

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal

Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE)

FACULTAD DE BIOLOGÍA



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE



cialle

INSTITUTO HISPANO-LUSO DE
INVESTIGACIONES AGRARIAS

PERIANTHIA is a nitric oxide molecular player in

***Arabidopsis thaliana* root stem cell niche**

PhD Thesis, International Doctorate Mention

MARÍA GUADALUPE FERNÁNDEZ ESPINOSA

SALAMANCA, 2019

FINANCIACIÓN Y ORGANISMOS IMPLICADOS

Durante el desarrollo de mi Tesis Doctoral he disfrutado una ayuda para la financiación de personal investigador en formación (EDU/1006/2015) otorgada por la Conserjería de Educación de la Junta de Castilla y León.

Los experimentos realizados durante la presente Tesis Doctoral se han llevado a cabo en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección del Dr. Óscar Lorenzo Sánchez. Los proyectos de investigación que han permitido financiar este trabajo se exponen a continuación:

“Impacts of Environmental Conditions on Seed Quality”. ERC.KBBE.2012.1.1-01. “EcoSeed-311840”. IP: Dr. Óscar Lorenzo Sánchez. 2013-2016.

“Explotación de nuevas funciones biotecnológicas de la señalización del óxido nítrico (NO) en el desarrollo de las plantas”. MINECO (BIO2014-57107-R). IP: Dr. Óscar Lorenzo Sánchez. 2015-2017.

“Potencial biotecnológico de la señalización del óxido nítrico (NO) en la germinación de semillas y las respuestas a estrés”. Junta de Castilla y León UIC 152 (SA093U16). IP: Dr. Óscar Lorenzo Sánchez. 2016-2018.

“Caracterización del papel del óxido nítrico (NO) en la acumulación de los ácidos grasos y la tolerancia al frío en semillas”. Fundación

Memoria de D. Samuel Solórzano Barruso (FS/12-2017). IP: Dra. María Inmaculada Sánchez Vicente. 2018.

“Descifrado de la señalización molecular del óxido nítrico (NO) en el desarrollo y la biotecnología de plantas”. MINECO (BIO2017-85758-R). IP: Dr. Óscar Lorenzo Sánchez. 2018-2020.

“Impacto biotecnológico del gasotransmisor óxido nítrico (NO) en el desarrollo y las respuestas a estrés de las plantas”. Junta de Castilla y León UIC 152 (SA313P18). IP: Dr. Óscar Lorenzo Sánchez. 2019-2021.

ABBREVIATIONS/ABREVIATURAS

ABA: Abscisic acid / Ácido abscísico

AG: AGAMOUS

ASC: Ascorbic acid/Ácido ascórbico

AUX: Auxins/Auxinas

BiFC: Bimolecular fluorescence complementation/
Complementación bimolecular fluorescente

BOP: BLADE ON PETIOLE

bp: Base pair/Par de bases

BR: Brassinosteroids/Brasinosteroides

BRAVO: BRASSINOSTEROIDS AT VASCULAR AND ORGANIZING
CENTER

bZIP: Basic leucine zipper/Cremallera de leucina básica

cDNA/ADNc: Complementary DNA/ADN complementario

CDS: Coding sequence/Secuencia codificante

CK: Cytokinin/Citoquinina

cm: Centimeter/Centímetro

CL: Columella layer/Capa de células de la columela

cPTIO: 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3
oxide/2-(4-Carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxil-3 óxido

CSC: Columella stem cell/Célula madre de la columela

CTCF: Corrected total cell fluorescence/ Fluorescencia total
corregida

CUE1: Chlorophyll a/b binding protein UnderExpressed 1

CYCD: D-type cyclin/Ciclina tipo D

Cys: Cysteine residue/Residuo de cisteína

DEG: Differentially expressed gene/Gen expresado diferencialmente

DHA: Dehydroascorbic acid/Ácido dehidroascórbico

DNA/ADN: Deoxyribonucleic acid/Ácido desoxirribonucleico

DTT: Dithiothreitol/Ditiotreitol

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid/ Ácido etilen-diamino tetra
acético

EMSA: Electrophoretic mobility shift assay/Ensayo de cambio de
movilidad electroforética

ET: Ethylene/Etileno

FACS: Fluorescence activated cell sorting/Clasificación celular
activada por fluorescencia

GA: Gibberelin/Giberelina

GFP: Green fluorescent protein/Proteína verde fluorescente

GO: Gene ontology/Ontología génica

GR: Glutathione reductase/Glutatión reductasa

GRX: Glutaredoxin/Glutarredoxina

GSH: Reduced glutathione/Glutatión reducido

GSNO: S-nitrosoglutathione/ S-nitrosoglutatión

GSNOR1: GSNO reductase 1

GSSG: Oxidized glutathione/Glutatión oxidado

HCl: Hydrochloric acid/ácido clorhídrico

His: Histidine/Histidina

hr: Hour/Hora

H₂O₂: Hydrogen peroxide/Peróxido de hidrógeno

JA: Jasmonic acid/Ácido jasmónico

JKD: JACKDAW

KDa: Kilodalton

LC: liquid chromatography/cromatografía líquida

min: minutes/minutos

M: Molar

mM: Milimolar

MES: 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid/Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico

MS: Murashige and Skoog medium/Medio Murashige y Skoog

MS/MS: Tandem mass spectrometry/ Espectrometría de masas en tándem

MUT: mutated/mutado

NaCl: Sodium chloride/Cloruro sódico

NAD: nicotinamide adenine dinucleotide/nicotinamida adenina dinucleotido

NADP(H): Oxidized (reduced) NAD phosphate/NAD fosfato oxidado (reducido)

NIA1/2: Nitrate reductase 1/2 / Nitrato reductasa 1/2

nm: Nanometer/Nanómetro

NO: Nitric oxide/Óxido nítrico

NOA1: NO-associated 1

NOS: Nitric oxide synthase/Óxido nítrico sintasa

NPR: NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED

NR: Nitrate reductase/Nitrato reductasa

NT: Not treated/No tratado

NTR: NAD(P)H-dependent thioredoxin reductase/ Tiorredoxina reductasa dependiente de NAD(P)H

O₂: Molecular oxygen/oxígeno molecular

O₂⁻: Superoxide radical/Radical superóxido

PAN: PERIANTHIA

PCR: Polymerase chain reaction/Reacción en cadena de la polimerasa

PHB3: PROHIBITIN 3

PIN: PIN-FORMED protein/Proteína PIN-FORMED

PLT1/2: PLETHORA 1/2

PR: PATHOGENESIS-RELATED

QC: Quiescent center/Centro quiescente

qRT-PCR: Quantitative real time-PCR/PCR cuantitativa a tiempo real

RAM: Root apical meristem/Meristemo apical de la raíz

RBR: RETINOBLASTOMA

REF: Reference/Referencia

RNA/ARN: Ribonucleic acid/Ácido ribonucleico

RNA-seq: RNA sequencing/Secuenciación de ARN

RNS: Reactive nitrogen species/Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Reactive oxygen species/Especies reactivas de oxígeno

rpm: Revolutions per minute/Revoluciones por minuto

RSCN: Root stem cell niche/Nicho de células madre de la raíz

RT: Real time/Tiempo real

s: Seconds/Segundos

SA: Salicylic acid/Ácido salicílico

SAM: Shoot apical meristem/Meristemo apical del tallo

SAR: Systemic acquired resistance/Resistencia sistémica adquirida

SCL14: SCARECROW-like 14

SCN: Stem cell niche/Nicho de células madre

SCR: SCARECROW

SDS: Sodium dodecyl sulfate/Dodecilsulfato sódico

Ser: Serine residue/Residuo de serina

SHR: SHORTROOT

SNAP: S-nitroso-N-acetylpenicillamine/ S-nitroso-N-acetil-1,1-penicilamina

SNO: S-nitrosothiol/ S-nitrosotiol

SNP: Sodium nitroprusside/ Nitroprusiato de sodio

TAP: Tandem affinity purification/ Purificación por afinidad en tándem

TCEP: Tris(2-carboxyethyl) phosphine/ Tris(2-carboxyetil) fosfina

TF: Transcription factor/ Factor de transcripción

TGA: TGACG motif-binding protein

TRX: Thioredoxin/ Tiorredoxina

UV: Ultraviolet/ Ultravioleta

v/v: Volume-volume ratio/ Relación volumen-volumen

w/v: Weight-volume ratio/ Relación peso-volumen

WOX5: WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5

WT: Wild-type/ Tipo silvestre

WUS: WUSCHEL

YFC: C-terminal fragment of the Yellow fluorescent protein/ Fragmento C-terminal de la proteína fluorescente amarilla

YFN: N-terminal fragment of the Yellow fluorescent protein/ Fragmento N-terminal de la proteína fluorescente amarilla

YFP: Yellow fluorescent protein/ Proteína fluorescente amarilla

°C: Degree Celsius/ Grado Celsius

βE: β-estradiol

μg: Microgram/ Microgramo

μL: Microliter/ Microlitro

μM: Micromolar

μm: Micrometer/ Micrómetro



INTRODUCCIÓN

1. El nicho de células madre en la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

1.1. Generalidades en la estructura de la raíz primaria.

El extraordinario potencial de las células madre vegetales es un área de gran relevancia en la investigación fundamental, que abre nuevas perspectivas a multitud de aplicaciones biotecnológicas. Estas células, definidas por Spradling *et al.* (2001) como *fascinantes*, experimentan un proceso que define su identidad celular, su posterior división y diferenciación y, además, coordinan tanto la expresión génica, como la integración de señales ambientales en el desarrollo de los organismos pluricelulares. Es necesaria una comunicación entre las mismas y con el resto de células del organismo para regular y controlar todo un conjunto de actividades vitales como son el crecimiento y la supervivencia. Todo esto es posible gracias a una característica esencial de las células madre vegetales, la totipotencia (Skoog y Miller, 1957), definida como la potencia celular que le confiere la capacidad de dirigir el desarrollo total de un organismo. La planta modelo *Arabidopsis thaliana* y, en particular, su meristemo radicular y la aparente simplicidad del mismo, es un sistema excelente para el estudio de la biología de las células madre. Su raíz posee una estructura que se establece desde la embriogénesis (Dolan *et al.*, 1993). Se distingue la zona meristemática (MZ), cuando la célula sale de mitosis aparece la zona de elongación (EZ) y cuando las células cesan en este proceso entran en la zona de diferenciación (DZ), que se caracteriza por la aparición de los pelos radiculares y donde las células vasculares desarrollan una pared celular secundaria. En la parte distal de la raíz se

encuentra la caliptra, formada a su vez por la columela central y la cofia (Figura IA). Localizado justo en la parte superior se encuentra el centro quiescente (QC, *quiescent center*) y más allá se encuentra el cuerpo principal de la raíz. Los diferentes tejidos de la raíz primaria están organizados de fuera a dentro en cilindros concéntricos, denominados epidermis, córtex, endodermis, periciclo y el tejido vascular, el cual contiene las células competentes que darán lugar a las células del xilema y del floema (Bennett *et al.*, 2010) (Figura IB).

1.2. Definición de célula madre en el contexto vegetal.

Todos los tejidos nombrados en el apartado anterior están constituidos por una única fila longitudinal de células, originada cada una de ellas a partir de su correspondiente *célula inicial*. Estas células cumplen la definición de célula madre, siendo un conjunto de células que tienen la capacidad de dividirse durante un período de tiempo indeterminado manteniendo a su vez su identidad de forma estable. Cada *célula inicial* gestiona sin límite aparente un estado constante en el que es capaz de llevar a cabo una división asimétrica. En cada división da lugar a una *célula inicial* sustituta y a una *célula hija*, la cual sufrirá un número de divisiones adicionales y se diferenciará posteriormente (Bennett *et al.*, 2010). Los mecanismos que utilizan las células madre para llevar a cabo su auto-renovación son fundamentales para descifrar el origen y el diseño de los organismos pluricelulares. Sin embargo, hay que destacar que cada célula madre de la raíz solo da lugar a un único tipo de tejido lo que plantea la cuestión de si estas células madre tienen realmente un potencial limitado.

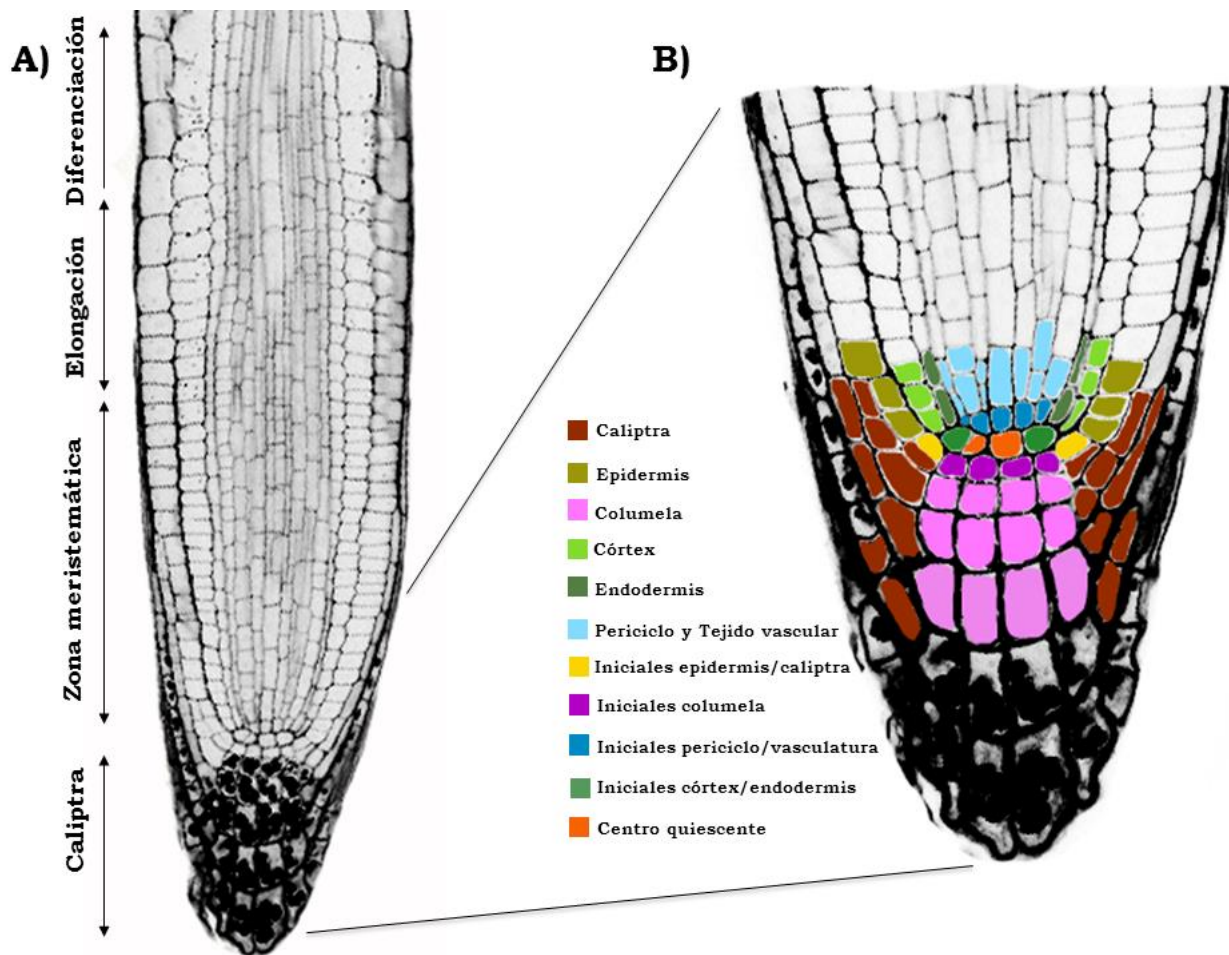


Figura I. Anatomía de la raíz primaria del ecotipo Columbia-0 (Col-0) de *Arabidopsis thaliana*. A) La raíz se divide en cuatro regiones de desarrollo a lo largo del eje longitudinal denominadas caliptra, zona meristemática, de elongación y diferenciación. B) El meristemo apical de la raíz contiene las células centrales del centro quiescente, rodeado de las células madre o iniciales que darán lugar a los tejidos concéntricos que componen la raíz.

Salvando todas las divergencias, estas características se pueden atribuir tanto a aquellas células madre animales como a las vegetales. Ambos reinos mantienen similitudes en los mecanismos de división celular debido a que comparten la maquinaria del ciclo celular eucariota (revisado en Cross *et al.*, 2011). No obstante, en

animales la forma adulta se establece desde la embriogénesis, en cambio, la forma adulta vegetal se desarrolla de una manera gradual gracias a la actividad de los tejidos meristemáticos y, en gran medida, en respuesta a señales posicionales (Steeves y Sussex, 1989). En animales, los comportamientos celulares dependen en

mayor medida del linaje celular, siendo esto importante para aquellas células con capacidad migratoria, la cual no es una característica de las células vegetales, aunque existen estudios que destacan la importancia de la impronta genómica en plantas (Steimer *et al.*, 2004; Hsieh y Fischer *et al.*, 2005).

1.3. Nicho de células madre y centro quiescente.

La comunidad científica ha establecido que la actividad tan específica de las células madre vegetales necesita de las células diferenciadas circundantes, las cuales controlan el comportamiento de las primeras mediante señales y otras conexiones intercelulares. A este microambiente particular se le ha denominado nicho, definido como un conjunto de células y sustratos extracelulares que puede albergar una o más células madre y controla su auto-renovación y la producción de su descendencia *in vivo* (Schofield, 1978; Ohlstein *et al.*, 2004). En los meristemos apicales es donde se encuentran estos nichos de células madre (SCN, *stem cell niche*) y su patrón de desarrollo se controla por un balance entre señales que inhiben la diferenciación y aquellas que refuerzan el destino celular, afectando a dos procesos clave: proliferación y diferenciación. En *A. thaliana* se encuentran dos meristemos apicales, el situado en la punta del tallo, denominado meristemo apical del tallo (SAM, *shoot apical meristem*), y, adicionalmente, en la punta de la raíz se localiza el meristemo apical de la raíz (RAM, *root apical meristem*). Existen similitudes funcionales en la organización de ambos meristemos y se sugiere la existencia de un mecanismo similar en la especificación de las células madre, en ambos casos dependiente de señales posicionales

(Veit *et al.*, 2006). Las células iniciales se albergan en la denominada zona central en el caso del SAM, o bien se asocian al centro quiescente en el caso del RAM (Steeves y Sussex, 1989). Comparten rutas genéticas funcionales como por ejemplo *WUSCHEL/CLAVATA*, aunque ambos meristemos difieren en numerosos aspectos como los referentes a los patrones de organogénesis. Referente al RAM, todas las células madre rodean a un grupo de células con una capacidad mitótica menor denominado QC (Clowes, 1956; Steeves y Sussex, 1989). Mediante experimentos de ablación láser y diferentes estudios genéticos, Van den Berg *et al.* (1997) lo definieron como un centro organizador del patrón celular necesario para el mantenimiento de las células madre, inhibiendo la diferenciación de las mismas y permitiendo así su división. Cuando se eliminaron por láser las *células iniciales*, otras células diferentes las reemplazaron, en cambio, cuando se eliminó una célula del QC, aquella *célula inicial* que estaba en contacto directo sufrió un cambio en la división y adquirió marcadores típicos de diferenciación, mientras que el resto de *células iniciales* que no estaban en contacto no sufrieron ninguna detención mitótica (Van den Berg *et al.*, 1997). Con estos estudios proponen un modelo donde la señal que guía la diferenciación dependiente de la posición se origina desde una célula más madura y alcanza a la *célula inicial*. A su vez, la diferenciación de la *célula inicial* está inhibida a través de su contacto directo con el QC que le manda señales inhibitorias. Tras la división de la *inicial*, la *célula hija* no estará más en contacto con el QC y no recibe sus señales, respondiendo ahora a las señales de una *célula hija* más madura que guiará su diferenciación a su correspondiente tipo celular. También muestran que en el meristemo radicular las células

centrales controlan la diferenciación, más que la división, y que la inhibición de la diferenciación está mediada por un mecanismo de célula a célula y posiblemente dependiente del contacto celular. De este modo, el QC sirve como un núcleo que integra diferentes señales para el sustento del meristemo en su conjunto (Jiang *et al.*, 2005).

