1991). En el embrión globular de *Arabidopsis* el empleo de moléculas difusibles fluorescentes indican un movimiento de proteínas, el cual se previene en la etapa de embrión corazón (Stadler *et. al.*, 2005). Estos resultados son consistentes con el desarrollo embrionario en las Crasuláceas, en que se da una complejidad en los plasmodesmos del suspensor, encontrándose plasmodesmos simples con una límite de exclusión amplio en las etapas tempranas del desarrollo del proembrión, a plasmodesmos complejos en que se bloquea el paso de sustancias (Kozieradzka-Kiszkurno y Plachno, 2012; Sager y Lee, 2014).

El estudio de mutantes ha permitido determinar a aquellos genes que participan al inicio de las vías de regulación para la morfogénesis. Los primeros estudios en el desarrollo embrionario empleando mutantes en *Arabidopsis*, estableció que la mutación en ciertos genes provocaban embriones abortivos, por los que a estos genes se les denominó genes letales, la mutación se realizó en genes del metabolismo primario, y por ello el efecto letal. En *Arabidopsis* se encontraron mutaciones en que se perdió la polaridad apical-basal o causó un desarrollo anormal en la embriogénesis, implicando que la expresión de genes maestros es necesaria para el establecimiento de los sistemas tisulares. La mutación de estos genes permite mantener el metabolismo primario sin ser alterado, y formar semillas maduras, que presentan una organización anormal en el desarrollo embrionario, lo cual provoca defectos morfológicos en las plántulas una vez se produce la germinación de tales semillas. Plántulas obtendrían de embriones con una mutación en

el gen *MONOPTEROS/ARF5* (MP) presentan la pérdida del hipocotilo y de la raíz embrionaria, manteniendo la región apical, aunque esta región no es morfológicamente normal ya que los cotiledones presentan una desorganización estructural (Berleth y Jürgens, 1993; Hardtke y Berleth, 1998). El efecto de la mutación en el gen *MONOPTEROS* (*monopteros* o *mp*) se presenta desde el octante (proembrión de ocho células, producto de la división del cigoto), lo cual provoca en una fase posterior, que no se establezca el procambium en los embriones globulares y con ello la generación del tejido vascular en la zona que corresponderá al futuro hipocotilo y la raíz. Sin embargo, en la fase de embrión corazón y torpedo, los cotiledones pueden formar tejido vascular aunque los haces vasculares se encuentran conectados incorrectamente. Durante la germinación de los embriones *mp*, las plántulas pueden generar raíces adventicias, en que se observa que el tejido vascular posee un desarrollo incipiente, con discontinuidades en su organización. El gen MP es necesario para establecer la formación de la raíz embrionaria principal, pero no para la formación de la raíz en la planta adulta y es necesario para la formación del tejido vascular durante el desarrollo postembriionario (Przemeck *et. al.*, 1996). Otra mutación de importancia estudiada es la mutación homocigótica en el gen *GNOM*, que provoca plántulas con pérdida de la raíz y de los cotiledones (Mayer *et. al.*, 1993). Los efectos de la mutación se dan desde las primeras divisiones del cigoto, y los embriones con la mutación *gnom* son esféricos y pierden completamente el eje de polaridad apical-basal (Mayer *et. al.*, 1993). En ese entonces no se poseía un modelo completo de la función de estos genes maestros en el desarrollo, sin embargo, se sabía que *MONOPTEROS* y *GNOM* están correlacionados a la vía de señalización de la auxina. *GNOM* codifica para un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), el cual está involucrado en la distribución polar del transportador de eflujo de las auxinas PIN-FORMED, y con ello el establecimiento de gradientes en la distribución de la auxina (Steinman *et. al.*, 1999; Geldner *et. al.*, 2003); mientras que *MONOPTEROS/ARF5* es un factor de respuesta a auxinas (Berleth y Jürgens, 1993; Hardtke y Berleth, 1998). Haciendo relevante la importancia de la auxina como un inductor en el desarrollo y establecimiento de la polaridad del embrión (eje apical-basal), en el establecimiento radial de los tres sistemas tisulares en la parte inferior del embrión: el sistema vascular central, rodeado por tejido fundamental y éste a su vez rodeado por el tejido

dérmico y de la importancia en la generación de los cotiledones y la transformación apical de una simetría radial a una simetría bilateral.

A. Regulación del cigoto, reestablecimiento de la polaridad y desarrollo del proembrión

En las angiospermas, la división del cigoto es típicamente asimétrica, generando dos células de diferente tamaño con propiedades diferentes.

La primera división del cigoto de *Arabidopsis* se realiza después de un largo tiempo posterior a la fecundación, implicando que durante este periodo se realiza una dinámica celular compleja (Lersten, 2004), durante ese tiempo se reestablece la polaridad celular y con ello se da el movimiento de mitocondrias, plastidios y núcleo hacia el polo apical, ocupando en el polo opuesto la vacuola central. En otras especies la vacuola central se fragmenta y el cigoto se alarga 2 a 3 veces antes que se vuelva a ensamblar la vacuola; el alargamiento puede ser mayor en otras especies (Fig. 3; Ahuja y Bhaduri, 1956; Faure *et. al.*, 2002).

La asimetría está preestablecida aún antes de que se forme el saco embrionario, debido a que durante la formación del gametofito femenino éste se encuentra inmerso en un gradiente de auxina durante la formación del óvulo, que repercute en la polaridad dentro del saco embrionario, con un polo en el que se encuentra el aparato del huevo, conformado por la dos sinérgidas y la ovocélula o célula huevo y en posición opuesta, el polo en que se encuentran las antipodas; entre ambos polos, se encuentra la célula central con dos núcleos, que están en la posición basal de esta célula (Pagnussat *et. al.*, 2009).

La doble fecundación se realiza una vez se descargan las dos células espermáticas provenientes del tubo polínico entre el aparato del huevo (ovocélula y 2 sinérgidas) y la célula central. Una de las células espermáticas provenientes del gametofito masculino se fusiona con la ovocélula generando el cigoto, estructura diploide, mientras que la otra célula espermática se fusiona con los dos núcleos de la célula central para producir el endospermo triploide.

La entrada de la célula espermática a la ovocélula produce fuga de electrolitos y material de la célula huevo, provocando su reducción en el ta-

maño, afectando principalmente a la vacuola. El nuevo núcleo formado por esta fecundación es diploide y las señales que inicialmente determinaron la polaridad de la ovocélula ya no se producen, con ello, el núcleo del cigoto se desplaza hacia el centro y se pierde la polaridad celular (Christensen *et. al.*, 2002; Faure *et. al.*, 2002; Ueda *et. al.*, 2011). El cigoto, como el de *Arabidopsis*, requiere que se restablezca la polaridad para generar dos células hijas de diferente tamaño (Fig. 3A y 3B), con una célula hija apical, pequeña que originará al embrión, y una célula hija basal y grande conteniendo una gran vacuola que dará origen al suspensor, esta estructura es efímera pero importante para la nutrición y determinación del embrión (Zhang y Laux, 2011). Empleando metodologías para el análisis de imágenes y experimentos farmacológicos mediante el uso de inhibidores específicos dirigidos a citoesqueleto, se ha demostrado que posterior a la pérdida de polaridad por la fecundación, el cigoto adquiere tres veces su tamaño original y se repolariza. Este alargamiento y la repolarización, en donde se reubica el núcleo en el ápice del cigoto se realiza a través de la modificación del citoesqueleto (Fig. 3A). Inicialmente en el cigoto joven se define la zona de entrada de la célula espermática (que se da en la cara de la ovocélula que está en contacto con la célula central), este dominio de membrana es recubierto por microfilamentos de actina (actina F), formando un casquete. Este casquete de actina en el extremo apical, predetermina la posición de un anillo de microtúbulos corticales transversales en una posición subapical, lo que implica que estarán por debajo del casquete de microfilamentos de actina y con ello se pasa de un cigoto joven a la fase de yema. En una fase posterior se inicia la fase de expansión del cigoto, para ello los microfilamentos de actina se rearreglan formando haces paralelos orientados en el eje de expansión, éstos en conjunto con los microtúbulos corticales definirán la zona de descarga de componentes de secreción provenientes del complejo de Golgi y con ello el proceso de alargamiento del cigoto (Fig. 3B). El anillo de microtúbulos corticales transversales se desplaza continuamente hacia la cara apical conforme el cigoto se expande, hasta adquirir el tamaño final, y con ello se llega a la fase de maduración (Fig. 3A). La posición del núcleo dentro de la célula se debe al anclaje de la envoltura nuclear a través de microfilamentos de actina al citoesqueleto subyacente a la membrana plasmática. Durante la expansión del cigoto, el desplaza-

miento a través de los microfilamentos, permite el movimiento del núcleo desde la parte central al extremo apical del cigoto. En la fase de maduración, el anillo de microtúbulos transversales se compacta en una pequeña zona en el ápice, forma una banda de microtúbulos corticales, anillo que estará asociado a través de los microfilamentos a la envoltura nuclear y ubicará al núcleo en la parte apical del cigoto. Una vez ubicado el núcleo, la posición del anillo compacto de microtúbulos corticales o banda preprofásica se desensamble determinará la ubicación de la parte media del huso acromático de la mitosis. Con ello se da origen a una célula apical pequeña a través de la cual se originará el embrión y una célula basal grande que será el futuro suspensor (Fig. 3A y 3B; Kimata *et. al.*, 2016).

WOX2, *WOX8* y *WOX9* son genes marcadores del cigoto, que se expresan durante la fase inicial en la formación del proembrión. *WOX2* se expresa desde la célula huevo y posteriormente en el cigoto. Después de la primera división, la expresión de *WOX2* restringe su presencia a la célula apical, mientras que *WOX8* y *WOX9* se expresan en la célula basal y sus descendientes, y entre ambos genes ambos poseen funciones redundantes (Fig. 3B; Bosca *et. al.*, 2011). Para que se de la expresión diferencial, inicialmente es necesario que se reestablezca la polaridad en el cigoto y *WRKY2* es un gen requerido para esta función (Ueda *et. al.*, 2011). *WRKY2* codifica para un factor de transcripción con dedos de zinc, se encuentra en la vía de señalización por arriba de los factores de transcripción *WOX8* y *WOX9*. La ausencia de la actividad de *WRKY2* incapacita al cigoto para su repolarización, con el resultado de una división celular simétrica, lo que provoca que se de una célula basal más pequeña que lo normal y afectará a las divisiones subsecuentes, con la producción de un suspensor con células pequeñas y con divisiones periclinales (divisiones paralelas a la superficie; Ueda *et. al.*, 2011). Por lo que *WRKY2* está involucrado en forma importante en la especificación del suspensor y/o en la manutención de la identidad del suspensor. Esta identidad proporcionada por *WRKY2* se da a través de la regulación de la expresión de *WOX8* y *WOX9*. En el mutante *wrky2*, *WOX8* es fuertemente reprimido, mientras que *WOX2*, gen específico del embrión, extiende su zona de expresión sobre las células del suspensor y les proporciona características embrionarias. La expresión de *WOX8* se encuentra muy reducida en el cigoto, por lo que debe de haber otras señales involucradas para restringir la expresión de *WOX8* en el em-

brión, dado que en el mutante *wrky2* produce embriones maduros normales (Ueda *et. al.*, 2011).

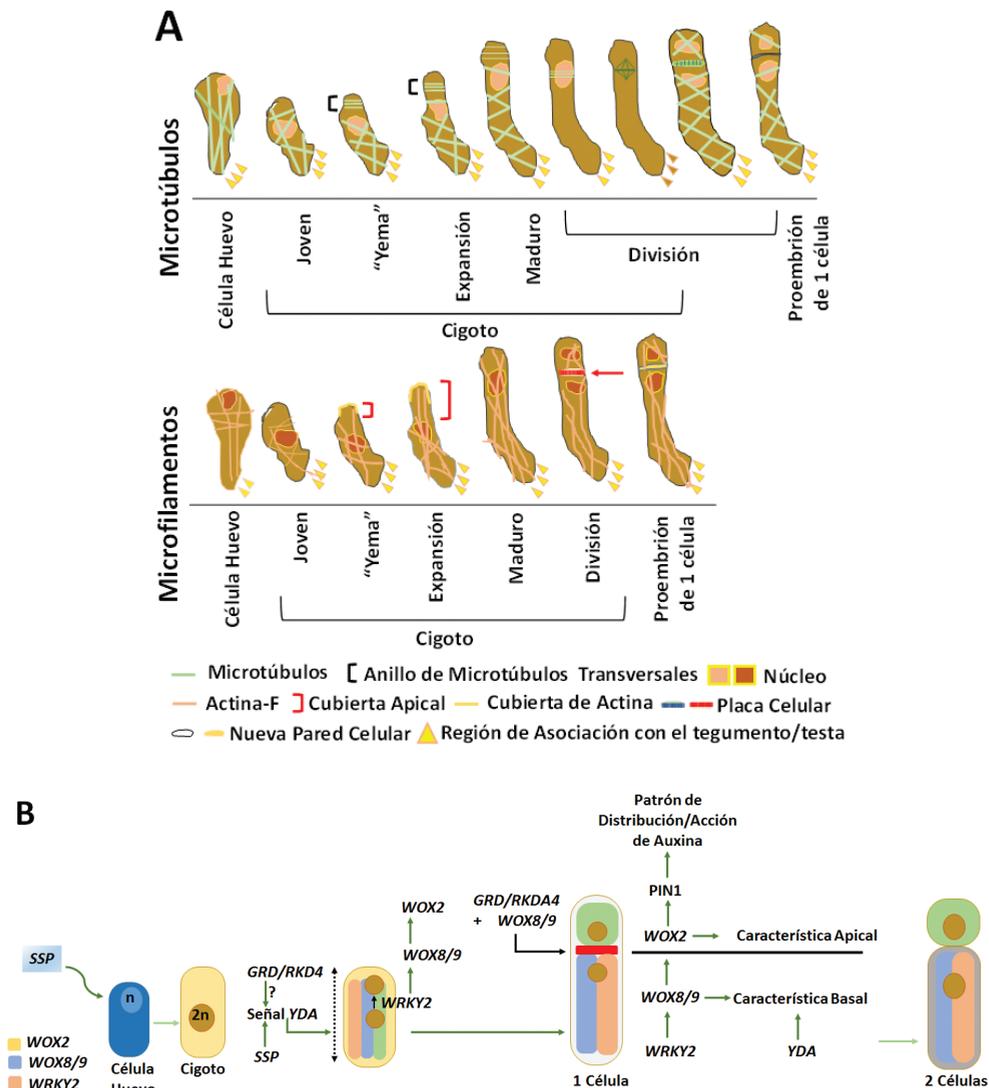


Figura 3. Establecimiento de la polaridad durante la embriogénesis temprana, regulación del alargamiento y división asimétrica del cigoto en *Arabidopsis thaliana*. **A**; Esquema mostrando el reestablecimiento de la polaridad del cigoto a

través del arreglo de los microtúbulos corticales y los microfilamentos de actina **F**; La expresión de los genes involucrados en la polaridad del cigoto se muestra en diferentes colores. **G**; Una de las primeras etapas importantes es el alargamiento del cigoto, regulado predominantemente por la vía de señalización *YODA (YDA)*, la cual es activada por vía paterna por medio de *SHORT SUSPENSOR (SSP)*. *GRD/RKD4* actúa también en el alargamiento del cigoto, pero la conexión molecular es desconocida. **D**; *WRKY2* regula la posición del núcleo del cigoto y activa la expresión de *WOX8/9*. *WOX8/9* en la célula basal es un proceso celular no-autónomo inducido por la expresión de *WOX2* en la célula apical y junto con *GRD/RKD4*, regula la división asimétrica del cigoto. Esquema modificado de Bosca *et. al.*, 2011, Kimata *et. al.*, 2016, Wendrich y Weijers, 2013.

En el cigoto se induce la actividad de *YODA (YDA)*, que codifica para una proteína MAPCinasa-cinasa (Lukowitz *et. al.*, 2004), que pertenece a la cascada de fosforilación de la MAPCinasa, (Mitogen Activated Protein Kinase) y de proteínas redundantes tipo MAPCinasa como *MPK3* y *MPK6* (Wang *et. al.*, 2007), que en conjunto con dos genes que participan en la vía, *SHORT SUSPENSOR (SSP)* y *GROUNDED (GRD)* producen el alargamiento del cigoto y determina la región del suspensor (Fig. 3). En el mutante *yoda* se reduce en gran medida el alargamiento del cigoto, provocando un suspensor pequeño, con divisiones erróneas, mientras que la sobreexpresión de *YODA* da por efecto un excesivo crecimiento del suspensor, conteniendo un mayor número de células que el silvestre. El módulo de acción de *YDA* en embriogénesis no se conoce en detalle, sin embargo, en la epidermis de la hoja, *YDA* y *MPK3/MPK6* interactúan con *MPK4*, *MPK5*, *MPK7* y *MPK9* (Wang *et. al.*, 2007; Lampard *et. al.*, 2009). La mutación de este módulo de MAPCinasas en conjunto con *SSP* y *GRD*, resulta en la incapacidad del embrión de alargarse, produce células pequeñas en la base y resulta de esta división un suspensor oblongo o cónico. Por otra parte, la sobreexpresión del módulo de las MAPCinasas, produce un alargamiento exagerado del cigoto, un suspensor con una mayor cantidad de células y una supresión en el crecimiento de la célula apical y con ello no se forma un proembrión. Características similares a las que se producen cuando se pierde el transporte polar de auxinas (Friml *et. al.*, 2003), por lo que *YDA* y las auxinas generan señales que son antagónicas.

La activación de la cascada de las MAPCinasas (Lukowitz *et. al.*, 2004) en que *YDA* participa en el cigoto, está mediada por el producto del gen *SSP*, un miembro de la superfamilia *Pelle/IRAK/Receptor Like* (Bayer *et. al.*, 2009), *SSP*

es una proteína que se asocia a la membrana plasmática por una modificación de tipo mirosilación/palmitilación y posee un dominio de interacción que es esencial para su función, sin embargo, no parece que tenga un dominio de cinasa, sugiriendo que funciona a través de una interacción proteína-proteína en la membrana plasmática, así, *SSP* se encuentra por arriba en la vía de señalización de YDA con respecto a las MAPcinasas (Fig. 3B). La mutación en *ssp* presenta un efecto parental en la que el fenotipo depende del genotipo del padre proveniente del grano de polen, por lo que se generan embriones normales si la mutación está en la parte materna o pistilos. El efecto se debe al transcrito de *SSP* en la célula espermática, el cual es descargado en la célula huevo durante la fecundación, este transcrito se acumula temporalmente en el cigoto, el transcrito es traducido solamente después de que se ha realizado la fecundación, momento en que es capaz de activar la vía de YDA (Bayer *et. al.*, 2009). Por lo que implica que debe haber un mecanismo que bloquee la traducción del transcrito de *SSP* en la célula espermática.

BSK1 (BRASSINOSTEROID-ASSOCIATED KINASE 1; Tang *et. al.*, 2008; Kim *et. al.*, 2010) es parte del complejo receptor de los brasinoesteroides de la membrana plasmática. Esta proteína es fosforilada y con ello activa al receptor *BRI1*, *BSK1* y *SSP* que poseen un ancestro común, que se dio cuando se originó al ancestro basal de las Brassicales durante la duplicación génica, dando a la clada Brassicales que incluye a la mostaza y a *Arabidopsis*. *BSK1* y sus ortólogos no muestran expresión en el grano e polen, a diferencia de los ortólogos de *SSP* (Liu y Adams, 2010). *BSK1* es muy similar al ancestro común, mientras que *SSP* ha sido modificado mucho más en el tiempo, por lo que puede que éste último sea una adquisición nueva en la vía *YDA*, probablemente adoptado ante el conflicto paterno (Scott *et. al.*, 1998) durante el crecimiento del suspensor y el flujo de nutrientes hacia el proembrión en crecimiento bajo un control paterno. Lo importante es que la vía ancestral de *YDA* poseía un receptor membranal y que era activado por una señal externa al cigoto, y en *Arabidopsis* contribuye a la activación de la vía *YDA* (considerando que no es la única vía, pues *SSP* es más débil en los mutantes *yda* o *mkp3 mpk6*).

Por su parte, el gen *GROUNDED* codifica a una proteína que contiene un dominio RWP-RK (Jeong *et. al.*, 2011; Waki *et. al.*, 2011), también denominada

RKD4. Las proteínas con un dominio RWP-RK se encuentran filogenéticamente desde las algas (Ferris y Goodenough, 1997) hasta las angiospermas (Schauser *et. al.*, 1999), pero no en animales. El dominio RWP-RK forma una estructura secundaria bHLH (basic-helix-turn-helix; Schauser *et. al.*, 2005) que implica una capacidad de unión al DNA y con ello la regulación en la transcripción. *GRD/RKD4* induce la expresión específica de los genes embrionarios (Walki *et. al.*, 2011), el mutante *grd/rk4 yda ssp* fenotípicamente posee los mismos defectos en el alargamiento del cigoto y malformaciones en el suspensor, *GRD/RKD4* posee una interacción con la vía *YDA*, sin embargo, la interacción ocurre regulando la expresión de los genes blanco activos en la vía *YDA* de forma cooperativa o independiente. *GRD/RKD4* actúa cooperativamente con *WOX8* y *WOX9* en el establecimiento de la polaridad del cigoto. Existe una sinergia entre *WOX* y la vía *YDA*, ya que afectando a los genes del desarrollo embrionario se detiene el proceso y no prosigue más allá de una célula (Jeong *et. al.*, 2011).

Tabla 1. Familia de genes *WOX*

Los miembros de la familia de genes *WOX* juegan un papel importante en la determinación del desarrollo de la planta. Estudios filogenéticos han identificado 3 cladas mayores en la familia *WOX* (Ueda *et. al.*, 2011):

1. Los genes modernos que incluyen a *WUSCHEL*, *WOX 1 a 8*.
2. Los genes intermedios que contiene a los genes *WOX9*, *WOX11* y *WOX12*.
3. Los genes o clada ancestro con los genes *WOX10*, *WOX13* y *WOX14*

Los genes *WOX* conforman una familia específica de factores de transcripción en plantas (Tabla 1). *WUSCHEL* fue el primer miembro identificado de esta familia. En el proembrión se expresan *WOX2* y *WOX8*, *WOX9/STIMPY* (*STIP*; Wu *et. al.*, 2007) miembros de dos subclases, los cuales se expresan en forma dinámica y complementaria, que en combinación definen 4 dominios en el proembrión octante.

En el cigoto, la expresión de *WOX2* se restringe a la célula apical y sus descendientes, quedando exclusivamente en la hilera de células de la capa superior del octante (Fig. 3 y 4). Por su parte *WOX8* se expresa también en el cigoto y una vez se da la división del mismo, la expresión se restringe a la célula basal y con ello a sus descendientes que formarán al suspensor. *WOX9* inicialmente se expresa en las células hijas basales y posteriormente exclusivamente en la célula apical del suspensor, con una expresión posterior en que se extiende a las células inferiores del proembrión. La expresión génica que se encontró en *Arabidopsis* también se ha observado en maíz, por lo que se piensa que este patrón está conservado y es común al resto de las angiospermas (Chandler *et. al.*, 2008).

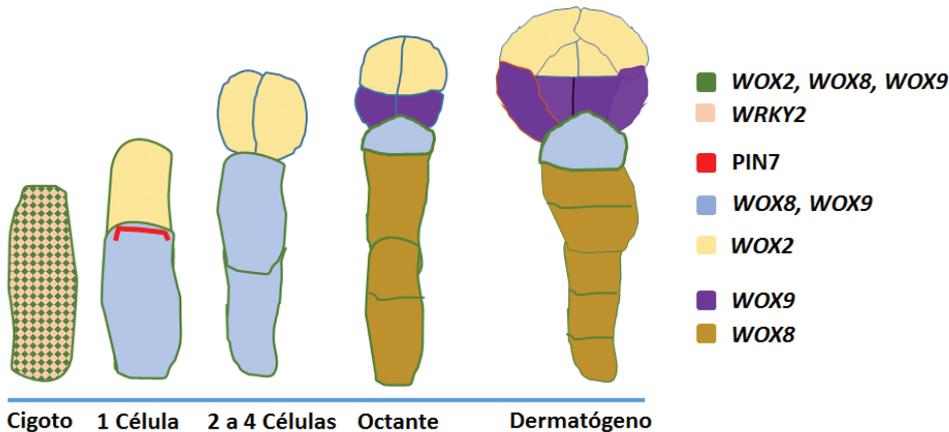


Figura 4. Desarrollo del linaje celular apical y basal. En el cigoto se co-expresa a *WOX2*, *WOX8* y *WOX9* que definen el patrón de expresión en el diseño de la futura planta. Esquema modificado de Zhang y Laux, 2011.

La consecuencia de la pérdida en la expresión de *WOX2* es la presencia de aberraciones en la división celular del ápice, que se observa en el embrión globular. Sin embargo, removiendo la expresión de otros genes, como *WOX1* (el cual se expresa preferencialmente en el tejido provascular), o *WOX3/PRESSED FLOWER (PRS)*; que se expresa preferentemente en el primordio de los cotiledones y en el margen de los órganos florales; Matsumoto y Okada, 2001; Haecker *et. al.*, 2004) o *WOX5* resulta en embriones que pierden el hipocotilo (*shootless*; Breuninger *et. al.*, 2008) morfología que es similar a lo que

ocurre cuando solamente ocurre la mutación *wox2*. Por lo que *WOX2* es un gen regulador predominante en el ápice del embrión.

WOX8 y *WOX9/STIP* se expresan en la célula basal y el suspensor, parece que actúan de una forma no-autónoma en la célula basal del proembrión. En dobles mutantes, el cigoto se alarga y divide normalmente, pero la célula apical es incapaz de formar un proembrión y en su lugar se forma una célula alargada en forma de dedo muy vacuolada (Breuninger *et. al.*, 2008; Wue *et. al.*, 2007), mientras que la mutación *stip* provoca la letalidad del embrión en presencia del alelo de *WOX8* silvestre, por lo que *WOX9* debe estar confinado a pocas células, las superiores del suspensor. En la doble mutante *wox8 wox9* los genes que originalmente se expresaban en el proembrión no se detectan, entre estos genes están *PINFORMED1 (PIN1)* y *WOX2*, implicando que después de la división del cigoto la expresión de *WOX8* o *WOX9/STIP* en la célula basal restringe la expresión de *WOX2* a la célula apical.

WOX2 actúa antagónicamente a *YDA* y se sugiere una regulación en la señalización en las células hijas del cigoto. *WOX8* y *WOX9/STIP* median la transcripción de *WOX2* en la célula apical y *WOX2* en conjunto con otras actividades contrarresta la actividad de *YDA* para establecer la región apical en el proembrión.

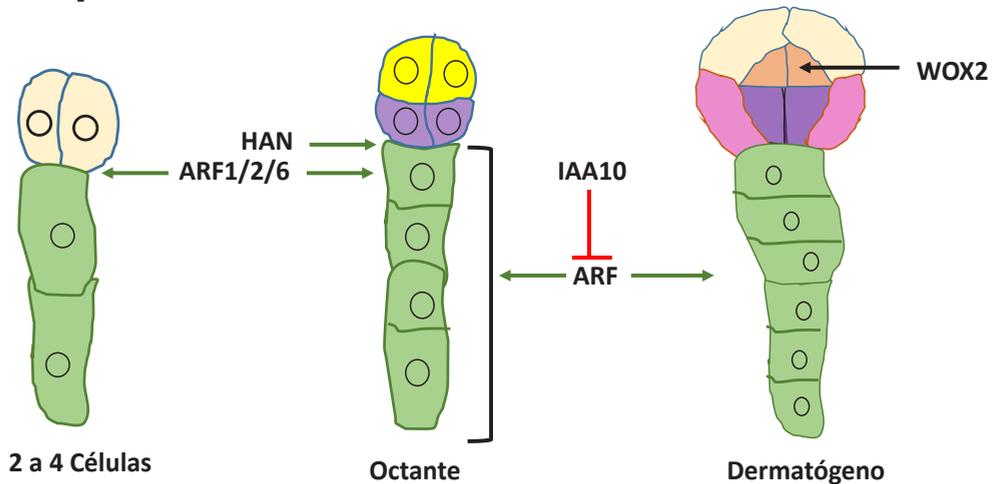


Figura 5. Especificación del protodermo, el suspensor y la frontera en el proembrión de *Arabidopsis*. La identidad del suspensor es mantenida activamente por varios factores de respuesta a auxina redundantes (ARF), los cuales son inhibi-

dos por la proteína IAA10. La frontera entre el proembrión y el suspensor requiere la actividad del factor de transcripción HAN. *WOX2* es necesario para la correcta división de la hilera superior, tanto de las células protodérmicas, como de las células internas. Los diferentes colores expresan los dominios de diferentes tipos celulares que componen el proembrión y al suspensor. Esquema modificado de Jeong *et. al.*, 2011.