Las células del QC se dividen con la mitad de frecuencia que las células madre adyacentes y aún con una frecuencia menor si se comparan con las células cercanas al final de la zona meristemática (Rahni *et al.*, 2018). En *A. thaliana*, el QC iniciará divisiones infrecuentes después de 6 ó 7 días post-germinación (Baum *et al.*, 2002), las cuales también pueden ser inducidas bajo condiciones de estrés (Kinder *et al.*, 2000). Estas divisiones permitirían el reemplazo del conjunto de células madre y la regeneración del QC en sí mismo (Kidner *et al.*, 2000). Aunque en *A. thaliana* el QC se compone de hasta cuatro células centrales, existe una gran complejidad en otras especies como la cebada con 30 células en el QC o el maíz, donde el QC posee hasta 1000 células, las cuales muestran diferentes grados de quiescencia, incrementando su actividad mitótica hacia el meristemo proximal (Kirschner *et al.*, 2017). Un estudio de 1984 ya señaló una correlación entre el número de células en el QC y el diámetro de la raíz, proponiendo que raíces más gruesas pueden necesitar un QC más grande como fuente de protección ante el daño celular (Clowes *et al.*, 1984). Algunos autores distinguen entre *células iniciales estructurales* correspondientes al QC, con un proceso de división más lento, y *células iniciales funcionales*, las células madre en sí, con una división más rápida. En especies con

raíces primarias más grandes, que poseen un número mayor de células en el QC y de *células iniciales*, el QC se compone de una población heterogénea, mezcla de células con diferentes ratios de división (Barlow *et al.*, 1997).

Por otra parte, la idea de que el RAM produce continuamente nuevas células, resultando en un crecimiento radicular indeterminado a lo largo de la vida de la planta, es un concepto erróneo. Las raíces de algunas plantas, por ejemplo, las de la familia *Cactaceae*, muestran un crecimiento determinado y constitutivo. Esto podría ser particular de algunas plantas determinadas, pero un análisis más profundo de algunos datos disponibles muestra que, a pesar de la plasticidad del RAM, el crecimiento determinado es una regla en las plantas (de Tullio *et al.*, 2010). Por ejemplo, el crecimiento indeterminado de la raíz primaria de *A. thaliana* se para después de 4 ó 5 semanas. Esta parada puede ser una respuesta más temprana en determinadas condiciones ambientales, por ejemplo, con la infección de hongos patogénicos o micorrícicos (Fusconi *et al.*, 1999). Barlow (1997) sugiere que se puede definir este estado determinado esencialmente como la pérdida de la capacidad de división de las células del QC y la incapacidad de reponer a las *células iniciales*. Aunque este estado se puede considerar como *el final* de la función de la raíz, en algunos casos es *el principio*, como, por ejemplo, algunas especies de palmeras convierten sus primeras raíces en espinas protectoras (Tomlinson, 1990).

El crecimiento indeterminado depende exclusivamente del establecimiento y funcionalidad del QC. Nawy *et al.* (2005)

establecieron un conjunto de genes enriquecidos en este tipo celular. Para ello, generaron un marcador basado en elementos reguladores *cis* del factor de transcripción (TF) de tipo MADS-box AGAMOUS-LIKE 42 (AGL42), que se expresa preferencialmente en el QC, aunque no exclusivamente. Se combinó con la estrategia conocida como clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) desarrollada por Birnbaum *et al.*, (2005). Es una técnica a través de la cual se generan protoplastos a partir de raíces que poseen una subpoblación de células fluorescentes. Estas últimas se puede seleccionar sin perturbar de manera significativa su perfil transcripcional. De este modo, se obtuvo el perfil transcripcional de las células del QC 4 días post-germinación. Aunque la técnica conlleva el riesgo de separar una proporción pequeña de células de manera incorrecta, lo cual contaminaría el ARN a analizar, se solventa mediante el uso de los controles adecuados y siendo estricto en la ventana de células separadas. Este trabajo proporcionó una ventana muy amplia de los genes que contribuyen a la actividad y el mantenimiento del QC, identificando hasta 290 transcritos diferentes. A partir de estos datos y mediante los estudios basados en la genética reversa, se han podido asignar funciones específicas a los diferentes factores que contribuyen a este proceso, observándose un alto grado de redundancia entre los reguladores transcripcionales del QC.

2. Mecanismos principales de regulación en el nicho del RAM.

Para describir los mecanismos de regulación que controlan el mantenimiento del RAM es posible distinguir entre aquellos procesos que determinan la identidad celular y los que regulan la división y diferenciación, aunque ambos procesos se combinan. En los tipos celulares diferenciados, la identidad se basa principalmente en mantener un *statu quo* metabólico, sin embargo, las células madre deben recrear patrones complejos de transcripción en cada división mitótica (Veit *et al.*, 2006). De forma tradicional se han descrito tres mecanismos principales de regulación que proporcionan identidad en el nicho de células madre de la raíz (RSCN, *root stem cell niche*) que pueden actuar de forma redundante (Figura II).

Por un lado, la ruta genética constituida por dos TFs tipo GRAS, SCARECROW (SCR) y SHORTROOT (SHR) (Di Laurenzio *et al.*, 1996). El gen *SCR* se expresa, en primer lugar, en las células precursoras del QC durante la embriogénesis, extendiéndose posteriormente a las células iniciales del córtex y la endodermis y a la endodermis *per se* (Wysocka-Diller *et al.*, 2000) y este patrón de expresión se mantiene en el desarrollo post-embrionario. En el mutante *scr1* no tiene lugar la división asimétrica que sufre la célula hija derivada de la célula inicial del córtex y la endodermis, resultando en una única capa celular con una mezcla de identidades celulares (Di Laurenzio *et al.*, 1996).

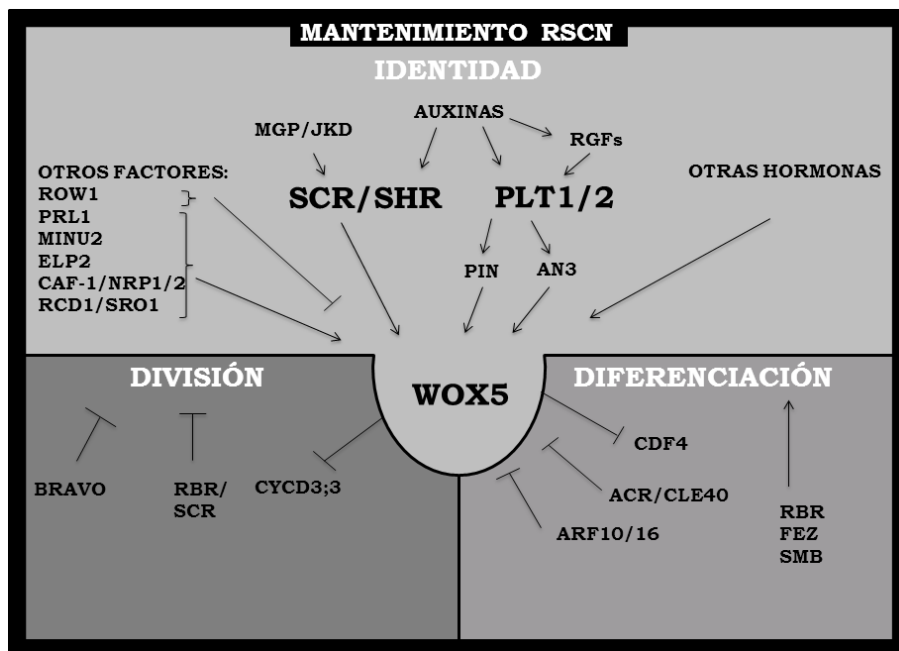


Figura II. Principales mecanismos de regulación involucrados en el mantenimiento del SCN de la raíz del ecotipo Col-0 de *Arabidopsis thaliana*. Se distinguen aquellos que controlan la identidad celular de los implicados en la división y posterior diferenciación celular. ACR4: ARABIDOPSIS CRINKLY4; AN3: ANGUSTIFOLIA; ARF10/16: FACTORES DE RESPUESTA A AUXINA 10/16; BRAVO: BRASSINOSTEROIDS AT VASCULAR AND ORGANIZING CENTER; CAF-1: CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR 1; CDF4: CYCLING DOF FACTOR 4; CLE40: CLAVATA3/ESR-RELATED 40; CYCD3;3: CYCLIN D3;3; ELP2: SUBUNIDAD 2 DEL COMPLEJO ELONGADOR; FEZ ó ANAC009; JDK: JACKDAW; NRP1/2: MGP: MAGPIE; MINU1/2: MINUSCLE 1/2; NAP1 RELATED PROTEIN1/2; PIN: PIN-FORMED; PLT1/2: PLETHORA 1/2; PRL1: PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1; RBR: RETINOBLASTOMA; RCD1: RADICAL-INDUCED CELL DEATH; RGFs: ROOT MERISTEM GROWTH FACTORS; ROW1: REPRESSOR OF WUSCHEL 1; SCR: SCARECROW; SHR: SHORTROOT; SMB: SOMBRERO/ANAC033; SRO1: SIMILAR TO RCD ONE 1; WOX5: WUSCHEL-RELATED HOMEBOX

Además, las células del QC tienen forma aberrante, fracasan en el mantenimiento de las células iniciales de la columela y finalmente se detiene el crecimiento. Por su parte, *SHR* se transcribe exclusivamente desde la embriogénesis en el tejido vascular, sin embargo, la proteína se mueve hasta las capas celulares que rodean al QC, inclusive, y promueve la expresión del gen *SCR* en las mismas (Nakajima *et al.*, 2001). Ambas proteínas forman un complejo en el núcleo y juntas regulan la expresión génica. La expresión de *SCR* en el fondo mutante *shr* no recupera los defectos de este último, indicando que ambos deben estar presentes en el QC para mantener la actividad meristemática. Además, esto se acompaña de la actividad diferencial de dos proteínas tipo dedo de zinc, MAGPIE (MGP) y JACKDAW (JDK), que o bien activan o bien restringen la actividad de *SCR* y *SHR* (Welch *et al.*, 2007). Por lo tanto, ambos se requieren para la identidad del QC y el mantenimiento de las células adyacentes (Sabatini *et al.*, 2003).

Por otra parte, los genes *PLETHORA1* (*PLT1*) y *PLETHORA2* (*PLT2*), los cuales codifican dos TFs tipo APETALA2, se expresan inicialmente en la región basal del embrión, en el primordio radicular y en el RSCN finalmente. De manera semejante, estos genes se requieren para la identidad y el mantenimiento celular. Sus mutantes, con un tamaño radicular reducido, muestran alteraciones en las capas de la columela, observándose un número mayor de células que acumulan gránulos de almidón desde las células iniciales. Actúan en paralelo con la ruta de *SCR*-*SHR* para definir el QC y la posición de las células madre. Aunque inicialmente se describen como rutas independientes, puesto que ni *SCR* ni *SHR* son esenciales para la transcripción de *PLT1*, se sugiere un solapamiento

entre ambas para la expresión de los marcadores del QC QC25 y QC46. A su vez, tienen dianas independientes como QC184, dependiente de PLT1 pero no de SCR/SHR (Aida *et al.*, 2004).

Finalmente, el homólogo del gen *WUSCHEL* (*WUS*), relacionado con el mantenimiento de las células madre en el tallo (Laux *et al.*, 1996; Nardmann *et al.*, 2009), es el gen *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5* (*WOX5*), que se expresa en las células del QC y en sus células precursoras desde el estado globular embrionario. Esto es muestra de las similitudes moleculares en el desarrollo de ambos meristemas, radicular y apical del tallo y, además, no se han encontrado secuencias proteicas relacionadas con la familia *WOX* (*WUS HOMEODOMAIN*) fuera del reino vegetal (Haecker *et al.*, 2004). Ambos genes son equivalentes funcionalmente, la expresión de *WOX5* bajo el control del promotor de *WUS* es suficiente para recuperar el fenotipo de los mutantes *wus* y viceversa (Sarkar *et al.*, 2007). La pérdida de función de *WOX5* causa la diferenciación prematura de las células iniciales de la columela, por el contrario, la ganancia de función bloquea la diferenciación de las mismas, sin embargo, estas células tampoco se diferencian tras la ablación del QC (Sarkar *et al.*, 2007). Este fenotipo no parece ser el resultado de potenciar la señal proveniente del QC, si no que se interpreta de forma diferente: la expresión ectópica de *WOX5* transforma a las células iniciales funcionales en células iniciales estructurales, es decir, un nuevo QC, y a las células hija en una nueva célula inicial, incrementando así el tamaño del nicho. Además, las células del QC de *wox5* son irregulares y de un tamaño mayor comparadas con las del ecotipo silvestre. De esta forma, Sarkar *et al.*, (2007) proponen a *WOX5* como un factor necesario para la especificidad del QC en un

mecanismo de célula a célula (*non-cell autonomously*), aunque no parece ser el factor principal debido a que la raíz del mutante continúa creciendo de forma indeterminada. Esta señal procedente del QC mantiene a las células madre no diferenciadas, sin embargo, el destino de las células hijas se determina gracias al contexto celular.

Se ha analizado el promotor de *WOX5* en 30 especies vegetales diferentes y se ha concluido que la expresión de este gen puede ser regulada a diferentes niveles, desde una regulación epigenética, transcripcional, post-transcripcional o incluso post-traduccional. Los factores de regulación encontrados en este estudio *in silico* engloban a factores de las familias AHB, MADS, MYB y DOF y se podrían unir tanto al promotor, al transcrito o a la proteína, directamente o a través de intermediarios (Oshchepkova *et al.*, 2017). Existen diversos ejemplos de esta regulación. Así, REPRESSOR OF WUSCHEL 1 (ROW1) se une al promotor de *WOX5* y restringe su transcripción en el QC (Zhang *et al.*, 2015). Asimismo, PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1 (*PRL1*) es también necesario para la inducción de los genes *PLT1/2* y *WOX5* en la raíz de *A. thaliana* (Ji *et al.*, 2015). JKD puede mantener y amplificar la expresión de *WOX5* de manera independiente a SCR-SHR, así la interacción de JKD y SHR puede inducir la expresión de *WOX5* bajo condiciones fisiológicas, y a su vez, niveles elevados de JKD pueden mantener de manera independiente la expresión de *WOX5* (Long *et al.*, 2017). Shimotohno *et al.* (2018) publicaron un estudio en el que muestran cómo PLT y SCR, junto con proteínas de la familia TEOSINTE-BRANCHED CYCLOIDEA PCNA, regulan la actividad del promotor de *WOX5*. Este estudio revela cómo dos de las principales

rutas reguladoras del SCN tienen puntos en común, como se había postulado hace más de una década (Sabatini *et al.*, 2003; Aida *et al.*, 2004; Bennett y Scheres, 2010), aunque también existen aquellas funciones adicionales que no solapan entre las dos rutas (Levesque *et al.*, 2006; Moreno-Risueño *et al.*, 2015; Santuari *et al.*, 2016).

Además de los mecanismos clásicos de identidad celular, actualmente se conocen otros puntos de regulación del RSCN (Figura II). Para ejemplificar esto, Sang *et al.*, 2012 muestran la importancia de la regulación de la cromatina en la población de células madre. El subgrupo SWI2/SNF2 de ATPasas remodeladoras de cromatina está compuesto de los tres genes homólogos *BRAHMA*, *SPLAYED* y *MINUSCULE 1/2 (MINU1/2)*. En el doble mutante *minu1minu2* está alterada la expresión de *SCR*, *SHR* y *WOX5*. Así, *MINU2* puede unirse al promotor de *WOX5* regulando directamente su actividad. Además, se conoce que la movilidad de las proteínas histonas es menor en las células madre de la raíz que en las células adyacentes, sugiriendo que la flexibilidad en la organización de la cromatina es un factor importante en el nicho radicular (Rosa *et al.*, 2014), que se establece dinámicamente en respuesta a la posición celular (Gailloch *et al.*, 2015).

También se ha descrito que la subunidad 2 del complejo elongador (ELP2) afecta epigenéticamente a la transcripción de genes relacionados con el mantenimiento del meristemo radicular (Jia *et al.*, 2015). Recientemente, se han relacionado incluso proteínas chaperonas con funciones en el mantenimiento de la integridad del SCN y sustentar así el crecimiento radicular post-embriionario. En concreto, CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR 1 (CAF-1) para las

histonas H3 y H4, y NAP1 RELATED PROTEIN1/2 (NRP1/2) para las histonas H2A y H2B (Ma *et al.*, 2018).

Por otra parte, la familia poli ADP-ribosa polimerasa (PARP) está implicada en un gran número de procesos celulares que comprenden principalmente la reparación de ADN (Boltz *et al.*, 2014). Dos miembros de esta familia, RADICAL-INDUCED CELL DEATH 1 (RCD1) y SIMILAR TO RCD ONE 1 (SRO1) participan en la organización del RAM, siendo necesarios para el mantenimiento de la célula en un estado de división competente y en la regulación del plano de división, así como una diferenciación celular apropiada. El doble mutante presenta un crecimiento radicular más corto, con menor actividad mitótica y menor número de células en la zona de división. Además, su QC no se puede distinguir histológicamente (Teotia *et al.*, 2010).

Adicionalmente, Ercoli *et al.*, 2018 describe la función de los co-reguladores GROWTH REGULATING FACTOR-INTERACTING FACTOR (GIF) en la homeostasis del meristemo radicular. A diferencia de otros reguladores del SCN, cuyos fenotipos causan una reducción en el tamaño del meristemo, la pérdida de función de los genes *GIF* provoca un incremento en el tamaño del mismo. *AN3 (ANGUSTIFOLIA, GIF1)*, *GIF2* y *GIF3* poseen un patrón de expresión solapante, lo que probablemente explique sus funciones redundantes. En concreto, el gen *AN3*, considerado una diana de PLT (Santuari *et al.*, 2016), se expresa en mayores niveles en el área de las células madre, explicando así la razón por la que su mutación afecta a la expresión de *WOX5* y al mantenimiento del QC. Además, se ha comprobado que *AN3* se une a los promotores de los genes *PLT* y *SCR*, regulando su expresión (Ercoli *et al.*, 2018).

Como se viene señalando, no se puede considerar este ambiente celular de forma independiente dado que un número creciente de estudios avala que las células madre se mantienen en el nicho mediante interacciones intercelulares y diferentes rutas de señalización. Entre las señales extracelulares que mantienen este microambiente, los péptidos secretados se reconocen ahora como miembros importantes en la señalización intercelular y coordinan muchas funciones celulares en plantas. Algunos de estos péptidos sufren modificaciones post-traduccionales complejas mediadas por enzimas específicas que reconocen secuencias particulares en el péptido diana. Matsuzaki *et al.* (2010) identificaron una familia de péptidos con actividad tirosil-sulfotransferasa y redundantes funcionalmente, nombrados como factores de crecimiento del meristemo radicular (RGFs, *root meristem growth factors*). Se expresan en la capa más interna de la columela y son clave para el mantenimiento del nicho y la proliferación celular. Por ejemplo, RGF1, inducido por auxina, define el patrón y nivel de expresión de los genes *PLTs*, principalmente a nivel post-transcripcional (Zhou *et al.*, 2010).