B. Regulación del proembrión: flujo de auxinas y la regulación de la frontera

En el desarrollo del proembrión se dan las pautas para establecer la simetría radial y el eje apical-basal, lo cual es dependiente de la acción de la auxina. La auxina actúa como una señal con efecto profundo en el establecimiento de los patrones embrionarios. La acción y efecto de las auxinas antes del estado del proembrión de 16 células se encuentra en debate, pues los mutantes asociados a la auxina expresan pocos o nulos efectos. Los mutantes *gnom* que alteran el reciclamiento de los PIN a la membrana plasmática desde el endosoma (Geldner *et. al.*, 2003), causan divisiones aberrantes en el cigoto (Mayer *et. al.*, 1993), múltiples mutaciones en los genes PIN provocan o anulan el desarrollo del proembrión (Friml *et. al.*, 2003). Es por ello que el transporte polar de las auxinas es indispensable para establecer los dominios en el embrión.

En concentraciones bajas de auxina, la proteína Aux/IAA se encuentra unida al factor ARF, lo cual inhibe su función en la regulación génica (Tiwari *et. al.*, 2001, 2003). Con el aumento de la auxina, ésta se une a TIR1/AFB1-5 subunidad del complejo de ubiquitina-ligasa del SCF^{TIR1/ARF}, lo que incrementa la afinidad al complejo de la proteína Aux/IAA (Gray *et. al.*, 2001; Dharmasiri *et. al.*, 2005a; Kepinski y Leyser, 2005). La ubiquitinación de la proteína Aux/IAA provoca que sea degradada por el proteosoma 26S, liberando del complejo al ARF, permitiendo de esta forma que formen homodímeros y se una a la región de los genes inducidos por esta fitohormona, en la región promotora en el dominio denominado elemento de respuesta auxina e induzca su transcripción (Lokerse y Weijers, 2009). Por otra parte, varias de las proteínas Aux/IAA actúan reclutando al co-represor TOPLESS (TRL; Szemenyei *et. al.*, 2008) y reprimen la respuesta a auxina, de forma que la

cantidad de auxina dentro de la célula está altamente controlada. Cuando el pH en el apoplasto es ácido, la auxina se encuentra protonada, por ello la fitohormona puede entrar a la célula por una difusión simple. Cuando el pH cambia, la auxina se desprotona, posee una carga y por ello no entra a la célula por difusión (Rubery y Shelldrake, 1973), sin embargo, es transportada a través de la membrana plasmática desde el exterior o en su caso desde el interior de la célula mediante transportadores específicos de influxo o de eflujo respectivamente, generando un transporte direccional o polar de la auxina (Grunewald y Friml, 2010). Esta pequeña molécula con un mecanismo tan simple y de pocos pasos en su transporte, regula una infinidad de procesos morfológicos y funcionales diferentes con una alta especificidad.

Las proteínas involucradas en el señalamiento inducido por la auxina son parte de grandes familias. Las familias TIR1/ARB, Aux/IAA y ARF consisten de 6, 29 o 23 miembros respectivamente (Reed, 2001; Dharmasiri *et. al.*, 2005b; Guilfoyle y Hagen, 2007). Las diferentes combinaciones entre estos miembros, a través de diferencias en afinidad y ubicación proporcionan una especificidad en la señal.

Existe un pre-patrón en la expresión de los genes ARF en el proembrión, lo cual contribuye/actúa para especificar la respuesta a las auxinas en las diferentes células, dado que los diferentes tipos celulares de los diferentes tejidos poseen grupos diferentes de ARF, que permiten responder de forma diferencial al mismo estímulo y con ello inducir diferentes patrones en el desarrollo (Rademacher *et. al.*, 2011). Se desconoce como se establece este pre-patrón de ARF, pero en este proceso está involucrado *SPP* (Rademacher *et. al.*, 2012).

El suspensor posee la posibilidad de desarrollarse como un embrión (Schwartz *et. al.*, 1994), por lo que en condiciones normales esta actividad debe de estar reprimida y la auxina es la señal que está involucrada. La manutención de la identidad del suspensor es fundamental para el desarrollo normal del embrión. La yuxtaposición de una doble identidad celular, embrión *vs* suspensor crea la necesidad de establecer una frontera. Esta frontera es mantenida en etapas tempranas de la embriogénesis por el gen *HANABA TARANU* (*HAN*; Nawy *et. al.*, 2010), del cual se genera un represor transcripcional negativo tipo *GATA* (Zhang *et. al.*, 2013), regulando la transcripción de varios genes en la parte basal del pro-embrión o grupo de células.

las en la hilera inferior del pro-embrión (Fig. 5). Cuando su función se altera, el dominio en la expresión de genes basales se extiende más hacia la región apical del proembrión como los genes *SUCROSE TRANSPORTER3*, *WOX5*, *SHORT ROOT*, o a regiones laterales en el dominio del gen *PLETHORA* (Nawy *et. al.*, 2010). Indicando que la frontera entre el suspensor y el proembrión es desplazada apicalmente en el mutante y no se encontró ninguna característica anatómica del eje embrionario en etapas posteriores, sin embargo, todos los defectos causados por la mutación *han* en que se pierden la raíz embrionaria se pueden recuperar en la fase de plántula.

Los genes blanco de *HAN* son dos miembros de la familia *PIN-FORMED*, *PIN1* y *PIN7* que participan en el transporte polar de la auxina (Friml *et. al.*, 2003). En una fase inicial la auxina fluye desde el suspensor hacia el proembrión en que se encuentra polarizado el *PIN7* en la cara apical de cada célula del suspensor (Fig. 6). *PIN1* se expresa en el proembrión e inicialmente muestra una distribución homogénea o no polarizada en la membrana plasmática, con el tiempo se redistribuye y la célula se polariza, en donde el transportador se localiza en la cara basal de las células centrales e inferiores del proembrión (Steinmann *et. al.*, 1999), las cuales posteriormente darán origen al tejido vascular. En una fase más adelantada, en el embrión globular se establecerá un circuito en el transporte polar de auxina desde la parte central hacia la parte basal del embrión, acumulando auxina en la célula superior del suspensor, denominada célula hipofisiaria, induce la expresión de genes inducibles por auxina (Fig. 6 y 8; Petersson *et. al.*, 2009). La expresión de *PIN1* en el proembrión se promueve por la acción del factor de respuesta a auxinas *MONOPTEROS/ARF5* (Weijers *et. al.*, 2006) y *WOX8/WOX9*, que en conjunto con el gen *JLO (JAGGED LATERAL ORGANS)* establecen la fronteras de los órganos laterales (Borghi *et. al.*, 2007; Bureu *et. al.*, 2010).

La pérdida de *MONOPTEROS* o alelos débiles de *JLO*, resulta en embriones que pierden completamente el eje apical/basal con hipocotilos y primordios radiculares mal formados. En el caso del mutante *han*, *PIN1* se deslocaliza y se acumula en la membrana apical de las células centrales de la hilera superior del octante, por su parte, *PIN7*, que se encuentra normalmente en la membrana apical de las células del suspensor, en el mutante *han* se distribuye además en la membrana apical de las células basales del pro-embrión (Nawy *et. al.*, 2010) y con ello existe un cambio en el flujo de auxinas.

Además de la especificación de la polaridad del cigoto, *WOX2* actúa en forma redundante con *WOX1* y *WOX3* en la regulación del compromiso/formación de la protodermis y subsecuentemente en el cambio del plano de división de la capa de las células externas superiores del proembrión, con lo que se establece el eje de simetría radial (Breuninger *et. al.*, 2008); este proceso no se ha descrito para la capa de las células externas de la parte basal del proembrión, probablemente pueda estar involucrado *WOX9* y que sea funcionalmente complementario a *WOX2* (Fig. 4 y 5).

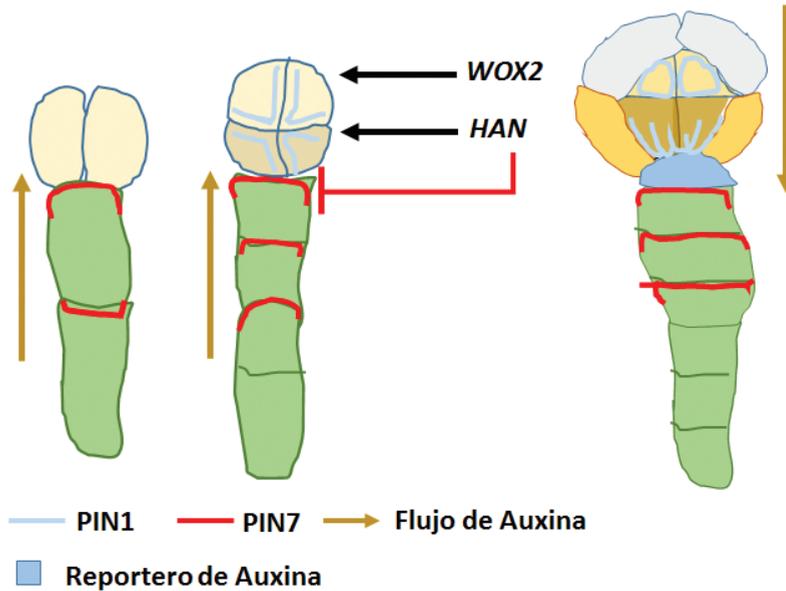


Figura 6. Transporte de auxina y respuesta en el proembrión. Dos ondas de flujo polar de auxina ocurren mediante un transporte polar dinámico a través de PIN7 y PIN1. La respuesta a la acumulación de auxina se determinó mediante el reportero transcripcional DR5, encontrándose en la célula más apical del suspensor. En el proembrión, la expresión de PIN1 requiere la actividad de *WOX2* y *MP*, además *HAN* es requerido para la expresión de PIN1 en la hilera inferior de células del proembrión y restringe la expresión de PIN7, localizada en el suspensor. La dirección de la auxina proveniente desde el suspensor y desde las células centrales del embrión por el transporte polar de la auxina, provocan un máximo de la fitohormona, que se determina por un reportero indicado en azul en el esquema, a esta célula se le denomina célula hipofisiaria y con su célula hija, la célula lenticular, a partir de ellas se generará el centro quiescente y el caliptrogeno. Esquema modificado de Jeong *et. al.*, 2011.

C. Especificación de la protodermis

El compromiso para la formación de la epidermis en las plantas se realiza en la embriogénesis. Posterior a la fertilización, en la etapa de transición entre el proembrión al embrión globular se inicia el establecimiento de los tres sistemas tisulares (Kaplan y Cook, 1997), esta etapa es crucial y ocurre en un proembrión con simetría radial y antes de la adquisición del eje apical/basal (tallo/raíz) y el establecimiento de los meristemas apicales. En *A. thaliana* y en el maíz la polaridad apical/basal en la célula se manifiesta como una distribución asimétrica del contenido citoplasmático que se da desde el cigoto (Goldberg *et. al.*, 1994). En el desarrollo embrionario de *Arabidopsis* se empieza a determinar morfológicamente una capa externa después de la cuarta ronda de división celular, equivalente al proembrión de 16 células o etapa de dermatógeno (Fig. 4). En el caso del maíz las divisiones son menos sincrónicas, la diferenciación de la protodérmis es aparente hasta los 6 días de iniciada la fecundación. En ambas especies, el compromiso para formar la protodermis se caracteriza por la presencia de una forma rectangular regular de las células, con paredes celulares más gruesas, lo que se exagera en las etapas posteriores en que se dividen anticlinalmente (Zhang y Laux, 2011).

En *A. thaliana* la diferenciación citológica es precedida por la expresión de dos genes con funciones redundantes, MERISTEM LAYER1 (AtML1) y PROTODERMAL FACTOR2 (PDF2) los cuales contienen un homeodominio tipo cremallera (zipper) de leucina clase IV (HDZIPIV), los cuales se expresan desde el cigoto hasta el proembrión de 16 células, y en una etapa posterior su expresión se restringe a la capa de células externas (Lu *et. al.*, 1996; Abe *et. al.*, 2003; Tanaka *et. al.*, 2007). De forma tal que el mutante *atml1/pdf2* es incapaz de organizar la capa protodérmica en la parte apical del embrión (Abe *et. al.*, 2003). En el maíz, el gen HDZIPIV que se expresa es OUTER CELL LAYERED1 (OCL1), mostrando un patrón uniforme de expresión en el proembrión a los 3 días de desarrollo, a partir del 4° día se establece un gradiente en la expresión génica y para el 5° día se encuentra restringida la expresión a la capa externa, lo que correlaciona con el inicio de la diferenciación citológica (Ingram *et. al.*, 1999). Por lo que se ha establecido que *AtML1* y *PDF2* en *Arabidopsis* y *OCL1* en maíz regulan a nivel molecular la inducción de la identidad protodérmica (Ingram *et. al.*, 1999; Abe *et. al.*, 2003).

Durante la inducción de la protodermis, los genes *DEFECTIVE KERNEL1* (*AtDEK1*) actúan en la vía de señalamiento por arriba a los genes *AtML1* y *PDF2* (Fig. 6; Johnson *et. al.*, 2005), en el mutante *dek1* se establece la polaridad en un eje apical/basal pero la división de las células del embrión y del suspensor están alteradas y los embriones son abortados en etapas tempranas del desarrollo (Johnson *et. al.*, 2005; Lid *et. al.*, 2005), en donde no ocurre la localización específica en la expresión del gen *AtML1* en la capa externa que especifica a la protodermis (Johnson *et. al.*, 2005). *AtDEK* codifica para una proteína integral de membrana con un dominio citoplasmático carboxiterminal con actividad de proteínasa cisteín calpaina (Lid *et. al.*, 2002), la cual sirve para percibir la señal producida en el apoplasto y generar la transducción de la señal a través de la ruptura autocatalítica del dominio calpaina, la cual es liberada de la membrana (Johnson *et. al.*, 2008). La expresión de *AtDEK* no se encuentra restringida a la capa celular externa, más bien los transcriptos se encuentran localizados en todo el embrión en etapas tempranas de la embriogénesis (Johnson *et. al.*, 2005; Lid *et. al.*, 2005), por lo que una hipótesis atractiva, es que una señal de posición proveniente de fuera del embrión es percibida a través de *AtDEK1* y es requerida para la diferenciación de la capa protodérmica (Fig. 7). Dentro de estas señales están involucrados *ABNORMAL LEAF SHAPE1* (*ALE1*) y *ALE2*, los cuales codifican para una subtilisina serin-proteasa y un RLK o receptor tipo serin/treonina cinasa respectivamente (Tanaka *et. al.*, 2001, 2007). *ALE2* se expresa a través de todo el embrión (Tanaka *et. al.*, 2007; Tsuwamoto *et. al.*, 2008), mientras que *ALE1* muestra una alta expresión en la región del endospermo contiguo al embrión (ERE, Tanaka *et. al.*, 2001; Yang *et. al.*, 2008). La expresión de *ALE1* esta regulada por el factor de transcripción *ZHOUP1/RETARDED GROWTH OF EMBRYO1* (*ZOU/RGE1*) una proteína con una estructura básica de hélix-loop-helix o bHLH (Yang *et. al.*, 2008). La mutación *ale1*, produce la muerte de las plántulas en condiciones de baja humedad, en las que se exhibe una morfología irregular de las células epidérmicas, donde se pierde la continuidad de la capa cuticular (Tanaja *et. al.*, 2001).

Se ha postulado que la pared celular del cigoto proporciona información para mantener la identidad de las células externas o protodérmicas, siendo ellas las únicas que conservan fragmentos de esta pared después de una serie de rondas de división (Laux *et. al.*, 2004) aunado a esto, en los cítricos

se ha demostrado la existencia de una película de cutina rodeando al cigoto, esta característica es necesaria para establecer la identidad futura de la protodermis (Bruck y Walker, 1985). Se ha propuesto que la identidad epidérmica se puede adquirir una sola vez, y esto ocurre en la embriogénesis. La identidad se mantiene en la capa externa mediante una señalización que requiere la presencia de paredes celulares externas intactas y/o la presencia de cutina. De forma tal que la capacidad de depositar cutícula está restringida exclusivamente a las células epidérmicas.

Capítulo III.

Desarrollo del embrión globular

Una etapa crucial en el desarrollo embrionario es el embrión globular en *Arabidopsis thaliana*, etapa en que el embrión posee alrededor de 150 células y se especifican los dominios del meristemo apical del tallo y el meristemo apical de la raíz, con ello se establece el eje de polaridad apical/basal en el embrión, además, las células centrales del embrión se comprometerán a ser células fundadoras del tejido vascular (Fig. 8). En esta fase se da la identidad regional, en donde se expresan grupos de genes para dar origen a los cotiledones, los meristemos apical de tallo y de raíz como se menciono anteriormente (Long *et. al.*, 1996, Long y Barton, 1998; Aida *et. al.*, 2004).

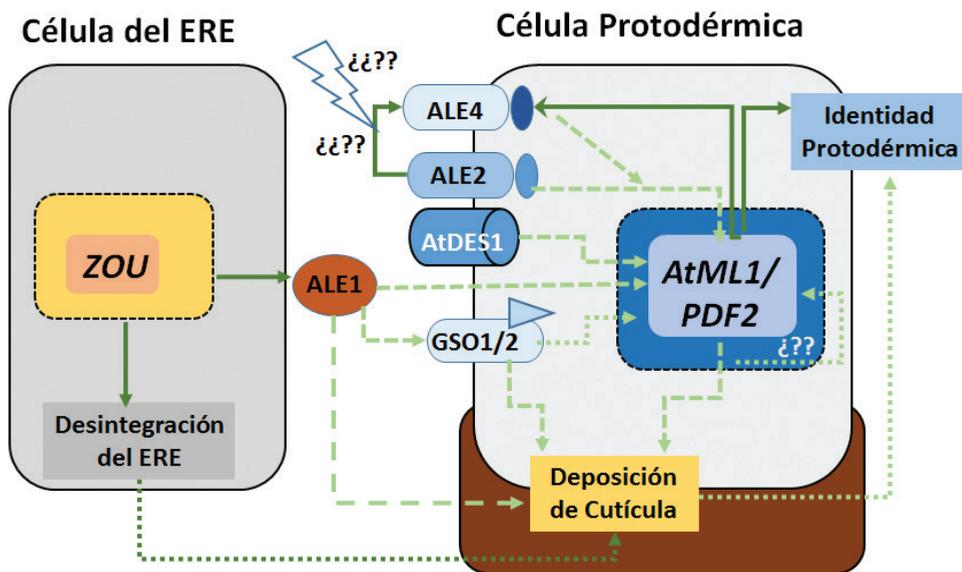


Figura 7. Desarrollo del linaje celular protodérmico. Red genómica para la mantención de la identidad protodérmica en embriones. En el embrión de *Arabidopsis thaliana* el regulador mejor caracterizado en la identidad protodérmica son las proteínas con homeodominio de zipper de leucina clase IV (HDZIPIV), MERISTEM LAYER 1 (AtML1) y PROTODERMAL FACTOR2 (PDF2). Estas proteínas son requeridas para la adquisición de la identidad protodérmica y a través de la regulación en la expresión de las proteínas necesarias para deposición de la cutícula. La expresión de estos genes aparentemente son regulados por al menos tres diferentes vías. Las proteínas fitocalpains DEFECTIVE KERNEL1 (AtDEK1) que se postula que son percibidas por un componente aún no conocido y son necesarios para la mantención de la expresión de genes de identidad protodérmica como *AtML1*

y *PDF2*. Una segunda vía involucra un receptor tipo cinasa (RKL), *ARABIDOPSIS CRINKLY4* (*ACRA4*) y *ABNORMAL LEAF SHAPE2* (*ALE2*), el ligando del cual no se ha identificado. *AtML1* y *PDF2* promueven la expresión de *ACR4*, lo que sugiere la presencia de una retroalimentación positiva. En una tercera vía, la proteasa subtilisina *ALE1*, se expresa en el *endospermo contiguo al embrión* (*ERE*) en respuesta a la actividad del factor de transcripción *ZHOUP1* (*ZOU*), se cree que éste procesa una molécula de señalización percibida por el embrión y es necesaria para la formación normal de la cutícula que rodeará posteriormente al embrión. *GASSHO1* (*GSO1*) Y *GSO2*, dos receptores tipo RLK redundantes están involucrados en este proceso. El depósito de la cutícula por sí mismo, aparentemente es necesario para la manutención de la identidad epidérmica, sin que se entienda aún el mecanismo involucrado. La degradación del *ERE*, está regulado por *ZOU* y puede jugar un papel en el depósito de la cutícula. Las líneas solidas involucran vías que se han comprobado. Flechas punteadas indican vías propuestas o vías funcionales propuestas observadas en mutantes. Modificado de Tanaka *et. al.*, 2001, 2007; Yang *et. al.*, 2008).

A. La auxina como un regulador de importancia en la determinación estructural del embrión

La auxina es una fitohormona que regula y modula diversos procesos, entre ellos el desarrollo embrionario. La generación de dominios o regiones celulares con una concentración diferencial en la cantidad de auxina, debido al flujo que se da por el transporte polar de la fitohormona empleando los transportadores de influjo y eflujo, en conjunto con la sensibilidad o capacidad de detección diferencial de las células a esta fitohormona, inducen una respuesta. Se ha establecido que un proembrión de 32 células ya posee un transporte polar de auxina, con ello se da la capacidad de generar dominios diferenciales, que conducirán al establecimiento de un eje apical/basal.

En *Arabidopsis*, durante el estado de embrión globular temprano, la auxina se concentra en el embrión, debido a que es transportada desde los tejidos maternos (los tegumento o pared del ovulo) a través del suspensor (Fig. 6), el cual utiliza el transportador de eflujo de auxina *PINFORMED7* (*PIN7*), uno de varias isoformas de este tipo de transportadores. Conforme progresa el desarrollo embrionario, la concentración máxima de auxina se encuentra en la parte central del embrión, región donde se induce e inicia la síntesis de nueva fitohormona. Este grupo de células poseen un transporte polarizado

de la auxina, en donde se utiliza el transportador PIN1 para dirigir la fitohormona hacia la parte basal del embrión y de ahí se transporta mediante el PIN4 a la célula denominada hipófisis. La célula hipofisiaria es una de las células hijas derivadas después de varios ciclos de división de la célula basal producto de la división asimétrica del cigoto. La célula basal origina por lo tanto al suspensor y la célula cercana a las células embrionarias inferiores es la célula hipofisiaria (Fig. 6 y 8).

Así, la confluencia en el transporte de auxina desde el suspensor y desde la región central del embrión globular, hacen que se establezca un máximo de auxina en la célula hipofisiaria, estímulo que da origen a que se determine la estirpe celular que formará el meristemo apical radicular. La división asimétrica de la hipófisis crea una célula hija pequeña, de forma de lente denominada célula lenticular, la cual es la progenitora de la estirpe celular que formará el centro quiescente a partir del cual se origina el meristemo apical de la raíz, la otra célula hija larga producto de la división, que ocupa una posición inferior a la anterior, dará origen a las células madre que se comprometerán para formar al caliptogeno, del cual se desarrollará la caliptra en *Arabidopsis* (Fig. 8 y 16).

Por lo tanto, la auxina es el inductor inicial del centro quiescente de la raíz y el factor fundamental para la especificación de este meristemo es el producto del gen *MONOPTEROS (MP)/AUXIN RESPONSE FACTOR5 (ARF5)* y la proteína represora codificada por *BODENLOS (BDL/IAA12)*, MP es un regulador clave en la especificación de la célula hipofisiaria y las demás células que conformarán a la raíz embrionaria (Fig. 8A; Berleth y Jurgens, 1993; Hardtke y Berleth, 1998; Weijers *et al.*, 2006). Mutaciones de MP y un parálogo cercano a éste, *ARF7/NPH4*, resulta en una especificación incorrecta en la hipófisis y permite una división en las células basales del embrión que generará una plántula sin raíz (Haecker *et al.*, 2004; Möller y Weijers, 2009). La expresión de MP y BDL está confinada al embrión y actúan en una forma no-autónoma. La auxina induce la expresión de MP en el centro del embrión, con lo que se da la división de la hipófisis, la fitohormona es capaz de restablecer la formación de la raíz en el mutante *mp* (Weijers *et al.*, 2006). La función inicial de MP es establecer el eje con polaridad apical/basal mediado por el transporte polar de auxinas. La acumulación de auxinas en la hipófisis, es la señal que da inicio a la formación de la raíz. La aplicación

exógena de auxina no es suficiente para restablecer la formación de la raíz en el mutante *mp*.

MP a su vez regula al grupo de genes *TARGET MONOPTEROS (TMO)* en particular a *TMO5* y *TMO7*, los cuales codifican para factores de transcripción con una estructura basic-helix-loop-helix (bHLH), ambos factores se encuentran en las células centrales y basales del embrión (Fig. 8A; Schlereth *et al.*, 2010). La reducción en la expresión de *TMO7* en etapas tempranas causa divisiones aberrantes de la hipófisis y sus descendientes, mientras que la expresión de *TMO7* en el mutante *mp* restablece parcialmente el fenotipo. *TMO7* media un grupo de funciones dependientes de *MP* y *TMO7* como blanco de *MP* se sobrepresa exclusivamente en el embrión. La proteína TOM7 es móvil y se desplaza desde las células centrales/basales del embrión donde es sintetizada, hacia la célula hipofisiaria, actuando como una señal que es requerida para la especificación de ésta célula (Fig. 8A y 8B). En el mutante *mp*, la expresión local de *TMO7* en la región de la hipófisis restablece la raíz, indicando que *TMO7* es uno de varios factores inducibles por *MP* y requeridos para generar el centro quiescente. *TMO7* es miembro de una subfamilia pequeña de proteínas bHLH que han perdido el dominio de unión al ADN, por ello deben de interaccionar con otros factores de transcripción.

Por su parte, *TOM5* conforma un dímero con otro miembro de la familia bHLH, *LONESOME HIGHWAY (LHW)*; Ohashi *et al.*, 2013a), actuando en la orientación periclinal del plano de división durante el desarrollo del tejido vascular (Fig. 8B; De Rybel *et al.*, 2013).

Además, la familia *TMO* se encuentra involucrada en las vías inducibles por giberelinas y brasinoesteroides, por lo que es un punto potencial en la integración de las vías de señalización de varias fitohormonas. La participación de las giberelinas y los brasinoesteroides no está clara en la embriogénesis (Lee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009).