En cuanto a los mecanismos que controlan los procesos de división y diferenciación en el RSCN, existen multitud de estudios que tratan de establecer diferentes puntos de regulación (Figura II). Forzani *et al.*, 2014 proponen que, para restringir la división celular, *WOX5* reprime la expresión de *CYCLIN D3;3* (*CYCD3;3*) en el QC. Debido a que son necesarios ciertos niveles de *CYCLIN D1;1* y *CYCD3;3* para el desarrollo normal del QC, se propone que *WOX5* lleva a cabo una regulación muy fina de su expresión. A su vez, *WOX5* reprime la transcripción de *CYCLING DOF FACTOR 4* (*CDF4*)

mediante la unión a su promotor. *CDF4* es un TF de tipo DOF que promueve la diferenciación de las células madre de la columela. La expresión de *CDF4* es gradual, con niveles altos en la columela diferenciada, bajos niveles en las células madre de la columela y no detectable en el QC, siendo el gradiente de *WOX5* el opuesto (Pi *et al.*, 2015). *WOX5* recluta al represor *TOPLESS* (*TPL*) y a la *HISTONA DEACETYLASA 19* (*HDA19*) en el promotor de *CDF4*.

Por otra parte, existen TFs tipo *R2R3-MYB* implicados en la división celular de la raíz. Se ha descrito a *BRASSINOSTEROIDS AT VASCULAR AND ORGANIZING CENTER* (*BRAVO* ó *MYB56*) como un represor específico de las divisiones del QC, otorgando un papel a los brasinoesteroides en la regulación de la quiescencia de las células madre vegetales (Vilarrasa-Blasi *et al.*, 2014). *BRAVO* está implicado en la inhibición del crecimiento radicular extendiendo la duración de la metafase en las células mitóticas, siendo uno de sus genes diana *CYCB1;1* (Mu *et al.*, 2009).

La proteína *RETINOBLASTOMA* (*RBR*), mediante su interacción con *SCR* (Cruz-Ramírez *et al.*, 2013), es clave en la represión de la división del QC. A su vez, participa en el control de la diferenciación celular en el meristemo. La pérdida de función genera divisiones adicionales y retrasa la diferenciación, mientras que un aumento en la actividad de *RBR* causa una diferenciación prematura (Wildwater *et al.*, 2005). Por su parte, *CLAVATA3/ESR-RELATED 40* (*CLE40*) se expresa en las células diferenciadas de la columela y actúa vía su receptor tipo kinasa *ARABIDOPSIS CRINKLY4* (*ACR4*), que se expande hasta las células iniciales, de tal forma que el complejo *CLE40/ACR4* podría funcionar reprimiendo la expresión de *WOX5* de manera indirecta (Stahl *et al.*, 2009). Al mismo tiempo, TFs con

dominio NO APICAL MERISTEM AND CUP-SHAPED COTYLEDONS (NAC) también son esenciales para el proceso de diferenciación. Así, ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 9, también conocido como FEZ, es necesario para la actividad de las células madre de la columela (Willemsen *et al.*, 2008) y SOMBRERO (SMB), correspondiente al factor ANAC033, promueve la salida del ciclo celular y la diferenciación del mismo tipo de células (Willemsen *et al.*, 2008, Bennett *et al.*, 2010, Fendrych *et al.*, 2014). Análisis genéticos y de expresión a gran escala revelaron que factores como RBR, FEZ y SMB, FACTORES DE RESPUESTA A AUXINA 10/16 (ARF10/16) y WOX5 regulan, en principio de manera independiente, pero paralela, el número de células madre de la columela, aunque existen puntos de conexión, como por ejemplo la represión de la actividad de SMB por la acción de WOX5 (Bennett *et al.*, 2014).

3. Regulación hormonal en el nicho de células madre del RAM.

El control hormonal es otro aspecto a tener en cuenta en el crecimiento y desarrollo radicular, permitiendo el balance entre división y diferenciación. Su interacción, tanto sinérgica como antagónica, es crucial para la coordinación temporal y espacial del desarrollo (Lee *et al.*, 2012). Aunque sin profundizar, se puede subrayar el papel de las hormonas clásicas en la organogénesis de la raíz (Figura III).

En el caso de la auxina, su acción promueve el mantenimiento de la actividad meristemática en el RAM, mientras que tiene un efecto opuesto en el SAM, donde los niveles bajos de auxina son un

requisito para la formación del meristemo. Las auxinas regulan el RSCN de dos maneras, bien inhibiendo la activación del QC (Jiang *et al.*, 2003), o promoviendo la diferenciación en la parte distal del meristemo (Wang *et al.*, 2005; Ding y Friml, 2010).

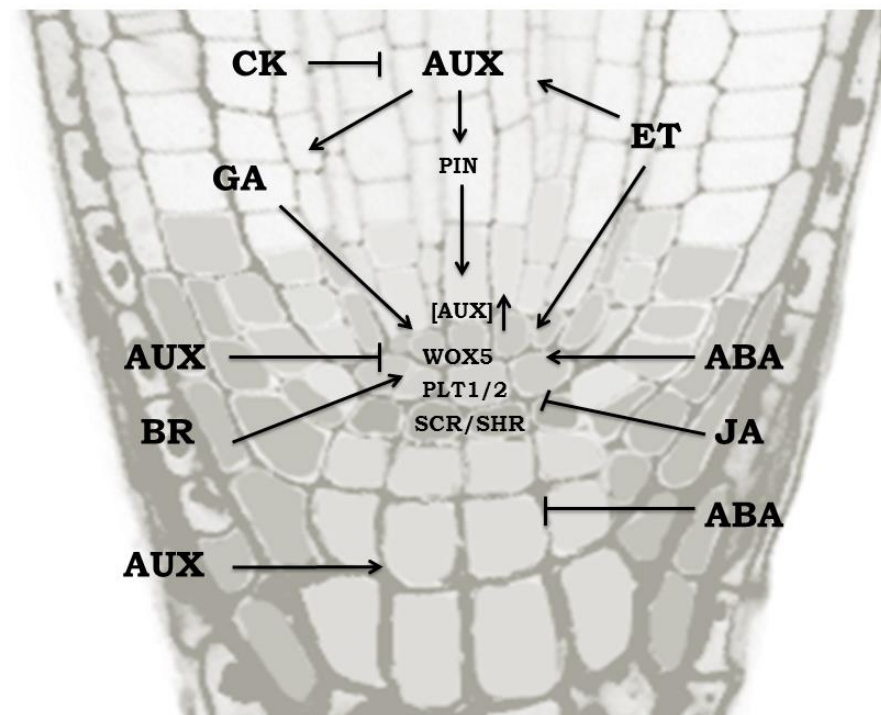


Figura III. Representación esquemática de las principales hormonas vegetales que participan en el desarrollo y mantenimiento del RAM. Existe una red compleja de interacciones que afecta a la señalización mediada por los principales mecanismos de identidad del RAM. La localización de las proteínas PIN determina la distribución del máximo de auxina en el QC, indispensable para el mantenimiento del mismo. ABA: ÁCIDO ABSCÍSICO, AUX: AUXINA; BR: BRASINOESTEROIDE; CK: CITOQUININA; ET: ETILENO; GA: GIBERELINA; JA: ÁCIDO JASMÓNICO.

El desarrollo de un nuevo primordio radicular se asocia con un incremento local en la concentración de auxinas, generalmente asociado a las células del QC en la punta de la raíz primaria (Blilou *et al.*, 2005). Los tratamientos que perturban los niveles de auxinas alrededor del QC alteran la organización funcional del RAM y pueden desplazar su posición, indicando que la identidad del RAM puede deberse en parte a un máximo en la concentración de auxina (Sabatini *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2003; Ponce *et al.*, 2005). El estudio de Gonzali *et al.*, (2005) propone que el máximo de auxina se alcanza paso a paso mediante las proteínas PIN-FORMED (PIN), las cuales generan un flujo de auxinas hacia la punta de la raíz, en concreto el QC, induciendo la expresión de *WOX5*, lo que a su vez permite el mantenimiento del máximo de auxina reprimiendo la conjugación de la hormona, así como favoreciendo su síntesis *in situ* (Ljun *et al.*, 2005). De forma muy resumida, existen 5 proteínas PIN en *A. thaliana* encargadas de coordinar el transporte de las auxinas en el meristemo radicular, siendo capaz de mantener esta distribución en ausencia de auxinas exógenas creando una especie de circuito en el meristemo. Por otra parte, la señalización mediada por SHR influye negativamente en el transporte y biosíntesis de la auxina (Levesque *et al.*, 2006).

Por su parte, el etileno (ET) aumenta la biosíntesis de auxinas y modula su transporte, inhibiendo la expansión de las células (Swarup *et al.*, 2007) y promoviendo la división celular en el QC (Ortega-Martínez *et al.*, 2007), aunque existen resultados contradictorios en maíz (Ponce *et al.*, 2005).

El ácido abscísico (ABA) inhibe el crecimiento de la raíz a concentraciones en el rango micromolar, pero lo estimula a

concentraciones menores. Se ha demostrado que el ABA promueve el mantenimiento del QC y suprime la diferenciación (Zhang *et al.*, 2010).

Las citoquininas (CKs) actúan de manera antagonista a las auxinas, promoviendo la diferenciación en el meristemo radicular aumentando la expresión del represor auxínico SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2) (Moubayidin *et al.*, 2010). Además, regulan negativamente la expresión génica de *PIN1* y *PIN4* y positivamente la expresión de *PIN7*, afectando a la distribución de las auxinas (Ruzicka *et al.*, 2009).

Las giberelinas (GAs) promueven la proliferación celular en el meristemo de la raíz afectando a inhibidores del ciclo celular, aunque no parecen estar relacionadas con la especificación del SCN (Achard *et al.*, 2009). Los genes de la biosíntesis de esta hormona se expresan en el QC (Nawy *et al.*, 2005).

El crecimiento de la raíz mediado por el ácido jasmónico (JA) está relacionado con la actividad meristemática a través de la unión directa del TF MYC2 a los promotores de los genes *PLT1* y *PLT2*, reduciendo su expresión y promoviendo así la división celular en el QC y la diferenciación de la columela (Chen *et al.*, 2011). Adicionalmente, se ha descrito un papel esencial para esta hormona en la regeneración tisular y la activación meristemática tras el daño por herida provocada por nematodos a través del complejo SCR-RBR (Zhou *et al.*, 2019). Por otro lado, oxilipinas provenientes de la misma ruta enzimática que da lugar al JA, como por ejemplo el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), inhiben la división celular y el crecimiento de la raíz, una propiedad compartida también por el JA (Vellosillo *et al.*, 2007). En este sentido hay que destacar la

existencia de una molécula activa de jasmonato en plantas briofitas, que comparte la misma ruta de transducción de la señal existente en las plantas vasculares (Monte *et al.*, 2018).

Los brasinoesteroides (BRs) regulan el crecimiento de la raíz a través de un mecanismo dependiente de la concentración, siendo necesario un umbral óptimo para desencadenar la transducción de la señal (Kim *et al.*, 2007; Lozano-Elena *et al.*, 2018). El trabajo de Villarrasa-Blasi *et al.* (2014) define a BRAVO como un represor molecular impidiendo el papel de esta hormona en el proceso de división celular en las células del QC. Este mecanismo asegura una proliferación celular baja en estas células y confiere la plasticidad necesaria para adaptarse a condiciones ambientales variables. Así, permite la división de las células del QC bajo ciertas condiciones, sirviendo de interruptor en la división celular, a través de la inhibición de la transcripción de BRAVO mediante BR INSENSITIVE1 (BRI1)-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1).

4. Regulación redox en el nicho de células madre del RAM.

La organización del RAM es el resultado de interacciones complejas entre factores genéticos, hormonales y bioquímicos estrictamente conectados. Así, el establecimiento y el mantenimiento del RAM durante la vida de la planta es, definitivamente, mucho más dinámico y plástico de lo que se puede concluir observando fenotipos bajo determinadas condiciones experimentales. Además, esta organización es muy sensible a señales ambientales, pudiendo alterar el programa de desarrollo para asegurar la supervivencia de

la planta bajo condiciones desfavorables (de Tullio *et al.*, 2010). Así, múltiples evidencias apuntan a que el desarrollo del RAM experimenta una regulación redox.

El estado redox celular se puede definir como la proporción de una molécula antioxidante y su estado reducido, relativo al tamaño total del contenido de estas especies (Potters *et al.*, 2010). Los antioxidantes más estudiados en plantas y animales son el ascorbato (ASC) y el glutatión (GSH), en su forma reducida, que, junto con sus formas oxidadas, dehidroascorbato (DHA) y glutatión disulfuro (GSSG), respectivamente, conforman dos parejas redox conectadas en multitud de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Los primeros trabajos que asignan un papel al ASC en el crecimiento de la raíz vienen de Reid *et al.* (1937, 1941), donde se relaciona el contenido de ASC con el tamaño celular en la raíz de judía. Trabajos posteriores relacionan el bajo contenido de ASC con un bloqueo en la progresión del ciclo celular en la fase G1 (Liso *et al.*, 1984) y la adición exógena del mismo promueve la síntesis de ADN en las células del QC (Liso *et al.*, 1988). En cuanto a la implicación del GSH en los mecanismos que controlan el crecimiento radicular y la organización del RAM destaca el trabajo que estudia el gen *ROOTMERISTEMLESS1 (RML1)*, que codifica la enzima glutamylcisteína sintetasa, el primer paso en la síntesis del GSH (Vernoux *et al.*, 2002). Mutantes de pérdida de función forman embriones aparentemente normales, pero no mantienen un desarrollo radicular post-embrionario debido a un déficit en la división celular, pudiéndose revertir este fenotipo con GSH. Así, se conoce que en el ápice radicular la localización de GSH y ASC es altamente dependiente de la identidad celular. Se encuentran

principalmente en sus formas oxidadas en las células del QC, mientras que aparecen en sus formas reducidas en las células adyacentes con mayor actividad en la división celular (Jiang *et al.*, 2003, Dinneny y Benfey; 2008). Cierta nivel de oxidación restringe la función nuclear y afecta a la progresión del ciclo celular conduciendo a un menor número de células en el RAM (de Simone *et al.*, 2017).

Los niveles de auxinas en el RAM son un requisito para promover un ambiente oxidado en el QC (Jiang *et al.*, 2003). Sin embargo, la auxina restringe la actividad meristemática y promueve la diferenciación en la columela. Esto ocurre a través de los AUXIN RESPONSE FACTOR 10 (ARF10) y 16 (ARF16), activados por esta hormona. ARF16 podría estar involucrado en restringir el dominio de expresión de *WOX5* al QC permitiendo así la diferenciación de la columela (Ding *et al.*, 2010) (Figura II). Por su parte, el transporte polar de las auxinas, que controla el desarrollo radicular, está influenciado por GSH a través de una regulación post-transcripcional (Koprivova *et al.*, 2010) y por glutaredoxinas como AtGrxS17 (Cheng *et al.*, 2011). Cuando la actividad glutaredoxina se altera aparecen deficiencias en el meristemo. Curiosamente, la flavín-monooxigenasa YUCCA6, que cataliza un paso clave en la biosíntesis de auxinas, también presenta actividad tiol reductasa, relacionando así el control redox con la ruta biosintética de auxinas en la raíz (Cha *et al.*, 2015). Por otra parte, la enzima glutatión reductasa (GR) cataliza la reducción de GSSG a GSH. El genoma de *A. thaliana* posee dos genes que codifican estas enzimas, *GR1* y *GR2*. Mientras que la enzima citosólica/peroxisomal GR1 no parece tener un papel crucial en el desarrollo, Yu *et al.* (2013) mostraron que la

enzima plastidial GR2, a través del mutante *miao*, es esencial para el crecimiento radicular y el mantenimiento del RAM. Identificaron el mutante *miao* para el gen *GR2* con un fenotipo drástico de inhibición radicular y defectos graves en el RAM.

Benitez-Alonso *et al.* (2009) identificaron un gen relacionado con el tráfico célula a célula a través de los plasmodesmos denominado *GFP ARRESTED TRAFFICKING 1 (GAT1)* y se corresponde con una tioredoxina m3. El mutante de este gen mimetiza el fenotipo del mutante *rml1* en la punta de la raíz, mostrando una acumulación de ROS y callosa impidiendo el transporte a través de los plasmodesmos y sugiriendo que la comunicación célula a célula es esencial en los meristemas. Así, las tioredoxinas también están involucradas en los procesos que definen el tamaño del meristemo radicular. Por ejemplo, en los mutantes de las enzimas tioredoxina reductasas *ntxA* y *ntxB* se observan meristemas de un tamaño menor (Reichheld *et al.*, 2007; Bashandy *et al.*, 2010).

La proteína fosfatasa 2A (PP2A) es una fosfoproteína fosfatasa (PPP) del grupo de las proteína serina/treonina fosfatasas, que modula la desfosforilación proteica formando un complejo heterotrimérico con la subunidad catalítica y las subunidades A y B. En concreto, una isoforma de la subunidad A de *A. thaliana*, ROOTS IN NAPHTHYLPHTHALAMIC ACID1 (RCN1) desempeña un papel importante en el control de la actividad fosfatasa en raíz e hipocotilo. Las raíces de las plántulas de mutantes *rcn1* presentan alteraciones en el patrón de división en el RAM, a su vez, un crecimiento reducido frente a diversas condiciones como estrés oxidativo, iónico u osmótico. Su función es esencial para el mantenimiento de la distribución de la auxina y, por tanto, la organización del SCN. La

inhibición de la actividad fosfatasa es suficiente para perturbar la función del meristemo, mostrando que su patrón de organización es un proceso dinámico que responde rápidamente a cambios en los niveles de fosforilación (Blakeslee *et al.*, 2008).

Por otro lado, hoy día está muy establecido en la Biología Vegetal que las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, ROS y RNS respectivamente, no son solo moléculas perjudiciales, si no que, por el contrario, pueden actuar como moléculas señalizadoras en los sistemas biológicos, controlando varios programas genéticos y participando en multitud de procesos fisiológicos. Las ROS se producen como consecuencia del funcionamiento de la cadena de transporte de electrones, siendo las mitocondrias y los cloroplastos los principales productores de estas moléculas. Bajo ciertas circunstancias que alteran el equilibrio de este transporte de electrones o bien cuando los pigmentos presentes en ellos se sobreexcitan, se puede transferir un electrón al O_2 , formándose el radical libre anión superóxido O_2^- . Este agente oxidante es muy reactivo y puede ser un sustrato para la generación de otras moléculas ROS. La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del O_2^- en O_2 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). A su vez, el H_2O_2 puede generar el radical hidroxilo OH (Correa-Aragunde *et al.*, 2015). Estas moléculas pueden interaccionar, de manera selectiva y en un proceso controlado, con diferentes dianas capaces de percibir el incremento en su concentración y traducirlo en cambios en la expresión génica, por ejemplo, oxidando componentes de las rutas de señalización que posteriormente modifican la actividad de TFs, péptidos, hormonas u otro tipo de señales.

El RAM se reorganiza rápidamente en respuesta a diferentes señales ambientales. Esta plasticidad se relaciona con una compleja señalización en la que ROS, RNS y antioxidantes se integran con las diferentes rutas hormonales que operan en el RAM. Esta es una zona activa de producción de ROS, incluyendo desde las células meristemáticas hasta aquellas en la zona de diferenciación (Scheres *et al.*, 2002). El anión O_2^- se localiza de forma predominante en el apoplasto celular de la zona de elongación, mientras que el H_2O_2 en la zona de diferenciación y en la pared celular de los pelos radiculares en formación (Dunand *et al.*, 2007). Recientemente se ha detectado H_2O_2 en la zona de elongación, en concreto en columela, caliptra, epidermis y tejido vascular (Tsukagoshi *et al.*, 2010), así como en las células del córtex (Tsukagoshi *et al.*, 2016).