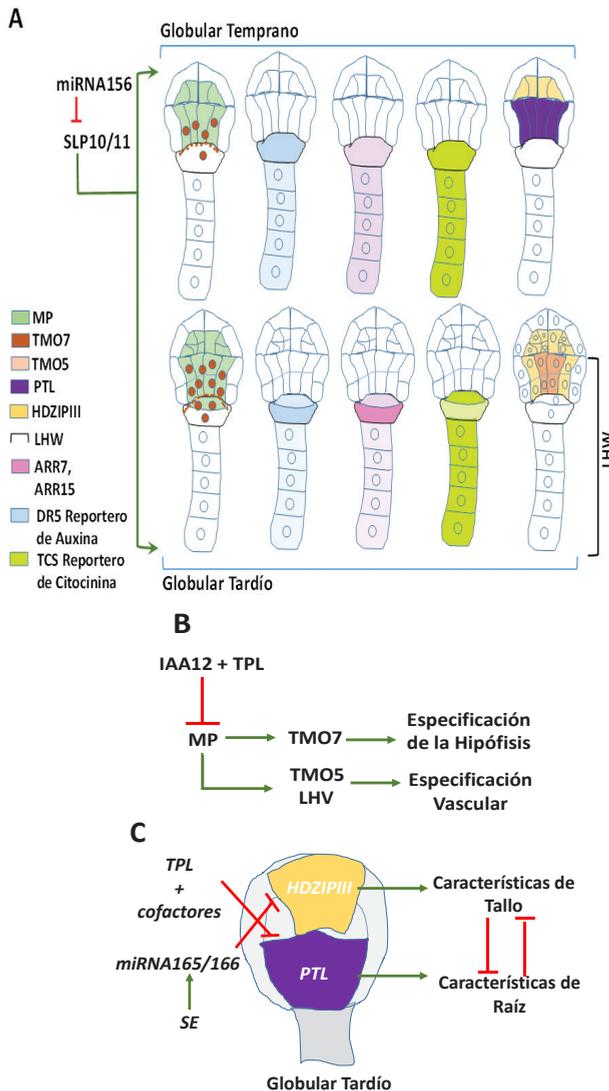


Figura 8. Especificación de los dominios celulares en el embrión globular. En el embrión globular temprano de *Arabidopsis* se especifican dos dominios celulares, la hilera de células superiores y la hilera de células basales. A, El gen *MONOPTEROS* (*MP*) se expresa desde la fase de proembrión; en el embrión globular, este gen a su vez regula positivamente a *TMO7* en la hilera inferior de células del embrión, el cual se moviliza hacia la base hasta alcanzar a la célula superior del suspensor y le confiere especificaciones diferenciales al del resto del suspensor, además en el esquema se

muestra el reportero DR5 para auxinas y TCS para las citocininas, y los factores de respuesta ARR7 y ARR15, los cuales participan para especificar a la célula hipofisiaria y lenticular. En el proembrión octante se acumula una cantidad considerable de DICER-LIKE1 (*DCL1*) la cual es requerida para la biosíntesis del miRNA156, la mutación y/o pérdida de estos componentes detienen el desarrollo embrionario en esta etapa. En el proembrión de ocho células de los mutantes *dcl1*, los genes que se expresan en mayor cantidad son *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE10* (*SLP10*) y *SLP11*, que codifican para factores de transcripción; de forma tal que en condiciones normales, *DCL1* realiza la biosíntesis del miRNA156 que reprime la expresión de *SLP10* y *SLP11*, previniendo la prematura acumulación de estos factores, los cuales deben expresarse en una fase posterior en el desarrollo o fase de maduración. La represión de los genes *SLP* previene la “maduración” del embrión en una fase temprana del desarrollo. *DCL1* es necesario para los eventos de compromiso celular y después para la propia división celular de las células subepidérmicas y de la hipófisis. En el embrión globular temprano, la mutación *dcl1* y la falta del miRNA156 provoca la sobreexpresión de aproximadamente 50 genes blancos (Nodine y Bartel, 2010; Preston y Hileman, 2013). En el embrión globular tardío, un dímero de TMO5 (el cual fue inducido por *MP*) y *LHV* despierta la regulación del desarrollo del tejido vascular en las células centrales del embrión tardío. **B**, la actividad de *MP* es regulada en el embrión globular por *IAA2* que recluta a *TOPLESS* (*TPL*) y co-represores que aún no se conocen, para inhibir selectivamente a *MP*. **C**, La regulación en la expresión diferencial de *MP* permite comprometer a la hilera de células superior que expresa la familia *HDZIIII* que poseerá características de tallo, mientras que en la hilera inferior de células se expresa *PLETORA 1/2* (*PTL*) que poseerá características de raíz. Esquema modificado de Jeong *et. al.*, 2011, Wendrich y Weijers, 2013.

Por otra parte, la interacción de la auxina y la citocinina se ha demostrado que forma parte en la decisión de la formación de la raíz incipiente (Fig. 8A; Müller y Sheen, 2008). Las citocininas afectan la expresión génica a través de dos familias de reguladores de respuesta, los activadores de respuesta tipo B (*BRR*) y los represores de respuesta tipo A (*ARR*), los cuales se expresan abundantemente en el suspensor, incluyendo a la hipófisis en el estado de embrión globular. Después de la división de la hipófisis, la expresión de estos activadores/represores disminuyen en la célula hija basal de la hipófisis, destinada a formar el caliptrógeno, mientras que la célula hija o lenticular y el resto del suspensor la expresión se encuentra alta en ambos elementos (Fig. 8A). Las auxinas y las citocininas poseen una relación antagónica. Los factores de respuesta a las auxinas, los ARF, en particular *MONOPTEROS/ARF5* y *NPH4*, median la activación de los RR de tipo A, que provocan la

represión en la respuesta a citocininas en la célula hija hipofisiaria basal, en particular ARR7 y ARR15. La acción de ARR7 y ARR15 por RNA de interferencia (miRNA), reduce la expresión de *WOX5*, *SCARECROW* y *PLETHORA*, factores de transcripción requeridos para mantener los nichos celulares totipotenciales radiculares y con ello se altera la formación del centro quiescente. Mientras que la interferencia por miRNA en la transcripción de *ARF10*, *ARF16* y *ARF17* causa una aberración en el suspensor.

B. Desarrollo de la etapa de embrión globular: especificación del dominio apical vs basal

Ambos meristemos, el apical de tallo y el de raíz tienen un origen filogenético común, en donde la regulación y vías de señalamiento se comparten, como es el efecto de las auxinas y citocininas y los factores con homodominio tipo WUS/WOX5 (Benkova *et. al.*, 2003; Sarkar *et. al.*, 2007; Müller y Sheen, 2008; Zhao *et. al.*, 2010). Debido a que ambos meristemos dan origen a órganos completamente diferentes, implica que la organización común debe de ser interpretada en una manera dependiente del contexto y por ello son requeridos “maestros de la regulación”, en algunos tejidos son suficientes para imponer el patrón de organogénesis particular y como el caso entre el dominio radicular *vs* el tallo se requiere de factores de transcripción adicionales para el establecimiento de los meristemos apicales, los cuales se encuentran vía abajo en la señalización mediada por los ARF. *PLETHORA* (*PTL*) codifica para un miembro de la familia de proteínas con un dominio AP2 (APETALA2) y la CLASE III HDZIP son reguladores que cumple esta función. Las proteínas PTL muestran una distribución gradual sobre el eje apical-basal en la raíz madura (Galinha *et. al.*, 2007). La expresión de PTL en el dominio radicular es promovida por la auxina. En el embrión globular temprano los miRNA de PTL se encuentran en el grupo de células basales y más tarde su transcripción es confinada a las células del incipiente centro quiescente y a las células centrales del embrión, estas últimas serán las células precursoras del tejido vascular. La manutención de los transcritos de *PTL1* es dependiente de *MP/ARF5* (Aida *et. al.*, 2004). Una evidencia de la expresión regional de *PTL1* se confirmó en la mutación dominante *tpl1* (mutación en *TOPLESS 1*) que causa una transformación condicional del hipocotilo de ser un dominio apical o de tallo a una raíz o estructuras tipo raíz. TLP funciona

como un co-represor para factores de transcripción que poseen un dominio EAR (incluyendo a las proteínas AUX/IAA) formando tetrámeros que recluta a reguladores de la cromatina como las HDAC (histona desacetilasas que remueven grupos acetilos de las lisinas de las histonas) y forman estados compactos de la cromatina en un estado refractario a la transcripción, también empleado en procesos epigenéticos (Long *et. al.*, 2006; Szemenyei *et. al.*, 2008; Weijer y Wagner, 2016), BDL y otras proteínas IAA son requeridas para que TLP funcione como un co-represor. Los genes *PTL* en el embrión son blanco de la represión por parte de *TPL1*, la mutación *tpl1* causa la expresión de *PTL* en el ápice o hipocotilo o futuro tallo. La expresión forzada de *PTL* en el hipocotilo produce la formación de estructura tipo raíz en ese ápice, por lo que la expresión de *PTL* en la parte basal del embrión es la responsable de especificar el dominio basal que origina la raíz (Fig. 8C).

La exclusión de la expresión de *PTL* en la región apical es necesaria para la formación del dominio apical (Smith y Long, 2010). La inhibición de la expresión de *PTL* en la región apical se da por la actividad de los genes de la familia *HDZII*. Las proteínas clase III HDZIP funcionan o especifican al hipocotilo y promueven las características adaxiales en órganos laterales como los cotiledones y establecen las características centrales como las del meristemo apical de tallo en una etapa posterior (Engstrom *et. al.*, 2004). Los genes *HDZIP III* están ampliamente expresados en la hilera de células apicales del embrión globular, estos genes están excluidos de expresarse en el la base del dominio radicular, que será el centro quiescente. Solamente la pérdida múltiple de los genes *clase III HDZIP (HDZIPIII)* afectan el patrón embrionario, resultando en un embrión que pierde el meristemo apical de tallo y con un sistema vascular incipiente (Prigge *et. al.*, 2005). Los transcritos de la *clase III HDZIP* son regulados negativamente por los miRNA165/166 (Tang *et. al.*, 2008), familia antigua de microRNA que esta presente en las plantas terrestres (Floyd y Bowman, 2004). Mutaciones puntuales en los sitios de unión a los miRNA, da lugar a alelos semidominantes, hay que recordar que la unión del miRNA al mRNA causa su degradación; otros semialelos causan efectos no obvios en el embrión, pero interfieren con el desarrollo normal de los órganos laterales y el sistema vascular del hipocotilo (Engstrom *et. al.*, 2004; Ochando *et. al.*, 2006).

Un mayor efecto se obtiene con la ganancia en la función fenotípica con alelos fuertes del gen *SERRATE (SE)* que codifica para una proteína con dedos de zinc, el cual interrumpe la biogénesis de los miRNA. Embriones con la mutación *se-5* se desarrollan normalmente pero se restringe o acorta el tiempo de su participación como el requerido en el embrión normal, de esta forma no puede mantenerse el eje apical/basal y no se realiza la formación de la raíz (Grigg *et. al.*, 2009), el efecto observado se debe a la expresión ectópica de los genes *PHABULOSA* y *PHAVOLUTA* pertenecientes a la familia *clase III HDZIP* en el meristemo radicular incipiente, por ello, la *clase III HDZIP* es un represor de raíz (Fig. 8C). Alelos *HDZIP* resistentes a la acción de los miRNA suprimen la formación de la raíz en los mutantes *tpl-1* y aumentan el efecto en la pérdida de función de los alelos en el mutante *plt*. La expresión forzada o ectópica de los alelos *HDZIP* resistentes a miRNA en la región basal del embrión empleando el promotor de *PTL2* es suficiente para causar una transformación homeótica en las raíces incipientes y su transformación en hipocotilos (Smith y Long, 2010). El mecanismo en el antagonismo entre *PLT* y *HDZIPIII* no se ha dilucidado y se sugieren que existen regiones moleculares específicas en la expresión de los factores de transcripción tipo *HDZIPIII* hacia *PLT*.

La participación de los miRNA en la especificación de los dominios apical/basal hace que estas moléculas estén involucradas en un mayor número de vías. Un análisis de la biosíntesis de los miRNA realizado en el mutante *dicer-like1 (dcl1)*, genera la disrupción de varios procesos, incluyendo la pérdida de expresión de varios marcadores moleculares en los linajes celulares, como es el caso de *WOX2*, *WOX5*, *WOX8* y la expansión de los marcador protodérmica como *MERISTEM LAYER 1 (ATML1)* y *PROTODERMAL FACTOR1*. En el mutante *dcl1* se expresan temporalmente la actividad de genes de desarrollo tardío como los factores de transcripción *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE 10 y 11*, los cuales son regulados por el miRNA156 (Nodine y Bartel, 2010).

El antagonismo entre *HDZIPIII* y *PLT* genera dos dominios en el embrión globular, la hilera de células centrales superiores que expresan a los genes de la familia *clase III HDZIP*, como *PHABULOSA*, *PHAVOLUTA*, *REVOLUTA*, *INCURVATA4*, y *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN BOX 8*, que inhiben la expresión de *PLT* en ese dominio celular; y la hilera de células inferior del embrión globular que expresa a *PLT*, dominio en que se bloquea la expresión de los

genes *HDZ1/III*. El patrón en la expresión génica de los meristemos es incipiente y complejo, lo cual se realiza en una etapa posterior a la etapa de embrión globular.

C. Desarrollo de la etapa de embrión globular: especificación del meristemo apical de tallo.

En las plantas, las células totipotenciales se encuentran confinadas a regiones especializadas conocidas como meristemos, los cuales persisten en la planta adulta. El término meristemo fue usado por primera vez por el botánico suizo Carl Wilhem von Nägeli en 1858, esta palabra deriva del griego *merizen* o se divide; por lo que el término en la actualidad es funcional e implica el sitio que provee de células para la formación de los diversos órganos (Lyndon, 1998; Tooke y Battey, 2003).

En el meristemo existen dos procesos, la manutención de una cantidad de células totipotenciales que son renovadas, y otro proceso que permite la exportación de estas células para su compromiso y la formación de los diversos órganos (Fig. 1). El número de células en el meristemo debe de permanecer constante para cumplir con el primer proceso, con ello se forma una estructura abierta o funcional durante la vida del organismo (Lyndon, 1998; Laufs *et. al.*, 1998; Haecker y Laux, 2001; Carles y Fletcher, 2003); de lo contrario, si todas las células totipotenciales se comprometen, implica que el tiempo en que esta estructura meristemática permanece en la planta es finito y por ello se tiene un meristemo cerrado. Para que exista un meristemo abierto debe de existir un balance entre la cantidad de células madre o iniciales totipotenciales que conforman el meristemo y la cantidad de células que se exportan del meristemo para comprometerse y formar los órganos (Laufs *et. al.*, 1998; Haecker y Laux, 2001). *WUSCHEL* (*WUS*) es un gen esencial para la manutención del meristemo apical de tallo (SAM por sus siglas en inglés), que codifica para un factor de transcripción, que debe su nombre a que los mutantes *wus* presentan un meristemo desorganizado y con un desarrollo prematuro, en que se da una apariencia “borrosa”. Para mantener un balance entre las células madre y las células hijas con un compromiso, existe una retroalimentación a través de dos genes *WUS* y *CLAVATA* (Schoof *et. al.*, 2000).

El meristemo es una pequeña región o nicho de células con un microambiente específico que permite que las células permanezcan con una capacidad totipotenciales y por ello indiferenciadas en respuesta a señales posicionales provenientes de entorno (Scheres, 2007; Sablowski, 2007; Tucker y Laux, 2007). La arquitectura del meristemo apical (SAM) en *Arabidopsis*, que consiste de 500 células que conforman una estructura con forma de domo de aproximadamente 60 μ m de diámetro en el ápice del tallo. Estas células se dividen en regiones específicas, lo que definen zonas y capas celulares (Reddy, 2008). De forma tal que se encuentran 3 capas: la L1, capa más externa del meristemo, constituida de células que se dividen únicamente en forma anticlinal, es decir el plano de división es perpendicular a la superficie de la estructura, con ello implica que mantiene la estructura de monocapa que se expande lateralmente, las células de esta capa se comprometen y formarán a la protodermis de los diferentes órganos; la L2, capa subyacente a la L1, conteniendo células que se dividen casi totalmente en planos anticlinales, de ellas se originará las células del meristemo de crecimiento y su diferenciación dará al tejido de crecimiento o fundamental; la L3, es la capa más interna de las tres, las células que la conforman se dividen en diferentes planos, y formará los tejidos centrales de las hojas tallos (Meyerowitz, 1997; Weigel y Jurgens, 2002; Williams y Fletcher, 2005). En la mayoría de las dicotiledoneas, las capas L1 y L2 corresponden a la túnica, mientras que la L3 y el centro de organización en la parte central sería el corpus. Para la mayoría de las monocotiledoneas, la túnica solo correspondería a la L1 (Carles y Fletcher, 2003; Kim *et. al.*, 2007).

Tres zonas funcionales y citohistológicas se encuentran sobrepuestas a estas tres capas celulares (Fig. 9). La zona central (CZ) conformada por células totipotenciales se encuentra flanqueada por la zona periférica (PZ) con células multipotenciales, término que implica una restricción en la capacidad de diferenciación de las células, por ello existe ya un cierto compromiso en estas células. Dentro de la CZ, por debajo de las tres capas L1 a L3 se encuentra el Centro de Organización, nicho de células madre del meristemo y que provee de células a la capa L3, la generación de nuevas células son transferidas a la L2 y L1. La zona periférica (PZ) puede a su vez dividirse en una zona periférica externa (OPZ) y una zona periférica interna (IPZ). Las células dentro de la IPZ son capaces de revertir cualquier compromiso adquiri-

do, sin embargo las células de la OPZ, pierden parte de la multipotencialidad y no pueden regresar a ser células sin compromiso (Reddy y Meyerowitz, 2005; Reddy, 2008). En la parte fronteriza se encuentra un grupo de células multipotenciales que proveen de células al ápice del tallo y que soportan la SAM, zona del borde, que en inglés se denomina Rib (Fig. 9A; Lyndon, 1998).

En *Arabidopsis*, estudios citológicos de la CZ establecieron que existen 9 células madre o iniciales, tres células por capa; estudios con marcadores moleculares usando *CLAVATA3* muestran que este número es mayor, estableciéndose en 35 células aproximadamente (Steward y Dermen, 1970; Reddy y Meyerowitz, 2005). Las células de la CZ permanecen casi constante en la vida de la planta y poseen ciclos más largos que las de la PZ, esto es debido a que estas células constantemente están en una revisión o chequeo, que permite una replicación fidedigna (Irish y Sussex, 1992) para que no se produzcan errores en el proceso. Para esto, son indispensables los genes *BRCA2-like* que están involucrados en la reparación de rupturas de doble cadena de DNA, manteniendo la estabilidad genómica, lo cual lo demuestra el doble mutante *brca2a brca2b* que presenta una alteración en la progresión de ciclo, sugiriendo que la incapacidad o ineficiencia en la reparación de los daños en la doble hebra del DNA en éstos mutantes provoca la alteración en la programación del ciclo celular y la desorganización en el SAM con la expresión alterada de *WUS* (Abe *et. al.*, 2009, Dumont *et. al.*, 2011). En la PZ, las células se dividen a una mayor velocidad y esto es debido a los requerimientos de proveer una cantidad suficiente de células a los meristemos laterales, por ejemplo, para generar los primordios de los órganos (Fig. 9A; Clark, 2001; Reddy *et. al.*, 2004; William y Fletcher, 2005; Reddy, 2008).

El centro de organización (OC) se caracteriza por la expresión del gen *WUSCHEL*, el cual codifica para un factor de transcripción con un homodominio y pertenece a la familia de genes *WOX* (Laux *et. al.*, 1996). Este es un gen de identidad meristemática apical de tallo y se expresa en aproximadamente en 10 células del OC, el cual se encuentra en capas más profundas a la L3 (Fig. 9B).

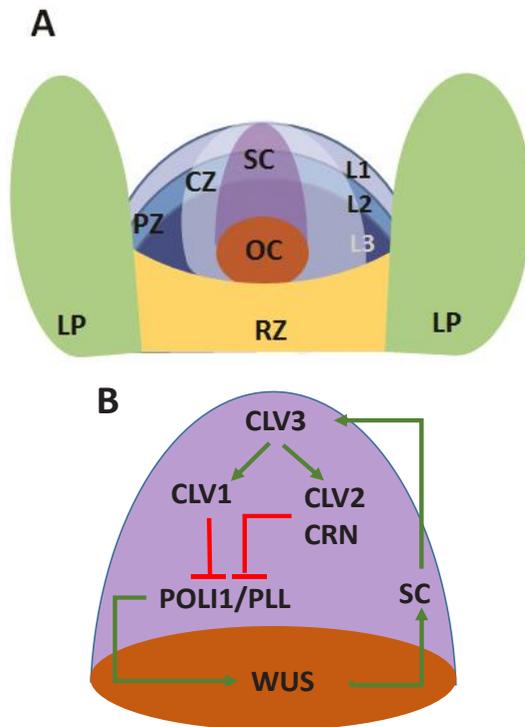


Figura 9. Estructura del Ápice en el hipocotilo/tallo. **A**, estructura básica del meristemo apical, se muestra el centro de organización (OC), la zona de células meristemáticas (SC), la zona central (CZ), la zona periférica (PZ), cotiledón/primordio foliar (LP) y la frontera (RZ) del meristemo. Las capas del meristemo se indican con L1, L2 y L3. **B**, Regulación génica de los marcadores de la OC y la CZ. Esquema modificado de Lyndon, 1998 y Dodsworth, 2009.

Para la regulación de *WUS* están involucrados varios factores diferentes, el más notable es la vía de regulación de *CLAVATA* (CLV) (Fig. 9B; Betsuyaku *et al.*, 2011). La señal que produce *WUS* en el OC estimula la expresión de *CLAVATA3* (CLV3), mientras que *WUSCHEL* (*WUS*) promueve la actividad celular meristemática, *CLAVATA3* reprime esta actividad, la sobreexpresión de este último provoca la disminución del número de células que expresan a *WUSCHEL*, por lo que se genera un circuito de retroalimentación negativo (Clark *et al.*, 1995; Fletcher *et al.*, 1999; Lenhard y Laux, 1999; Fletcher y Meyerowitz, 2000; Brand *et al.*, 2000; Schoof *et al.*, 2000). La pérdida de función en el

mutante *clv3* muestra un SAM alargado, y la expresión de *WUS* está expandido fuera del dominio normal, mientras que la sobreexpresión de *CLV3* causa la terminación prematura del meristemo (Mayer *et. al.*, 1998; Brand *et. al.*, 2000; Miwa *et. al.*, 2009). La disminución en la expresión de *WUSCHEL* provoca que existan pocas células en el centro de organización ya que son movilizadas a la L3. En forma opuesta se engrosa el número de células del centro de organización si se sobre expresa *WUSCHEL*. Existe por lo tanto una vía o circuito de retroalimentación negativo que mantiene un balance entre los compartimentos que expresan a estos dos genes. De forma tal, la señal que genera *CLAVATA3* en la L1 y L2 difunde a la L3 en que se encuentra con el receptor *CLAVATA1*, con ello se provoca que las células que expresan a *WUSCHEL* por provenir del centro de organización disminuyan la expresión de este gen y salgan del dominio de *WUSCHEL*, permitiendo a la célula cuando sea desplazada a la L2 y L1 expresar a *CLAVATA3*. La expresión de *WUSCHEL* y *CLAVATA3* se superponen en la L3.

CLV3 se expresa en células de las capas L1, L2 y L3 y no se expresa en los dominios interiores a éstas (Fletcher *et. al.*, 1999; Reddy y Meyerowitz, 2005). *CLAVATA3* codifica para una proteína de 96 aminoácidos, con una señal de secreción en su dominio amino-terminal (Schoof *et. al.*, 2000; Miwa *et. al.*, 2009) a la que se le denomina dominio CLE, nombre que se debe a genes de la misma familia que se expresan en un dominio del endospermo de maíz, *EMBRYO SURROUNDING REGION (ESR)*. En *Arabidopsis* se han encontrado 32 genes *CLE* y se expresan en diferentes tejidos durante el desarrollo (Jun *et. al.*, 2008; Sawa *et. al.*, 2008; Miwa *et. al.*, 2009), 10 de ellos poseen la capacidad de detener la formación del SAM (Strabala *et. al.*, 2006; Fiers *et. al.*, 2007; Miwa *et. al.*, 2009), indicando que entre ellos poseen funciones redundantes en el meristemo apical. La forma activa de *CLAVATA3* es un péptido de 12 aminoácidos que se ubica en el extremo carboxiterminal de la proteína *CLV3* constituida por 96 aminoácidos, el péptido posee dos hidroxiprolinas, la modificación postraducciona con la adición de un residuo arabinosil a la hidroxiprolina en posición 7 es crítica para su actividad (Ohyama *et. al.*, 2009).

CLV3 actúa como un factor celular difusible no autónomo, el cual es percibido por complejos de receptores membranales (Jun *et. al.*, 2008; Miwa *et. al.*, 2009) que son proteínas integrales de la membrana plasmática, los que posee una mayor afinidad por el péptido *CLV3* en la forma de arabinosil-*CLAVATA3*,

la pérdida del residuo arabinosil del péptido disminuye la actividad al bajar la afinidad por el receptor, la aplicación exógena de CLV3-arabinosil rescata al mutante *clv3*, indicando que esta es la forma activa (Ohyama *et. al.*, 2009).

Se conocen varios complejos de recepción para el péptido CLV3 para generar la señal que limita la expresión de *WUS* en el meristemo apical de tallo (De Smet *et. al.*, 2009, Betsuyaku *et. al.*, 2011), en donde CLAVATA3 es el péptido ligando que se une a los complejos de recepción conformado por CLAVATA 1 (Ogawa *et. al.*, 2008) o a CLAVATA2, ambos pertenecen a la familia de receptores ricos en regiones repetidas de leucina (LRR; Leucin Rich Repeat Receptor-Like Kinase). La diferencia entre ambos es que *CLV1* codifica para una proteína que además de la región receptora LRR posee un dominio citoplasmático con actividad de cinasa (Clark *et. al.*, 1993, 1997; Ogawa *et. al.*, 2008; Bleckmann *et. al.*, 2010). A diferencia, un segundo complejo de recepción está conformado por dos componentes: *CLV2* que codifican para un receptor LRR con un dominio transmembranal pero que ha perdido el dominio de cinasa y por una segunda proteína codificada por *CORYNE/SUPPRESSOR OF LLP1-2 (CRN/SOL2)* el cual ha perdido el dominio de recepción con LRR y mantiene los dominios intermembranales y de cinasa expuesto al citosol (Kayes y Clark, 1998; Jeong, 1999; Diévert *et. al.*, 2003; Jun *et. al.*, 2008; Miwa *et. al.*, 2008, 2009; Müller *et. al.*, 2008). *CLV2* y *CNR/SOL2* son proteínas residentes de la membrana del retículo endoplásmico y dependen una de la otra para su relocalización en la membrana plasmática en donde se expone la región receptora de *CLV2* e interactúa con *CLV3* para activar la cinasa de *CNR/SOL2* (Bleckmann *et. al.*, 2010). Se ha propuesto la existencia de un tercer complejo LRR-RLK para el péptido *CLV3* codificado por *RECEPTOR-LIKE PROTEIN 2 (RPK2)/TOADSTOOL2* (*TOAD2*, Kinoshita *et. al.*, 2010, Betsuyaku *et. al.*, 2011), en que la triple mutación *clv1 cvl2 rpk2/toad2* produce meristemas muy largos, que equivale al tamaño del meristemo del mutante *clv3*, indicando que este sistema de tres complejos de recepción son los que generan una transducción de la señal *CLV3* en forma independiente (Clark *et. al.*, 1993, 1995; Kayes y Clark, 1998; Jeong *et. al.*, 1999; Müller *et. al.*, 2008), existe evidencia de una débil interacción entre los tres complejos en las vías inducidas (Kinoshita *et. al.*, 2010). Se han identificado otros receptores que se asocian a *CLV3*, aunque su participación es menos clara. El receptor *BAM1* y *BAM2* están relacionados a *CLAVATA1*. El mutante *bam1/2* potencia el fenotipo

tipo del mutante *clv1*, por lo que se piensa que ambos genes son redundantes en cuanto a la unión con CLAVATA3 (DeYoung y Clark, 2008).

Se propone que los receptores-cinasa LRR forman dímeros a través de sus dominios moleculares transmembranales, de forma tal que generan la estructura activa CLV2-CRN o CLV1-CLV1. *CRN* y *CLV2* se expresan además del meristemo en varios tejidos, por lo que ambos mecanismos CLV1-CLV1 y CLV2-CRN con CLV3 contribuyen a la transducción de la señal en la misma forma en espacios diferentes (Müller *et. al.*, 2008; Miwa *et. al.*, 2009). Los RNA mensajeros de *CLAVATA1* se encuentran restringidos a las células que están en la CZ en la L3, mientras que la expresión de *CORYNE* no existe restricción o exclusividad a esta capa y se ubica en la L1, L2 y L3 (Müller *et. al.*, 2008). Por su parte la expresión de *CLAVATA3* genera una frontera entre el centro de organización el cual ésta libre de este péptido, de la zona central en que difunde CLV3 y puede unirse a sus receptores, la asociación ligando-receptor genera una señal que induce a la célula a pasar de un estado pluripotencial a uno pluripotencial restringiendo su capacidad meristemática, que le permite alargarse e iniciar el proceso de compromiso que se adquiere en la zona periférica (Fig. 9B).

La vía de señalización y con ello los componentes por debajo de la inducción de la señal que se induce por la unión de CLV3 a CLV1 o CLV2 no está totalmente clara, aunque se conoce que en la vía de señalización una vez activado el complejo de recepción por CLV3 están involucradas varias fosfatasa de tipo 2C, la Kinase-associated protein phosphatase (KAPP) interacciona directamente el dominio fosforilado de la cinasa de CVL1 y actúa como un regulador negativo de la señal generada por *CLV3-CLV1* (Williams *et. al.*, 1997; Stone *et. al.*, 1998). Se conoce que participan los productos codificados por los genes *POLTERGEIST1* (*POL1*) y de *POL1-like* (*PLL1*) que codifican para fosfatasa (Yu *et. al.*, 2000, 2003; Song *et. al.*, 2006; Müller *et. al.*, 2008). La mutante *pol* posee un fenotipo que no presenta características que sean diferentes a las plantas silvestres, por lo que pasó desapercibido y se le denominó por ello como “*duende o fantasama ruidoso*”, solamente muestra su efecto la mutación cuando está asociada a otra mutación. La mutación *pol* revierte los efectos de la mutación *clv1*, *clv2* y *clv3*; indicando que este factor está en una secuencia de eventos en la parte baja en la vía de señalización de CLV3 (Song *et. al.*, 2006; Miwa *et. al.*, 2009). *POL1* y *PLL* actúan redundan-

temente para mantener la expresión de *WUS* y es negativamente regulado por la familia *CLAVATA* (*CLV1*, *CLV2*, *CRN/SOL2* y *CLV3*; Fig. 9B; Yu *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2007; Miwa *et al.*, 2009). En adición a estas fosfatasa, una proteína Rho GTPase-related protein, ROP, se ha encontrado asociada con *CLV1*, lo cual sugiere que esta involucrada la cascada de señalización MAPK (mitogen-activated protein kinase) inducida por *CLV1* (Trotochaud *et al.*, 1999).

La cascada de señalización mediada por la fosforilación mediada por MAPK es un componente clave para la respuesta ante varios estímulos extracelulares en células eucariontas (Lewis *et al.*, 1998; Madhani y Frink, 1998). La activación de la vía se realiza a los pocos minutos de ser estimulada, la vía típica de las MAPK consiste de tres cinasas, la MAPKKK (MAPcinasa cinasa cinasa), la MAPKK (MAPcinasa cinasa) y la MAPK (MAPcinasa), que se fosforilan en forma secuencial. La fosforilación de la MAPK activa a su vez a varias proteínas tales como a factores de transcripción, a otras protein cinasas, a enzimas metabólicas y citoesqueleto. En plantas, la vía de las MAPK media varios tipos de señal, la percepción de *CLV3* dispara la señal de fosforilación que restringe la expresión de *WUS* (Clark 2001; Jun *et al.*, 2008; Butenko *et al.*, 2009), sin que se conozca completamente el mecanismo implícito.

Otros reguladores involucrados en la transcripción de *WUSCHEL* son *STIMPY*, *SPLAYED*, *BARD1*, *OBERON1* y *OBERON2*, en donde es posible que uno o varios de ellos estén controlados por *CLAVATA3*. La mutación en el gen *STIMPY* (*STIP*) causa fenotipos similares a los mutantes en *WUS* (Wu *et al.*, 2005). *STIMPY* (*WOX9*) codifica para un miembro de la familia *WUSCHEL* de factores de transcripción con un homodominio y es requerido para mantener la expresión tanto de *CLAVATA3* y de *WUSCHEL*, el cual se encuentra por debajo en la vía de señalamiento inducida por *CLAVATA3*. La adición de sacarosa al medio de crecimiento puede provocar que los mutantes presenten características similares a la de los silvestres, así, se crece a los mutantes *stimpY* en presencia de sacarosa, el fenotipo que presenta es similar al del silvestre, pero no se puede rescatar el fenotipo silvestre con el mutante *wuschel* cuando es crecido en presencia de sacarosa. Se ha determinado que la sacarosa afecta la actividad del ciclo celular a través de una ciclina participante, la ciclina D que es codificada por el gen *CYCLIND D*, indicando que la sacarosa es una señal involucrada al inicio de la vía de señalización en el desarrollo del meristemo. Así, *STIMPY* afecta el desarrollo del embrión, dete-

niéndolo en la fase de embrión globular, en la que se establecen la identidad meristemática apical tanto de tallo como de raíz (Wu *et. al.*, 2005, 2007).

Dos factores interaccionan directamente con el promotor del gen *WUSCHEL*, éstos son *SPLAYED* (*SYD*) y *BARD1* (Kwon *et. al.*, 2005; Han *et. al.*, 2008). *SPLAYED* codifica para un remodelador de la cromatina, una cromatin-ATPasa tipo *SNF2*, éste se une a 500 pares de bases en el sitio de inicio de transcripción del gen *WUSCHEL* y es requerido para la transcripción eficiente del locus *WUSCHEL* (Kwon *et. al.*, 2005). La pérdida de función en los mutantes *splayed* genera meristemas de tamaño pequeño y los niveles del mRNA de *WUS* están muy reducidos. Se ha demostrado que en el mutante *clavata1-4 splayed*, *CLAVATA3* afecta disminuyendo o bloqueando la señal generada por *SPLAYED* y de esa forma afecta negativamente la expresión de *WUSCHEL*. Demostrado que la señal de *CLV3* actúa a través de *SPLAYED* para la reducción de los niveles de *WUS* (Fig. 10).

La proteína *BARD1* también se une a la región promotora de *WUSCHEL* e interacciona con *SPLAYED* (Han *et. al.*, 2008). Sin embargo, *BARD1* tiene un efecto opuesto a *SPLAYED* y por ello reprime a *WUSCHEL*, como se observa en la mutación *bard1* en que se sobreexpresa *WUSCHEL* y el tamaño del meristemo es substancialmente más grande que el silvestre. *BARD1* codifica para una proteína similar a la proteína humana *BREAST CANCER ASSOCIATED GEN 1* (*BRCA1*), que participa en la reparación del DNA, en la regulación transcripcional, la recombinación y el control del ciclo celular. *BARD1* en plantas es requerido para la reparación del DNA y participa en la represión de *WUSCHEL* (Han *et. al.*, 2008; Reidt *et. al.*, 2006). El papel antagónico entre las proteínas *BARD1* y *SPLAYED* con su asociación con el promotor de *WUS* sugiere que ellos actúan en el estado de la cromatina en el locus *WUS* (Fig. 10).

Dos factores transcripcionales adicionales están implicados en la mantención de la población de células madre son *OBERON1* y *OBERON2*, estos genes actúan de forma redundante entre ellos y mantienen la expresión de *CLAVATA3* y *WUSCHEL* (Saiga *et. al.*, 2008). El RNA mensajero de *OBERON* se encuentra en todo el meristemo apical, por lo que no cumple una función en la especificación de las capas L1 a L3. *OBERON* produce proteínas en plantas con un homodominio en forma de dedo (*finger homodomain*), los cuales reconocen a las histonas en la región de la cromatina activa en animales,

aunque en plantas podría funcionar de la misma manera, y es posible que sean requeridos para mantener el estado de heterocromatina de *WUSCHEL* o *CLAVATA3* en una forma activa.

El factor de transcripción *WUSCHEL* contiene un dominio de activación y un dominio carboxiterminal EAR que es importante para su función como factor de transcripción (Kieffer *et. al.*, 2006). *WUSCHEL* por lo tanto, dependiendo del contexto en que se encuentre funciona como un regulador positivo o negativo. Existen dos proteínas que interaccionan con el dominio EAR de *WUSCHEL* en levaduras. Los co-represores TOPLESS1 y TOPLESS4, también denominados *WUSCHEL INTERACTIVE PROTEINS 1 y 2*, los cuales pertenecen a una gran familia de co-represores *Groucho/TUP1* (Long *et. al.*, 2006; Kieffer *et. al.*, 2006). Este grupo de co-represores han perdido la habilidad de unirse al DNA, en lugar de ello reclutan a varias proteínas, entre ellas a los factores de transcripción que interactúan con regiones específicas de DNA (Liu y Karmarkar, 2008), este complejo causa la represión por alteración en la posición del nucleosoma, para ello, entre las proteínas que reclutan está la desacetilasa de historias, con ello compite y limita la cantidad de subunidades del mediador unido al DNA.

La proteína *WUSCHEL* actúa ejerciendo su actividad por la alteración y represión de las proteínas asociadas a la cromatina en el gen blanco. Ente los genes blanco de *WUSCHEL* se encuentran los reguladores de la expresión o respuesta tipo A, los *ARR5*, *ARR6* y *ARR7*. La expresión de *ARR5* y *WUSCHEL* parece ser complementaria en el meristemo apical de tallo (Gordon *et. al.*, 2009), consistente con el papel de *WUSCHEL* en reprimir la expresión de *ARR5* (Liebfried *et. al.*, 2005). *WUSCHEL* se une a 1000 pares de bases por arriba del inicio de la transcripción en *ARR7*, indicando que la transcripción de *ARR7* es directamente regulada por *WUSCHEL*. Los reguladores de respuesta tipo A se piensa que inhiben la señal de las citocininas (Müller y Sheen, 2007), por lo tanto una de las funciones de *WUSCHEL* es hacer que las células en el cual se expresa sean más sensibles a la señal de citocinina, ya que esta fitohormona juega un papel importante en el control de la división celular y la totipotencialidad del meristemo (Fig. 10).

Las citocininas son fitohormonas que son requeridas en el establecimiento del meristemo apical de tallo. En cultivos celulares, una proporción

mayor de citocininas que de auxinas induce la formación de tallo, mientras que la proporción de citocininas menor a las auxinas provoca la generación de una raíz (Skoog y Miller, 1957). La citocinina es sensada en la membrana del retículo endoplásmico por un receptor transmembranal histidin-cinasa que produce una transferencia de un fosfato a una proteína histidin-fosfo-transferasa (HPT), lo cual a su vez induce el movimiento de HPT al núcleo. El resultado de la fosforilación del regulador de respuesta tipo B (tipo B-ARR) es capaz de unirse al DNA y activa el o los genes correspondientes e inducibles por citocinina. La regulación negativa provocada por WUSCHEL en la expresión de un regulador de respuesta tipo A (tipo A-ARR), que ha perdido el dominio de unión al DNA, establece una competencia con los reguladores de tipo B en la fosforilación por la cinasa (inhibición por competencia) y con ello se inhibe la acción del RR tipo B afectando la señal o respuesta de las citocininas (Fig. 10; Müller y Sheen, 2007).

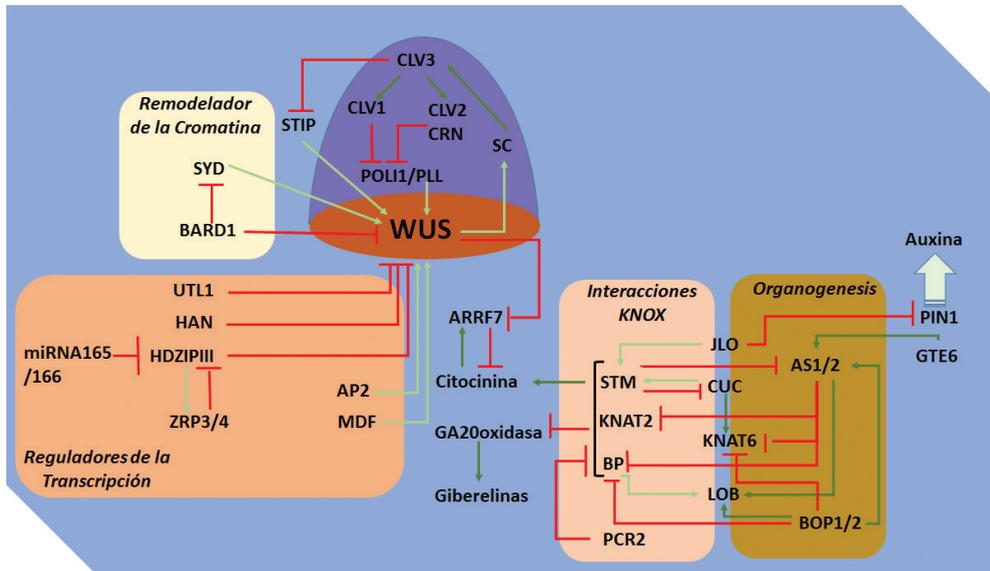


Figura 10. Esquema de la red de regulación génica del meristemo apical del tallo. La población de células madre en el ápice (zona de color morado) se mantiene a través de una señal que es generada por las células que expresan a *WUS* en el centro de organización (zona café). En las células madre se expresa el glucopéptido *CLV3*, el cual es percibido por los complejos de los receptores *CLV1-CLV1* o *CLV2-CRN*. La regulación transcripcional por *UTL1* y *HAN* restringen el dominio de expresión

de *WUS* a través de una vía independiente de *CLV3*. Las proteínas derivadas de los genes *HDZIPIII* regulan negativamente a *WUS*, y ellas mismas son sujetas a la regulación a través de los miRNA 165/166 y el inhibidor competitivo ZRP3/4. AP2 y MDF interaccionan con la vía *WUS/CLV*, probablemente a través de una regulación positiva de *WUS*. *STIP* regula positivamente a *WUS* y es sujeto a su vez por una regulación negativa por los productos de *CLV*. Los remodeladores de cromatina, SYD activa a *WUS* a través de una unión directa y BARD1 se une directamente a *WUS* y lo reprime o lo hace a través de la inhibición de SYD. La interacción *KNOX* a través de las proteínas producto de su expresión estimula la biosíntesis de citocininas e inhibe a la de las giberelinas y son sujetos de inhibición a través de Polycomb vía PRC2. *WUS* también puede prevenir la supresión de las citocininas por la represión de *ARR7*. En la organogénesis, *STM* inhibe a *AS1/AS2* para prevenir la diferenciación de SAM; *AS1/AS2* inhibe la expresión de *BP*, *KNAT2* y *KNAT6*, y son sujetos de la regulación epigenética por GTE6. La especificación de la frontera del meristemo está involucrado LOB que es activado por *AS1/AS2*, *BOP1/2* y *BP*. *CUC1-3* activan a *STM* y *KNAT6*, mientras que *STM* restringe la expresión de *CUC*. Mientras que *JLO* activa la expresión de los genes *KNOX* en el meristemo e inhibe la expresión de *PIN*, permitiendo la acumulación de citocinina y disminuyendo el flujo de auxina en el primordio en el desarrollo. El esquema es una modificación de Dodsworth, 2009.

El gen *LONELY GUY* codifica para una enzima que cataliza la última etapa en la formación de la citocinina (Kurakawa *et. al.*, 2007). Este gen genera un transcrito que se encuentra en dos de las tres capas del meristemo apical de tallo y abarca el centro de organización, siendo el meristemo el lugar de acción de esta fitohormona (Müller y Sheen, 2008). El mutante *lonely guy-1* muestra una baja actividad de citocininas, desarrollando meristemos más pequeños que los silvestres, por lo que la actividad de las citocininas es requerida para generar un tamaño adecuado del meristemo apical de tallo, como ha sido demostrado en el arroz. *WUSCHEL* genera un dominio o zona dentro del meristemo de alta respuesta a citocininas al regular negativamente a los *ARR*, inhibidores de la respuesta a citocinina (Fig. 10; Gordon *et. al.*, 2009). Además para mantener el dominio sensible a citocininas, están activos los factores de transcripción que contienen un dominio de *KNOX* clase I, que no únicamente mantienen sino además incrementan los niveles de citocininas (Endrizzi *et. al.*, 1996; Long *et. al.*, 1996; Kerstetter *et. al.*, 1997; Jasinski *et. al.*, 2005; Yanai *et. al.*, 2005). *KNOTTED1* en maíz o *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* en *Arabidopsis* pertenecen a la *clase I KNOX* (Long *et. al.*, 1996; Kerstetter *et. al.*, 1997), los que se expresan en todo el meristemo y son

regulados negativamente cuando se forma el primordio foliar (Fig. 9B y 10). La sobre-expresión de los genes *KNOX*, *KNOTTED1* y *SHOOTMERISTEMLESS* provoca la formación ectópica del meristemo (Sinha *et. al.*, 1993; Williams *et. al.*, 1997), el aumento de los niveles de citocininas (Yanai *et. al.*, 2005; Jasinski *et. al.*, 2005) debido a que la expresión de *STM* induce la transcripción de los genes de biosíntesis de citocininas, lo cual se inicia a las 4 horas posteriores a la actividad de *KNOX*. Existe una vía de retroalimentación en que la citocinina a su vez activa los genes *KNOX*, la acción de la citocinina es a través de la activación de *LONELY GUY* el cual es requerido para aumentar el transcrito de *KNOX* (Fig. 10; Kurakawa *et. al.*, 2007). Lo que muestra que se requiere una actividad umbral de citocinina, fitohormona que es requerida para la manutención de la capacidad totipotencial de las células del meristemo. La región de concentración máxima de citocinina se sobrepone la región de expresión de *WUS* en el meristemo, por lo que parte de la función de la citocinina es mantener un pequeño dominio dentro del meristemo en donde se exprese *WUS*.

Capítulo IV.
Del embrión globular al embrión
corazón: el ápice del embrión
y establecimiento de la polaridad
abaxial-adaxial en el primordio

Durante el desarrollo del embrión globular, en la región apical en una etapa media a tardía se empiezan a formar diferentes dominios y subdominios dentro de esta zona, en que los genes de la *clase III HDZIP* se expresan en el dominio adaxial del primordio y se extiende hacia la zona de frontera o borde con el meristemo apical de tallo, formando un dominio central (Fig. 11; McConnell *et. al.*, 2001; Prigge *et. al.*, 2005). En la parte lateral e inferior a este dominio se encuentra el dominio en el que se expresan los genes abaxiales como *KANADI*, ambos dominios están bien definidos en el desarrollo embrionario. Estos dominios comprenden lo que será la cara abaxial y abaxial de cada uno de los futuros cotiledones. De forma tal que el meristemo apical de tallo se encuentra entre dos subdominios de tipo adaxial con la expresión de los genes *HDZIPIII*. Si se pierden los dominios adaxiales antes mencionados, se pierde el meristemo apical. De esta forma *HDZIPIII* es necesario para establecer la polaridad apical-basal (*HDZIPIII vs PTL*) y posteriormente la polaridad abaxial/adaxial, momento en que se establece el meristemo. En este tiempo se encuentran activos los genes *HDZIPIII*, *PHABULOSA*, *PHAVOLUTA* y *REVOLUTA* como inductores de la formación del meristemo (McConnell *et. al.*, 2001; Prigge *et. al.*, 2005). El despertar de estos genes se debe a la actividad previa del gen *MONOPTEROS* (ver secciones anteriores; Fig. 8A; Husbands *et. al.*, 2009).

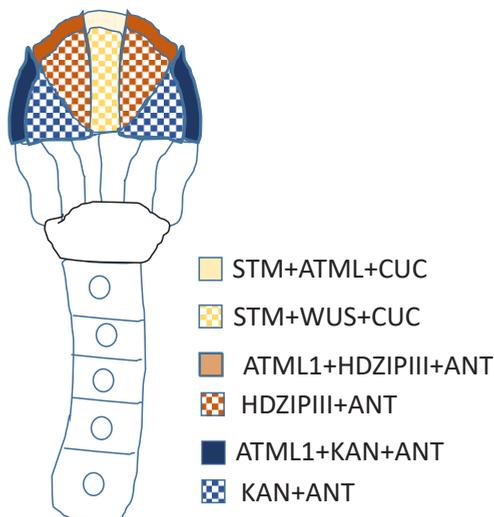


Figura 11. Patrón de la expresión génica en el dominio apical en el embrión globular de *Arabidopsis*. Existen cuando menos 7 diferentes subdominios en la región

apical, el esquema muestra 6 dominios que se distinguen por la combinación de la expresión diferencial de los genes, de los marcadores del primordio/identidad meristemática: *AINTEGUMENTA/SHOOTMERISTEMLESS*, *CUPSHAPED COTYLEDON* y *WUSCHEL* y los genes de identidad abaxial/adaxial: *HDZIII* y *KAN*; el de identidad protodérmica: *ATML1*. El séptimo dominio expresa *ANT+CUC* en la frontera del meristemo. Esquema modificado de Barton, 2010.

La falta en la actividad del gen *LITTLE ZIPPER*, que forma heterodímeros con las proteínas de mayor tamaño de la familia *HDZIII* e inhibe su actividad (Wenkel *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008) genera meristemas apicales con una zona central extendida y se debe a que la región de dominio de *CLAVATA3* se ha expandido (Kim *et al.*, 2008) e inhibiendo por ende la expresión de *WUSCHEL* y *STM*. Cuando se produce una mutación en el gen *CORONA* un miembro de la familia *HDZIII*, causa un meristemo masivo, por lo que *CORONA* se requiere para limitar o determinar el tamaño del meristemo a través de una vía que es redundante a *CLAVATA3* sobre *WUSCHEL* (Fig. 10 y 11). Lo cual se observa en la triple mutante *phabulosa phavoluta corona* en líneas de sobre-expresión con micro RNA, el miRNA166 produce meristemas grandes, lo que no ocurre al mutar solamente a *REVOLUTA*, por lo que *PHABULOSA*, *PHAVOLUTA* y *CORONA* son requeridos para determinar la función celular y limitar al meristemo apical (Fig. 12; Green *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005).

En el embrión en la posición apical coexisten varios dominios y subdominios (Fig. 11). En la parte media central se encuentra el dominio en que se expresa *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, dividido en dos subdominios, que se diferencian entre sí porque en la parte externa el subdominio en que además de *STM* se expresa a *ATML3* y *CLV3*, mientras en la parte interna se crea el subdominio en que se expresa además de *STM* a *WUS*, en la frontera o límite de este dominio se encuentran células con la expresión de *CUC*. Colateral al dominio central, existen el dominio adaxial en que se expresan los genes de la familia *HDZIP clase III*, y en una posición inferior a éste, un dominio en que se caracteriza por la expresión de *KANADI (KANI)* que corresponderá al dominio abaxial, además cada dominio (adaxial, abaxial) está dividido en dos subdominios, en donde además de los genes característicos de cada dominio, en la parte más externa se expresa *ATML1* que definirá el subdominio externo que definirá a la región protodérmica.

En la frontera el dominio central en que se expresa *STM* y *CUC* con los dominios adaxial (*HDZIII*) y abaxial (*KANADI*) se expresa el gen *AINTEGUMENTA* (*ANT*) que confronta en la frontera con la expresión de *CUC*, *KNAT6* y *SM* del dominio central que establecerán la frontera con los cotiledones en formación en una etapa posterior (Fig. 13; Lu *et. al.*, 1996; Long y Barton, 1998; Mayer *et. al.*, 1998; McConnell *et. al.*, 2001; Takada *et. al.*, 2001; Belles-Boix *et. al.*, 2006). De forma tal que el meristemo apical del tallo se desarrolla dentro o limitado por dos dominios adaxiales en el embrión globular. Las proteínas de *HDZIII* especifican al dominio abaxial y son necesarias para establecer los límites y mantener la organización del meristemo.

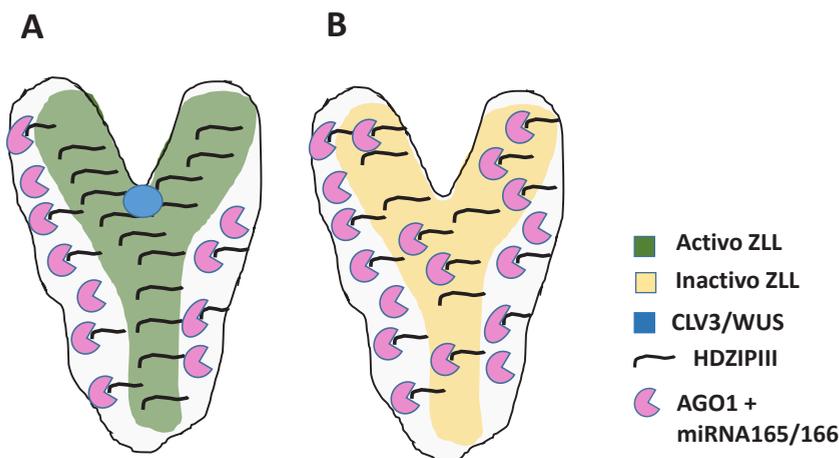


Figura 12. Función de LITTLE ZIPPER (ZLL), ARGONAUTA 1 (AGO1) y los miRNA165/166 en la embriogénesis. **A**, en un embrión silvestre, la expresión de ZLL en el dominio central (zona en verde) funciona secuestrando a los miRNA165/166, con ello permite la acumulación y traducción de los RNA mensajeros de los genes *HDZIII* (línea negra) en el dominio central del embrión. Fuera de esta zona (zona sin color), la existencia de los miRNA165/166 y AGO1 (círculos rosas), inactivan y degradan a los mRNA de *HDZIII*; de esta forma se establece en el embrión silvestre dos dominios diferenciales con presencia o ausencia de los factores *HDZIII*. La expresión de *HDZIII* en el dominio central permite el establecer el límite del dominio que será el meristemo apical de tallo (zona en azul). **B**, en el embrión del mutante *zll*, no se expresa *ZLL* y al desaparecer la proteína, los miRNA165/166 y AGO1 extienden su dominio de acción, produciendo la degradación de los transcritos de *HDZIII*, la falta de los factores *HDZIII* en la parte central, genera la desaparición del meristemo apical, y la expresión de los genes maestros de

identidad meristemática; además al faltar estos factores de transcripción provocan que no exista la especificación en la zona central para formar el cilindro vascular. Esquema modificado de Bosca *et. al.*, 2011.

La especificación de los dominios/subdominios dentro del embrión como se describió en los párrafos anteriores, se debe a los circuitos en el flujo polar de auxina que se generan en el embrión globular, provocando gradientes diferenciales de la fitohormona dentro del embrión, que establecen grupos de células con diferente cantidad, sensibilidad y respuesta a la auxina, que da origen a la transición del embrión globular al embrión corazón y posteriormente al embrión torpedo (Fig. 13). La inhibición del transporte polar de auxinas induce al grupo de células en los dominios adaxial/abaxial de los futuros cotiledones en el embrión globular, pero en el embrión torpedo adquieren la forma de una copa (Liu *et. al.*, 1993), a diferencia de dar lugar a dos laminas que se observan en forma natural, lo que es reproducible si se estudian mutantes deficientes en la biosíntesis de auxinas o de sus transportadores. En el embrión se genera un eflujo polar de auxinas por los transportadores PINFORMED (PIN) y P-Glucoprotein ABC TRANSPORTER (PGP), mientras que el influjo se debe a la familia de transportadores AUX (Petrasek y Friml, 2009). PIN y PGP son codificados por una familia redundante de genes y su mutación produce defectos en el desarrollo de los cotiledones, indicando que es requerido el transporte polar de auxinas para la determinación adecuada de los cotiledones.

El flujo de auxina en la región apical en el embrión globular excluye a la fitohormona del meristemo apical y establece altas concentraciones de auxina en la parte superior y externa (dominio adaxial) del embrión, en el subdominio externo o protodérmico y el subdominio interno que especifica a los cotiledones (Benkova *et. al.*, 2003; Petrasek y Friml, 2009). El circuito se complementa con el flujo polar de auxina de las células internas que acumulan auxina en la parte basal del embrión, lugar que será la futura raíz y fluye posteriormente en forma lateral a la región apical. El incremento en la cantidad de auxina, induce localmente la síntesis de nuevos PIN y su relocalización en la membrana plasmática. La localización polar de los transportadores de auxina (ubicación diferencial de los componentes en la membrana plasmática en las diferentes caras que constituyen a la célula), en particular

PIN esta regulada por una cinasa, la cinasa AGC PINOID (PID; Christensen *et. al.*, 2000; Friml *et. al.*, 2004). Miembros adicionales de la familia que incluyen a PINOID2, WAG1 y WAG2, cinasas que participan en este proceso de localización diferencial en la membrana plasmática, así la triple mutante *pid1 wag1 wag2* no forma cotiledones (Cheng *et. al.*, 2008). En embriones con defectos en el transporte polar de auxinas como en el mutante *pin1 pinoid* el dominio de transcripción de *CUC* y *STM* se expande más allá de lo que se observa en el embrión normal, debido a que no acumulan auxinas en las regiones laterales del embrión globular y la transcripción que normalmente se encuentran restringidos a la región media superior del embrión globular se encuentra más allá que lo hacen normalmente (Furutani *et. al.*, 2004). De esta forma, la acumulación de auxinas posibilita la disminución en la expresión de *CUC* y *STM*, mientras que altas concentraciones de la fitohormona inhibe totalmente la expresión.

Proteínas de los miembros de la familia denominada *MACCHI-BOU4/ENHACER OF PINOID/NAKED PINS IN YUCCA MUTANTS (MAB4/END/NPY)* interactúan con el gen *PINOID* (Trembl *et. al.*, 2005; Cheng *et. al.*, 2007; Furutani *et. al.*, 2007), en los mutantes *mab4 pid* se induce la pérdida de los cotiledones y se revierte la polaridad en el flujo de auxinas al deslocalizar a los PIN de la cara basal, con ello el flujo de auxinas va de la parte central del embrión hacia el meristemo apical, acumulando ahí a la fitohormona. Esto indica que los productos de la familia *MAB4/ENP/NPY* junto con *PINOID* están involucrados en la determinación y ubicación apropiada de los PIN.

Las proteínas PINOID y MAB4 muestran similitud con PHOTOTROPIN y NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3 (NPH3) respectivamente. PHOTOTROPIN es una cinasa de respuesta a la luz azul, que fosforila a NPH3 (Pedmale y Liscum, 2007). La acción de la cinasa es requerida para que el hipocotilo o futuro tallo, adquiera la capacidad de crecimiento hacia la luz y para la adecuada localización de los transportadores de auxina. Por lo que si este modelo es correcto en el embrión globular, PINOID fosforila a MAB4 que a su vez relocaliza a los PIN, el inductor de la fosforilación inicial en el embrión debe ser otro que la luz azul, y debe ser un factor interno espacial, lo cual lleva a proponer a *MONOPTEROS* y *GNOM* como responsables. PINOID ha perdido el dominio que PHOT1 usa para interactuar con NPH3, de tal forma que PINOID y MAB4 interactúan con un mecanismo diferente tal vez a través de una tercera proteína.