La actividad de la enzima ASC oxidasa se encuentra inducida en las células del QC pero no en la zona de elongación (Liso *et al.*, 2004; Tyburski *et al.*, 2009). Así, esta enzima podría tener una función dual, por un lado oxidando ASC a DHA y, por otro, reduciendo el O_2 a H_2O , eliminando así el O_2 , que es la principal fuente de ROS. Mantener bajos los valores de O_2 en el QC podría ser clave para preservar la totipotencia. EL DHA, formado como consecuencia de la acción enzimática de la ASC oxidasa es capaz de ralentizar la progresión del ciclo celular, contribuyendo a un ciclo de mayor duración en las células del QC (Potters *et al.*, 2004). Esta molécula es capaz de reaccionar con GSH y proteínas que contienen grupos tiol, regulando así la actividad redox.

Las peroxidasas están presentes en todos los organismos y en casi todos los tejidos, pero son especialmente abundantes en las raíces. Están relacionadas con muchos procesos fisiológicos, como el

crecimiento, la diferenciación de la pared celular o respuestas a varios estreses bióticos y abióticos (Penel *et al.*, 1992). De forma clásica se han relacionado con procesos de inhibición del crecimiento desde que son capaces de oxidar a la auxina e incluso están implicadas en fortalecer la unión de los constituyentes de la pared celular. Sin embargo, Passardi *et al.* (2006) mostraron que al disminuir los niveles de expresión de estas enzimas se reducía la elongación radicular, en cambio, al aumentar los niveles se promovía el crecimiento de la raíz. Las peroxidasas están presentes en el apoplasto de las tres zonas de la raíz. En las primeras dos zonas, la combinación de anión O_2^- con las peroxidasas produce el radical hidroxilo, el cual es necesario para la flexibilidad de la pared celular (Liszkay *et al.*, 2004). Por otro lado, la presencia de H_2O_2 y peroxidasas en la zona de diferenciación lleva a reforzar la pared celular mediante depósitos de lignina (Ros Barceló, 1997). UPBEAT1 (UPB1) es un TF que regula el balance entre proliferación y diferenciación en la raíz de *A. thaliana*. Este TF regula directamente la expresión de un conjunto de peroxidasas entre la zona de proliferación celular y la zona de elongación donde comienza la diferenciación, actuando como una señal que se mueve de célula a célula. La pérdida de función de este TF altera el balance redox y provoca un retraso en la diferenciación. Esta ruta funciona de forma independiente a las auxinas y a las CKs (Tsukagoshi *et al.*, 2010).

Tanto en animales como en plantas, las proteínas PROHIBITINAS (PHBs) se han identificado como reguladores negativos del ciclo celular en las células madre, compartiendo motivos conservados a lo largo de la evolución (Ahn *et al.*, 2006; Artal-Sanz y Tavernarakis, 2009). El genoma de *A. thaliana* contiene

siete genes *PHB* y, en concreto, PHB3 ha sido previamente relacionada con el control de la división en la punta de la raíz y el funcionamiento mitocondrial en los tejidos meristemáticos (Van Aken *et al.*, 2007). Actualmente, Kong *et al.* (2018) demostraron que PHB3 es esencial para el mantenimiento del QC, donde inhibe la proliferación celular, y las células madre de la columela y controla la actividad del meristemo restringiendo la expresión espacial de los factores de respuesta a ROS *ERF115*, *114* y *109*. Además, recientemente se ha propuesto a PHB3 como un co-regulador transcripcional que reprime la expresión de genes *MINICHROMOSOME MAINTENANCE (MCM)* para el mantenimiento de la integridad del genoma y así, la proliferación celular en las células madre de la raíz de *A. thaliana*. Esta función la realiza a través de una localización dual entre mitocondria y núcleo (Huang *et al.*, 2019).

5. El óxido nítrico (NO) en el desarrollo y mantenimiento del nicho de células madre de la raíz.

5.1. Concepto químico y biológico del NO.

El NO se define como una RNS, siendo una molécula gaseosa diatómica sin carga que puede difundir libremente en el citoplasma y cruzar la bicapa lipídica hacia el espacio extracelular y *vice versa* (Subczynski *et al.*, 1996). Químicamente, el NO puede aceptar o donar un electrón, alternativamente entre tres estados redox que incluyen el anión nitroxilo (NO^-), el radical sin carga ($NO\cdot$) con un electrón desapareado en el orbital 2p, y el catión nitrosonio (NO^+).

Estas RNS tienen diferentes propiedades químicas, lo que explica las diversas reacciones que ocurren en los sistemas biológicos en los que participan. A su vez, puede convertirse a dióxido de nitrógeno (NO_2), trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), o peroxinitrito (ONOO^-) y reaccionar con tioles, aminas secundarias o aminas aromáticas (Stamler *et al.*, 1992).

Por otra parte, comparado con otros radicales libres, tiene una vida biológica media relativamente larga debido a que no dimeriza ni sufre dismutación. A concentraciones bajas, menos de $1 \mu\text{mol/l}$, su vida media puede llegar incluso hasta minutos y puede difundir sobre varias capas celulares o distancias largas en el espacio intercelular. Por el contrario, a concentraciones altas, tiene una vida media mucha más corta, del orden de segundos (Henry *et al.*, 1997). La vida media también depende de la concentración local de sus dianas, por ejemplo, proteínas, grupos hemo, hierro, cobre, cisteínas, ASC, O_2 y H_2O_2 . Es más, el NO puede reaccionar directamente con las ROS, y esta interacción puede ser tanto citotóxica como protectora, dependiendo de la concentración relativa de la ratio ROS/NO (Delledonne *et al.*, 2001; Beligni *et al.*, 2002).

En 1992, fue reconocida como molécula del año por la revista *Science*. Así, en las últimas décadas se ha propuesto al NO como una molécula señalizadora a la que se le ha asignado un papel en el proceso de diferenciación, auto-renovación y pluripotencia (Tejedo *et al.*, 2010) en células madre animales, entre otros muchos papeles fisiológicos. Hasta una fecha reciente, la investigación sobre los efectos del NO en las plantas se centraba en la contaminación atmosférica causada por los óxidos de nitrógeno, NO y NO_2 . Posteriormente, se demostró que las plantas no solo responden al

NO atmosférico, sino que también producen cantidades considerables del gas. El NO es una molécula bioactiva que tiene un papel muy importante en la regulación de un rango amplio de respuestas fisiológicas durante el crecimiento y desarrollo vegetal (Shapiro, 2005; Palavan-Unsal y Arisan, 2009). Como regulador del desarrollo, promueve la germinación, el desarrollo de la hoja, el crecimiento de la raíz, la floración, y retrasa la senescencia foliar y la maduración del fruto (Neill *et al.*, 2003). Como modulador de la resistencia a enfermedades desencadena la respuesta hipersensible, la muerte celular programada, y puede activar la expresión de varios genes de defensa (Romero-Puertas *et al.*, 2004). Del mismo modo, el NO participa en el gravitropismo de la raíz (Hu *et al.*, 2005).

5.2. Origen del NO en plantas.

Los mecanismos de síntesis del NO en plantas se clasifican, de forma general, en rutas reductoras y rutas oxidativas, existiendo procedencias múltiples. Las rutas mejor estudiadas y caracterizadas en el reino vegetal son las reductoras (Astier *et al.*, 2017), que consisten en la reducción de nitrito a NO. Por una parte, esta reducción puede ocurrir de forma no enzimática bajo condiciones de pH ácido (< 4), pudiéndose demostrar en capas de aleurona de cebada por Bethke *et al.* (2004). Conforme a este estudio, dado el pH tan ácido requerido para la reacción, este mecanismo de síntesis queda restringido al apoplasto en zonas determinadas de la planta como las semillas o las raíces y, probablemente, no ocurre en partes verdes. El mecanismo de síntesis de NO de mayor importancia en plantas, sin embargo, es la reducción enzimática de nitrito. La

principal enzima que cataliza esta reacción es la nitrato reductasa (NR) citosólica, cuya principal actividad es la reducción de nitrato a nitrito como primer paso de la ruta de asimilación de nitratos, pero que también reduce nitrito a NO a expensas de NAD(P)H (Yamasaki *et al.*, 1999). Además de la NR citosólica, se han identificado otras enzimas que catalizan la reducción de nitritos a NO. Por una parte, una nitrato:NO reductasa (Ni:NOR) presente en la membrana plasmática de células de la raíz participa en la síntesis de NO a partir del nitrito generado por una NR de membrana, en condiciones de hipoxia (Stöhr *et al.*, 2001). Esta actividad parece ser muy dependiente de la disponibilidad de nitrato en el suelo (Stöhr *et al.*, 2006). También se ha propuesto que otras enzimas que contienen un cofactor de molibdeno (xantina, aldehído y sulfito oxidasas) puedan catalizar esta reacción, aunque los datos *in planta* aún son insuficientes y tal actividad no está confirmada (Maia y Moura, 2015). Por último, el nitrito puede funcionar como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial en condiciones de anoxia, quedando reducido a NO. Este mecanismo no solo responde al mantenimiento del metabolismo de la mitocondria, sino que el NO generado tendría funciones de señalización (Gupta *et al.*, 2011b).

La síntesis por rutas oxidativas es el principal mecanismo de producción de NO en mamíferos gracias a la enzima NO sintasa (NOS), que cataliza la formación de NO y L-citrulina a partir de L-arginina a expensas de NADPH y O₂ (Förstermann y Sessa, 2011). Dada la relevancia de la NOS en la producción de NO en animales, se inició la búsqueda de una enzima equivalente en el reino vegetal. Guo *et al.* (2003) reconocieron a la proteína NITRIC OXIDE SYNTHASE 1 (NOS1) como posible NOS-like en plantas superiores

dados los niveles reducidos de NO en el mutante *nos1*; sin embargo, se descubrió que, en realidad, se correspondía con una GTPasa (Moreau *et al.*, 2008) y se renombró como NITRIC OXIDE-ASSOCIATED 1 (NOA1). Pese a la existencia de publicaciones que han hallado indicios de la existencia de una actividad NOS-like vegetal (Astier *et al.*, 2017), en el presente no existe una enzima descrita en plantas terrestres. En efecto, se ha descartado que tal actividad en plantas esté catalizada por una enzima con homología estructural a la NOS de mamíferos (Jeandroz *et al.*, 2016) y, actualmente, se propone la existencia de un complejo multiproteico (Corpas y Barroso, 2017). Sin embargo, se ha encontrado homología estructural a la enzima NOS de mamíferos en varias especies de algas (Jeandroz *et al.*, 2016). El primer trabajo caracteriza en *Ostreococcus tauri* una proteína con un 42 % de similitud a una isoforma de la enzima NOS humana, conteniendo ambas dominios claves para su función (Foresi *et al.*, 2010).

Por otra parte, existen estudios que relacionan los fenotipos contradictorios de *atnoa1* en cuanto a la acumulación de NO con la fuente de carbono en el medio de crecimiento (Van Ree *et al.*, 2011). Así, este mutante acumula niveles basales de ácido salicílico (SA) y NO cuando crece en un medio que contiene sacarosa. Por el contrario, cuando crece en ausencia de sacarosa posee niveles bajos de fumarato y clorofila, hojas verdes pálidas y un crecimiento lento, además de poseer niveles disminuidos de NO. Estos fenotipos son consistentes con un defecto en los cloroplastos y se pueden revertir con un suplemento de sacarosa en el medio. Así, AtNOA1 tiene un papel importante en la función cloroplástica y la alteración en los niveles de NO pueden deberse a un efecto indirecto.

Dada su naturaleza de radical libre, el exceso de NO en la célula resulta tóxico. Además, para que el NO pueda funcionar como señal específica debe haber rutas que reviertan sus efectos. Estos dos factores determinan la importancia de la existencia de mecanismos de secuestro, metabolismo y almacenamiento de NO en la planta (Mur *et al.*, 2013). El S-nitrosoglutatión (GSNO) se forma por nitrosilación de GSH y constituye la principal forma de reserva intracelular de NO. Dado que el GSNO puede actuar como donador de NO (bien liberando el radical libre por ruptura homolítica o bien por transnitrosilación), el contenido celular de esta molécula es un punto de regulación clave (Malik *et al.*, 2011). La enzima GSNO reductasa (AtGSNOR) cataliza la reducción de GSNO hasta GSSG y amonio; por tanto, es la principal reguladora tanto de las reservas de GSNO como de S-nitrosotioles totales (Feechan *et al.*, 2005). Por otra parte, las hemoglobinas vegetales no simbióticas (nsHb) de clase I, renombradas hoy como fitoglobinas (Hill *et al.*, 2016), constituyen un importante mecanismo de secuestro y detoxificación de NO (Gupta *et al.*, 2011a), gracias a la oxidación enzimática del NO hasta nitrato y al secuestro de NO del GSNO por transnitrosilación.

5.3. Efectos del NO en la expresión génica.

Los efectos de este gas vienen mediados según sea su ubicación, así como la fuente de producción y la concentración en la célula (Roszer *et al.*, 2014). Así, promueve el crecimiento a bajas concentraciones, mientras que lo inhibe a altas (Prado *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2009). Sirviendo de ejemplo, de forma similar al efecto en hojas (Leshem y Haramaty, 1996), se observó un incremento en la

expansión tisular en las raíces, únicamente a concentraciones bajas, mientras que concentraciones altas inhibieron el proceso (Gouvea *et al.*, 1997).

Estos efectos se acompañan de cambios en la expresión génica, existiendo numerosos estudios que reflejan la diversidad de genes alterados en diferentes especies vegetales en respuesta o bien a NO endógeno o a diferentes tratamientos farmacológicos (Besson-Bard *et al.*, 2009). Entre las dianas se encuentran proteínas relacionadas con la patogénesis, otras relacionadas con neutralizar la toxicidad de esta molécula, como la enzima alternativa oxidasa (AOX1), proteínas relacionadas con el redox celular como la glutatión S-transferasa y la glutatión peroxidasa. De la misma forma, el NO altera genes de la biosíntesis de hormonas como el ET y JA, de moléculas como la lignina y el citocromo p450, proteínas quinasas, relacionados con procesos de adquisición de hierro y genes modulados por JA y SA, entre muchos otros. En general, las respuestas varían dependiendo de la especie vegetal, el tejido, el contexto fisiológico y la fuente de NO (Polverani *et al.*, 2003; Parani *et al.*, 2004; Besson-Bard *et al.*, 2009; Begara-Morales *et al.*, 2014). No obstante, Grün *et al.* (2006) señala que la aplicación de donadores de NO probablemente no refleje ningún aspecto espacio-temporal de la señalización de NO en plantas. Así, este gas afecta al nivel de expresión de un número bajo de genes en *A. thaliana*. Sin embargo, todos ellos pertenecen a categorías funcionales muy diversas, reflejo de la diversidad de competencias que se han asignado a esta molécula a lo largo de los años.

5.4. Efectos del NO en la actividad proteica.

La pregunta es cómo es posible que el NO afecte a la expresión de todos estos genes. La actividad de una gran diversidad de proteínas reguladoras se ve afectada considerablemente por el NO. En este contexto, se puede destacar que la formación de proteínas S-nitrosiladas es un mecanismo de especial importancia en la regulación de dicha actividad. Así el NO es responsable de llevar a cabo tres modificaciones post-traduccionales. La primera de ellas concierne la interacción de NO con metaloproteínas, denominada nitrosilación de metales. La segunda consiste en la modificación de residuos de tirosina en las proteínas por NO, formando 3-nitrotirosina por nitración. La última, denominada S-nitrosilación, radica en la formación de un grupo nitrosotiol en un residuo de cisteína de una proteína diana. Bajo diferentes condiciones, se pueden observar también otras modificaciones dependientes de derivados de NO, como por ejemplo la molécula GSNO, como la S-glutathionilación o la formación de puentes disulfuro (Astier y Lindermayr, 2012).

De manera resumida, debido a sus propiedades químicas, el NO puede interactuar con metales de transición de metaloproteínas, en concreto, el NO se une a centros de hierro, zinc o cobre. Además, esta unión es susceptible de ataques nucleofílicos, o con menor frecuencia, electrofílicos, dependiendo de la unión (Astier y Lindermayr, 2012). Estos complejos pueden inducir cambios en la conformación que alterarán la actividad de la proteína en cuestión, como la fitoglobina, el ejemplo mejor conocido en las plantas (Gupta *et al.*, 2011).

La nitración de tirosinas en plantas es una reacción entre un agente nitrante y un residuo de tirosina en una proteína llevando a la adición de un grupo nitro (NO₂) en la posición *orto* de un grupo hidroxilo fenólico. El grupo nitro se origina principalmente a partir de peroxinitrito. Esta modificación también puede surgir por la unión de NO a un radical tirosilo. Es una reacción específica y puede causar cambios conformacionales activando o inhibiendo a la proteína diana (Corpas *et al.*, 2013). Existen evidencias de la existencia de procesos de denitración, enzimática o no enzimáticamente. Lozano-Juste *et al.* (2011) identificaron 127 proteínas candidatas de sufrir esta modificación. Entre ellas, el 35% son proteínas que poseen homología con otras que han sido previamente identificadas en otros organismos y el 60% están relacionadas con el metabolismo primario.

Finalmente, la S-nitrosilación constituye la modificación post-traducciona dependiente de NO más estudiada y descrita en plantas. Es una unión covalente reversible de una molécula de NO a un grupo tiol de un residuo de cisteína, llevando a la formación de un grupo S-nitrosotiol (SNO). El catión NO⁺ es muy reactivo ante los grupos SH, sin embargo, funciona principalmente como precursor de otros óxidos de nitrógeno, los cuales mediarán la S-nitrosilación (Hill *et al.*, 2010). Esta reacción también puede lograrse a través de un intercambio de una molécula de NO desde una proteína S-nitrosilada a través de una reacción denominada trans-nitrosilación, siendo el GSNO uno de los principales actores de esta reacción (Kneeshaw *et al.*, 2014). La especificidad de esta modificación radica en la presencia de aminoácidos ácidos y básicos alrededor del residuo de cisteína, así como de la presencia de un bolsillo

hidrofóbico que pueda favorecer la concentración de los agentes nitrosilantes (Lamotte *et al.*, 2015). Es una reacción reversible para la que varios mecanismos de denitrosilación han sido propuestos, tanto enzimáticos como no (Kovacs y Lindermayr, 2013, Paris *et al.*, 2013). El estudio de esta modificación se ha llevado a cabo principalmente mediante el uso de la técnica del cambio por biotina o *biotin switch*. (Jaffrey *et al.*, 2001) (Figura IV).

Se han caracterizado numerosas proteínas que sufren esta modificación, por ejemplo, inhibe a la enzima peroxirredoxina II E (PrxII E) (Romero-Puertas *et al.*, 2007), o influye en la interacción entre las proteínas NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED 1 (NPR1) y el TF TGACG SEQUENCE-SPECIFIC BINDING PROTEIN 1 (TGA1) en la respuesta defensiva de la planta (Tada *et al.*, 2008, Lindermyer *et al.*, 2010).