La señal que genera la auxina es mediada a través de factores de transcripción ARF. Los factores de transcripción ARF están unidos a las proteínas represoras IAA, lo que previene que la formación de un homodímero ARF, el cual es capaz de unirse a la región reguladora de los genes blanco inducibles por auxina; en la respuesta a la auxina, la proteína IAA es degradada por medio de la ubiquitinación/proteosoma, liberando al ARF (Dharmasiri y Estelle, 2002; Liscum y Reed, 2002). El gen *IAA18* está involucrado en la dominancia apical, se expresa en el dominio apical del embrión y es específico para el desarrollo de los cotiledones (Floense *et. al.*, 2009). Una mutación dominante del gen *IAA18* previene la degradación de esta proteína por inducción de auxina y repercute en que se formen embriones con defectos en los cotiledones, que incluyen la formación de un menor o mayor número de cotiledones o cotiledones fusionados. Una mutación en el gen *ARF5* o *MONOPTEROS*, causa la formación de un solo cotiledón. La doble mutante *iaa18* *monopteros* produce embriones sin cotiledones, por lo que se propone la existencia de heterodímeros IAA/MONOPTEROS en que la auxina promueve la liberación de ARF5 por degradación inducida de la proteína IAA. La proteína ARF7 o NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4 (NPH4) es redundante en la formación de los cotiledones (Hardtke *et. al.*, 2004). Una vez que se encuentra libre el factor de transcripción ARF5/MONOPTEROS se une al promotor de *DORNRÖSCHEN*, un gen blanco, que promueve la acumulación del mRNA *DORNRÖSCHEN* en los cotiledones. *DORNRÖSCHEN* codifica a su vez a un factor de transcripción tipo AP2 y que actúa en forma lineal con *MONOPTEROS* en que este último se encuentra por arriba en la vía de señalamiento (Cole *et. al.*, 2009).

La mutación en los genes *TOPELESS* que codifican para co-represores, afectan el patrón apical (Long *et. al.*, 2002, 2006), las plántulas de los mutantes *topless* expresan *AINTEGUMENTA (ANT)* en todo el dominio apical y son incapaces de expresar a *CUC* y *STM*, lo cual es consistente con la incapacidad de restringir la respuesta a la auxina a las regiones periféricas del embrión. La expresión de *ANT* en todo el meristemo apical genera la pérdida completa de los cotiledones o del meristemo, o bien, los cotiledones adquieren la forma de copa, con la pérdida en la expresión de *CUC* y *STM* que concuerda con la falta de restricción de la zona de influencia de la auxina externa al meristemo. Las proteínas IAA, poseen un dominio ETR que permite la unión a la fa-

milia de proteínas co-represoras TOPLESS (Szemenyei *et. al.*, 2008), por ello el mutante *topless* es incapaz unirse y degradar a las proteínas IAA, implicando que no se pueda liberar el factor ARF5 y se bloquee el efecto de la auxina.

La mutación *bobber* causa la expansión de la zona de expresión de los genes marcadores del meristemo apical (Jurkuta *et. al.*, 2009), a costa de los cotiledones e impide que el embrión pase de la fase globular a la de corazón. Este mutante pierde la expresión de marcadores del primordio como *AINTEGUMENTA* lo que causa una expresión ectópica de *SHOOTMERISTEMLESS*, el efecto de la mutación no se rescata eliminando a *STM* de la zona que deberían ser los cotiledones, en el mutante *bobber* no se da una disminución en la cantidad de auxina en la parte media del ápice, encontrándose que las concentraciones son uniformes al resto del ápice, esto indica que es necesario un gradiente de auxina y no la cantidad absoluta de esta fitohormona la que determina el efecto en la inducción de los cotiledones. El gen *BOBBER* codifica para una proteína de bajo peso molecular y es homóloga a las proteínas NUDC de *Aspergillus* y presenta una función de chaperona *in vitro* (Jurkuta *et. al.*, 2009; Perez *et. al.*, 2009), por lo que su función está relacionada a la de ser una chaperona de proteínas involucradas en el transporte polar de auxinas. Esto concuerda con la observación de que una gran cantidad de auxina es transportada por la protodermis en el embrión globular, generando un circuito en el flujo de auxina en la periferia del embrión y por ello mutaciones que afecten la formación de la protodermis presentan defectos en la inducción o formación de los cotiledones.

Dos receptores redundantes tipo cinasa están involucrados en la formación de los cotiledones, estos son RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 1 (RPK1) y TOADSTOOL2 (TOAD2; Nodine *et. al.*, 2007; Nodine y Tax, 2008). La doble mutante *rpk1 toad2* produce la pérdida de los cotiledones y son incapaces de expresar a *ANT* en la frontera de los futuros cotiledones pero pueden expresar *STM*. Además el mutante tiene defectos en el desarrollo de la epidermis, es incapaz de generar concentraciones altas de auxina en la región de los cotiledones por falta de la conducción polar de la fitohormona, debido al no existir la especificidad de la capa protodérmica, en que se está afectado la expresión de genes de la familia *HDZIP clase IV*, *ATML1* y *PROTODERMAL FACTOR 2* (Abe *et. al.*, 2003).

**Capítulo V.
Fronteras de fronteras en
el meristemo apical**

En el límite o parte externa del meristemo apical se expresa el gen *CUC* mientras que el resto del meristemo está dominado por la expresión de *STM*; otros genes que se observan en el límite del meristemo son *UNUSUAL FLORAL ORGAN* el cual delimita la expresión de *CLV3* (Long y Barton, 1998). De forma tal que *CUC* en *Arabidopsis* y *NO APICAL MERISTEM* en *Petunia* son los genes que se expresan en el límite del meristemo, y se requieren para establecer y mantener la frontera del meristemo apical o en su momento a los cotiledones (Souer *et. al.*, 1996). *CUC1*, *CUC2* y *CUC3* son necesarios para mantener la expresión de los genes de la zona central del meristemo en el embrión globular (Fig. 10 y 13; Takada *et. al.*, 2001; Vroemen *et. al.*, 2003; Hibara *et. al.*, 2006) y estos tres genes actúan redundantemente entre ellos. *CUC* al igual que *NO APICAL MERISTEM* genera un factor de transcripción específico de plantas, que posee un dominio conservado NAC en su amino terminal (Olson *et. al.*, 2005).

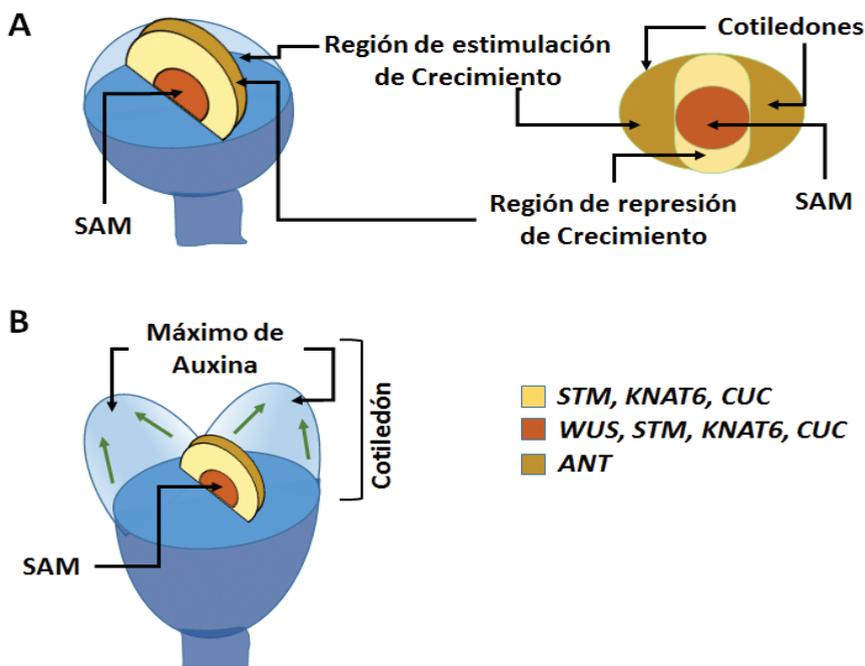


Figura 13. Participación de los genes *CUPSHAPED COTYLEDON*, *KNOX* y las auxinas en el establecimiento del patrón apical del embrión de *Arabidopsis*. **A**, esquema de un embrión globular en la parte izquierda se muestra la frontera entre los dos

cotiledones y la región meristemática, en la derecha se muestra un corte en que la región en donde se especifica las regiones diferenciales de crecimiento. En la frontera se expresan los genes *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, *KNAT6* y *CUPSHAPED COTYLEDON (CUC)*. Las fronteras establecen una zona de dominio (zona translúcida amarilla del esquema en la derecha) que limita la expresión de *AINTEGUMENTA* en la zona verde. Diferencias en crecimiento son requeridas para que la zona de los cotiledones crezcan y den la forma característica del embrión corazón. Cuando existen defectos en *CUC* o *STM* o *KNAT6* se pierde la zona de no crecimiento entre ambos cotiledones y se genera una estructura en forma de copa. En contraste, la expresión ectópica de *CUC* provoca la desaparición de los cotiledones. **B**, embrión en forma de corazón a torpedo temprano en que se muestra el crecimiento de los cotiledones, en donde la concentración de auxina aumenta debido al transporte polar de la misma (flechas verdes) que la concentra en estas estructuras. Esquema modificado de Barton, 2010.

Bordeando en la parte externa a esta zona límite del meristemo apical, domina la expresión de *CUC*, *KNAT6* y *STM*, y se encuentra una franja de células que expresan al gen *AINTEGUMENTA* (Fig. 13) que marca la frontera con los futuros cotiledones (Long y Barton, 1998; Takada *et. al.*, 2001; Vroemen *et. al.*, 2003; Hibara *et. al.*, 2006; Jurkuta *et. al.*, 2009).

Durante el desarrollo, *CUC* se expresa en toda la zona meristemática, conforme transcurre el desarrollo, la zona de dominio de *CUC* es desplazada hacia el límite del meristemo, en esta franja fronteriza se produce un decremento en el tiempo de división y expansión celular. No se conoce qué induce que *CUC* sea desplazado a la frontera, pero esta disposición es requerida para establecer el límite entre las células madre totipotenciales a diferencia de las células que están adquiriendo un compromiso en la formación de los órganos laterales e impedir el crecimiento en la región intercotiledonar (Paucelle *et. al.*, 2007; Sieber *et. al.*, 2007). Al igual que *WUSCHEL*, *CUC* requiere un dominio *SWI/SNF* para su expresión (Kwon *et. al.*, 2006). Existen cuatro proteínas con dominio *SWI/SNF* en *Arabidopsis* y dos de ellas *SPLAYED* y *AtBRM* son necesarias en la embriogénesis. *AtBRM* está involucrada en incrementar la transcripción de *CUC1* a *3*, mientras que *SPLAYED* es requerida principalmente para sobrerregular a *CUC2*, se desconoce si esta interacción es directa o a través de otros actores (Fig. 10).

La acumulación del mRNA de *CUC* se debe a la sobre activación a través del promotor del gen *CUC* y en parte a la actividad del miRNA164 (los que se encuentran codificados en los genes *MIRNA164a*, *164b* y *164c*), los cuales restringen la expresión de *CUC1* y *CUC2* a la franja fronteriza del meristemo (Fig 10; Laufs *et. al.*, 2004; Mallory *et. al.*, 2004; Sieber *et. al.*, 2007).

Además, los genes *KNOX*, *KNAT6* y *STM* se encuentran involucrados en la formación de la franja fronteriza en conjunto con *CUC* (Aida *et. al.*, 2004; Long y Barton, 1998; Takada *et. al.*, 2001). *STM* y *KNAT6* poseen funciones redundantes entre sí y la función de *KNAT6* se observa cuando se genera una mutante *shootmeristemless*. Los mutantes *stm knat6* presentan cotiledones fusionados en forma similar a los que se dan en la mutante *cuc*. Las proteínas *KNAT6* al igual que las proteínas *KNOX*, son requeridas para la separación de los cotiledones (Belles-Boix *et. al.*, 2006). Las proteínas *KNOX* forman heterodímeros con BEL1-like homeodomain proteins (BLH) para regular la transcripción (Cole *et. al.*, 2006). Los genes *BLH* de *Arabidopsis*, *ARABIDOPSIS HOMEBOX1 (ATH1)*, *PENNYWISE* y *POUNDFOOLISH* funcionan en forma redundante, y la triple mutación en ellos repercute en la pérdida del meristemo (Rutjens *et. al.*, 2009), pero se presenta una pequeña fusión entre los cotiledones, indicando que existe otros *BLH* que cooperan con las proteínas *KNOX* en la franja fronteriza de separación de los cotiledones. *ATH1* es necesario para la formación de la franja fronteriza, la separación de los cotiledones y la polaridad adaxial- abaxial (Gómez-Mena y Sablowski, 2008).

Los mutantes *wuschel* al igual que los mutantes *cuc* y *stm* no forman el meristemo apical de tallo. En *wuschel* el meristemo se forma más lejos que en los mutantes *stm*, con un mayor número de células en *wuschel* que en los mutantes *stm* o *cuc*. Doble mutantes muestran que el efecto de *WUSCHEL* y *SHOOTMERISTEMLESS* es aditivo y afectan a dos procesos complementarios pero diferentes, que actúan en tiempos diferentes del desarrollo, debido a que *WUSCHEL* se expresa antes en desarrollo que *SHOOTMERISTEMLESS* y *KNAT6* (Lenhard *et. al.*, 2002; Mayer *et. al.*, 1998) en que *WUSCHEL* se expresa en las células apicales internas del proembrión de 16 células (Mayer *et. al.*, 1998). El establecimiento de un grupo de células que expresan a *WUSCHEL* promueve la generación de una región con actividad de citocininas, sin que el dominio de *WUSCHEL* se induzca inicialmente por esta fitohormona (Müller y Sheen, 2008).

Capítulo VI.

Especificación del tejido vascular

Debido a su carácter sésil, las plantas poseen un poder de regeneración y modificación de su estructura corporal, proceso que se da en etapas posteriores a la embriogénesis, adaptando su crecimiento y desarrollo en respuesta a las condiciones ambientales del momento, a este fenómeno se le denomina plasticidad y se basa en la conservación de células madre o fundamentales que se encuentran en los meristemos. Una célula madre por definición se caracteriza por una división celular, generando dos células hijas más pequeñas, cuando ambas células mantienen la totipotencialidad, el meristemo se incrementa en tamaño; para mantener el tamaño del meristemo, una de las células hijas con su totipotencialidad permanece mientras que la otra célula hija es desplazada hacia la frontera, donde inicia el compromiso para diferenciarse, lo cual es inducido por señales tanto intrínsecas como extrínsecas. El “estatus” totipotencial de las células madre se mantiene en microambientes especiales denominados “*nichos celulares totipotenciales o madre*” o “*stem cell niches*” (Spradling *et. al.*, 2001). Las células localizadas en el nicho envían señales que tienen una acción a corta distancia, lo cual es requerido para la manutención de las condiciones propias del nicho.

Las plantas adultas continúan creciendo en dirección apical y en forma lateral, formando nuevas células y órganos a través de los nichos de células totipotenciales. La división celular que promueve este crecimiento se encuentra en los meristemos, dominios especializados que mantienen activamente la división celular de las células indiferenciadas. El meristemo provee un microambiente que protege a las células madre totipotenciales y actúa como un lugar central para el crecimiento y el desarrollo (Scheres, 2007). El número de células madre de los meristemos apical de tallo y de raíz están estrechamente regulado por un balance entre el número de divisiones y el compromiso celular.

La actividad del procambium aparece inicialmente durante la germinación, en el tejido vascular de la raíz embrionaria, en el hipocotilo y los cotiledones diferenciados; el procambium proviene de un tejido pre-establecido. La especificación de este tipo de células meristemáticas se da en el desarrollo del embrión en la fase de embrión globular, en donde las células centrales se comprometen con este tipo celular (Fig. 15A). Posterior a su especificación o compromiso, estas células se dividen en planos específicos y se alargan en una forma coordinada entre ellas, aumentando el número de células inicia-

les y adquieren su distribución anatómica característica formando una capa o banda de células en el embrión en desarrollo (Yoshida *et. al.*, 2014). A partir de este grupo de células madre por divisiones consecutivas se establecen los precursores de floema y del xilema en lados opuestos de la capa de células meristemáticas o procambiales (Fig. 16; Mähönen *et. al.*, 2000).

En las plantas vasculares, en adición a las células totipotenciales en SAM y RAM, existe un grupo de células meristemáticas con capacidad pluripotencial aunque restringida a la formación del sistema tisular vascular, que se encuentran en el procambium/cambium, que originarán al xilema y al floema que conforma el sistema tisular vascular. El tejido vascular proporciona una fuerza física al cuerpo de la planta, así como transporte de agua, macro- y micronutrientes y sustancias elaboradas, además de la movilización de fitohormonas y de otras señales que son requeridas para el crecimiento coordinado del organismo y para su desarrollo. El xilema es el tejido responsable de transportar agua y nutrientes desde la raíz al resto de la planta, mientras que el floema es la ruta para la distribución de los productos derivados de la fotosíntesis y otros productos elaborados o sintetizados en los órganos aéreos, entre ellos varias moléculas que sirven de señalamiento. Las células pluripotenciales del procambium y del cambium vascular generan a ambos tejidos de conducción, además de tejido de sostén que los acompaña como son el parénquima y fibras asociados a los vasos vasculares (Eames y MacDaniels, 1947; Esau, 1965).

Las gimnospermas y muchas dicotiledóneas se encuentran bajo dos fases distintas de crecimiento y desarrollo (Eames y MacDaniels, 1947; Esau, 1965); éstas son: el crecimiento primario, en el cual se incrementa la biomasa del organismo en dirección apical; y el crecimiento secundario que se realiza en dirección lateral. Durante el crecimiento primario, se diferencia el xilema y el floema a partir del tejido meristemático vascular denominado procambium, una vez que el tejido vascular primario es establecido, el cambium es generado a partir del procambium con una reorientación en el plano de división celular, así las células vecinas del tallo y la raíz se comprometen en el crecimiento secundario o en grosor. Se ha observado que la proliferación celular en el cambium es más activa que en el procambium (Eames y MacDaniels, 1947; Esau, 1965). El incremento en la cantidad de tejido vascular por efecto del cambium es una de las características que

distingue a las dicotiledóneas maderables y las gimnospermas de las monocotiledóneas. En la mayoría de las monocotiledóneas, todas las células del procambium se diferencian en tejido vascular durante el crecimiento primario, y por ende, no puede formarse cambium vascular para un crecimiento secundario (Esau, 1965). Se considera que el procambium y el cambium provienen del mismo grupo celular mersitematico, pero que se establecen en dos etapas diferentes del desarrollo.

La división celular y el compromiso en el cambium permite el engrosamiento de los tallos y de las raíces, lo que incrementa la biomasa del organismo. El crecimiento secundario ocurre masivamente en las plantas maderables. Sin embargo el crecimiento secundario se observa también en plantas herbáceas, y resulta en la organización tisular muy semejante a los árboles, esto ha permitido que *Arabidopsis* sea un modelo adecuado para el estudio del crecimiento secundario. La raíz de esta especie es un excelente modelo para el estudio del desarrollo del tejido vascular relacionado al crecimiento primario y secundario (Mähönen *et. al.*, 2000; 2006; Matsumoto-Kitano *et. al.*, 2008; Carlsbecker *et. al.*, 2010).

Se ha establecido la participación de varios genes marcadores en las diferentes etapas en la formación del sistema tisular vascular y la regulación de las células madre vasculares, los cuales actúan durante la:

- a.- determinación de la posición del preprocambium
- b.- especificación del tejido vascular
- c.- formación del tejido vascular
- d.- elementos que afectan la continuidad de los haces vasculares y/o venas
- e.- formación y/o manutención del procambium/cambium

En la embriogénesis se inicia el establecimiento de las células madre de tipo vascular y con ello se especifica a los precursores del procambio a los que se ha denominado pre-procambium, proceso que se ha caracterizado en *Arabidospis*. En el estado de embrión globular temprano, las células internas se dividen en distintas capas concéntricas dando origen a las células meristemáticas del tejido fundamental (o de crecimiento) y a las células ini-

ciales precursoras del tejido vascular o pre-procambium (Fig. 15A, Mansfield y Briarty, 1991; Lau *et. al.*, 2010). En el embrión globular tardío, cuatro células de la parte interna se dividen periclinalmente dando lugar al periciclo y a las células madres vasculares. En la transición del estado globular a corazón y posteriormente a torpedo, el número de filas de células más interna se incrementa por divisiones periclinales generando el procambium, resultando en un patrón de distribución radial que se encuentra en la raíz primaria post-embriónica (Scheres *et. al.*, 1994; Mähönen *et. al.*, 2000). Simultáneamente una red de células madres meristemáticas vasculares surgen en los cotiledones del embrión torpedo; generando así una estructura continua de células procambiales que se extiende en el eje apical-basal sin que se exhiba ninguna otra característica en el embrión maduro, sin embargo, se han detectado varios marcadores moleculares de tejido específicos en estas etapas, indicando que la decisión o compromiso celular se realiza durante la embriogénesis (Bonke *et. al.*, 2003; Mähönen *et. al.*, 2006).

En el establecimiento o determinación del patrón radial, en que se definen las células precursoras o del procambium se encuentran varios genes involucrados (Jenik *et. al.*, 2007), un par de genes que codifican para los receptores tipo cinasa LRR; RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE1 (RPK1) y TOADSTOOL2 (TOAD2) son los responsables en la determinación de la posición del procambium durante la embriogénesis temprana (Tabla 1; Nodine *et. al.*, 2007). Ambos genes inician su expresión en el estado globular temprano, lo cual se demuestra porque el desarrollo embrionario se detiene en los doble mutantes *rpk1* y *rpk2*; y en el embrión de los mutantes *rpk1 toad2*, la expresión de los marcadores genéticos del tejido vascular se extiende más allá de las células del procambium hacia las células iniciales del tejido fundamental y la protodermis, en que la expresión de los marcadores de los dos últimos tejidos se ven severamente disminuidos, indicando que estos dos receptores tipo cinasa LRR regulan la posición del procambium en el embrión (Nodine *et. al.*, 2007).

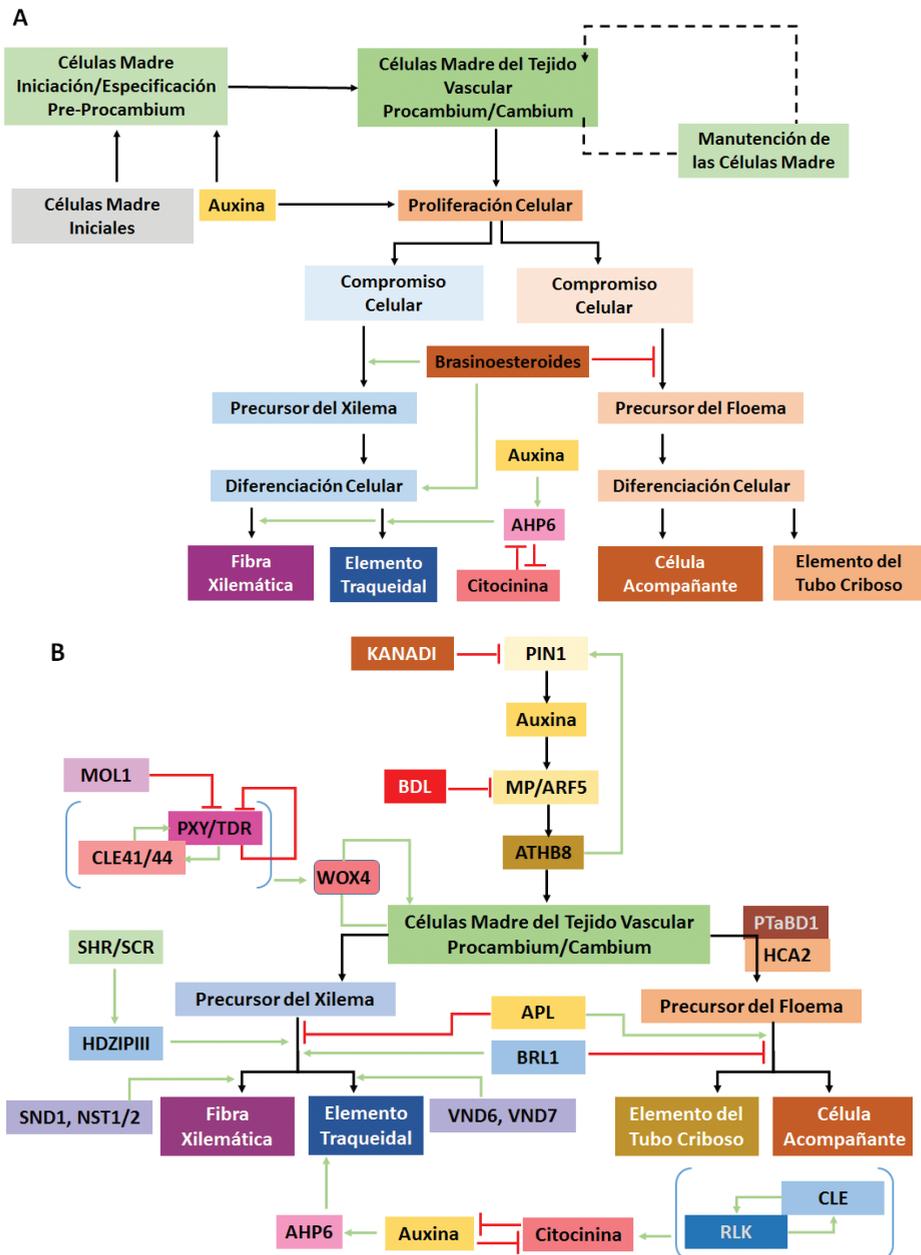


Figura 14. Regulación y especificación del tejido vascular. **A**, Regulación hormonal en la determinación y especificación del tejido vascular; en el desarrollo embrio-

nario se da la especificación de las células precursoras del procambium, la proliferación y compromiso es un proceso que se da después de la germinación. **B**, Red génica en el control de la actividad de las células madre del tejido vascular; en el embrión se especifican las células precursoras del tejido vascular, la diferenciación se da en un evento postgerminativo (El nombre de los genes se encuentran en la Tabla 2). Esquema modificado de Miyashima *et. al.*, 2013.

Un progreso significativo se ha realizado en el conocimiento del establecimiento, desarrollo y crecimiento del tejido vascular en relación al papel que juegan las fitohormonas. Varias hormonas, tales como la auxina, citocinina, giberelinas, etileno, brasinoesteroides y estrigolactona están implicadas en la regulación de varios aspectos de la morfogénesis vascular (Fig. 14A; Tuominen *et. al.*, 1997; Scarpela *et. al.*, 2006; Nilsson *et. al.*, 2008; Matsumoto-Kitano *et. al.*, 2008; Ibañes *et. al.*, 2009; Mauriat y Moritz, 2009). Estudios genéticos en *Arabidopsis*, *Populus* y cultivos celulares de *Zinnia* han permitido establecer los mecanismos subyacentes a las fitohormonas en el desarrollo vascular (Ohashi-Ito *et. al.*, 2002; Schrader *et. al.*, 2004; Mähönen *et. al.*, 2006; Scarpella *et. al.*, 2006). Además se han identificado varios factores de transcripción involucrados en la diferenciación y compromiso celular, indicando que existen programas de regulación conservados ente las diferentes pozas de células madre de la planta (Fig. 14B, Tabla 2; Sablowski, 2011).

La participación de la auxina es fundamental en la iniciación de las células madres del tejido vascular (Reinhardt, 2003). Esta fitohormona está relacionada con la especificación del procambium, y el sitio de mayor acumulación de auxina se da en la parte central del embrión pre-globular, lo que precede al compromiso de ese grupo de células como células procambiales. El factor de transcripción de respuesta a auxina, MONOPTEROS (MP)/AUXIN RESPONSE FACTOR5 (ARF5) juega un papel crítico en la especificación de las células madres vasculares (Hardtke y Berleth, 1998). Durante el desarrollo del embrión, *MP* se expresa en las células procambiales del embrión y su expresión es rápidamente regulada positivamente por la auxina (Fig. 8A y 15B) y por ello el transporte polar de auxina es necesario. Durante la embriogénesis, las proteínas de eflujo de auxina PINFORMED 1 (PIN1) se encuentran polarizadas en la cara interna de las células del proembrión antes de que se comprometan a ser el procambium (Fig. 15A; Friml, 2003). La expresión de

PIN1 se reduce dramáticamente en el mutante con pérdida de función de *mp*, sugiriendo que *MP* regula la transcripción de los *PIN1* (Fig. 15B; Wenzel *et. al.*, 2007).

Las señales mediadas por los factores de transcripción dependientes de auxinas *MONOPTEROS/AUXIN RESPONSE FACTORS 5 (MP/ARF5)* son fundamentales para la síntesis *in situ*, acumulación y transporte polar de la auxina, y con ello, el sitio de una máxima acumulación que establece el procambium (Berleth y Jürgens, 1993, Hardtke *et. al.*, 1998). Entre los genes blancos de *MONOPTEROS*, se encuentra el gen que codifica para el factor de transcripción TARGET OF MONOPTEROS (TMO5) que es el primero que se expresa en el procambium, este es un factor de transcripción tipo bHLH (una estructura básica hélice-asa-hélice, basic helix-loop-helix), y se encuentra restringido a las células precursoras del xilema en la región apical de la raíz embrionaria (Schlereth *et. al.*, 2010; De Rybel *et. al.*, 2013). En el embrión se dan una serie de divisiones celulares periclinales del procambium que son dependientes de un dímero proteico formado entre TMO5 (o su homólogo T5L1) y otro factor bHLH denominado LHW (LONESOME HIGHWAY) o su homólogo LL1 (Fig. 3; De Rybel *et. al.*, 2013; Ohashi-Ito *et. al.*, 2013a, 2013b).

Tan pronto se activa *MP/ARF5* en la zona central del embrión (Fig. 8A y 15), se determina el sitio del pre-procambium, la cantidad de auxina *in situ* se aumenta debido a que se establece el transporte polar de auxina, lo que genera un flujo definido de la fitohormona y se da el proceso conocido como canalización de la auxina, de forma similar a la formación de la venación de las hojas, en donde se establece un transporte polar unidireccional de la hormona mediante el reclutamiento de células adyacentes, en donde *MP/ARF5* regula a los genes *PIN* y al gen *ATHB8*, otro miembro de la familia clase III *HDZIP*. *ATHB8* es un gen que es necesario para estabilizar la expresión de los genes *PIN* en regiones o bandas celulares estrechas que determinarán la identidad celular del procambium dentro de los futuros haces vasculares. A su vez *ATHB8* activa a *ACL5 (ACAULIS5)* gen importante en la producción de termoespermina, la cual atenúa la diferenciación del xilema en una vía de retroalimentación negativa en que están involucrados otros factores de la familia *HDZIPIII* (Fig. 8; Milhinhos *et. al.*, 2013; Baima *et. al.*, 2014).

Una interacción negativa entre la auxina y la citocinina es importante para la formación del procambium (Bishopp *et. al.*, 2011). El gen *ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE* (*AHK2*, *AHK3*, *AHK4/WOL/CRE1*) que codifica para componentes de la transducción de señales, se encuentra involucrado en la división periclinal en el procambium (Mähönen *et. al.*, 2000, 2006). La reducción de la señal de citocininas altera la polaridad subcellular de los transportadores de eflujo (salida) PINFORMED 1 (PIN1), PIN3 y PIN7 que se expresan en el procambium y en el floema a lo largo de donde es transportada simplásticamente la citocinina (Bishopp *et. al.*, 2011). El transporte lateral de la auxina mediada por los PIN, genera un máximo de auxina en el polo xilemático (Bishopp *et. al.*, 2011), el cual está alineado inicialmente con la posición de los dos cotiledones (Help *et. al.*, 2011; De Rybel *et. al.*, 2014). En el procambium, la señal de auxina promueve la expresión de una proteína histidin-pseudo-fosfotransferencia (AHP6), el gen es potenciado por *MP/ARF5* o por el dímero LWH-T5L1 (Fig. 14B; Ohashi-Ito *et. al.*, 2014).

La señal de citocinina inhibe la formación del protoxilema (Bishopp *et. al.* 2011; Mähönen *et. al.*, 2006), en el procambium la señal de citocinina es regulada negativamente por la expresión de *AHP6*. La interacción de otro factor de transcripción PHB (PHABULOSA) que pertenece a la familia de factores de transcripción *HDZIII* (*CLASS III HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER*) reprime a su vez la expresión de *AHP6* (Ilegems *et. al.*, 2010; Carlsbecker *et. al.*, 2010) con lo que se logra mantener una cantidad de citocinina necesaria para conservar la identidad del procambium y poder diferenciar al floema en una etapa posterior. Existe una conexión entre el módulo *MP-TMO5/LHW* que activan directamente a *LOG4*, el gen esta relacionado a una enzima clave en el control en la vía de síntesis de la citocinina. Indicando que la citocinina es una señal no-celular autónoma (non-cell autonomous) que induce división celular fuera del polo xilemático dominado por la expresión de *TMO5/LHW*.

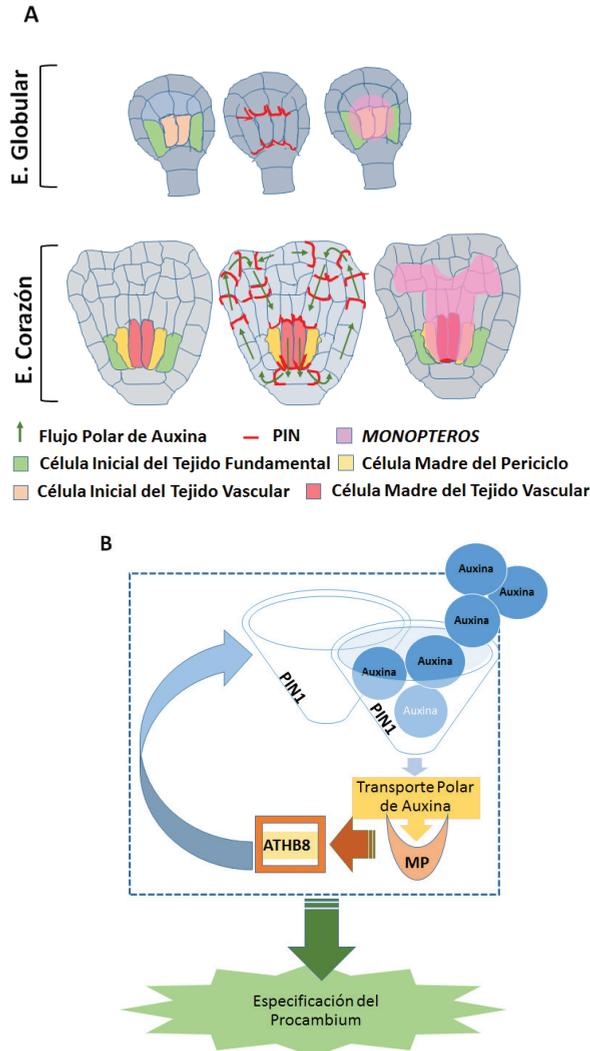


Figura 15. Iniciación y formación de las células procambiales. La iniciación y formación del procambium se debe a una vía de retroalimentación positiva de auxina. **A**, esquema que representa el estado embrionario globular y de corazón de *Arabidopsis*, en él se muestran de izquierda a derecha, la especificación celular, la polaridad de los transportadores de eflujo PIN, y el dominio de expresión de *MONOPTEROS*. **B**, regulación de la vía mediada por la auxina en la iniciación del tejido vascular. Ver en la Tabla 2 los nombres de los genes que en el presente esquema se muestran sus siglas. Esquema modificado de Miyashima *et. al.*, 2013.

Capítulo VII.
Iniciación y actividad del procambium
vascular durante la germinación al
establecimiento de la plántula

El desarrollo del embrión pasa por tres fases una vez se ha fecundado el huevo o cigoto; la fase de diferenciación, etapa que hemos estado describiendo, la cual concluye con el establecimiento de los diferentes nichos de células madre totipotencial que se requieren para establecer los tres sistemas tisulares y con ello la conformación de la plántula una vez ha germinado el embrión (Fig. 16). Las etapas subsecuentes una vez que se han establecido los diferentes dominios en el embrión corazón/torpedo, son las de crecimiento o expansión del embrión torpedo hasta que adquiera el tamaño final de los cotiledón(es), para entrar en la última fase denominada de maduración, en la que se acumulan las sustancias de reserva exclusivamente en los cotiledones como en la leguminosas, o en los cotiledones y el endospermo como en dicotiledóneas del género *Ipomoea* (Díaz-Pontones *et. al.*, 2009) o en el escutelo/endospermo como es el caso de los cereales. Dependiendo de la especie, las semillas pueden germinar inmediatamente, como las semillas recalcitrantes del encino (Díaz-Pontones y Reyes-Jaramillo, 2012) o bien como las semillas ortodoxas que entran en un periodo de desecación, para almacenarse temporalmente en el suelo y germinar una vez que las condiciones ambientales sean adecuadas. Se encuentra un tercer grupo de semillas con capacidades de germinación intermedio entre estos grupos de semillas, al que se le ha denominado semillas intermedias.

Tabla 2. Genes, proteínas y fitohormonas

Determinación de la posición del pre-procambium
o RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE1 (RPK1)
<ul style="list-style-type: none"> • TOADSTOOL2 (TOAD2) Receptores tipo cinasa LRR, determinan la posición del procambium en el embrión de <i>Arabidopsis</i> . (Nordine <i>et. al.</i> , 2007).
Especificación del Tejido Vascular:
o Factores ARF
<ul style="list-style-type: none"> • MONOPTEROS (MP) Factor de transcripción de respuesta a auxina, especificación de las células madre vasculares, pre-procambium. (Hardtke y Berleth, 1998; Scarpella <i>et. al.</i> , 2006; Donner <i>et. al.</i> , 2009).

o HDZIPIII	
<ul style="list-style-type: none"> • ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 8 (ATHB8): miembro de la familia de genes <i>HDZIPIII</i>, factor de transcripción con un homodominio- zipper de leucina, formación del xilema, blanco de miRNA165/166. (Baima <i>et. al.</i>, 2001; Carlsbecker <i>et. al.</i>, 2010; Donner <i>et. al.</i>, 2009; Hardtke & Berleth, 1998; Scarpella <i>et. al.</i>, 2006). 	
<ul style="list-style-type: none"> • PHABULOSA (PHB) Miembro de la familia de genes <i>HDZIPIII</i>, factor de transcripción con un homodominio-ziper de leucina, participa en la formación vascular, es blanco de los microRNA165/166. (Carlsbecker <i>et. al.</i>, 2010). 	
<ul style="list-style-type: none"> • PHAVOLUTA (PHV) Miembro de la familia de genes <i>HDZIPIII</i>, factor de transcripción con un homodominio-ziper de leucina, participa en la formación vascular, es blanco de los microRNA165/166. Carlsbecker <i>et. al.</i>, 2010). 	
<ul style="list-style-type: none"> • REVOLUTA (REV) Miembro de la familia de genes <i>HDZIPIII</i>, factor de transcripción con un homodominio- zipper de leucina, participa en la formación de fibras interfasciculares, es blanco de los microRNA165/166. (Carlsbecker <i>et. al.</i>, 2010). 	
<ul style="list-style-type: none"> • CORONA (CNA) Miembro de la familia de genes <i>HDZIPIII</i>, factor de transcripción con un homodominio- zipper de leucina, participa en la formación vascular, es blanco de los microRNA165/166. (Carlsbecker <i>et. al.</i>, 2010). 	
o Transportadores de Eflujo de Auxina	
<ul style="list-style-type: none"> • PINFORMED 1 (PIN1) Transportador de eflujo de auxinas, iniciación de las células madre vasculares. (Hardtke y Berleth, 1998; Scarpella <i>et. al.</i>, 2006; Donner <i>et. al.</i>, 2009). 	
o KANADI (KAN)	
<p>Proteína de la familia GARP, factor de transcripción con funciones antagónicas a los miembros de la familia <i>HDZIPIII</i>. (Emery <i>et. al.</i>, 2003; Ilegems <i>et. al.</i>, 2010).</p>	

Formación del Tejido Vascular
<ul style="list-style-type: none"> o VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 6/7 Factores de transcripción tipo NAC, participa en la formación de los vasos. (Kubo <i>et. al.</i>, 2005).
<ul style="list-style-type: none"> o SCARFACE (SFC) Proteína ARF-GAP para el reciclamiento de los PIN, afecta el crecimiento de las venas. (Deyholos <i>et. al.</i>, 2000; Koizumi <i>et. al.</i>, 2005; Sieburth <i>et. al.</i>, 2006)
<ul style="list-style-type: none"> o ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT (APL) Factores de transcripción tipo coiled-coil tipo MYB, diferenciación del floema. (Bonke <i>et. al.</i>, 2003)
Elementos que afectan la continuidad de los haces vasculares o venas
<ul style="list-style-type: none"> o Xylogen (XYP1/2) Proteoglucano, afecta la continuidad de la red de elementos traqueidales. (Motosé <i>et. al.</i>, 2004)
<ul style="list-style-type: none"> o OCTOPUS (OPS) Proteína membranal que afecta la continuidad del floema. (Truernit <i>et. al.</i>, 2012).
Factores que participan en la formación de la Endodermis
<ul style="list-style-type: none"> o Factores de transcripción tipo GRAS
<ul style="list-style-type: none"> • SHORT ROOT (SHR)
<ul style="list-style-type: none"> • SCARECROW (SCR) Factores de transcripción tipo GRAS, participan en la especificación de la endodermis, regulan/producen los microRNA165/166 en raíz. (Carlsbecker <i>et. al.</i>, 2010).
Formación o Manutención del Procambium y/o Cambium
<ul style="list-style-type: none"> o Factores de Transcripción
<ul style="list-style-type: none"> • WUSCHEL-like HOMEBOX 4 (WOX4) Factor de transcripción con una caja homobox o homeótica, manutención de las células madre del pro- o cambium vascular. (Hirakawa <i>et. al.</i>, 2010; Suer <i>et. al.</i>, 2011).
<ul style="list-style-type: none"> • ARK1/2 class I KNOTTED1-like homeobox (KNOX) Factor de transcripción perteneciente a la familia <i>KNOX</i>, proliferación celular en el cambium.
<ul style="list-style-type: none"> • HIGH CAMBIAL ACTIVITY 2 (HCA2) Factor de transcripción tipo Dof, participa en la proliferación celular y la formación del floema a partir del cambium. (Guo <i>et. al.</i>, 2009).

o Proteínas y Péptidos Señal
<ul style="list-style-type: none"> • Pta LBD 1 LBD/ASL Familia de proteínas para la proliferación celular en el cambium. (Du <i>et. al.</i>, 2009; Groover <i>et. al.</i>, 2006)
<ul style="list-style-type: none"> • CLAVATA3/ESR-related 41/44 (CLE41/44) Péptido de la familia CLE. Ligando que permite la manutención de la células procambiales. (Hirakawa <i>et. al.</i>, 2008; Whilord <i>et. al.</i>, 2008).
o Receptores
<ul style="list-style-type: none"> • PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM (PXY)/TDIF RECEPTOR (TDR) Receptor tipo cinasa LRR, específico para péptidos CLE, manutención del procambium. (Fisher y Turner, 2007; Hirakawa <i>et. al.</i>, 2008).
<ul style="list-style-type: none"> • MORE LATERAL GROWTH 1 (MOL1)
<ul style="list-style-type: none"> • REDUCED IN LATERAL GROWTH 1 (RUL1) Receptores tipo cinasa LRR, regulación de la proliferación celular en el cambium interfascicular. (Agusti <i>et. al.</i>, 2011)
o Fitohormonas
<ul style="list-style-type: none"> • Citocinina
<ul style="list-style-type: none"> -CYTOKININ RESPONSE 1(CRE1)/WOODEN LEG (WOL)/ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE (AHK) Histidin cinasa, receptor de citocininas, manutención de las células madre en el procambium/cambium por inhibición de la diferenciación del xilema. (Mähönen <i>et. al.</i>, 2000).
<ul style="list-style-type: none"> -AHP6 Proteína de pseudo-fosfotransferencia en la señal de citocininas, especificación del xilema. (Mähönen <i>et. al.</i>, 2006).
<ul style="list-style-type: none"> -ARR1, 10 y 12 Tipo B ARRs Participantes en la vía de señalización inducida por citocinina, inhiben la diferenciación del procambium a xilema. (Argyros <i>et. al.</i>, 2008; Hutchison <i>et. al.</i>, 2006; Ishida <i>et. al.</i>, 2008; Yokoyama <i>et. al.</i>, 2007).
<ul style="list-style-type: none"> • Brasinoesteroides
<ul style="list-style-type: none"> -ISOPENTENYLTRANSFERASE (IPT) Enzima de la biosíntesis de citocinina, promueve la actividad del cambium. (Matsumoto-Kitano <i>et. al.</i>, 2008).
<ul style="list-style-type: none"> -BRI1, BRL1-3 Receptor tipo cinasa LRR para los brasinoesteroides, promueve el desarrollo de xilema. (Cano-Delgado <i>et. al.</i>, 2004; Nakamura <i>et. al.</i>, 2006; Yamamoto <i>et. al.</i>, 2001, 2007)

<ul style="list-style-type: none"> • Giberelinas
<ul style="list-style-type: none"> -GIBBERELLIN 20-OXIDASE y GIBBERELLIN 3-OXIDASE <p>Biosíntesis de giberelinas, promueve la actividad del pro/cambium, la formación de fibras xilemáticas. (Israelsson <i>et. al.</i>, 2005).</p>
<ul style="list-style-type: none"> -GIBBERELLIN 3-oxidase y GIBBERELLIN 20-OXIDASE <p>Biosíntesis de giberelinas, promueven la actividad del cambium y la formación de fibras del xilema. (Israelsson <i>et. al.</i>, 2005).</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Jasmónico
<ul style="list-style-type: none"> -JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) <p>7 a 10 proteínas en la vía de señalamiento inducidas por jasmónico, proteínas con un dominio ZIP, receptores de jasmónico, reprimen la actividad del cambium por la inhibición de MYC2. (Chini <i>et. al.</i>, 2007; Sehr <i>et. al.</i>, 2010; Thines <i>et. al.</i>, 2007)</p>
<ul style="list-style-type: none"> -CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1) <p>Proteína con una caja F (F-box) en la vía de señalamiento del jasmónico, receptor de jasmónico. (Chini <i>et. al.</i>, 2007; Sehr <i>et. al.</i>, 2010; Thines <i>et. al.</i>, 2007).</p>
<ul style="list-style-type: none"> -MYC2 <p>Factor de transcripción inducido por jasmónico, promueve la actividad cambial. (Chini <i>et. al.</i>, 2007; Sehr <i>et. al.</i>, 2010; Thines <i>et. al.</i>, 2007).</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Etileno
<ul style="list-style-type: none"> -ERF104 ETHYLENE RESPONSE FACTOR <p>Factor que promueve la iniciación del cambium interfascicular. (Bethke <i>et. al.</i>, 2009).</p>

Tabla modificada de Miyashima *et. al.*, 2013.

Durante la fase de germinación, se reestablece el metabolismo y se inicia la diferenciación de los tejidos, manteniendo los nichos celulares establecidos durante la embriogénesis. Durante la diferenciación el pre-procambium da origen al procambium, para la manutención de las células meristemáticas se establece la expresión del gen *WOX4*. El módulo que induce la expresión de este gen en el procambium pertenece al grupo *CLE/PXY/WOX*. En *Arabidopsis*, el grupo de genes *CLAVATA3/ESR-RELATED (CLE)*, *CLE41* y *CLE44* producen un péptido que difunde desde la cara del dominio del floema e interacciona con un receptor de membrana de las células meristemáticas procambiales, PXY (PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM), también conocido

como TDIF RECEPTOR (TDR; Ito *et. al.*, 2006; Fisher *et. al.*, 2007; Hirakawa *et. al.*, 2008, 2010), genera una cascada de señales que provocan la proliferación celular y reprimen la diferenciación de estas células hacia elementos traqueidales a través de un efector positivo del factor de transcripción WOX4 (y su homólogo WOX14), más que una identidad inicial de tipo procambial, este gen es inducible por auxina (Fig. 14B).

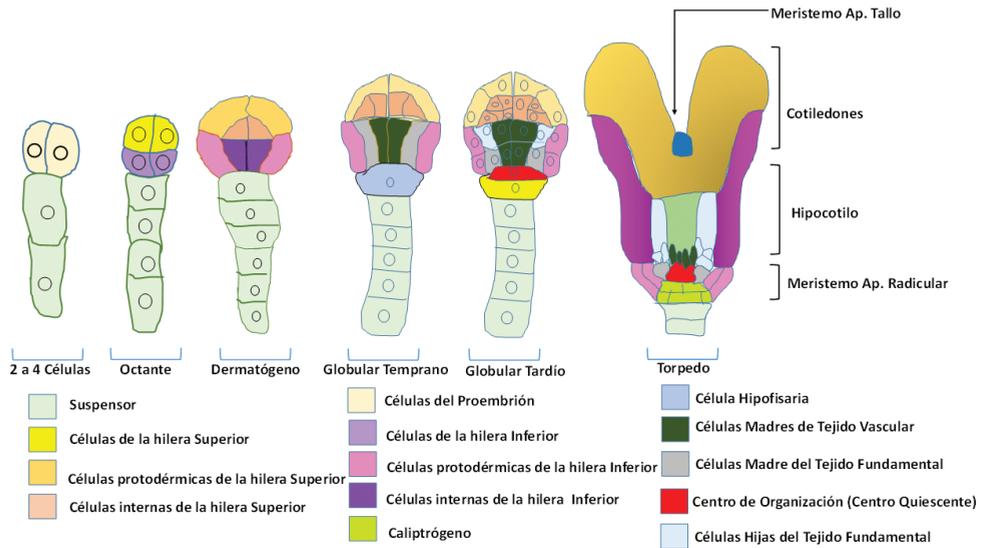


Figura 16. Desarrollo embrionario y la especificación de los tejidos. El esquema muestra el desarrollo del embrión y la especificación de los dominios celulares: apical *vs* basal, el establecimiento con ello del eje apical basal; el paso de simetría radial del embrión globular al embrión corazón, el establecimiento de subdominios central, y del subdominio adaxia/abaxial y con ello la formación de los meristemo apical y los cotiledones; en un embrión torpedo se pueda encontrar las células fundadoras o madre que darán la organogénesis posterior. Esquema modificado de Möller Weijers, 2009.

Por otra parte, doce genes *ERF* (*ETHYLENE RESPONSE FACTORS*) codifican para factores de transcripción miembros de la familia *ERF/AP2* que promueven la actividad del procambium independiente de *PXY*. Dos péptidos pertenecientes a la familia de péptidos ricos en cisteína, EPFL4 (*EPIDERMAL PATTERNING FACTOR LIKE 4*) y EPFL6, se unen directamente a *ERF* (Uchida y Tasaka, 2013) y median el efecto directo y dependiente en el haz vascular,

donde EPFL4 y EPFL6 se expresan en la vaina externa de los haces vasculares que acumulan almidón (Uchida *et. al.*, 2012) lo que implica la importancia de la comunicación celular en el desarrollo del tejido vascular.

Junto a la promoción de la proliferación celular procambial debida a *WOX4*, la señal *CLE-PXY* modula la inhibición de la diferenciación hacia xilema, mediante la interacción con miembros la familia de proteínas GSK3 (GLYCOGEN SYNTHASE KINASE 3), incluyendo a BIN2 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2; Hirakawa *et. al.*, 2010; Cho *et. al.*, 2014; Kondo *et. al.*, 2014). La inhibición de la actividad de estas proteínas (mediante BIN2) resulta en la pérdida de las células procambiales a favor de las células xilemáticas en el hipocotilo. En la vía de señalamiento de los brasinoesteroides, la fosforilación dependiente de BIN2 inhibe la actividad de los factores de transcripción *BZR1* (*BRASSINAZOLE RESISTANT 1*) y *BES1* (*BZR2/BRI1-EMS SUPPRESSOR*), lo que indica que la vía de señalamiento de los brasinoesteroides es suprimida tempranamente en las células xilemáticas, para evitar su diferenciación (Caño-Delgado *et. al.*, 2004).

BIN2 promueve la iniciación de la formación de raíces laterales, fosforilando a ARF7 y ARF19 en una manera dependiente de PXY (Cho *et. al.*, 2014), de este modo BIN2 suprime la interacción con las proteínas AUXIN/INDOLE 3 ACETIC ACID (AUX/IAAs) y aumenta el efecto positivo en la transcripción de los genes. Se ha demostrado que la fosforilación de los factores de transcripción ARF es dependiente de *CLE-PXY* y es requerida para la respuesta de auxina durante la iniciación de la raíz lateral, sugiriendo otra relación entre las señales de auxinas y la regulación del procambium.

En el tallo, durante la formación del cambium se han caracterizado dos receptores tipo cinasa (kinase like) MOL1 (MORE LATERAL GROWTH1) y RUL1 (REDUCED IN LATERAL GROWTH 1), que regulan la formación de tejido vascular secundario y se ha especulado que su actividad está programada y modulada por un programa de desarrollo específico para regular la actividad del cambium y que sobre impone al programa descrito en el desarrollo del procambium (Fig. 14B).

Hasta aquí se ha establecido el origen de los tres sistemas tisulares, en que se han especificado el establecimiento de las células fundadoras o madre de cada uno de ellos, durante la primera fase del desarrollo embrionario

que abarca desde la fecundación pasando por el proembrión dermatógeno al globular en que se posee una simetría radial y que dará origen al embrión corazón en que se cambia a una simetría bilateral, conservando en la parte basal la estructura de anillos concéntricos del tejido vascular, fundamental y epidérmico. Esta parte pretende ser la primera de una serie de publicaciones, en donde las subsecuentes aborden la organogénesis que ocurre desde la germinación hasta la obtención de una plántula.

Lecturas Sugeridas

- Barton M.K. Twenty years on: the inner working of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. *Development Biology*. (2010). 341:95-113.
- Boscá S., Knauer S., Laux T. Embryonic development in *Arabidopsis thaliana*: from the zygote division to the shoot meristem. *Frontiers in Plant Science*. (2011). 2:93. doi: 10.3389/fpls.2011.00093
- Bewley J.D., Bradford K.J., Hilhorst H.W.M., Nonogaki H. (2013). Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. 3rd Edition. Springer. New York. Cap: 2, pp: 38-41.
- Dodsworth S. A diverse and intricate signalling network regulates stem cell fate in the shoot meristem. *Developmental Biology*. 336 (2009). 1-9
- Jeong S., Bayer M., Lukowitz W. Taking the very first steps: from polarity to axial domains in the early *Arabidopsis* embryo. *Journal of Experimental Botany*. (2011). 65 (5): 1687-1697.
- Javelle M., Vernoud V., Rogowsky P.M., Ingram G.G. Epidermis: the formation and function plant tissue. *New Phytologist*. (2011). 189:17-39.
- Miyashima S., Sebastian J., Lee J.Y., Helariutta, Y. Stem cell function during plant vascular development. *The EMBO Journal*. (2013). 32:178-193.
- Virginie J., Brackmann K., Greb T. (Pro)cambium formation and proliferation: two sides of the same coin? *Current Opinion in Plant Biology*. (2015). 23:54–60.
- Wendrich J.R., Weiner D. The *Arabidopsis* embryo as a miniature morphogenesis. *New Phytologist*. (2013) 199:14-25.
- Zhu T., Moschou P.M., Alvarez J.J., Sutil Berg J.J., von Arnold S. *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 2* is important for protoderm and suspensor development in gymnosperm *Norway Spruce*. *BMC Plant Biology*. (2016). 16:19.