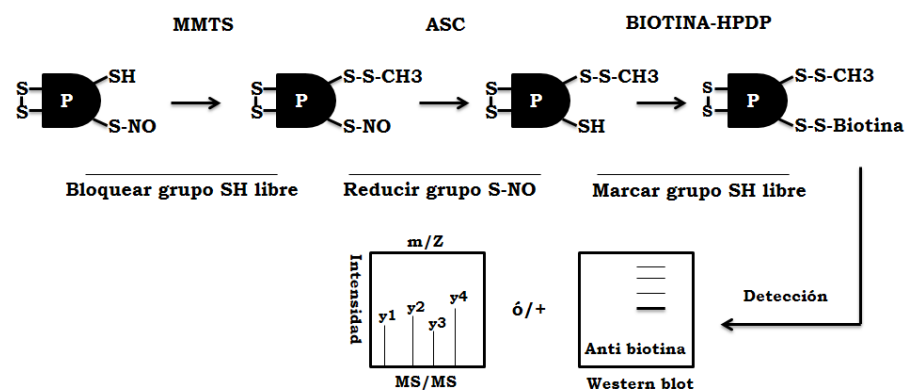


Figura IV. Esquema de la técnica "cambio por biotina" ("biotin switch") para la detección de proteínas S-nitrosiladas (grupo SNO), adaptado de Forrester *et al.*, 2009. En el primer paso, los grupos tioles libres (SH) se bloquean con metil-metano-tiosulfato (MMTS). A

continuación, los grupos SNO se reducen a SH de manera específica por la adición de ascorbato (ASC), a la vez que se vuelven a bloquear mediante Biotina-HPDP. Este último compuesto permite la detección mediante western blot con anticuerpo específico anti-biotina y adicionalmente, tras una digestión enzimática adecuada, la detección de péptidos modificados mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

5.5. Papel fisiológico del NO en el desarrollo radicular.

Como se ha nombrado previamente, la enzima AtGSNOR1 se ha descrito como el principal mecanismo de regulación de los niveles totales de SNO en la planta. La pérdida o ganancia de función del gen que codifica esta proteína altera considerablemente el crecimiento y desarrollo de la planta. Kwon *et al.* (2012) proponen que su actividad controla múltiples rutas genéticas, por ejemplo, la ramificación del tallo, el crecimiento del hipocotilo, el rendimiento de la semilla, el tiempo de floración y el desarrollo radicular. En concreto, regula el tamaño celular en el RAM y el crecimiento de la raíz primaria (Figura V) y raíces laterales, poniendo de relieve al NO como regulador clave en la arquitectura radicular.

Así, el grupo del doctor Lorenzo Lamattina (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina, CONICET), ha ofrecido a la comunidad científica numerosos trabajos que describen el papel del NO en el desarrollo radicular. Precisamente, el NO es necesario para la organogénesis radicular (Pagnussat *et al.*, 2002), la formación de raíces adventicias (Pagnussat *et al.*, 2003), raíces

laterales (Correa-Aragunde *et al.*, 2004), y pelos radiculares (Lombardo *et al.*, 2006).

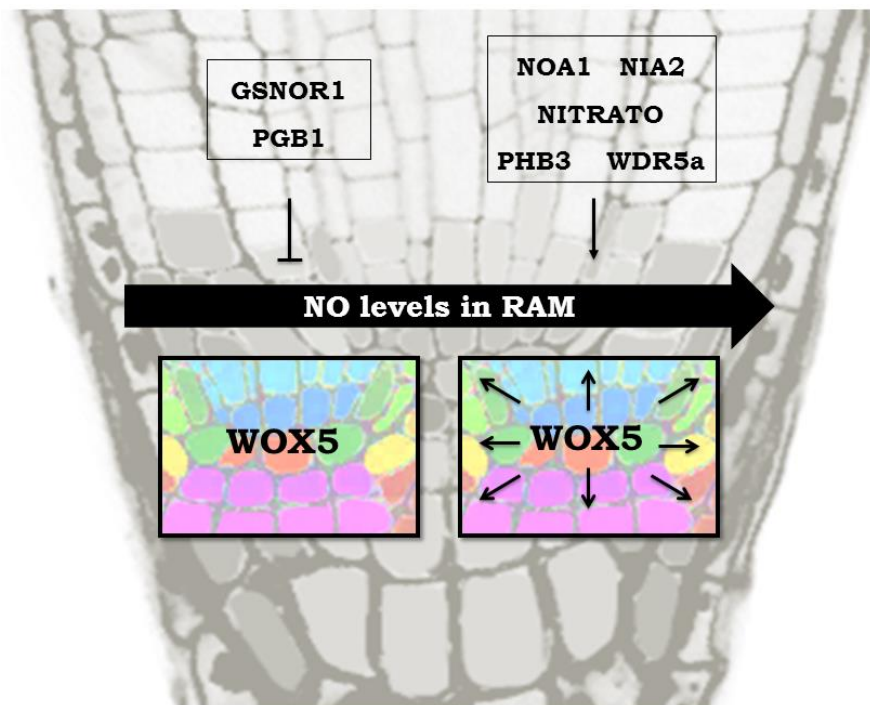


Figura V. Homeostasis del NO en el RAM de *Arabidopsis thaliana*. Los niveles de NO en el nicho de células madre se ven influenciados por múltiples factores. Por su parte, la perturbación en estos niveles conlleva una alteración del dominio de expresión de WOX5 en las células del centro quiescente y aquellas que lo rodean, promoviendo cambios en las rutas de regulación génica involucradas en el mantenimiento del conjunto de células madre. GSNOR1: GSNO REDUCTASA 1; NIA2: NITRATO REDUCTASA 2; NOA1: NITRIC OXIDE-ASSOCIATED 1; PGB1: FITOGLOBINA 1; PHB3: PROHIBITINA 3; WDR5a: WD40-REPEAT 5a.

Se ha establecido el papel esencial de la auxina en este proceso (Kramer y Bennett, 2006), y en relación, se identificaron tanto al NO como al cGMP como efectores de esta señalización (Pagnussat *et al.*, 2003). Últimamente, el NO aparece como molécula clave en el desarrollo radicular a través de la inducción de genes del ciclo celular y alterando la síntesis de celulosa (Correa-Aragunde *et al.*, 2006, 2008), influyendo en el tráfico vesicular (Lombardo y Lamattina, 2002) y en la disposición de las fibras de actina en el citoesqueleto (Yemets *et al.*, 2011).

Por otra parte, las mutaciones en dos genes que codifican enzimas arginina amidohidrolasas, *ARGAH1* y *ARGAH2*, produjeron un incremento de raíces laterales y adventicias, así como un aumento en la acumulación de NO. Estos mutantes mostraron una respuesta incrementada en los procesos anteriores cuando fueron expuestos a una auxina sintética. Se propone al aminoácido arginina o derivados del mismo como una fuente potencial del NO desde que una actividad arginasa reducida en los mutantes manifestó una conversión mayor de Arg a NO, potenciando así la acción de la auxina en la raíz en el entorno de la mitocondria, como órgano productor de NO (Flores *et al.*, 2008). Al mismo tiempo, se relacionó al NO y a la auxina en conjunto en los primordios de las raíces laterales a través de ruta reductora de la nitrato reductasa (Kolbert *et al.*, 2008), a diferencia de la ruta oxidativa expuesta anteriormente.

Las RNS como el NO también regulan el crecimiento de la raíz primaria y el transporte de auxinas en la misma (Fernández-Marcos *et al.*, 2011). Un incremento en los niveles endógenos de NO afecta al tamaño del meristemo, principalmente reduciendo la división celular

y, por otro lado, estimulando la diferenciación celular. A través de estudios genéticos de mutantes con niveles elevados de NO, como es el mutante acumulador de NO *cue1/nox1* (*chlorophyll a/b binding protein underexpressed/NO overproducer 1*), se observó una reducción en la expresión del promotor de respuesta a auxinas *DR5*, en el transporte de auxinas y en los niveles de PIN1 en la raíz primaria. Como consecuencia, estos mutantes tienen un fenotipo similar a aquel encontrado en el mutante *pin1*, observando desorganización en el QC y en las células adyacentes, en particular en las células madre de la columela. Se encontró que el número total de células entre el QC y el inicio de la zona de elongación en la capa de células del córtex se encuentra alrededor de la célula número 17, 33 y 28 en un tratamiento con SNAP, cPTIO y las plantas control, respectivamente. Así, los niveles de NO se correlacionan inversamente con el número de células en la zona meristemática, suprimiendo el pool de células en división y promoviendo la elongación celular en todos los tipos celulares del meristemo de la raíz (Fernández-Marcos *et al.*, 2011).

Desde que el NO se acumula en las células iniciales del córtex y endodermis, donde *NOA1* y *NIA2* se expresan particularmente (Figura V) (Sozzani *et al.*, 2010), se sugiere que existe una relación especial entre el NO y las divisiones en la capa celular de la endodermis. La actividad nitrato reductasa también influye en la homeostasis del RSCN (Sanz *et al.*, 2014). El doble mutante *nia1nia2*, deficiente tanto en niveles de NO como en la actividad enzimática nitrato reductasa, tiene un meristemo más pequeño, así como divisiones celulares anómalas, respaldando la idea de que las rutas de NO dependientes de nitrato ejercen una función en la

regulación del SCN. A la vez, el triple mutante deficiente en niveles de NO *nia1nia2noa1* exhibe una reducción en el tamaño de la raíz primaria con un meristemo menor y divisiones irregulares. Esto puede deberse a la acumulación de flavonoides más que a la homeostasis del NO, siendo evidente que la generación de NO en la planta sensible al tratamiento con L-NMMA (N-monometil-L-arginina), inhibidor de la actividad NOS en animales, es necesaria para la proliferación celular en la raíz (Sanz *et al.*, 2014). Aunque las mutaciones simples en *NOA1*, *NIA1* y *NIA2* apenas tienen efecto sobre la expresión de *WOX5*, sin embargo, el mutante *cue1/nox1* provocó una ligera expansión en el dominio de expresión de este marcador celular (Figura V). Por otro lado, los niveles del transcrito *WOX5* están disminuidos en el doble mutante *nia1nia2* y, por el contrario, los niveles de auxinas son mayores (Sanz *et al.*, 2014).

Un estudio reciente (Landrein *et al.*, 2018) muestra que un incremento en la producción de NO bajo altas concentraciones de nitrato (Figura V) influyen en la regulación de las células madre. Además, no se puede excluir la posibilidad de un incremento en la producción de NO en condiciones con niveles bajos de nitrógeno (Wany *et al.*, 2018).

Por su parte, aunque carente de fenotipo en plantas sin estrés, la sobreexpresión de la fitoglobina de clase 1 de *A. thaliana* (*AtPgb1*), mediado por ROS y ET, resulta ser clave en el mantenimiento del RAM bajo condiciones de estrés como la sequía (Mira *et al.*, 2017), indicando de nuevo que niveles óptimos de NO son fundamentales para un mantenimiento radicular adecuado con un meristemo funcional (Figura V).

Además, existen otros mecanismos que pueden relacionar la señalización de NO con los procesos de regulación del SCN. Bai *et al.* (2014) identificaron a PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF3), un componente principal en la señalización mediada por fitocromos, como un inhibidor del crecimiento radicular en plántulas de *A. thaliana* inducido por NO en condiciones de luz. La sobreexpresión del gen *PIF3* disminuye los efectos inhibitorios del NO en la raíz, ocurriendo lo opuesto en el mutante de pérdida de función.

Adicionalmente, el NO media la activación desencadenada por CKs del gen del ciclo celular *CYCD3*, lo que promueve la proliferación celular y el mantenimiento del meristemo (Shen *et al.*, 2013). A su vez, el NO regula negativamente la señalización de CKs mediante la S-nitrosilación de la proteína ARABIDOPSIS HISTIDINA FOSFOTRANSFERASA 1 (AHP1), reprimiendo la transferencia del grupo fosforilo en la cascada de señalización. Por ejemplo, el mutante *gsnor1-3* tratado con CKs muestra menor sensibilidad a esta hormona en la elongación radicular y en el RAM (Feng *et al.*, 2013).

Por su parte, Terrile *et al.* (2012) mostraron que la S-nitrosilación del receptor auxínico TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) en la cisteína 140 facilita la interacción TIR1-AUX/AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA), de tal forma que facilita la degradación de Aux/IAA y consecuentemente promueve la activación de la expresión génica. La inducción de raíces laterales dependiente de auxina y la inhibición de la elongación de la raíz primaria están afectadas en el mutante *tir1*, debido a la incapacidad del receptor de percibir la hormona. A su vez, la auxina participa en

el balance entre proteínas S-nitrosiladas/denitrosiladas en la raíz de plántulas de *A. thaliana* (Figura V). Correa-Aragunde *et al.* (2013) identificaron a la enzima ASCORBATO PEROXIDASA 1 (APX1) como una diana de este proceso, siendo más activa en su estado S-nitrosilado, contribuyendo al control del desarrollo radicular. Esta enzima tiene un papel clave en la redistribución adecuada de H₂O₂ en el crecimiento de la raíz y el desarrollo de raíces laterales. Por otra parte, el NO promueve la relocalización de la proteína PIN2 en las células de la epidermis durante la respuesta gravitrópica de la raíz, ejemplificando de nuevo que el NO regula el transporte polar de auxinas en la raíz. De esta forma, el NO es un regulador positivo del gravitropismo, probablemente actuando como un integrador de los niveles de auxinas en la raíz (Paris *et al.*, 2018).

Además, el NO también media la señalización de las GAs en el crecimiento radicular promoviendo la actividad de las proteínas represoras DELLA. Así, la aplicación de GAs restaura la inhibición provocada por el NO incrementando la expansión celular en la zona de elongación (Fernández-Marcos *et al.*, 2012).

Los resultados de Barrera-Ortiz *et al.* (2018) sugieren que el NO media la señalización de JA durante la configuración del sistema radicular. De esta manera, el JA induciría la producción de NO a través de *JAR1*, *COI1* y *MYC2* y activaría a *JAZ1* y *JAZ10* como dianas aguas abajo de este proceso. Además, el NO mediaría la señalización entre JA y ET a través de EIN2 en la organogénesis radicular en general y en la región meristemática en particular.

Por otra parte, se han descrito genes que afectan a la homeostasis del NO y a la arquitectura radicular al mismo tiempo (Figura V). La planta silvestre Col-0 incrementa sus niveles de NO

hasta ocho veces en respuesta a un tratamiento de 30 minutos con H₂O₂. De esta forma, se identificó al mutante *phb3* deficiente en la producción de NO tras este tratamiento. Además, presentó una menor sensibilidad al estrés salino (Wang *et al.*, 2010). Así, PHB3 no solo es esencial para el mantenimiento del SCN, sino que también lo es para la producción de NO durante las respuestas a estrés. Liu *et al.* (2018) describen a WD40-REPEAT 5a (WDR5a) como un nuevo factor que participa en el crecimiento de la raíz modulando la acumulación de NO. El mutante *wdr5a-1* acumula niveles menores de NO y produce raíces más largas que la planta control, presentando un meristemo con un mayor número de células, mientras líneas que sobreexpresan este gen, con un mayor contenido en NO, tienen el fenotipo opuesto. Por lo tanto, WDR5a participa en el mantenimiento del RAM modulando la homeostasis del NO y por consiguiente afectando a la acumulación de la auxina.

6. Familia TGA de los TFs de tipo bZIP.

6.1. Los TFs de tipo bZIP.

Los TFs tipo bZIP (*basic leucine zipper*) contienen una estructura bipartita, compuesta por una región rica en aminoácidos básicos con una secuencia de localización nuclear y, adyacente, se sitúa una zona rica en leucinas u otros aminoácidos hidrofóbicos, localizadas ambas regiones en una estructura alfa hélice. La región básica es la que entra en contacto con el ADN, en tanto que la cremallera de leucinas es la responsable de la homodimerización y heterodimerización de los monómeros proteicos, lo que genera

numerosas combinaciones posibles, entre ellos y con factores de otras familias (Corrêa *et al.*, 2008). Además, la regulación post-traducciona de los mismos puede abrir aún más la ventana de las propiedades regulatorias que pueden ejercer *in vivo*. Las proteínas con dominios bZIP están presentes en todos los eucariotas y, en particular, es una familia muy conservada en plantas. *A. thaliana* tiene cuatro veces más genes que codifican TFs tipo bZIP que el genoma de levadura, gusano y humano (Riechmann *et al.*, 2000). Estudios genéticos y moleculares han demostrado que estos TFs pueden participar en procesos biológicos diversos como la defensa contra patógenos y estrés, y las respuestas a luz, la maduración de semillas y el desarrollo floral, por ejemplo (Jakoby *et al.*, 2002).

6.2. La familia TGA de los TFs de tipo bZIP.

Dentro de los TFs de tipo bZIP, quizá la familia TGA (*TGACG motif-binding protein*) sea la más enigmática. Esta familia de proteínas reconoce a los elementos reguladores *cis* denominados secuencia de activación *as-1* (*activating sequence-1*), los cuales suelen contener dos copias en tándem del motivo TGACG, secuencia mínima de reconocimiento en los promotores de los genes diana, que ha dado lugar al nombre de esta familia (Lam *et al.*, 1989). Estas proteínas poseen cremalleras de leucinas especialmente cortas, con siete aminoácidos, algunos de los cuales en posiciones determinadas promueven la desestabilización de esta estructura. A pesar de esta característica, sin embargo, pueden formar tanto homodímeros como heterodímeros (Deppmann *et al.*, 2004).

Dentro de la familia, la región N-terminal es la parte más variable entre los miembros, pudiendo ser responsable de las distintas funciones que ejerce cada uno. En cambio, la parte C-terminal se encuentra conservada entre ellos. Todos los componentes de este grupo poseen, además, dos dominios ricos en glutamina (Q1, con 8 glutaminas en 29 residuos totales, y Q2, con 6 residuos de los 25 totales). Además, estos factores parecen contener residuos de cisteína cruciales que pueden ser dianas para ciertas modificaciones post-traduccionales que podrían alterar su función o unión al ADN (Gatz, 2013).

Por lo general, este grupo participa en tres procesos diferentes, como la defensa frente a patógenos, detoxificación y desarrollo, dado que el elemento *cis as-1* se encuentra en el promotor de genes como *PATHOGENESIS-RELATED 1 (PR-1)* y *GLUTATION S-TRANSFERASA (GST)* (Xiang *et al.*, 1997; Lebel *et al.*, 1998; Chen y Singh, 1999; Johnson *et al.*, 2001; Garreton *et al.*, 2002).

La familia está compuesta por diez miembros que se dividen en cinco subgrupos. El subgrupo 1 incluye a TGA1 (At5g65210), primer TF clonado en plantas (Vinson *et al.*, 1989, Katagiri *et al.*, 1989), y a TGA4 (At5g10030) (Zhang *et al.*, 1993). El subgrupo 2 abarca a los tres miembros más cercanos TGA2 (At5g06950) (Kawata *et al.*, 1992), TGA5 (At5g06960) (Zhang *et al.*, 1993) y TGA6 (At3g12250) (Xiang *et al.*, 1997), todos con un dominio N-terminal más corto que el resto. TGA3 (At1g22070) (Miao *et al.*, 1994) y TGA7 (At1g77920) (Zimmermann *et al.*, 2004) constituyen el subgrupo 3. *PERIANTHIA* (At1g68640) (Chuang *et al.*, 1999) y, por otro lado, TGA9 (At1g08320) y TGA10 (At5g06839) (Murmu *et al.*, 2010), conforman los dos subgrupos restantes (Jakoby *et al.*, 2002) (Tabla I).

Los esfuerzos para obtener fenotipos en plantas que únicamente contengan mutaciones en un único miembro han dado resultados negativos durante décadas de investigación. Sin embargo, se ha podido establecer el papel de TGA1 y TGA4, no solo en la resistencia basal contra patógenos (Gatz *et al.*, 2013), sino también como factores reguladores que median las respuestas mediadas por nitrato en raíces de *A. thaliana* (Álvarez *et al.*, 2014). Entre las rutas hormonales vegetales existen numerosas conexiones y los miembros del subgrupo 2 parecen ser importantes en varias de ellas. De esta forma, TGA2, TGA5 y TGA6 son necesarios para el establecimiento de la respuesta sistémica adquirida (SAR), efectiva frente a patógenos biotrofos, sin embargo, también parecen ser necesarios para el establecimiento de los mecanismos de defensa mediados por JA y ET que actúan contra los patógenos necrotrofos. Así, el efecto positivo de estos TFs sobre la señalización mediada por JA y ET se suprime en presencia de SA, siendo dos rutas antagónicas en la defensa de la planta (Zander *et al.*, 2010). Estos TFs también parecen ser esenciales en la conexión SA y ET (Zander *et al.*, 2014). Además, Stotz *et al.* (2013) proponen la existencia de dos rutas de señalización mediadas por oxilipinas. Una ruta regularía la expresión génica necesaria para la detoxificación de compuestos nocivos siendo regulada de manera positiva tanto por COI1 como por TGA2/5/6. Mientras que la otra ruta inhibiría el crecimiento radicular mediado por COI1, pero con una influencia negativa por parte de los TGAs.