Referencias

- Abe M, Katsumata H, Komeda Y, Takahashi T. Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in *Arabidopsis*. *Development*. (2003). 130: 635–643.
- Abe K., Osakabe K., Ishikawa Y., Tagiri A., Yamanouchi H., Takyuu T., Yoshioka T., Ito T., Kobayashi M., Shinozaki K., Ichikawa H., Toki S. Inefficient doublestrand DNA break repair is associated with increased fasciation in *Arabidopsis* BRCA2 mutants. *Journal of Experimental Botany*. (2009). 60: 2751–2761.
- Agusti J., Lichtenberger R., Schwarz M., Nehlin L., Greb T. Characterization of transcriptome remodeling during cambium formation identifies MOL1 and RUL1 as opposing regulators of secondary growth. *PLOS Genetics*. (2011). 7: e1001312.
- Ahuja Y.R., Bhaduri P.N. The embryology of *Brassica campestris* L. var. Toria Duth. & Full. *Phytomorphology*. (1956). 6: 63–67.
- Aida M., Beis D., Heidstra R., Willemsen V., Blilou I., Galinha C., Nussaume L., Noh Y.S., Amasino R., Scheres B. The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell*. (2004). 119: 109–120.
- Argyros R.D., Mathews D.E., Chiang Y-H., Palmer C.M., Thibault D.M., Etheridge N., Argyros D.A., Mason M.G., Kieber J.J., Schaller G.E. Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development. *Plant Cell*. (2008). 20: 2102–2116.
- Baima S., Possenti M., Matteucci A., Wisman E., Altamura M.M., Ruberti I., Morelli G. The *Arabidopsis* ATHB-8 HDZIP protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. *Plant Physiol*. (2001). 126: 643–655.
- Baima S, Forte V, Possenti M, Penalosa A, Leoni G, Salvi S, Felici B, Ruberti I, Morelli G. Negative feedback regulation of auxin signaling by ATHB8/ACL5-BUD2 transcription module. *Molecular Plant* (2014). 7:1006-1025.
- Bayer M., Nawy T., Giglione C., Galli M., Meinnel T., Lukowitz W. Paternal control of embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Science*. (2009). 323: 1485–1488.

- Belles-Boix E., Hamant O., Witlak S.M., Morin H., Traas J., Pautot V. KNAT6, an *Arabidopsis* homeobox gene involved in meristem activity and organ separation. *Plant Cell*. (2006). 18: 1900–1907
- Benkova E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G., Friml J. Local efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*. (2003). 115: 591–602.
- Berjak P., Pammenter N.W. Recalcitrant seeds. En: *Handbook of Seed Physiology: Applications to Agriculture*. Benech-Arnold R.L. y Sanchez R.A. (eds). (2004). Haworth Press Inc, New York.
- Benjak P., Pammenter N.W. Progress in the understanding and manipulation of desiccation sensitive (recalcitrant) seed. En: *Basic and Applied Aspects of Seed Biology. Proceeding of the Fifth International Workshop of Seed*. Ellis R.H., Black M., Murdoch A.J. y Hong T.D. (eds). (1997). Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture 30: 689-703.
- Berleth T., Jürgens G. The role of the *MONOPTEROS* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development*. (1993). 118: 575–587.
- Bethke G., Unthan T., Uhrig JF, Pöschl Y., Gust A.A., Scheel D., Lee J. Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. (2009). 106:8067–8072.
- Betsuyaku S., Takahashi F., Kinoshita A., Miwa H., Shinozaki K, Fukuda H., Sawa S. Mitogen-Activated Protein Kinase regulated by the CLAVATA Receptors contributes to shoot apical meristem homeostasis. *Plant and Cell Physiology*. (2011). 52(1):14–29 doi:10.1093/pcp/pcq157
- Bishopp A, Help H, El-Showk S, Weijers D, Scheres B, Friml J, Benkova E, Mähönen A.P, Helariutta Y. A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Current Biology*. (2011). 21:917-926.
- Bleckmann , A., Weidtkamp-Peters S., Seidel C., Simon R. Stem cell signaling in *Arabidopsis* requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiology*. (2010) 152 : 166–176 .

- Bonke M., Thitamadee S., Mähänen A.P., Hauser M-T., Helariutta Y. APL regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis*. *Nature*. (2003). 426: 181–186.
- Bonner F.T. y Bozo J.A. *Seed Biology and Technology of Quercus*. (1987). United States of America Department of Agricultural, Forest Service. Genetic and Technology Reproduction. 50-66.
- Borghi L., Bureau M., Simon R. *Arabidopsis* JAGGED LATERAL ORGANS is expressed in boundaries and coordinates KNOX and PIN activity. *The Plant Cell*. (2007). 19: 1795–1808.
- Boscá S., Knauer S., Laux T. Embryonic development in *Arabidopsis thaliana*: from the zygote division to the shoot meristem. *Frontiers in Plant Science*. (2011). 2: 93.
- Brand U., Fletcher J.C., Hobe M., Meyerowitz E.M., Simon R. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science*. (2000). 289: 617–619.
- Breuninger H., Rikirsch E., Hermann M., Ueda M., Laux T. Differential expression of *WOX* genes mediates apical–basal axis formation in the *Arabidopsis* embryo. *Developmental Cell*. (2008). 14: 867–876.
- Bruck D.K. y Walker D.B. Cell determination during embryogenesis in citrus Jambhiri. 1. Ontogeny of the epidermis. *Botanical Gazette*. (1985). 146: 188–195.
- Bureau M., Rast M.I., Illmer J., Simon R. JAGGED LATERAL ORGANS (*JLO*) controls auxin dependent patterning during of the *Arabidopsis* embryo and root. *Plant Molecular Biology*. (2010). 74: 479–491.
- Butenko M.A., Vie A.K., Brembu T., Aalen R.B., Bones A.M. Plant peptides in signalling: looking for new partners. *Trends in Plant Science*. (2009). 14: 255-263.
- Carles C.C. y Fletcher J.C. Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends in Plant Science*. (2003). 8: 394–401.
- Caño-Delgado A., Yin Y., Yu C., Vafeados D., Mora-Garcia S., Cheng J-C., Nam K.H., Li J., Chory J. BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid recep-

- tors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development*. (2004). 131: 5341–5351.
- Carlsbecker A., Lee J-Y., Roberts C.J., Dettmer J., Lehesranta S., Zhou J., Lindgren O., Moreno-Risueno M.A., Vatén A., Thitamadee S., Campilho A., Sebastian J., Bowman J.L., Helariutta Y., Benfey P.N. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose dependent root cell fate. *Nature*. (2010). 465: 316–321.
- Chandler J., Nardmann J., Werr W. Plant development revolves around axes. *Trends in Plant Science* (2008). 13: 78–84.
- Cheng Y., Qin G., Dai X., Zhao, Y. A role for a BTB-NPH3-like protein in auxin-regulated organogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. (2007). 104, 18825–18829.
- Cheng Y., Qin G., Dai X., Zhao Y., 2008. NPY genes and AGC kinases define two key steps in auxin-mediated organogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. (2008). 105: 21017–21022.
- Chini A., Fonseca S., Fernandez G., Adie B., Chico J.M., Lorenzo O., Garcia-Casado G., Lopez-Vidriero I., Lozano F.M., Ponce M.R., Micol J.L., Solano R. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*. (2007). 448: 666–671.
- Cho H., Ryu H., Rho S., Hill K., Smith S., Audenaert D., Park J., Han S., Beekman T., Bennett M. J. *et. al.* A secreted peptide acts on BIN2-mediated phosphorylation of ARFs to potentiate auxin response during lateral root development. *Nature Cell Biology*. (2014). 16:66-76.
- Christensen S.K., Dagenais N., Chory J., Weigel, D. Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell*. (2000). 100: 469–478.
- Christensen C.A., Gorsich S.W., Brown R.H., Jones L.G., Brown J., Shaw J.M., Drews G.N. Mitochondrial GFA2 is required for synergid cell death in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. (2002). 14: 2215–2232.
- Clark S.E. Cell signalling at the shoot meristem. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. (2001). 2: 276–284.

- Clark S.E., Running M.P., Meyerowitz, E.M. CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development*. (1993). 119: 397–418.
- Clark S.E., Running M.P., Meyerowitz E.M. CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1. *Development*. (1995). 121: 2057–2067.
- Clark S.E., Williams R.W., Meyerowitz E.M. The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell*. (1997). 89: 575–585.
- Cole M., Nolte C., Werr W. Nuclear import of the transcription factor SHOOT-MERISTEMLESS depends on heterodimerization with BLH proteins expressed in discrete subdomains of the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acid Research*. (2006). 34: 1281–1292.
- Cole M., Chandler J., Weijers D., Jacobs B., Comelli P., Werr W. DORNROSCHE is a direct target of the auxin response factor MONOPTEROS in the *Arabidopsis* embryo. *Development*. (2009). 136: 1643–1651.
- DeYoung B.J., Clark S.E. BAM receptors regulate stem cell specification and organ development through complex interactions with CLAVATA signalling. *Genetics*. (2008). 180: 895–904.
- De Rybel B., Moller B., Yoshida S., Grabowicz I., Barbier de Reuille P., Boeren S., Smith R.S., Borst J.W., Weijers D. A bHLH complex controls embryonic vascular tissue establishment and indeterminate growth in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*. (2013). 24: 426–437.
- De Rybel B, Adibi M, Breda AS, Wendrich J, Smit ME, Novák O, Yamaguchi N, Yoshida S, Van Isterdael G, Palovaara J *et. al.* Integration of growth and patterning during vascular tissue formation in *Arabidopsis*. *Science*. (2014). 345: 1255215.
- De Smet I., Voss U., Jurgens G., Beeckman T. Receptor-like kinases shape the plant. *Nature Cell Biology*. (2009). 11:1166–1173.
- Deyholos M., Corder G., Beebe D., Sieburth L. The SCARFACE gene is required for cotyledon and leaf vein patterning. *Development*. (2000). 127: 3205–3213.

- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*. (2005a). 435: 441–445.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Weijers D., Lechner E., Yamada M., Hobbie L., Ehrismann J.S., Jurgens G., Estelle M. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Developmental Cell*. (2005b). 9: 109–119.
- Dharmasiri S., Estelle M. The role of regulated protein degradation in auxin response. *Plant Molecular Biology*. (2002). 49: 401–409.
- Díaz-Pontones D.M., García-Lara S. López-L. Biochemical and Morphological changes in seed development of an endospermic dycotyledoneus plant. En: Functional Diversity of Plant Reproduction. (2009). Gamboa-deBuen A., Orozco-Segovia A., Cruz-García F. eds. Research Simpost. India. Cap: 6, pp: 139-174. doi:10.1186/2193-1801-3-399.
- Díaz-Pontones D.M. y Reyes-Jaramillo I. Controllable storage conditions increase survival and germination rates of *Quercus hintonii* acorns. *Current Topics in Plant Biology*. 13:45-55.
- Diévert A., Dalal M., Tax F.E., Lacey A.D., Huttly A., Li J.M., Clark S.E. CLAVATA1 dominant-negative alleles reveal functional overlap between multiple receptor kinases that regulate meristem and organ development. *Plant Cell*. (2003). 15: 1198–1211.
- Donner T.J., Sherr I., Scarpella E. Regulation of preprocambial cell state acquisition by auxin signaling in *Arabidopsis* leaves. *Development*. (2009). 136: 3235–3246.
- Du J., Mansfield S.D., Groover A.T. The *Populus* homeobox gene *ARBORKNOX2* regulates cell differentiation during secondary growth. *The Plant Journal*. (2009). 60: 1000–1014.
- Duclercq J., Sangwan-Norreel B., Catterou M., Sangwan R.S. *De novo* shoot organogenesis: from art to science. *Trends in Plant Science*. (2011). 16: 597–606.
- Dumont M., Massot S., Doutriaux M-P., Gratias A. Characterization of *Brca2-Deficient* plants excludes the role of *NHEJ* and *SSA* in the meio-

- tic chromosomal defects phenotype. *PLOS Genetics*. (2011). 6(10): e26696. Doi: 10.1371/journal.pone.0026696.
- Dute R.R., Peterson C.M., Rushing A.E.** Ultrastructural changes of egg apparatus associated with fertilization end proembryo development of soybean, *Glycine max* (Fabaceae). *Annals of Botany*. (1989). 64: 123-135.
- Eames A.J., MacDaniels L.H.** An Introduction to Plant Anatomy. 2nd ed. New York: McGraw-Hill. (1947).
- Ellis R.H., Hong T.D. y Roberts E.H.** An Intermediate Category of Seed Storage Behaviour?: I. COFFEE. *Journal of Experimental Botany*. (1990). 41(9):1167-1174. doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/41.9.1167>
- Emery J.F., Floyd S.K., Alvarez J., Eshed Y., Hawker N.P., Izhaki A., Baum S.F., Bowman J.L.** Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by *class III HD-ZIP* and *KANADI* genes. *Current Biology*. (2003). 13: 1768-1774.
- Endrizzi K., Moussian B., Haecker A., Levin J.Z., Laux T.** The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *The Plant Journal*. (1996). 10: 967-979.
- Engstrom E.M., Izhaki A., Bowman J.L.** Promoter bashing, microRNAs, and *Knox* genes. New insights, regulators, and targets-of regulation in the establishment of lateral organ polarity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. (2004). 135: 685-694.
- Esau K.** Vascular Differentiation in Plants. New York: Holt, Rinehart, and Winston. (1965).
- Faure J.E., Rotman N., Fortuné P., Dumas C.** Fertilization in *Arabidopsis thaliana* wild type: developmental stages and time course. *The Plant Journal*. (2002). 30: 481-488.
- Ferris P.J., Goodenough U.W.** Mating type in *Chlamydomonas* is specified by mid, the minus-dominance gene. *Genetics*. (1997). 146: 859-869.
- Fiers M., Ku K.L., Liu C.M.** CLE peptide ligands and their roles in establishing meristems. *Current Opinion in Plant Biology*. (2007). 10: 39-43.

- Fisher K., Turner S.** PXY, a receptor-like kinase essential for maintaining polarity during plant vascular-tissue development. *Current Biology*. (2007). 17: 1061–1066.
- Fletcher J.C., Meyerowitz E.M.** Cell signalling within the shoot meristem. *Current Opinion in Plant Biology*. (2000). 3: 23–30.
- Floyd S.K., Bowman J.L.** Ancient microRNA target sequences in plants. *Nature*. (2004). 428; 485–486.
- Fornara F., de Montaigu A., Coupland G.** SnapShot: control of flowering in *Arabidopsis*. *Cell*. (2010). 30(141): 550, 550.e1–2 doi: 10.1016/j.cell.2010.04.024.
- Friml J.** Auxin transport–shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology*. (2003). 6: 7–12.
- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R., Jürgens G.** Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*. (2003). 426: 147–153.
- Friml J., Yang X., Michniewicz M., Weijers D., Quint A., Tietz O., Benjamins R., Ouwerkerk P.B.F., Ljung K., Sandberg G., Hooykaas P.J.J., Palme K., Offringa R.** A PINOID dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science*. (2004). 306: 862–865.
- Furutani M., Kajiwara T., Kato T., Treml B.S., Stockum C., Torres-Ruiz R.A., Tasaka M.** The gene *MACCHI-BOU4/ENHANCER OF PINOID* encodes a NPH3-like protein and reveals similarities between organogenesis and phototropism at the molecular level. *Development*. (2007). 134: 3849–3859.
- Furutani M., Vernoux T., Traas J., Kato T., Tasaka M., Aida M.** PIN-FORMED and PINOID regulate boundary formation and cotyledon development in *Arabidopsis* embryogenesis. *Plant Cell*. (2004). 131: 5021–5030
- Galinha C., Hofhuis H., Luijten M., Willemsen V., Blilou I., Heidstra R., Scheres B.** PLETHORA proteins as dosedependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature*. (2007). 449, 1053–1057.
- Geldner N., Anders N., Wolters H., Keicher J., Kornberger W., Muller P., Debarre A., Ueda T., Nakano A., Jürgens G.** The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF

- mediates endosomal recycling, auxin transport and auxin-dependent plant growth. *Cell*. (2003). 112: 219–230.
- Goldberg R.B., de Paiva G., Yadegari R. Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science*. (1994). 266: 605–614.
- Gómez-Mena C., Sablowski R. Arabidopsis THALIANA HOMEBOX1 establishes the basal boundaries of shoot organs and controls stem growth. *Plant Cell*. (2008). 20: 2059–2072.
- Gordon S.P., Chickarmane V.S., Ohno C., Meyerowitz E.M. Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. (2009). 106: 16529–16534.
- Gray W.M., Kepinski S., Rouse D., Leyser O., Estelle M. Auxin regulates SCF (TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*. (2001). 414: 271–276.
- Green K.A., Prigge M.J., Katzman R.B., Clark S.E. CORONA, a member of the class III homeodomain-leucine zipper gene family in Arabidopsis, regulates stem cell specification and organogenesis. *Plant Cell*. (2005). 17: 691–704.
- Grigg S., Galinha C., Kornet N., Canales C., Scheres B., Tsiantis M. Repression of apical homeobox genes is required for embryonic root development in Arabidopsis. *Current Biology*. (2009). 19: 1485–1490
- Groover A., Mansfield S., DiFazio S., Dupper G., Fontana J., Millar R., Wang Y. The Populus homeobox gene ARBORKNOX1 reveals overlapping mechanisms regulating the shoot apical meristem and the vascular cambium. *Plant Molecular Biology*. (2006). 61: 917–932.
- Grunewald W., Friml J. The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *The EMBO Journal*. (2010). 29: 2700–2714.
- Guilfoyle T.J., Hagen G. Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology*. (2007). 10: 453–460.
- Guo Y., Qin G., Gu H., Qu L-J. Dof5.6/HCA2, a Dof transcription factor gene, regulates interfascicular cambium formation and vascular tissue development in Arabidopsis. *Plant Cell*. (2009). 21: 3518–3534.

- Haecker A., Groß-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Herrmann M., Laux T. Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. (2004). 131: 657–668.
- Haecker A., Laux T. Cell–cell signalling in the shoot meristem. *Current Opinion in Plant Biology*. (2001). 4: 441–446.
- Han P., Li Q., Zhu Y.X. Mutation of *Arabidopsis BARD1* causes meristem defects by failing to confine *WUSCHEL* expression to the organizing centre. *Plant Cell*. (2008). 20: 1482–1493.
- Hardtke C.S., Berleth T. The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *The EMBO Journal*. (1998). 17: 1405–1411.
- Hardtke C.S., Ckurshumova W., Vidaurre D.P., Singh S.A., Stamatiou G., Tiwari S.B., Hagen G., Guilfoyle T.J., Berleth T. Overlapping and non-redundant functions of the *Arabidopsis* auxin response factors MONOPTEROS and NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4. *Development*. (2004). 131: 1089–1100.
- Haecker A., Gross-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Herrmann M., Laux T. Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. (2004). 131: 657–668.
- Help H., Mähönen A.P., Helariutta Y., Bishopp A. Bisymmetry in the embryonic root is dependent on cotyledon number and position. *Plant Signal and Behavior*. (2011). 6:1837-1840.
- Hibara K., Karim M.R., Takada S., Taoka K., Furutani M., Aida M., Tasaka M. *Arabidopsis* CUP-SHAPED COTYLEDON3 regulates postembryonic shoot meristem and organ boundary formation. *Plant Cell*. (2006). 18: 2946–2957.
- Hirakawa Y., Kondo Y., Fukuda H. TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the *WOX4* homeobox gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. (2010). 22: 2618–2629.

- Hirakawa Y., Shinohara H., Kondo Y., Inoue A., Nakanomyo I., Ogawa M., Sawa S., Ohashi-Ito K., Matsubayashi Y., Fukuda H. Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. (2008). 105:15208-15213.
- Husbands A.Y., Chitwood D.H., Plavskin Y., Timmermans M.C. Signals and prepatterns; new insights into organ polarity in plants. *Genes and Development*. (2009). 23: 1986–1997.
- Hutchison C.E., Li J., Argueso C., Gonzalez M., Lee E., Lewis M.W., Maxwell B.B., Perdue T.D., Schaller G.E., Alonso J.M., Ecker J.R., Kieber J.J. The *Arabidopsis* Histidine Phosphotransfer Proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell*. (2006). 18: 3073–3087.
- Ibañez M., Fábregas N., Chory J., Caño-Delgado A.I. Brassinosteroid signaling and auxin transport are required to establish the periodic pattern of *Arabidopsis* shoot vascular bundles. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. (2009). 106: 13630–13635.
- Ilegems M., Vr Douet, Meylan-Bettex M., Uyttewaal M., Brand L., Bowman J.L., Stieger P.A. Interplay of auxin, KANADI and Class III HD-ZIP transcription factors in vascular tissue formation. *Development*. (2010). 137: 975–984.
- Ingram G.C. Signalling during epidermal development. *Biochemical Society Transactions*. (2007). 35: 156–160.
- Irish V.F., Sussex I.M. A fate map of the *Arabidopsis* embryonic shoot apical meristem. *Development*. (1992). 115: 745–753.
- Ishida K., Yamashino T., Yokoyama A., Mizuno T. Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. (2008). 49: 47–57.
- Israelsson M., Sundberg B., Moritz T. Tissue-specific localization of gibberellins and expression of gibberellin-biosynthetic and signaling genes in wood-forming tissues in aspen. *The Plant Journal*. (2005). 44:494–504.

- Ito Y., Nakanomyo I., Motose H., Iwamoto K., Sawa S., Dohmae N., Fukuda H. Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. *Science*. (2006). 313:842-845.
- Jasinski S., Piazza P., Craft J., Hay A., Woolley L., Rieu I., Phillips A., Hedden P., Tsiantis M. *KNOX* action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Current Biology*. (2005). 15: 1560–1565.
- Jenik P.D., Gillmor C.S., Lukowitz W. Embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Cell and Development Biology*. (2007). 23: 207–236.
- Jeong S., Palmer T.M., Lukowitz W. The RWP-RK factor GROUNDED promotes embryonic polarity by facilitating YODA MAP kinase signaling. *Current Biology*. (2011). 21: 1268–1276.
- Jeong S., Trotochaud A.E., Clark S.E. The *Arabidopsis* *CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *Plant Cell*. (1999). 11: 1925-1934.
- Johnson K.L., Degnan K.A., Walker J.R., Ingram G.C. AtDEK1 is essential for specification of embryonic epidermal cell fate. *Plant Journal*. (2005). 44: 114–127.
- Johnson K.L., Faulkner C., Jeffree C.E., Ingram G.C. The phytocalpain defective kernel 1 is a novel *Arabidopsis* growth regulator whose activity is regulated by proteolytic processing. *Plant Cell*. (2008). 20: 2619–2630.
- Jun J.H., Flume E., Fletcher J.C. The *CLE* family of plant polypeptide signaling molecules. *Cell and Molecular Life Science*. (2008). 65: 743–755.
- Jung J.H., Park C.M. MIR166/165 genes exhibit dynamic expression patterns in regulating shoot apical meristem and floral development in *Arabidopsis*. *Planta*. (2007). 225: 1327–1338.
- Jurkuta R.J., Kaplinsky N.J., Spindel J.E., Barton M.K. Partitioning of the apical domain of the *Arabidopsis* embryo requires the BOBBER1 NudC domain protein. *Plant Cell*. (2009). 21: 1957–1971.
- Kaplan D.R., Cooke T.J. Fundamental concepts in the embryogenesis of dicotyledons: a morphological interpretation of embryo mutants. *Plant Cell*. (1997). 9: 1903–1919.

- Kepinski S., Leyser O.** The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*. (2005). 435: 446–451.
- Kayes J.M., Clark S.E.** CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Development*. (1998). 125: 3843-3851.
- Kermode A.R., Finch-Savage B.E.** Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. En: *Desiccation and survival in plants: drying without dying*. (2002). Black M., Prithchard H.W. (eds.) doi: 10.1079/9780851885342.0000.
- Kerstetter R.A., Laudencia-Chinguanco D., Smith L.G., Hake S.C.** Loss of function mutations in the maize homeobox gene, *knotted1*, are defective in shoot meristem maintenance. *Development*. (1997). 124: 3045–3054.
- Kieffer M., Stern Y., Cook H., Clerici E., Maulbetsch C., Laux T., Davies B.** Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *Plant Cell*. (2006). 18: 560–573.
- Kim T.W., Guan S., Sun Y., Deng Z., Tang W., Shang J.X., Sun Y., Burlingame A.L., Wang Z.Y.** Brassinosteroid signal transduction from cell surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nature Cell Biology*. (2010). 11: 1254–1260.
- Kim Y.-S., Kim S.G., Lee M., Lee I., Park H.-Y., Seo P.J., Jung J.-H., Kwon E.J., Suh S., Paek K. H.** HDZIP III activity is modulated by competitive inhibitors via a feedback loop in *Arabidopsis* shoot apical meristem development. *Plant Cell*. (2008). 20: 920–933.
- Kimata Y., Higaki T., Kawashima T., Kurihara D., Satof Y., Yamada T., Hasezawa S., Berger F., Higashiyama T., Ueda M.** Cytoskeleton dynamics control the first asymmetric cell division in *Arabidopsis* zygote. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. (2016). 113(49): 14157–14162. /doi/10.1073/pnas.1613979113.
- Kimb I. Kobayashi K., Cho E., Zambryski P.C.** Subdomains for transport via plasmodesmata corresponding to the apical-basal axis are established during *Arabidopsis* embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. (2005). 102: 11945-11950.

- Kim C.Y., Liu L., Kim J.Y.** Signaling network for stem cell maintenance and functioning in *Arabidopsis* shoot apical meristem. *Journal of Plant Biology*. (2007). 50: 274–281.
- Kinoshita A., Betsuyaku S., Osakabe Y., Mizuno S., Nagawa S., Stahl Y., et. al.** RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in *Arabidopsis*. *Development*. (2010). 137: 3911–3920.
- Koizumi K., Naramoto S., Sawa S., Yahara N., Ueda T., Nakano A., Sugiyama M., Fukuda H.** VAN3 ARF-GAP-mediated vesicle transport is involved in leaf vascular network formation. *Development*. (2005). 132: 1699–1711.
- Kondo Y., Ito T., Nakagami H., Hirakawa Y., Saito M., Tamaki T., Shirasu K., Fukuda H.** Plant GSK3 proteins regulate xylem cell differentiation downstream of TDIF-TDR signalling. *Nature Communications*. (2014). 5:3504.
- Kozieradzka-Kiszkurno M., Plachno B.J.** Are there symplastic connections between the endosperm and embryo in some angiosperm? A lesson from the Crassulaceae family. *Protoplasma*. (2012). 249: 1081–1089.
- Kubo M., Udagawa M., Nishikubo N., Horiguchi G., Yamaguchi M., Ito J., Mimura T., Fukuda H., Demura T.** Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes and Development*. (2005). 19: 1855–1860.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J.** Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin activating enzyme. *Nature*. (2007). 455: 652–656.
- Kwon C.S., Chen C.B., Wagner D.** *WUSCHEL* is a primary target for transcriptional regulation by *SPLAYED* in dynamic control of stem cell fate in *Arabidopsis*. *Genes and Development*. (2005). 19: 992–1003.
- Kwon C.S., Hibara K., Pfluger J., Bezhani S., Metha H., Aida M., Tasaka M., Wagner D.** A role for chromatin remodeling in regulation of *CUC* gene expression in the *Arabidopsis* cotyledon boundary. *Development*. (2006). 133: 3223–3230.
- Lampard G.R., Lukowitz W., Ellis B.E., Bergmann D.** Novel and expanded roles for MAPK signaling in *Arabidopsis* stomatal cell fate revealed by cell type-specific manipulations. *The Plant Cell*. (2009). 21: 3506–3517.

- Lau S., Ehrismann J.S., Schlereth A., Takada S., Mayer U., Jurgens G. Cell-cell communication in *Arabidopsis* early embryogenesis. *European Journal of Cell Biology*. (2010). 89: 225–230.
- Laufs P., Grandjean O., Jonak C., Kieu K., Traas J. Cellular parameters of the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. (1998). 10: 1375–1389
- Laufs P., Peaucelle A., Morin H., Traas J. MicroRNA regulation of the *CUC* genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Development*. (2004). 131: 4311–4322.
- Laux T., Mayer K.F.X., Berger J., Jurgens G. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*. (1996). 122: 87–96.
- Laux T., Würschum T., Breuninger H. Genetic regulation of embryonic pattern formation. *Plant Cell*. (2004). 16: 190–202.
- Leibfried A., To J.P.C., Busch W., Stehling S., Kehle A., Demar M., Kieber J.J., Lohmann J.U. *WUSCHEL* controls meristem function by direct regulation of cytokinin inducible response regulators. *Nature*. (2005). 438: 1172–1175
- Lee S., Lee S., Yang K.Y., Kim Y.M., Park S.Y., Kim S.Y., Soh M.S. Overexpression of *PRE1* and its homologous genes activates gibberellin-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. (2006). 47: 591–600
- Lenhard M., Laux T. Shoot meristem formation and maintenance. *Current Opinion in Plant Biology*. (1999). 2: 44–50.
- Leprince O., Pellizzaro A., Berri S., Buitink J. Late seed maturation: drying without dying. *Journal Experimental Botany*. (2016) doi: 10.1093/jxp/erw363.
- Leersten N.R. Flowering plant embryology. En: Ames I.A. (ed). *Blackwell Publishing*. (2004). 172–175.
- Lewis T.S., Shapiro P.S., Ahn N.G. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in Cancer Research NCBI*. (1998). 74: 49–139.
- Lid S.E., Gruis D., Jung R., Lorentzen J.A., Ananiev E., Chamberlin M., Niu X., Meeley R., Nichols S., Olsen O.A. The *defective kernel 1 (dek1)* gene requi-

red for aleurone cell development in the endosperm of maize grains encodes a membrane protein of the calpain gene superfamily. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. (2002). 99: 5460–5465.

Lid S.E., Olsen L., Nestestog R., Aukerman M., Brown R.C., Lemmon B., Mucha M., Opsahl-Sorteberg H.G., Olsen O.A. Mutation in the *Arabidopsis thaliana* *DEK1* calpain gene perturbs endosperm and embryo development while over expression affects organ globally. *Planta*. (2005). 221: 339–351.

Liscum E., Reed J.W. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Molecular Biology*. (2002). 49: 387–400.

Liu S.L., Adams K.L. Dramatic change in function and expression pattern of a gene duplicated by polyploidy created a paternal effect gene in the *Brassicaceae*. *Molecular Biology and Evolution*. (2010). 27: 2817–2828.

Liu Z., Karmarkar V. Groucho/Tup1 family co-repressors in plant development. *Trends in Plant Science*. (2008). 13: 137–144.

Liu C.-M., Xu Z.-H., Chua N.-H. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early embryogenesis. *Plant Cell*. (1993). 5: 621–630.

Lokerse A.S., Weijers D. Auxin enters the matrix—assembly of response machineries for specific outputs. *Current Opinion in Plant Biology*. (2009). 12: 52–526.

Long J.A., Barton M.K. The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development*. (1998). 125: 3027–3035.

Long J.A., Moan E.I., Medford J.I., Barton M.K. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature*. (1996). 379: 66–69.

Long J.A., Woody S., Poethig R.S., Meyerowitz E.M., Barton K. Transformation of shoots into roots in *Arabidopsis* embryos mutant at the *TOPLESS* locus. *Development*. (2002). 129, 2797–2806.

Long J.A., Ohno C., Smith Z.R., Meyerowitz E.M. *TOPLESS* regulates apical embryonic fate in *Arabidopsis*. *Science*. (2006). 312: 1520–1523.

- Lu P., Porat R., Nadeau J.A., O'Neil S.D. Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *Plant Cell*. (1996). 8: 2155–2168.
- Lukowitz W., Roeder A., Parmenter D., Somerville C. A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell*. (2004). 116: 109–119.
- Lyndon R.F. The Shoot Apical Meristem: Its Growth and Development. Cambridge University Press, Cambridge. (1998).
- Madhani H.D., Fink G.R. The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Trends in Genetics*. (1998). 14: 151-155.
- Mähönen A.P., Bishopp A., Higuchi M., Nieminen K.M., Kinoshita K., Tormakangas K., Ikeda Y., Oka A., Kakimoto T., Helariutta Y. Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science*. (2006). 311: 94–98
- Mähönen A.P., Bonke M., Kauppinen L., Riikonen M., Benfey P.N., Helariutta Y. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes and Development*. (2000).14: 2938–2943.
- Mallory A.C., Dugas D.V., Bartel D.P., Bartel B. MicroRNA regulation of NAC domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Current Biology*. (2004). 14: 1035–1046.
- Mansfield S.G., Briarty L.G. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Canadian Journal Botany*. (1991). 69: 461–476.
- Matsumoto N., Okada K. A homeobox gene, *PRESSED FLOWER*, regulates lateral axis-dependent development of *Arabidopsis* flowers. *Genes and Development*. (2001). 15: 3355–3364.
- Matsumoto-Kitano M., Kusumoto T., Tarkowski P., Kinoshita-Tsujimura K., Václavíková K., Miyawaki K., Kakimoto T. Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. (2008). 105: 20027–20031.

- Mauriat M., Moritz T.** Analyses of GA20ox- and GID1-overexpressing aspen suggest that gibberellins play two distinct roles in wood formation. *The Plant Journal*. (2009). 58: 989–1003.
- Mayer U., Buettner G., Jürgens G.** Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: Studies on the role of the gnom gene. *Development*. (1993). 117: 149–162.
- Mayer K.F., Schoof H., Haecker A., Lenhard M., Jurgens G., Laux T.** Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*. (1998). 95: 805–815.
- McConnell J.R., Emery J., Eshed Y., Bao N., Bowman J., Barton M.K.** Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots. *Nature*. (2001). 411: 709–713.
- Meyerowitz, E.M.** Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell*. (1997). 88: 299–308.
- Milhinhos A., Prestele J., Bollhoner B., Matos A., Vera-Sirera F., Rambla J.L., Ljung K., Carbonell J., Blazquez M.A., Tuominen H. et al.** Thermospermine levels are controlled by an auxin-dependent feedback loop mechanism in *Populus* xylem. *The Plant Journal*. (2013). 75:685-698.
- Miwa H., Betsuyaku S., Iwamoto K., Kinoshita A., Fukuda H., Sawa S.** The receptor-like kinase SOL2 mediates CLE signaling in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*. (2008). 49: 1752-1757.
- Miwa H., Kinoshita A., Fukuda H., Sawa S.** Plant meristems: CLAVATA3/ESR-related signalling in the shoot apical meristem and the root apical meristem. *Journal of Plant Research*. (2009). 122: 31–39.
- Möller B., Weijers D.** Auxin Control of Embryo Patterning. Cold Spring Harb Perspect. NBCI Biology (2009). 1:a001545. doi: 10.1101/ cshperspect.a001545.
- Motose H., Sugiyama M., Fukuda H.** A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development. *Nature*. (2004). 429: 873–878.
- Müller R., Bleckmann A., Simon R.** The receptor kinase CORYNE of *Arabidopsis* transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *Plant Cell*. (2008). 20: 934–946.

- Müller B., Sheen J. Advances in cytokinin signaling. *Science*. (2007). 318: 68–69.
- Müller B., Sheen J. Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*. (2008). 453: 1094–1098.
- Nakamura A., Fujioka S., Sunohara H., Kamiya N., Hong Z., Inukai Y., Miura K., Takatsuto S., Yoshida S., Ueguchi-Tanaka M., Hasegawa Y., Kitano H., Matsuoka M. The role of *OsBRI1* and its homologous genes, *OsBRL1* and *OsBRL3*, in rice. *Plant Physiology*. (2006). 140: 580–590.
- Nawy T., Bayer M., Mravec J., Friml J., Birnbaum K.D., Lukowitz W. The GATA factor HANABA TARANU is required to position the proembryo boundary in the early *Arabidopsis* embryo. *Developmental Cell*. (2010). 19:103–113.
- Nilsson J., Karlberg A., Antti H., Lopez-Vernaza M., Mellerowicz E., Perrot-Rechenmann C., Sandberg G., Bhalerao R.P. Dissecting the molecular basis of the regulation of wood formation by auxin in hybrid aspen. *Plant Cell*. (2008). 20: 843–855.
- Nodine M.D., Bartel D.P. MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes and Development*. (2010). 24:2678–2692.
- Nodine M.D., Tax F.E. Two receptor-like kinases required together for the establishment of *Arabidopsis* cotyledon primordia. *Developmental Biology*. (2008). 314: 161–170.
- Nodine M.D., Yadegari F., Tax F.E. RPK1 and TOAD2 are two receptor-like kinases redundantly required for *Arabidopsis* embryonic pattern formation. *Developmental Cell*. (2007). 943–956.
- Ochando I., Jover-Gill S., Ripoll J.J., Candela H., Vera A., Ponce M.R., Martínez-Laborda A., Micol J.L. Mutations in the microRNA complementary site of the *INCURVATA4* gene perturb meristem function and adaxialize lateral organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. (2006). 141: 607–619.
- Ogawa M., Shinohara H., Sakagami Y., Matsubayashi Y. *Arabidopsis* CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science*. (2008). 319: 294.

- Ohashi-Ito K., Demura T., Fukuda H. Promotion of transcript accumulation of novel zinnia immature xylem-specific *HD-Zip III* homeobox genes by brassinosteroids. *Plant and Cell Physiology*. (2002). 43: 1146–1153.
- Ohashi-Ito K, Matsukawa M, Fukuda H. An atypical bHLH transcription factor regulates early xylem development downstream of auxin. *Plant and Cell Physiology*. (2013b). 54:398-405.
- Ohashi-Ito K, Oguchi M, Kojima M, Sakakibara H, Fukuda H. Auxin-associated initiation of vascular cell differentiation by *LONESOME HIGHWAY*. *Development*. (2013a). 140:765-769.
- Ohyama K., Shinohara H., Ogawa-Ohnishi M., Matsubayashi Y. A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chemical Biology*. (2009). 5: 578–580.
- Olson A.N., Ernst H.A., Leggio L.L., Skriver K. NAC transcription factors, structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science*. (2005). 10: 79–87.
- Pagnussat G.C., Alandete-Saez M., Bowman J.L., Sundaresan V. Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Science*. (2009). 324: 1684–1689.
- Peaucelle A., Morin H., Traas J., Laufs P. Plants expressing a miR164-resistant *CUC2* gene reveal the importance of post-meristematic maintenance of phyllotaxy in *Arabidopsis*. *Development*. (2007). 134: 1045–1050.
- Pedmale U.V., Liscum E. Regulation of phototropic signaling in *Arabidopsis* via phosphorylation state changes in the phototropin 1-interacting protein NPH3. *The Journal of Biological Chemistry*. (2007). 282: 19992–20001.
- Penfield S. Temperature perception and signal transduction in plants. *New Phytologist*. (2008) 179: 615–628. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02478.x
- Perez D.E., Hoyer J.S., Johnson A.I., Moody Z.R., Lopez J., Kaplinsky N.J. BO-BBER1 is a non-canonical *Arabidopsis* small heat shock protein required for both development and thermotolerance. *Plant Physiology*. (2009). 151: 214–252.

- Petersson S.V., Johansson A.I., Kowalczyk M., Makoveychuk A., Wang J.Y., Moritz T., Grebe M., Benfey P.N., Sandberg G., Ljung K. An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *The Plant Cell*. (2009). 21: 1659–1668.
- Petrasek J., Friml J. Auxin transport routes in plant development. *Development*. (2009). 136: 2675–2688.
- Ploense S.E., Wu M.F., Nagpal P., Reed J.W. A gain-of-function mutation in IAA18 alters *Arabidopsis* embryonic apical patterning. *Development*. (2009). 136: 1509–1517.
- Preston J.C., Hileman L.C. Functional evolution in the plant *SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* gene family. *Frontiers in Plant Science*. (2013). 4: 80. doi: 10.3389/fpls.2013.00080.
- Prigge M.J., Otsuga D., Alonso J.M., Ecker J.R., Drews G.N., Clark S.E. *Class III homeodomain-leucine zipper* gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *The Plant Cell*. (2005). 17: 61–76.
- Przemeck G.K.H., Mattsson J., Hardtke C.S., Sung Z.R., Berleth T. Studies on the role of the *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* in vascular development and plant cell axialization. *Planta*. (1996). 200: 229–237.
- Rademacher E.H., Lokerse A.S., Schlereth A., Llavata-Peris C.I., Bayer M., Kientz M., Freire Rios A., Borst J.W., Lukowitz W., Jurgens G. *et. al.* Different auxin response machineries control distinct cell fates in the early plant embryo. *Developmental Cell*. (2012). 22: 211–222.
- Rademacher E.H., Moller B., Lokerse A.S., Llavata-Peris C.I., van den Berg W., Weijers D. A cellular expression map of the *Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family. *Plant Journal*. (2011). 68: 597–606.
- Reddy G.V. Live-imaging stem-cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Current Opinion in Plant Biology*. (2008). 11: 88–93.
- Reddy G.V., Meyerowitz E.M. Stem-cell homeostasis and growth dynamics can be uncoupled in the *Arabidopsis* shoot apex. *Science*. (2005). 310: 663–667.

- Reddy G.V., Heisler M.G., Ehrhardt D.W., Meyerowitz E.M.** Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Development*. (2004). 131: 4225–4237.
- Reed J.W.** Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*. (2001). 6: 420–425.
- Reidt W., Wurz R., Wanieck K., Chu H.H., Puchta H.** A homologue of the breast cancer associated gene *BARD1* is involved in DNA repair in plants. *The EMBO Journal*. (2006). 25: 4326–4337.
- Reinhardt D.** Vascular patterning: more than just auxin? *Current Biology*. (2003). 13: R485–R487.
- Roberts E.H.** Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*. (1973). 1: 499–514.
- Rubery P.H., Sheldrake A.R.** Effect of pH and surface change on cell uptake of auxin. *Nature: New Biology*. (1973). 244: 285–288.
- Rutjens B., Bao D., van Eck-Stouten E., Brand M., Smeekens S., Proveniers M.** Shoot apical meristem function in *Arabidopsis* requires the combined activities of three BEL1-like homeodomain proteins. *The Plant Journal*. (2009). 58: 641–654.
- Sablowski R.** The dynamic plant stem cell niches. *Current Opinion in Plant Biology*. (2007). 10: 639–644.
- Sablowski R.** Plant stem cell niches: from signalling to execution. *Current Opinion in Plant Biology*. (2011). 14: 4–9.
- Sager R., Lee J.Y.** Plasmodesmata in integrated cell signalling: insights from development and environmental signals and stresses. *Journal Experimental Botany*. (2014). 65(22): 6337–6358. doi: 10.1093/jxp/eru365.
- Saiga S., Furumizu C., Yokoyama R., Kurata T., Sato S., Kato T., Tabata S., Suzuki M., Komeda Y.** The *Arabidopsis* *OBERON1* and *OBERON2* genes encode plant homeodomain finger proteins and are required for apical meristem maintenance. *Development*. (2008). 135: 1751–1759.

- Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra H., Laux T. Conserved factors regulate signaling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature*. (2007). 446: 811–814.
- Sawa S., Kinoshita A., Betsuyaku S., Fukuda H. A large family of genes that share homology with *CLE* domain in *Arabidopsis* and rice. *Plant Signal and Behavior*. (2008). 3: 337–339.
- Scarpella E., Marcos D., Friml J.A., Berleth T. Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes Development*. (2006). 20: 1015–1027.
- Schauser L., Roussis A., Stiller J., Stougaard J. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature*. (1999). 402: 191–195.
- Schauser L., Wieloch W., Stougaard J. Evolution of NIN-like proteins in *Arabidopsis*, rice, and *Lotus japonicus*. *Journal of Molecular Evolution*. (2005). 60: 229–237.
- Scheres B. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. (2007). 8: 345–354.
- Schlereth A., Moller B., Liu W., Kientz M., Flipse J., Rademacher E.H., Schmid M., Jurgens G., Weijers D. *MONOPTEROS* controls embryonic root initiation by regulating a mobile transcription factor. *Nature*. (2010). 464:913–916.
- Scheres B., Wolkenfelt H., Willemsen V., Terlouw M., Lawson E., Dean C., Weisbeek P. Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development*. (1994). 120: 2475–2487.
- Schoof H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K.F.X., Jurgens G., Laux T. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell*. (2000). 100: 635–644.
- Schrader J., Nilsson J., Mellerowicz E., Berglund A., Nilsson P., Hertzberg M., Sandberg G. A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar identifies potential regulators of cambial stem cell identity. *Plant Cell*. (2004). 16: 2278–2292.

- Schwartz B., Yeung E., Meinke D.** Disruption of morphogenesis and transformation of the suspensor in abnormal suspensor mutants of *Arabidopsis*. *Development*. (1994). 120: 3235–3245.
- Scott R.J., Spielman M., Bailey J., Dickinson H.** Parent of origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. (1998). 125: 3329–3341.
- Sehr E.M., Agusti J., Lehner R., Farmer E.E., Schwarz M., Greb T.** Analysis of secondary growth in the Arabidopsis shoot reveals a positive role of jasmonate signalling in cambium formation. *The Plant Journal*. (2010). 63: 811–822.
- Sieber P., Wellmer F., Gheyselinck J., Riechmann J.L., Meyerowitz E.M.** Redundancy and specialization among plant microRNAs, role of the MIR164 family in developmental robustness. *Development*. (2007). 134: 1051–1060.
- Sieburth L.E., Muday G.K., King E.J., Benton G., Kim S., Metcalf K.E., Meyers L., Seamen E., Van Norman J.M.** *SCARFACE* encodes an ARF-GAP that is required for normal auxin efflux and vein patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. (2006). 18: 1396–1411.
- Simpson G.G., Dean C.** Environmental-dependent acceleration of a developmental switch: the floral transition. *Science Signaling*. (2000). 18: pe1. doi: 10.1126/stke.2000.18.pe1
- Sinha N.R., Williams R., Hake S.C.** Overexpression of the maize homeobox gene, *KNOTTED-1*, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes and Development*. (1993). 7: 787–795.
- Skoog F., Miller C.O.** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society of Experimental Biology*. (1957). 54: 118–130.
- Smith Z.A., Long J.A.** Control of Arabidopsis apical–basal embryo polarity by antagonistic transcription factors. *Nature*. (2010). 464: 423–426.
- Song S.K., Lee M.M., Clark S.E.** POL and PLL1 phosphatases are *CLAVATA1* signalling intermediates required for *Arabidopsis* shoot and floral stem cells. *Development*. (2006). 133: 4691–4698.
- Spradling A., Drummond-Barbosa D., Kai T.** Stem cells find their niche. *Nature*. (2001). 414: 98–104.

- Souer E., Van Houwelingen A., Kloos D., Mol J., Koes R.** The no apical meristem gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell*. (1996). 85: 159–170.
- Stadler R., Lauterbach C., Sauer N.** Cell-to-cell movement of green fluorescent protein reveals post-phloem transport in the outer integument and identifies symplastic domains in *Arabidopsis* seed and embryos. *Plant Physiology*. (2005). 139:701-712.
- Steinmann T., Geldner N., Grebe M., Mangold S., Jackson C.L., Paris S., Galweiler L., Palme K., Jürgens G.** Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science*. (1999). 286: 316–318.
- Stewart R.N., Dermen H.** Determination of number and mitotic activity of shoot apical initial cells by analysis of mericlinal chimeras. *American Journal of Botany*. (1970). 57: 816–826.
- Stone J.M., Trotochaud A.E., Walker J.C., Clark S.E.** Control of meristem development by CLAVATA1 receptor kinase and kinase-associated protein phosphatase interactions. *Plant Physiology*. (1998). 117: 1217-1225.
- Strabala T.J., O'Donnell P.J., Smit A.M., Ampomah-Dwamena C., Martin E.J., Netzler N., Nieuwenhuizen N.J., Quinn B.D., Foote H.C.C., Hudson K.R.** Gain-of-function phenotypes of many *CLAVATA3/ESR* genes, including four new family members, correlate with tandem variations in the conserved CLAVATA3/ESR domain. *Plant Physiology*. (2006). 140: 1331–1344.
- Strasser B., Alvarez M.J., Califano A., Cerdán P.D.** A complementary role for *ELF3* and *TFL1* in the regulation of flowering time by ambient temperature. *The Plant Journal*. (2009) 58: 629–640.
- Suer S., Agusti J., Sanchez P., Schwarz M., Greb T.** WOX4 imparts auxin responsiveness to cambium cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. (2011). 23: 3247–3259.
- Szemenyei H., Hannon H., Long J.A.** TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science*. (2008). 319: 1384–1386.

- Takada S., Hibara K., Ishida T., Tasaka M.** The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development*. (2001). 128: 1127–1135
- Tanaka H., Onouchi H., Kondo M., Hara-Nishimura I., Nishimura M., Machida C., Machida Y.** A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. *Development*. (2001). 128: 4681–4689.
- Tanaka H., Watanabe M., Sasabe M., Hiroe T., Tanaka T., Tsukaya H., Ikezaki M., Machida C., Machida Y.** Novel receptor-like kinase ALE2 controls shoot development by specifying epidermis in *Arabidopsis*. *Development*. (2007). 134: 1643–1652.
- Tang G., Reinhart B.J., Bartel D.** A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes and Development*. (2008). 17: 49–63.
- Thines B., Katsir L., Melotto M., Niu Y., Mandaokar A., Liu G., Nomura K., He S.Y., Howe G.A., Browse J.** JAZ repressor proteins are targets of the SCF-COI1 complex during jasmonate signalling. *Nature*. (2007). 448: 661–665.
- Tiwari S.B., Hagen G., Guilfoyle T.** The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell*. (2003). 15: 533–543.
- Tiwari S.B., Wang X.J., Hagen G., Guilfoyle T.J.** AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell*. (2001). 13:2809–2822.
- Tooke F., Battey N.** Models of shoot apical meristem function. *New Phytologist*. (2003). 159: 37–52.
- Trembl B.S., Winderl S., Radykewicz R., Herz M., Schweizer G., Hutzler P., Glawischnig E., Ruiz R.A.T.** The gene *ENHANCER OF PINOID* controls cotyledon development in the *Arabidopsis* embryo. *Development*. (2005). 132: 4063–4074.
- Trotochaud A.E., Hao T., Wu G., Yang Z., Clark S.E.** The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. *Plant Cell*. (1999). 11: 393–406.

- Tsuwamoto R, Fukuoka H, Takahata Y.** *GASSHO1* and *GASSHO2* encoding a putative leucine-rich repeat transmembrane-type receptor kinase are essential for the normal development of the epidermal surface in *Arabidopsis* embryos. *Plant Journal*. (2008). 54: 30–42.
- Truernit E., Bauby H., Belcram K., Barthelemy J., Palauqui J.C.** OCTOPUS, a polarly localised membrane-associated protein, regulates phloem differentiation entry in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. (2012). 139: 1306–1315.
- Tucker M.R., Laux T.** Connecting the paths in plant stem cell regulation. *Trends in Cell Biology*. (2007). 17: 403–410.
- Tuominen H., Puech L., Fink S., Sundberg B.** A radial concentration gradient of indole-3-acetic acid is related to secondary xylem development in hybrid aspen. *Plant Physiology*. (1997). 115: 577–585.
- Uchida N., Lee J.S., Horst R.J., Lai H.H., Kajita R., Kakimoto T., Tasaka M., Torii K.U.** Regulation of inflorescence architecture by intertissue layer ligand–receptor communication between endodermis and phloem. *Proceedings of National Academy of Science USA*. (2012). 109:6337–6342.
- Uchida N., Tasaka M.** Regulation of plant vascular stem cells by endodermis-derived EPFL-family peptide hormones and phloem-expressed ERECTA-family receptor kinases. *Journal of Experimental Botany*. (2013). 64:5335–5343.
- Ueda M., Zhang Z., Laux T.** Transcriptional activation of *Arabidopsis* axis patterning genes *WOX8/9* links zygote polarity to embryo development. *Developmental Cell*. (2011). 20(2):264–70.
- Vroemen C.W., Mordhorst A.P., Albrecht C., Kwssitaal M.A., deVries S.C.** The *CUPSHAPED COTYLEDON3* gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. (2003). 15, 1563–1577.
- Wenzel C.L., Schuetz M., Yu Q., Mattsson J.** Dynamics of *MONOPTEROS* and *PIN-FORMED1* expression during leaf vein pattern formation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. (2007).49: 387–398.

- Waki T., Hiki T., Watanabe R., Hashimoto T., Nakajima K. The *Arabidopsis* RWP-RK protein RKD4 triggers gene expression and pattern formation in early embryogenesis. *Current Biology*. (2011). 21: 1277–1281.
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J.C., Zhang S. Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. (2007). 19: 63–73.
- Wang H., Zhu Y., Fujioka S., Asami T., Li J., Li J. Regulation of *Arabidopsis* brassinosteroid signaling by atypical basic helix–loop–helix proteins. *The Plant Cell*. (2009). 21: 3781–3791.
- Weigel D., Jürgens G. Stem cells that make stems. *Nature*. (2002). 415: 751–754.
- Weijers D., Schlereth A., Ehrismann J.S., Schwank G., Kientz M., Jürgens G. Auxin triggers transient local signaling for cell specification in *Arabidopsis* embryogenesis. *Developmental Cell*. (2006). 10: 265–270.
- Weijers D., Wagner D. Transcriptional response to auxin hormone. *Annual Review of Plant Biology*. (2016). 67:539-574.
- Wenkel S., Emery J., Hou B.H., Evans M.M.S., Barton M.K. A feedback regulatory module formed by *LITTLE ZIPPER* and *HD-ZIPIII* genes. *Plant Cell*. (2007). 19: 3379–3390.
- Wenzel C.L., Schuetz M., Yu Q., Mattsson J. Dynamics of *MONOPTEROS* and *PIN-FORMED1* expression during leaf vein pattern formation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. (2007) 49: 387–398.
- Whitford R., Fernandez A., De Groodt R., Ortega E., Hilson P. Plant CLE peptides from two distinct functional classes synergistically induce division of vascular cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. (2008). 105: 18625–18630.
- Williams L., Fletcher J.C. Stem cell regulation in the *Arabidopsis* shoot apical meristem. *Current Opinion in Plant Biology*. (2005). 8: 582–586.
- Williams L., Griggs S.P., Xie M., Christensen S., Fletcher J.C. Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by mi-

- croRNA miR166g and its *AtHD-ZIP* target genes. *Development*. (2005). 132: 3657–3668.
- Williams R.W., Wilson J.M., Meyerowitz E.M.** A possible role for kinase-associated protein phosphatase in the *Arabidopsis CLAVATA1* signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. (1997). 94: 10467–10472.
- Wu X., Chory J., Weigel D.** Combinations of *WOX* activities regulate tissue proliferation during *Arabidopsis* embryonic development. *Developmental Biology*. (2007). 309: 306–316.
- Wu X.L., Dabi T., Weigel D.** Requirement of homeobox gene *STIMPY/WOX9* for *Arabidopsis* meristem growth and maintenance. *Current Biology*. (2005). 15: 436–440.
- Yamamoto R., Fujioka S., Demura T., Takatsuto S., Yoshida S., Fukuda H.** Brassinosteroid levels increase drastically prior to morphogenesis of tracheary elements. *Plant Physiology*. (2001). 125: 556–563.
- Yamamoto R., Fujioka S., Iwamoto K., Demura T., Takatsuto S., Yoshida S., Fukuda H.** Co-regulation of brassinosteroid biosynthesis-related genes during xylem cell differentiation. *Plant and Cell Physiology*. (2007). 48: 74–83.
- Yanai O., Shani E., Dolezal K., Tarkowski P., Sablowski R., Sandberg G., Samach A., Ori N.** *Arabidopsis* KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Current Biology*. (2005). 15: 1566–1571.
- Yang S., Johnston N., Talideh E., Mitchell S., Jeffree C., Goodrich J., Ingram G.** The endosperm-specific *ZHOUP1* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates endosperm breakdown and embryonic epidermal development. *Development*. (2008). 135: 3501–3509.
- Yokoyama A., Yamashino T., Amano Y-I., Tajima Y., Imamura A., Sakakibara H., Mizuno T.** Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. (2007). 48: 84–96.

- Yoshida S., Barbier de Reuille P., Lane B., Bassel G.W., Prusinkiewicz P., Smith R.S., Weijers D. Genetic control of plant development by overriding a geometric division rule. *Developmental Cell*. (2014). 29:75-87.
- Yu L.P., Miller A.K., Clark S.E. *POLTERGEIST* encodes a protein phosphatase 2C that regulates *CLAVATA* pathways controlling stem cell identity at *Arabidopsis* shoot and flower meristems. *Current Biology*. (2003). 13: 179-188.
- Yu L.P., Simon E.J., Trotochaud A.E., Clark S.E. *POLTERGEIST* functions to regulate meristem development downstream of the *CLAVATA* loci. *Development*. (2000). 127: 1661-1670.
- Zhang L.Y., Bai M.Y., Wu J., *et al.* Antagonistic HLH/bHLH transcription factors mediate brassinosteroid regulation of cell elongation and plant development in rice and *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. (2009). 21: 3767-3780.
- Zhang Z., Laux T. The asymmetric division of the *Arabidopsis* zygote: from cell polarity to an embryo axis. *Sexual Plant Reproduction*. (2011). 24: 161-169.
- Zhang X., Zhou Y., Ding L., Wu Z., Liu R., Meyerowitz E.M. Transcription repressor HANABA TARANU controls flower development by integrating the actions of multiple hormones, floral organ specification genes, and GATA3 family genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. (2013). 25: 83-101.
- Zhao Z., Andersen S.U., Ljung K., Dolezal K., Miotk A., Schultheiss S.J., Lohmann J.U. Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature*. (2010). 465: 1089-1093.

Aspectos moleculares del desarrollo de las angiospermas:
Embriogénesis y origen de los sistemas tisulares
se terminó de imprimir en mayo de 2018,
en los talleres de DocuMaster, Av. Coyoacán 1450,
Col. Del Valle, Benito Juárez, C.P. 03220
La edición consta de 200 ejemplares
más sobrantes para reposición.

Formación:
Citlali Ordaz Fernández



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina
Del. Iztapalapa, C. P. 09340, México, D.F.
Tel. (01) 58 04 46 00