De forma breve, se ha relacionado a TGA3 con la interacción hormonal entre SA y CKs (Choi *et al.*, 2010), a TGA9 y TGA10 con su función en el desarrollo de las anteras (Murmu *et al.*, 2010) y a

PERIANTHIA con su papel en los meristemos apicales (Maier *et al.*, 2009, de Luis Balaguer *et al.*, 2016). Hay poca información disponible del TF TGA7, aunque se podría inferir una función potencial utilizando su patrón de expresión (Zimmermann *et al.*, 2004). Se expresa especialmente en el xilema o bajo condiciones que inducen la diferenciación de este tejido (Gatz *et al.*, 2013).

Aunque TGA1, TGA2 y TGA3 pueden ser localizados, solo TGA2 se detecta en un contenido significativo en raíces (Lam y Lam, 1995). El estudio de Pontier *et al.* (2002) demuestra la existencia de mecanismos post-transcripcionales que controlan la presencia de TGAs específicos en diferentes tejidos durante el desarrollo, señalando la proteólisis como una estrategia para controlar la cascada de señalización de estos factores.

Tabla I. Funciones en el desarrollo e inmunidad vegetal descritas para los distintos miembros de la familia TGA.

Subgrupo	Miembro	Función	Referencia
1	TGA1	Control en la diferenciación de la fibra vascular	Ehltting <i>et al.</i> , 2005
	TGA4	Unión al promotor del gen <i>FLOWERING LOCUS</i>	Song <i>et al.</i> , 2008
	TGA1, TGA4	Resistencia basal independientemente de NPR1 en la inmunidad vegetal	Zhou <i>et al.</i> , 2000; Kesarwani <i>et al.</i> , 2007; Shearer <i>et al.</i> , 2012; Gatz <i>et al.</i> , 2013; Sun <i>et al.</i> , 2018
		Respuestas a SA a través de NPR1	Lindermayr <i>et al.</i> , 2010; Gatz <i>et al.</i> , 2013
		Respuestas a estrés mediadas por el retículo endoplasmático	Wang y Fobert, 2013
		Respuestas mediadas por nitrato en raíces de <i>A. thaliana</i>	Alvarez <i>et al.</i> , 2014; Canales <i>et al.</i> , 2017
		Respuesta hiponástica	Li <i>et al.</i> , 2018
Desarrollo de órganos laterales en el SAM	Wang <i>et al.</i> , 2019		
2	TGA2, TGA5, TGA6	Interacción con NPR1 por sistema de doble híbrido	Zhang <i>et al.</i> , 1999; Zhou <i>et al.</i> , 2000
		Activan resistencia sistémica adquirida mediada por SA contra patógenos biotrofos	Zhang <i>et al.</i> , 2003; Kesarwani <i>et al.</i> , 2007
		Interacción con SCL14 en respuestas a estrés	Fode <i>et al.</i> , 2008
		Disminuyen inhibición radicular mediada por oxilipinas	Mueller <i>et al.</i> , 2008; Stoz <i>et al.</i> , 2013
		Supresión de la señalización de JA a través de la señalización de SA mediada por la interacción de factores TGA y glutarredoxinas	Ndamukang <i>et al.</i> , 2007

		Resistencia a patógenos necrotrofos mediada por JA y ET	Zander <i>et al.</i> , 2010
		Inactivan la respuesta mediada por ET a través de la señalización de SA	Zander <i>et al.</i> , 2014
		Inducción de genes detoxificadores a través de la regulación negativa de ROXY19	Stoz <i>et al.</i> , 2013; Huang <i>et al.</i> , 2016
	TGA2, TGA5	Unión al promotor del gen PR	Hussain <i>et al.</i> , 2018
	TGA2	Interacción positiva con NPR1 y unión al promotor del gen PR en la señalización de SA	Després <i>et al.</i> , 2000; Fan <i>et al.</i> , 2002; Johnson <i>et al.</i> , 2003
		Interacción negativa con NPR1 para prevenir su unión al ADN	Boyle <i>et al.</i> , 2009
TGA5	Resistencia independiente de la SAR	Kim <i>et al.</i> , 2002	
3	TGA3	Regulación de calmodulina	Szymanski <i>et al.</i> , 1996
		Interacción con NPR1 por sistema de doble híbrido	Zhou <i>et al.</i> , 2000
		Expresión del gen PR en la señalización de SA	Zhou <i>et al.</i> , 2000; Johnson <i>et al.</i> , 2003
		Interacción con NPR3 y NPR4 por sistema de doble híbrido	Zhang <i>et al.</i> , 2006
		Intercomunicación entre SA y CK en la inmunidad vegetal	Choi <i>et al.</i> , 2010
		Unión al promotor de ROXY19 junto con TGA2 para la señalización del SA	Herrera-Vásquez <i>et al.</i> , 2015
		Síntesis de sulfuro de hidrógeno para la tolerancia a cromo	Fang <i>et al.</i> , 2017
	Unión al promotor del virus del rizado de la hoja amarilla de <i>Cestrum</i> junto con WRKY53 vía SA y NPR1	Sarkar <i>et al.</i> , 2018	
	TGA7	Respuesta a contaminación por cesio	Hampton <i>et al.</i> , 2004
		Expresión en el xilema	Gatz <i>et al.</i> , 2013
Respuesta a NO en la elongación del hipocotilo		Castillo <i>et al.</i> , 2018	
4	PAN	Desarrollo del meristemo apical del tallo	Chuang <i>et al.</i> , 1996; Running y Meyerowitz, 1996; Maier <i>et al.</i> , 2009; Maier <i>et al.</i> , 2011
		Desarrollo del meristemo floral y el gineceo	Das <i>et al.</i> , 2009; Wynn <i>et al.</i> , 2014; Gutsche and Zachgo, 2016
		Desarrollo del pétalo mediado por ROXY1	Li <i>et al.</i> , 2009, Gutsche <i>et al.</i> , 2017
		Desarrollo de la hoja y la flor mediado por BOP1 y BOP2	Hepworth <i>et al.</i> , 2005, Xu <i>et al.</i> , 2010
		Desarrollo del meristemo apical de la raíz	Nawy <i>et al.</i> , 2005; Lee <i>et al.</i> , 2006; de Luis Balaguer <i>et al.</i> , 2017
5	TGA9, TGA10	Desarrollo de anteras mediado por ROXY1 y ROXY2	Murmu <i>et al.</i> , 2010
		Señalización mediada por ROS en respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos	Noshi <i>et al.</i> , 2016

6.3. Relación entre la familia TGA y la familia NPR

El genoma de *A. thaliana* contiene seis genes de la familia NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES (NPR), denominados NPR1-4, NPR5/BLADE-ON-PETIOLE2 (BOP2) y NPR6/BLADE-ON-PETIOLE1 (BOP1). En su estructura proteica se encuentran dos dominios de interacción proteína-proteína de tipo BTB/POZ (Broad-Complex, Tramtrack, and Bric-abrac/Pox virus and Zinc finger), involucrado en la degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma, y una serie de cuatro repeticiones ankirina, que permiten la interacción con los TFs de la familia TGA (Aravind y Koonin, 1999; Sedgwick y Smerdon, 1999). NPR1 es una proteína con funciones clave en varios aspectos de la respuesta inmune de las plantas. Por una parte, es esencial para el establecimiento de la SAR (Cao *et al.*, 1994), que consiste en una resistencia a patógenos inducida en tejidos alejados del sitio de infección y mediada por una acumulación de SA y proteínas PR. También interviene en el desarrollo de la resistencia sistémica inducida (ISR) (Pieterse *et al.*, 1998), una respuesta que se desencadena por la interacción con rizobacterias no patogénicas y es independiente de SA, y en la interacción entre SA y JA (Spoel *et al.*, 2003), consistente en la represión de la síntesis y señalización de esta última hormona al haber una acumulación de SA. Salvo un papel secundario en la percepción del SA (Canet *et al.*, 2010), se desconocen las funciones de NPR2, el parálogo de NPR1 con mayor homología en la secuencia primaria. NPR3 y NPR4, por el contrario, se han caracterizado como receptores de SA, que se unen a esta molécula con diferentes

afinidades y regulan la degradación de NPR1 por la vía ubiquitina-proteasoma mediante un mecanismo dependiente de la concentración de SA (Fu *et al.*, 2012). Por su parte, BOP1 y BOP2 (NPR6 y NPR5, respectivamente) son la pareja de proteínas más divergente de la familia NPR y, de hecho, carecen de secuencia de localización nuclear reconocible. Aunque se ha descrito un papel de estas proteínas en la inmunidad de la planta como mediadoras de la resistencia inducida por jasmonato de metilo (Canet *et al.*, 2012), sus funciones más estudiadas son como reguladoras del desarrollo; especialmente, en el establecimiento de ejes de asimetría en la organogénesis de hojas y flores (Hepworth *et al.*, 2005). BOP1 y BOP2 actúan de forma redundante en el establecimiento del eje de asimetría proximal-distal de la hoja. En el doble mutante *bop1bop2*, las hojas presentan una morfología alterada con ausencia de patrón de asimetría proximal-distal (característica que da nombre a la mutación) y son anormalmente largas. Por otra parte, la arquitectura floral se encuentra alterada, dado que, mientras que en plantas silvestres de *A. thaliana* las flores poseen cuatro pétalos y presentan simetría radial, el mutante *bop1bop2* tiene flores con simetría bilateral y cinco pétalos, alteración que se debe a la aparición ectópica de órganos en el lado abaxial. Otra característica fenotípica de este mutante es la no abscisión de las flores tras la polinización, lo cual responde a un defecto en el desarrollo de la zona de abscisión (McKim *et al.*, 2008). Xu *et al.* (2010) describieron, además, un papel en la determinación del meristemo floral para estas proteínas, en una ruta independiente de LEAFY (LFY), regulando positivamente la expresión del marcador de identidad del

meristemo floral *APETALA1* (*AP1*). En general, BOP1/2 ejercen sus funciones en el desarrollo de la planta a través de su expresión en los límites de los órganos laterales y se consideran marcadores de esta zona de células (Khan *et al.*, 2014). Todos los órganos de la parte aérea de la planta se generan a partir del meristemo apical caulinar (SAM) por delimitación de los primordios correspondientes mediante una zona de transición de células indiferenciadas denominada límite de los órganos laterales. BOP1/2 se expresan en esta zona poco después de la iniciación del SAM y actúan modulando la expresión de genes que promueven la diferenciación y antagonizan la actividad meristemática, como *ASYMMETRIC LEAVES2* (*AS2*) (Jun *et al.*, 2010). Aunque las funciones descritas de BOP1/2 en el desarrollo de la planta son esencialmente en las partes aéreas, se ha encontrado que dos ortólogos de BOP2 en leguminosas, *COCHLEATA* (*COCH*) en guisante y *NODULE ROOT* (*NOOT*) en *Medicago truncatula*, son esenciales para el mantenimiento de nódulos en las interacciones simbióticas con rizobios fijadores de nitrógeno (Couzigou *et al.*, 2012). Recientemente, Woerlen *et al.* (2017) describieron un papel de BOP1/2 en el crecimiento secundario de la raíz, ya que su represión por parte del TF *KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA1* (*KNAT1*) es esencial para la diferenciación del xilema secundario.

TGA3, TGA5, TGA6 y TGA7 interactúan con NPR1, sin embargo, TGA1 y TGA4 únicamente muestran interacción tras la inducción por SA en hojas (Zhang *et al.*, 1999; Després *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000; Kim y Delaney, 2002), a través de su dominio C-terminal (Zhou *et al.*, 2000; Fan y Dong, 2002). Lo mismo ocurre con TGA2 y NPR1, los cuales no interactúan en el núcleo hasta

después de la inducción mediada por SA (Rochon *et al.*, 2006). En un estado basal, donde NPR1 y TGA2 no interactúan, TGA2 forma un oligómero capaz de unirse al promotor de genes como *PR*, reprimiendo así la transcripción mediante mecanismos desconocidos. Esta represión es dependiente del dominio N-terminal de TGA2. Tras la inducción por SA, el dominio BTB/POZ de NPR1 se encarga de desmontar los oligómeros de TGA2 y reclutar su correspondiente dímero sobre el ADN, excluyendo otros complejos superiores de unión al ADN. El complejo TGA2-NPR1 posee una estequiometría 2:2 (TGA2:NPR1). Así, el dominio BTB/POZ de NPR1 dimeriza e interactúa con el dominio represor N-terminal de TGA2, impidiendo así su capacidad de unión al ADN como oligómero (Boyle *et al.*, 2009).

La interacción dependiente del redox solo está descrita para TGA1 y TGA4, sin embargo, la interacción de NPR1 con el resto de TGAs parece ser independiente del estado redox celular (Zhang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Després *et al.*, 2003). NPR1 y TGA1 son dos proteínas descritas por su regulación redox (Després *et al.*, 2003). Ambas proteínas interactúan en su estado reducido, lo que resulta en una mejor unión de TGA1 al ADN y la activación de los genes *PR* (Després *et al.*, 2003; Pieterse y Van Loon, 2004). Lindermayr *et al.* (2010) demostraron que TGA1 se modificada estructuralmente por GSNO y H₂O₂. Bajo condiciones oxidantes, TGA1 se encuentra en su forma inactiva a través de puentes disulfuro entre las cisteínas 260 y 266. La modificación que lleva a cabo la molécula de GSNO altera la conformación de TGA1 y así su unión al ADN. En plantas tratadas con SA, las cisteínas de TGA1 se encuentran en su forma reducida permitiendo así la interacción

entre NPR1 y TGA1. De manera interesante, NPR1 mejora la unión al ADN de TGA1 en su estado reducido, sin embargo, también mejora la unión cuando TGA1 se encuentra *S*-nitrosilado. Aparentemente, las modificaciones que lleva a cabo la molécula de GSNO en TGA1 y NPR1, este último también sufre *S*-nitrosilación en la cisteína 156 (Tada *et al.*, 2008), permiten una interacción más efectiva entre TGA1 y NPR1 y, como consecuencia, una mejor unión al ADN. Esta actividad mejorada de NPR1 mediada por el NO es bastante sorprendente desde que la *S*-nitrosilación de NPR1 facilita su oligomerización y así su localización en el citoplasma. La forma monomérica de NPR1 se cataliza a través de la acción de la tiorredoxina h5, con actividad SNO-reductasa (Kneeshaw *et al.*, 2014), que promueve su reducción y translocación al núcleo. Sin embargo, esta translocación también se induce por GSNO. Aunque parezca contradictorio, esto puede deberse a que la forma monomérica de NPR1 tan solo sea su forma de transporte y NPR1 vuelva a ser *S*-nitrosilado en el núcleo.

La mutación de las cisteínas 172 y 287 en TGA1 impide la formación del puente disulfuro entre las anteriores, probablemente debido a un cambio en la conformación que da lugar a un impedimento estérico. Sin embargo, la mutación en las cisteínas 260 y 266 permite que se puedan formar puentes disulfuro entre la 172 y la 287. Curiosamente, la transformación del doble mutante *tga1tga4* con una versión mutada de TGA1 (C172S/C287S) da lugar a una sobreexpresión de los genes *PR2* y *PR5*. Este resultado demuestra que la reducción de estas cisteínas es importante para la función de TGA1 desde que estas mutaciones imitan su estado reducido.

Además, recientemente se ha descrito una función común para el clado I (TGA1 y TGA4) y BOP1 y BOP2, controlando una misma ruta genética en la arquitectura floral. En concreto, se ha demostrado su unión conjunta al promotor de *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX GENE1 (ATH1)* contribuyendo a su activación (Wang *et al.*, 2019).

Además de estas interacciones, también se ha descrito la interacción entre los factores TGA y las proteínas NPR3 y NPR4, llevando a su degradación a través del proteasoma, regulando así la degradación de los TGAs mediada por SA (Zhang *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2012; Kazan, 2018). Existen otras proteínas que interaccionan con miembros de la familia TGA en promotores relacionados con la señalización de SA, pero de una manera independiente a NPR1. Es el caso de SCARECROW-like 14 (SCL14), un componente de la familia GRAS de TFs. TGA2/5/6 reclutan a SCL14 sobre promotores de genes involucrados en procesos de detoxificación de xenobióticos y posiblemente metabolitos endógenos nocivos (Fode *et al.*, 2008).

6.4. Relación entre la familia TGA y diferentes glutaredoxinas.

Una característica inequívoca que diferencia a los animales de las plantas es que estas últimas son organismos sésiles. De esta forma, las plantas sometidas a condiciones de estrés desarrollan estrategias que se limitan a nivel de órgano, célula o incluso orgánulo. Sin embargo, muchos programas de desarrollo son indeterminados, permitiendo la generación de nuevos órganos de una manera mucho más flexible que en animales. Todas estas características abren la puerta a la influencia particular que pueden ejercer los cambios

redox en estos procesos y en la interrelación entre el ambiente y la fisiología interna del vegetal (Foyer y Noctor, 2016).

Las glutarredoxinas (Grx), pertenecientes a la superfamilia tiorredoxina (TRX) (Meyer *et al.*, 2009), son enzimas de tipo oxidorreductasa de bajo peso molecular que poseen dos residuos de cisteína, capaces de reducir un puente disulfuro normalmente usando GSH como donador de electrones (Rouhier *et al.*, 2006). A su vez, estas enzimas pueden ser reducidas o bien por GSH o bien por una tiorredoxina reductasa (Rouhier *et al.*, 2008). En plantas, las Grx están involucradas en procesos de estrés oxidativo, regeneración de enzimas, regulación de TFs, así como en procesos de deglutationilación (Rouhier *et al.*, 2010). Estas enzimas catalizan la reducción de residuos de cisteína, influyendo así en el estado redox de la proteína con propósitos reguladores. Este residuo aminoacídico es muy versátil, gracias a su grupo tiol, pudiendo sufrir diversas modificaciones post-traduccionales, lo que permite, por un lado, una regulación rápida de las proteínas y, por otro, la discriminación entre la señalización mediada por diferentes rutas hormonales o moléculas señalizadoras (Findling *et al.*, 2018).

Se han identificado 31 isoformas diferentes de Grx en plantas superiores, mientras que sólo 6 en el alga *Chlamydomonas reinhardtii* y 3 en la cianobacteria *Synechocystis* sp (Lemaire, 2004; Rouhier *et al.*, 2004; 2006). En plantas terrestres, incluidos los musgos, las Grx se pueden clasificar en 4 subgrupos. Todas ellas conservan tanto varios motivos como la estructura tridimensional, y poseen una cisteína o una serina en la cuarta posición de su sitio activo (CxxC o CxxS) (Rouhier *et al.*, 2004). La primera clase, o

aquellas conocidas como Grx tipo-CPXC, contienen Grx con motivos C[P/G/S][Y/F][C/S] y son homólogas a las clásicas Grx conocidas en *E.coli* con mecanismo ditiol. La segunda clase, o Grx tipo-CGFS, tienen el sitio activo conservado de manera estricta. Ambas clases están presentes en todos los organismos fotosintéticos. La tercera clase, o tipo-CC, reagrupa aquellas que contienen sitios activos CC[M/L][C/S/G/A/T], y son específicas de las plantas terrestres, mientras que están ausentes en los genomas de organismos fotosintéticos inferiores, bacterias y mamíferos. La cuarta clase, presente en algas y plantas terrestres, incluye aquellas que contienen un dominio CXXC/S en la parte N-terminal y otros dos dominios de función desconocida.

Las Grx tipo-CC interactúan con la familia TGA de TFs de tipo bZIP para controlar procesos de desarrollo y asociados con estrés. Recientemente, se ha descrito que estas enzimas atraen al co-represor transcripcional TOPLESS a los promotores de los genes diana de los TFs tipo TGA (Uhrig *et al.*, 2017). ROXY1 interactúa diferencialmente en ensayos de doble híbrido con 8 miembros de la familia TGA, mostrando una fuerte afinidad por TGA3, TGA7 y PAN, una afinidad intermedia por TGA2 y afinidad débil por TGA1 y TGA4-6. Mediante experimentos de complementación bimolecular fluorescente (BiFC) *in planta* se demostraron aquellas interacciones correspondientes a las afinidades fuertes e intermedias (Li *et al.*, 2009). La interacción específica de ROXY1 con diferentes factores del tipo TGA sugiere que esta enzima podría estar involucrada en modificaciones post-traduccionales de estos TFs, y así se relaciona con procesos en los que estos últimos intervienen. El dominio N-terminal parece no participar en la interacción con los TGAs, sin

embargo, un motivo conservado en el dominio C-terminal denominado AI/LWL es importante en esta interacción y para su función descrita en el desarrollo de los pétalos, aunque no para su localización (Li *et al.*, 2011; Zander *et al.*, 2012). Además, también se ha demostrado la interacción entre TGA9 y TGA10 con ROXY1 en el núcleo de la célula vegetal y, peculiarmente, los mutantes en estos tres genes presentan todos defectos en la gametogénesis (Murmu *et al.*, 2010). Por otro lado, TGA2 interactúa con 17 de las 21 Grx CC-tipo presentes en el genoma de *A. thaliana* (Zander *et al.*, 2012).

Por otra parte, la enzima CC-tipo ROXY19 o Grx480, inducida por SA, interactúa con varios TGAs, participando así en la interrelación existente entre las hormonas SA y JA, en concreto reprimiendo la transcripción del gen *PDF1.2* (Ndamukong *et al.*, 2007) y esta interacción también depende del motivo ALWL (Zander *et al.*, 2012). Además, ROXY19 también es responsable de reclutar a TGA2/5/6 en el promotor del gen *ORA59* (*OCTADECANOID-RESPONSIVE ARABIDOPSIS APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR domain protein 59*) para reprimir su expresión en la interrelación entre SA y ET (Zander *et al.*, 2014). De esta forma, ROXY19 puede funcionar como regulador negativo de los promotores dependientes de los TGAs controlando varios procesos tanto de defensa como de detoxificación (Zander *et al.*, 2012, 2014; Huang *et al.*, 2016). Recientemente también se ha descrito la interacción entre los factores TGA1 y TGA4 con las Grx ROXY8 y ROXY9, clave en el crecimiento hiponástico (Li *et al.*, 2018).

7. PERIANTHIA (PAN).

7.1. PAN en el desarrollo floral.

La regulación de los TGAs se ha estudiado ampliamente y, en especial, la interacción con miembros de la familia NPR y diferentes enzimas Grx. Este tipo de interacciones modulan la actividad de los miembros de esta familia en general, y de manera específica, la actividad de PAN (Hepworth *et al.*, 2005; Fan y Dong, 2002; Rouhier *et al.*, 2004; Xing *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2011; Zander *et al.*, 2012). A pesar de estas semejanzas, PAN es una excepción en la familia TGA. Hace aproximadamente una década, los trabajos de Maier *et al.* (2009, 2011), colocaron a PAN en la red de regulación de las células madre de *A. thaliana*, definiendo a este factor como un modulador de este proceso. Mediante el uso del lenguaje informático, un modulador es un nodo dentro de una red de regulación de un determinado proceso, que, traducido a un lenguaje biológico, permite a un organismo vivir y crecer de manera óptima. Estos estudios y otros anteriores, determinaron su expresión en la parte aérea, comprendiendo el meristemo apical, el meristemo floral, en los primordios de los órganos en cada verticilo y en el primordio del óvulo (Chuang *et al.*, 1999). De esta forma, se establece que PAN participa en el desarrollo floral y regula el inicio del primordio del órgano floral (Running y Meyerowitz, 1996). La mayoría de las flores del ecotipo silvestre Col-0 de *A. thaliana* tienen 4 sépalos, 4 pétalos, 6 estambres y 2 carpelos, sin embargo, las flores del mutante *pan* muestran comúnmente 5 sépalos, 5 pétalos, 5 estambres y 2 carpelos, dando lugar a una flor con estructura pentámera (Running y Meyerowitz, 1996; Chuang *et al.*, 1999), característica de otras

familias, pero no de la familia *Brassicaceae* a la que pertenece *A. thaliana*. Así, PAN podría estar implicada en promover la simetría bilateral en el meristemo floral.

En el mismo sentido, PAN actúa aguas abajo de los genes de identidad del meristemo floral *LEAFY (LFY)*, *APETALA1 (AP1)* y *APETALA2 (AP2)*, pero independientemente de aquellos relacionados con el tamaño de este meristemo como *CLV1*, *CLV3* y *WIG* y aquellos relacionados con la identidad del órgano como *APETALA3*, *PISTILLATA* o *AGAMOUS* (Running y Meyerowitz, 1996; Running *et al.*, 1998). Además, actúa redundantemente con genes como *LEUNIG (LUG)*, *ETTIN (ETT)*, *TOUSLED (TSL)* y *ULTRAPETALA (ULT)* tanto en el inicio de los primordios de los órganos florales como en el desarrollo del gineceo o incluso parcialmente en el control del tamaño general del SAM (Running y Meyerowitz, 1996; Roe *et al.*, 1997; Sessions *et al.*, 1997; Chuang *et al.*, 1999; Fletcher *et al.*, 2001).

Las dos contribuciones más importantes de Maier y colaboradores fueron, en primer lugar, que PAN promueve la expresión del gen *AG* en condiciones de día corto en las células madre de la parte aérea para dar lugar a la determinación del meristemo floral y la formación de carpelos funcionales (Maier *et al.*, 2009). El modelo aquí propuesto es que *WUS* contribuye tanto a la expresión de *AG* como a la expresión de *PAN*. Una vez se ha acumulado la proteína *AG*, se suprimiría la transcripción de *WUS*, lo que a su vez provocaría una disminución de la actividad de PAN (Figura VI).

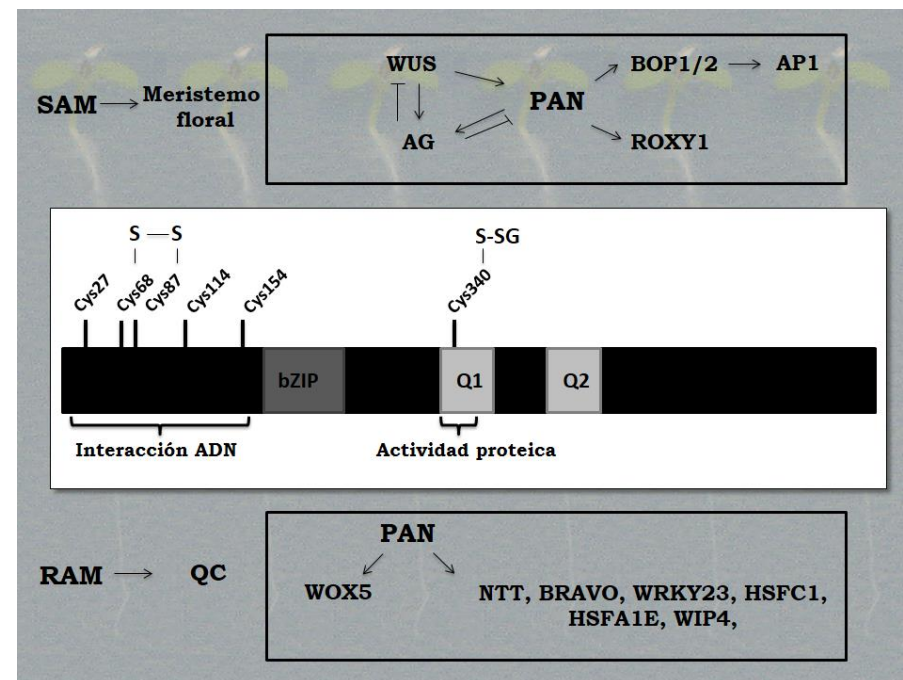


Figura VI. Resumen de la actividad funcional de PAN descrita en ambos meristemos (SAM y RAM) e interacciones conocidas. En la parte central, estructura bZIP de la proteína PAN y su regulación redox correspondiente al aminoácido cisteína. AG: AGAMOUS; AP1: APETALA 1; BOP1/2: BLADE ON PETIOLE 1/2; BRAVO: BRASSINOSTEROIDS AT VASCULAR AND ORGANIZING CENTER; bZIP: DOMINIO bZIP; HSFA1E: HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A1E; HSFC1: HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR C1; NTT: NO TRANSMITTING TRACT; PAN: PERIANTHIA; Q1/2: DOMINIOS RICOS EN GLUTAMINA; QC: CENTRO QUIESCENTE; RAM: MERISTEMO APICAL DE LA RAÍZ; SAM: MERISTEMO APICAL DEL TALLO; WIP4: WIP DOMAIN PROTEIN 4; WOX5: WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5; WRKY23: WRKY DNA-BINDING PROTEIN 23; WUS: WUSCHEL.

La interacción de PAN en el promotor de *AG* fue corroborada más tarde en el estudio de Das *et al.* (2009). La segunda fue que, en condiciones de día largo, PAN regula el mantenimiento de los procesos de proliferación celular en el centro del meristemo de la flor y también en otros meristemos aéreos, mediante su interacción con *CLV3* y *WUS* (Maier *et al.*, 2011). Asimismo, PAN no solo tiene una amplia expresión en el SAM y en flores, sino que también lleva a cabo diversas funciones en el mantenimiento del meristemo e integrando diferentes respuestas a señales ambientales. Análisis de expresión génica indican que PAN interacciona con multitud de rutas de desarrollo en la planta, incluyendo aquellas relacionadas con la luz y hormonales, señalando que PAN es un conector muy importante en el control de las células madre (Maier *et al.*, 2011).

7.2. Relación entre PAN y BOP1/2.

Debido a que el mutante pérdida de función *pan* presenta flores con cinco pétalos, de forma similar a las del doble mutante *bop1bop2*, se determinó que PAN coexpresa con BOP1/2 durante el desarrollo floral, participando en la misma ruta genética (Figura VI). Hepworth *et al.* (2005) demostraron mediante ensayos de doble híbrido en levadura que, de forma análoga a NPR1, BOP1 y BOP2 interactúan con TFs de la familia TGA pero con especificidades diferentes, mostrando preferencia por PAN. Por su parte, Xu *et al.* (2010) corroboraron tal interacción mediante BiFC en protoplastos de mesófilo de *A. thaliana* y comprobaron su localización en el núcleo celular. En esta publicación se describe la interacción BOP1/2-PAN para la unión a secuencias *cis* del promotor de

APETALA1 (AP1), como mecanismo de promoción de la identidad del meristemo floral.

7.3 Regulación redox de PAN

La casi ausencia de fenotipo en una planta transgénica que sobreexpresa PAN contrasta con la amplia expresión de este gen en la parte aérea y la especificidad en el fenotipo del mutante *pan*. Esto sugiere que su actividad podría estar siendo regulada post-transcripcional o post-traduccionalmente o incluso depender de otras proteínas.

7.3.1 Estudios redox *in vivo*.

En relación a su estructura proteica, PAN contiene seis residuos de cisteína susceptibles de sufrir modificaciones post-traduccionales (Figura VI). Cinco de ellos se encuentran situados en el dominio N-terminal, siendo únicos en PAN y ausentes en el resto de los miembros de la familia TGA. El sexto residuo, la cisteína 340, está presente en uno de los dominios ricos en glutamina, y es el residuo equivalente a la cisteína 260 de TGA1, conocida por formar un puente disulfuro con la cisteína 266, la cual no está presente en PAN.

Debido a que el mutante *pan* presenta cinco pétalos en lugar de cuatro, PAN podría controlar negativamente este proceso. Además, el doble mutante *roxy1pan* presenta cinco pétalos de la misma manera. Así, se ha postulado que, en su mecanismo de acción, ROXY1 regula la actividad de PAN, probablemente modificando post-traduccionalmente sus residuos de cisteína. Así, la

reducción de PAN vía ROXY1 promueve un patrón pentamérico en la formación de pétalos (Li *et al.*, 2009; Schippers *et al.*, 2016).

El fenotipo del doble mutante *roxy1pan* establece que PAN es epistático a ROXY1 con respecto a su función en el desarrollo del primordio del pétalo, participando ambos en la misma ruta genética (Figura VI). Además, estos pétalos exhiben una morfogénesis alterada imitando a aquellos observados en el mutante *roxy1*. Este fenotipo implica que ROXY1 posee una función adicional, pudiendo ser independiente de PAN, probablemente modificando a otras proteínas involucradas en la morfogénesis tardía del pétalo (Li *et al.*, 2009). De forma similar en maíz, la Grx tipo-CC *MALE STERILE CONVERTED ANTHER1 (MSCA1)* se une al TF tipo TGA *FASCIATED EAR4 (FEA4)* y ambos genes controlan el tamaño del meristemo (Pautler *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015), sugiriendo la importancia de estos mecanismos durante la evolución.

Experimentos en la planta terrestre *Marchantia polymorpha*, perteneciente a un género de musgos hepáticos de la familia *Marchantiaceae*, han permitido corroborar la actividad funcional entre la familia TGA y las Grx tipo-CC (Gutsche *et al.*, 2017). *M. polymorpha* contiene la mayoría de las familias génicas presentes en las plantas terrestres, sin embargo, con un número de genes bajo (Catarino *et al.*, 2016; Bowman *et al.*, 2017). Así, posee solo dos Grx tipo-CC, MpROXY1 y MpROXY2, y un único TF TGA, MpTGA, siendo así un organismo ideal para analizar el origen y evolución de la interacción ROXY/TGA y su actividad reguladora en el núcleo. MpROXY1/2 poseen el dominio típico en el sitio activo para su acción enzimática, y por su parte, MpTGA contiene el dominio bZIP y las regiones ricas en glutamina. Además, resulta muy interesante

que exista complementación del mutante *roxy1* de *A. thaliana* con aquellas proteínas de *M. polymorpha* (Gutsche *et al.*, 2017). La cisteína 231 en el dominio Q1 de MpTGA es equivalente a la número 340 en PAN y a la 261 en TGA1 de *A. thaliana*. Mediante análisis de la actividad de cada una de sus tres cisteínas (143, 199 y 231), se ha revelado la importancia de ambas, 143 y 231, en la actividad redox de este TF (Gutsche *et al.*, 2017). Además, mediante la técnica EMSA (ensayo de cambio en la movilidad electroforética) se demostró que la interacción entre MpROXY1/2 y MpTGA es necesaria bajo condiciones reductoras para la unión al elemento *cis as-1*, y su regulación redox es dependiente de la actividad Grx (Gutsche *et al.*, 2017).

7.3.2 Experimentos *in vitro*.

Como se ha citado anteriormente, PAN modula la expresión de AG mediante la unión al motivo AAGAAT en el segundo intrón de este gen (Maier *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2009). Las 33 pares de bases de este motivo, cuyo nombre proviene del inicio en 5' por la secuencia AAGAAT, incluye como secuencia de reconocimiento central la secuencia TGACG, el requerimiento mínimo para la unión al ADN de este tipo de TFs. Esta secuencia se encuentra, además, flanqueada por un par de elementos de unión tipo GARP (Maier *et al.*, 2009). Como curiosidad, este motivo también está presente en especies de monocotiledóneas (Causier *et al.*, 2009). En experimentos *in vitro*, se ha demostrado que PAN se une al motivo AAGAAT en condiciones reductoras, mientras que el tratamiento con diamida, un agente oxidante, reduce considerablemente esta interacción (Gutsche and Zachgo, 2016). Esta reversibilidad

permitiría un cambio específico y rápido en la actividad de la proteína. La reducción de la unión al ADN bajo condiciones oxidantes se mantiene cuando cada una de las cisteínas se muta a serina de manera independiente (Gutsche and Zachgo, 2016). Solo la sustitución de hasta cuatro residuos en el dominio N-terminal, o la mutación de todos ellos, lleva a la pérdida de la regulación redox (Gutsche and Zachgo, 2016). Otros TFs TGA, TGA1, 2, 3 y 10, como representantes de cada uno de los subgrupos de la familia, muestran unión bajo condiciones reductoras al motivo mencionado previamente, pero su unión no se altera si se modifican las condiciones redox (Gutsche and Zachgo, 2016).

De la incubación de PAN con diamida surgieron bandas de alto peso molecular indicando capacidad de oligomerización por parte de esta proteína, no ocurriendo lo mismo en una versión mutada de la proteína recombinante sin residuos de cisteína (Gutsche and Zachgo, 2016). Tras el tratamiento con diferentes compuestos, GSSG o GSH y H₂O₂ en conjunto, y su análisis posterior por espectrometría de masas, se detectaron dos modificaciones diferentes en diversas cisteínas de PAN (Figura VI), por un lado, S-glutacionilación de la cisteína 340, y por otro, la formación de un puente disulfuro entre las cisteínas 68 y 87, localizadas ambas en el dominio N-terminal (Gutsche and Zachgo, 2016). La S-glutacionilación podría tener un efecto protector y prevenir la oxidación irreversible del grupo tiol de la cisteína (Klatt y Lamas, 2000). Por su parte, la formación de puentes disulfuro puede regular la actividad proteica alterando su estado oligomérico (Chi *et al.*, 2013). No se pueden descartar, sin embargo, modificaciones

post-traduccionales adicionales que puedan contribuir a la regulación de PAN (Gutsche and Zachgo, 2016). Estos experimentos *in vitro* mediante EMSA muestran que la unión al ADN está mediada por una interacción entre las cinco cisteínas ubicadas en el extremo N-terminal, donde la cisteína 154 parece exhibir el efecto más fuerte en la sensibilidad redox. Sin embargo, la proteína con este residuo mutado aún puede complementar al mutante *pan* (Li *et al.*, 2009), mostrando la importancia de una actividad combinada de las cisteínas N-terminales. Una versión de la proteína sin cisteínas en este extremo no mostró una unión reducida al ADN en condiciones oxidantes. Esta observación refuerza la importancia *in vivo* de las cisteínas N-terminales para la función de PAN en el desarrollo de pétalos (Gutsche and Zachgo, 2016).

7.4 PAN en el RAM

En un estudio a gran escala Lee *et al.* (2006) observaron por primera vez transcripción de *PAN* en el QC y las células iniciales de la columela, mediante la fusión del promotor de *PAN* a la proteína GFP, generando la línea transcripcional *pPAN::GFP*. Los datos transcripcionales a gran escala pueden ser de gran utilidad para definir rutas de señalización en las plantas si se complementan con modelos de redes de regulación génica o GRN (*gene regulatory network*). Puntualizando, se pueden utilizar para identificar factores adicionales involucrados en la regulación de las células madre y predecir cómo interaccionan aquellos genes en estas rutas del desarrollo vegetal.

Entre los GRN, se pueden destacar aquellos basados en redes bayesianas dinámicas, los cuales pueden servirse de datos temporales para inferir qué dependencias existen entre los genes modelados. A pesar de esta ventaja, los datos temporales por sí solos no pueden predecir el dinamismo que existe entre las diferentes poblaciones celulares que se encuentran separadas espacialmente, como por ejemplo los diferentes tipos de células madre. De este modo, para inferir redes de regulación génica que capturen las diferencias transcripcionales entre distintos tipos celulares, es necesario combinar ambos datos, temporales y espaciales. De esta manera, de Luis Balaguer *et al.* (2017) ha desarrollado un algoritmo que ha permitido obtener redes génicas claves en la regulación del RSCN. Para ello, se han servido de los perfiles transcripcionales de diferentes células madre de la raíz para identificar aquellos genes expresados diferencialmente en cada tipo celular, y posteriormente determinar su importancia y posibles interacciones. Este algoritmo predice a PAN como un regulador clave de la función del QC (Figura VI). Además, gracias a estudios fenotípicos en líneas mutantes y sobreexpresoras de PAN, se relaciona también con el mantenimiento de la columela.

Para esta predicción se comparó el perfil transcripcional de las células del QC, mediante el uso de la línea marcadora *pWOX5::GFP*, con el perfil de las zonas meristemática, de elongación y diferenciación de la raíz. Además de las células del QC, este estudio también comprendía aquellas pertenecientes a las células iniciales del córtex y la endodermis, del xilema y del SNC completo. Esto permitió elucidar que la mayoría de los genes conocidos como reguladores de las células madre, véase *SCR*, *PHABULOSA*, *JKD*,

PLT2 o *PLT3* (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Prigge *et al.*, 2005; Welch *et al.*, 2007; Aida *et al.*, 2004) exhibían una expresión diferencial entre el perfil del SCN y el de las zonas de elongación y diferenciación, pero no entre el perfil del SCN y el de la zona meristemática, sugiriendo que estos genes no son específicos del SCN sino de la zona meristemática en general.

Finalmente, comparando los perfiles de los diferentes tipos celulares con los de las zonas de elongación y diferenciación, se identificaron 1625 genes, de los cuales 201 son TFs enriquecidos en la población de células madre. En el caso particular de los genes enriquecidos en el QC, no apareció *WOX5* debido a que no estuvo presente en el chip ATH1 de Affymetrix, sin embargo, sí aparecieron reguladores conocidos como NO TRANSMITTING TRACT (NTT), BRAVO y *PLT3* (Crawford *et al.*, 2015; Vilarrasa-Blasi *et al.*, 2014; Galinha *et al.*, 2007) como principales nodos en la red obtenida.

PAN apareció como un regulador principal en la red inferida. La longitud de la raíz primaria en el mutante *pan057190* es menor comparada con la planta silvestre Col-0. Aunque hay que destacar que posee una penetrancia del 12%, similar a la encontrada en flores. En este mutante se encontró desorganización en las células del QC, así como en células madre de la columela no identificables. Dos líneas transgénicas independientes, *35S: PAN* y la línea inducible por β -estradiol *XVE: PAN* (Coego *et al.*, 2014), presentaron capas adicionales de estas células madre y además, la línea inducible presentó divisiones adicionales en el QC. Por su parte, se encontró que la expresión de *WOX5* estaba reducida de manera significativa en el mutante *pan057190*, mientras que no se encontraron cambios en la expresión en el sentido inverso, esto es, el gen *PAN* en el

mutante *wox5*. Se propone que PAN actúa aguas arriba de WOX5 en la regulación de la actividad del QC, particularmente, promoviendo las divisiones en esas células y afectando al mantenimiento de las células madre de la columela.

Este modelo ha permitido estimar posibles dianas de PAN y proponen que su función en la regulación del QC sería a través de la activación de BRAVO y NTT. Otras dianas aguas abajo de PAN son WRKY23, HSFA1E, EBP/RAP2.3, HSFC1, EIN3 y SCRM2 (Grunewald *et al.*, 2011; Yoshida *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2018; Guan *et al.*, 2014; Munné-Bosch *et al.*, 2018; Nawy *et al.*, 2005). Además, mediante el uso de la técnica FACS con la línea *pWOX5:GFP* en el fondo mutante *pan057190*, se obtuvo el perfil transcripcional de este mutante. Se observaron 3397 genes diferencialmente expresados, entre los cuales se encuentran las dianas predichas en el modelo, así como los principales reguladores conocidos en el SCN, sugiriendo que la función de PAN afecta a multitud de rutas de señalización, al igual que ocurre en el SAM (Maier *et al.*, 2011).



BIBLIOGRAPHY

- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., ... & Genschik, P. (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Current biology*, 19(14), 1188-1193.
- Ahn, C. S., Lee, J. H., Reum Hwang, A., Kim, W. T., & Pai, H. S. (2006). Prohibitin is involved in mitochondrial biogenesis in plants. *The Plant Journal*, 46(4), 658-667.
- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., ... & Scheres, B. (2004). The PLETHORA genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell*, 119(1), 109-120.
- Albertos, P., Romero-Puertas, M. C., Tatematsu, K., Mateos, I., Sánchez-Vicente, I., Nambara, E., & Lorenzo, O. (2015). S-nitrosylation triggers ABI5 degradation to promote seed germination and seedling growth. *Nature communications*, 6, 8669.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Lisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., ... & Gadrinab, C. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301(5633), 653-657.
- Alvarez, J. M., Riveras, E., Vidal, E. A., Gras, D. E., Contreras-López, O., Tamayo, K. P., ... & Jordana, X. (2014). Systems approach identifies TGA 1 and TGA 4 transcription factors as important regulatory components of the nitrate response of *Arabidopsis thaliana* roots. *The Plant Journal*, 80(1), 1-13.
- Aravind, L., & Koonin, E. V. (1999). Fold prediction and evolutionary analysis of the POZ domain: structural and evolutionary relationship with the potassium channel tetramerization domain. *Journal of molecular biology*, 285(4), 1353-1361.
- Aronesty, E. (2011). ea-utils: "Command-line tools for processing biological sequencing data"; <https://github.com/ExpressionAnalysis/ea-utils>
- Artal-Sanz, M., & Tavernarakis, N. (2009). Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(8), 394-401.
- Arvidsson, S., Kwasniewski, M., Riaño-Pachón, D. M., & Mueller-Roeber, B. (2008). QuantPrime—a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC bioinformatics*, 9(1), 465.
- Astier, J., Gross, I., & Durner, J. (2017). Nitric oxide production in plants: an update. *Journal of Experimental Botany*, 69(14), 3401-3411.
- Astier, J., Kulik, A., Koen, E., Besson-Bard, A., Bourque, S., Jeandroz, S., Lamotte, O., Wendehenne, D. (2012). Protein S-nitrosylation: what's going on in plants?. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 1101-1110.
- Astier, J., & Lindermayr, C. (2012). Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. *International journal of molecular sciences*, 13(11), 15193-15208.
- Azpeitia, E., & Alvarez-Buylla, E. R. (2012). A complex systems approach to *Arabidopsis* root stem-cell niche developmental mechanisms: from molecules, to networks, to morphogenesis. *Plant molecular biology*, 80(4-5), 351-363.
- Azpeitia, E., Weinstein, N., Benítez, M., Mendoza, L., & Alvarez-Buylla, E. R. (2013). Finding missing interactions of the *Arabidopsis thaliana* root stem cell niche gene regulatory network. *Frontiers in Plant Science*, 4, 110.
- Bai, S., Yao, T., Li, M., Guo, X., Zhang, Y., Zhu, S., & He, Y. (2014). PIF3 is involved in the primary root growth inhibition of *Arabidopsis* induced by nitric oxide in the light. *Molecular plant*, 7(4), 616-625.
- Barlow, P. W. (1997). Stem cells and founder zones in plants, particularly their roots. In: Potten CS (ed) *Stem cells*. Academic Press, London, pp 29-57.
- Bashandy, T., Guillemot, J., Vernoux, T., Caparros-Ruiz, D., Ljung, K., Meyer, Y., & Reichheld, J. P. (2010). Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in *Arabidopsis* auxin signaling. *The Plant Cell*, 22(2), 376-391.
- Baum S. F., Dubrovsky J. G., Rost T. L. (2002). Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) roots. *Am. J. Bot.* 89, 908-920.
- Barceló, A. R. (1997). Lignification in plant cell walls. In *International review of cytology* (Vol. 176, pp. 87-132). Academic Press.
- Barrera-Ortiz, S., Garnica-Vergara, A., Esparza-Reynoso, S., García-Cárdenas, E., Raya-González, J., Ruiz-Herrera, L. F., & López-Bucio, J. (2018). Jasmonic Acid-Ethylene Crosstalk via

- ETHYLENE INSENSITIVE 2 Reprograms Arabidopsis Root System Architecture Through Nitric Oxide Accumulation. *Journal of plant growth regulation*, 37(2), 438-451.
- Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Valderrama, R., Mata-Pérez, C., López-Jaramillo, J., et al. (2014). Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *J. Exp. Bot.* 65, 527–538.
- Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A. F., Culiáñez, F., ... & Ferrando, A. (2012). Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PLoS One*, 7(10), e46907.
- Beligni, M. V., Fath, A., Bethke, P. C., Lamattina, L., & Jones, R. L. (2002). Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant physiology*, 129(4), 1642-1650.
- Benhar, M., Forrester, M. T., & Stamler, J. S. (2009). Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(10), 721.
- Benitez-Alfonso, Y., Cilia, M., San Roman, A., Thomas, C., Maule, A., Hearn, S., & Jackson, D. (2009). Control of Arabidopsis meristem development by thioredoxin-dependent regulation of intercellular transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3615-3620.
- Bennett, T., & Scheres, B. (2010). Root development—two meristems for the price of one?. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 91, pp. 67-102). Academic Press.
- Bennett, T., van den Toorn, A., Sanchez-Perez, G. F., Campilho, A., Willemsen, V., Snel, B., & Scheres, B. (2010). SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 regulate root cap maturation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 22(3), 640-654.
- Bennett, T., van den Toorn, A., Willemsen, V., & Scheres, B. (2014). Precise control of plant stem cell activity through parallel regulatory inputs. *Development*, 141(21), 4055-4064.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis I.: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 62(3), 293-300.
- Bertani, G. (2004). Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *Journal of bacteriology*, 186(3), 595-600.
- Besson-Bard, A., Astier, J., Rasul, S., Wawer, I., Dubreuil-Maurizi, C., Jeandroz, S., & Wendehenne, D. (2009). Current view of nitric oxide-responsive genes in plants. *Plant science*, 177(4), 302-309.
- Bethke, P. C., Badger, M. R., & Jones, R. L. (2004). Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell*, 16(2), 332-341.
- Birnbaum, K., Jung, J. W., Wang, J. Y., Lambert, G. M., Hirst, J. A., Galbraith, D. W., & Benfey, P. N. (2005). Cell type-specific expression profiling in plants via cell sorting of protoplasts from fluorescent reporter lines. *Nature methods*, 2(8), 615.
- Blakeslee, J. J., Zhou, H. W., Heath, J. T., Skottke, K. R., Barrios, J. A. R., Liu, S. Y., & DeLong, A. (2008). Specificity of RCN1-mediated protein phosphatase 2A regulation in meristem organization and stress response in roots. *Plant physiology*, 146(2), 539-553.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., ... & Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature*, 433(7021), 39.
- Boltz, K. A., Jasti, M., Townley, J. M., & Shippen, D. E. (2014). Analysis of poly (ADP-Ribose) polymerases in Arabidopsis telomere biology. *PLoS One*, 9(2), e88872.
- Bowman, J. L., Kohchi, T., Yamato, K. T., Jenkins, J., Shu, S., Ishizaki, K., ... & Adam, C. (2017). Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell*, 171(2), 287-304.
- Boyle, P., Le Su, E., Rochon, A., Shearer, H. L., Murmu, J., Chu, J. Y., ... & Després, C. (2009). The BTB/POZ domain of the Arabidopsis disease resistance protein NPR1 interacts with the repression domain of TGA2 to negate its function. *The Plant Cell*, 21(11), 3700-3713.
- Butterbrodt, T., Thurow, C., & Gatz, C. (2006). Chromatin immunoprecipitation analysis of the tobacco PR-1a and the truncated CaMV 35S promoter reveals differences in salicylic acid-dependent TGA factor binding and histone acetylation. *Plant molecular biology*, 61(4-5), 665-674.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

- Brown, D. E., Rashotte, A. M., Murphy, A. S., Normanly, J., Tague, B. W., Peer, W. A., ... & Muday, G. K. (2001). Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 126(2), 524-535.
- Buer, C. S., & Muday, G. K. (2004). The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. *The Plant Cell*, 16(5), 1191-1205.
- Canales, J., Contreras-López, O., Álvarez, J. M., & Gutiérrez, R. A. (2017). Nitrate induction of root hair density is mediated by TGA 1/TGA 4 and CPC transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 92(2), 305-316.
- Canet, J. V., Dobón, A., Fajmonová, J., & Tornero, P. (2012). The BLADE-ON-PETIOLE genes of *Arabidopsis* are essential for resistance induced by methyl jasmonate. *BMC plant biology*, 12(1), 199.
- Canet, J. V., Dobón, A., Roig, A., & Tornero, P. (2010). Structure-function analysis of npr1 alleles in *Arabidopsis* reveals a role for its paralogs in the perception of salicylic acid. *Plant, cell & environment*, 33(11), 1911-1922.
- Cao, H., Bowling, S. A., Gordon, A. S., & Dong, X. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 6(11), 1583-1592.
- Castillo, M. C., Coego, A., Costa-Broseta, Á., & León, J. (2018). Nitric oxide responses in *Arabidopsis* hypocotyls are mediated by diverse phytohormone pathways. *Journal of experimental botany*, 69(21), 5265-5278.
- Catarino, B., Hetherington, A. J., Emms, D. M., Kelly, S., & Dolan, L. (2016). The stepwise increase in the number of transcription factor families in the Precambrian predated the diversification of plants on land. *Molecular biology and evolution*, 33(11), 2815-2819.
- Causier, B., Bradley, D., Cook, H., & Davies, B. (2009). Conserved intragenic elements were critical for the evolution of the floral C-function. *The Plant Journal*, 58(1), 41-52.
- Cha, J. Y., Kim, W. Y., Kang, S. B., Im Kim, J., Baek, D., Jung, I. J., ... & Asami, T. (2015). A novel thiol-reductase activity of *Arabidopsis* YUC6 confers drought tolerance independently of auxin biosynthesis. *Nature communications*, 6, 8041.
- Chen, Q., Sun, J., Zhai, Q., Zhou, W., Qi, L., Xu, L., ... & Li, X. (2011). The basic helix-loop-helix transcription factor MYC2 directly represses PLETHORA expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23(9), 3335-3352.
- Chen, W., & Singh, K. B. (1999). The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the *Arabidopsis* GST6 promoter is mediated in part by an ocs element. *The Plant Journal*, 19(6), 667-677.
- Cheng, N. H., Liu, J. Z., Liu, X., Wu, Q., Thompson, S. M., Lin, J., ... & Hirschi, K. D. (2011). *Arabidopsis* monothiol glutaredoxin, AtGRXS17, is critical for temperature-dependent postembryonic growth and development via modulating auxin response. *Journal of Biological Chemistry*, 286(23), 20398-20406.
- Chi, Y. H., Paeng, S. K., Kim, M. J., Hwang, G. Y., Melencion, S. M. B., Oh, H. T., & Lee, S. Y. (2013). Redox-dependent functional switching of plant proteins accompanying with their structural changes. *Frontiers in plant science*, 4, 277.
- Choi, J., Huh, S. U., Kojima, M., Sakakibara, H., Paek, K. H., & Hwang, I. (2010). The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. *Developmental cell*, 19(2), 284-295.
- Chuang, C. F., Running, M. P., Williams, R. W., & Meyerowitz, E. M. (1999). The PERIANTHIA gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & development*, 13(3), 334-344.
- Clowes, F. A. L. (1956). Nucleic acids in root apical meristems of *Zea*. *New Phytologist*, 55(1), 29-34.
- Clowes, F. A. L. (1984). Size and activity of quiescent centres of roots. *New phytologist*, 96(1), 13-21.
- Coego, A., Brizuela, E., Castillejo, P., Ruiz, S., Koncz, C., del Pozo, J. C., ... & TRANSPLANTA Consortium. (2014). The TRANSPLANTA collection of *Arabidopsis* lines: a resource for functional analysis of transcription factors based on their conditional overexpression. *The Plant Journal*, 77(6), 944-953.
- Conn, C. E., & Nelson, D. C. (2016). Evidence that KARRIKIN-INSENSITIVE2 (KAI2) receptors may perceive an unknown

- signal that is not karrikin or strigolactone. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1219.
- Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2017). Nitric oxide synthase-like activity in higher plants. *Nitric oxide: biology and chemistry*, 68, 5.
- Corpas, F. J., Palma, J. M., Del Rio, L. A., Barroso, J. B. (2013). Protein tyrosine nitration in higher plants grown under natural and stress conditions. *Front Plant Sci* 4: 29.
- Corrêa, L. G. G., Riaño-Pachón, D. M., Schrago, C. G., dos Santos, R. V., Mueller-Roeber, B., & Vincentz, M. (2008). The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. *PloS one*, 3(8), e2944.
- Correa-Aragunde, N., Cejudo, F. J., & Lamattina, L. (2015b). Nitric oxide is required for the auxin-induced activation of NADPH-dependent thioredoxin reductase and protein denitrosylation during root growth responses in *Arabidopsis*. *Annals of botany*, 116(4), 695-702.
- Correa-Aragunde, N., Foresi, N., Delledonne, M., & Lamattina, L. (2013). Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 64(11), 3339-3349.
- Correa-Aragunde, N., Foresi, N., & Lamattina, L. (2015). Nitric oxide is a ubiquitous signal for maintaining redox balance in plant cells: regulation of ascorbate peroxidase as a case study. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2913-2921.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Chevalier, C., & Lamattina, L. (2006). Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 581-588.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., & Lamattina, L. (2004). Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 218(6), 900-905.
- Correa-Aragunde, N., Lombardo, C., & Lamattina, L. (2008). Nitric oxide: an active nitrogen molecule that modulates cellulose synthesis in tomato roots. *New Phytologist*, 179(2), 386-396.
- Couzigou, J. M., Zhukov, V., Mondy, S., el Heba, G. A., Cosson, V., Ellis, T. N., ... & Mysore, K. S. (2012). NODULE ROOT and COCHLEATA maintain nodule development and are legume orthologs of *Arabidopsis* BLADE-ON-PETIOLE genes. *The Plant Cell*, 24(11), 4498-4510.
- Crawford, B. C., Sewell, J., Golembeski, G., Roshan, C., Long, J. A., & Yanofsky, M. F. (2015). Genetic control of distal stem cell fate within root and embryonic meristems. *Science*, 347(6222), 655-659.
- Cross, F. R., Buchler, N. E., & Skotheim, J. M. (2011). Evolution of networks and sequences in eukaryotic cell cycle control. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1584), 3532-3544.
- Cruz-Ramírez, A., Díaz-Triviño, S., Wachsmann, G., Du, Y., Arteaga-Vázquez, M., Zhang, H., ... & Scheres, B. (2013). A SCARECROW-RETINOBLASTOMA protein network controls protective quiescence in the *Arabidopsis* root stem cell organizer. *PLoS biology*, 11(11), e1001724.
- Curtis, M. D., & Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 133(2), 462-469.
- D'Auria, J. C., & Gershenzon, J. (2005). The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Current opinion in plant biology*, 8(3), 308-316.
- Das, P., Ito, T., Wellmer, F., Vernoux, T., Dedieu, A., Traas, J., & Meyerowitz, E. M. (2009). Floral stem cell termination involves the direct regulation of AGAMOUS by PERIANTHIA. *Development*, 136(10), 1605-1611.
- de Luis Balaguer, M. A., Fisher, A. P., Clark, N. M., Fernandez-Espinosa, M. G., Möller, B. K., Weijers, D., ... & Sozzani, R. (2017). Predicting gene regulatory networks by combining spatial and temporal gene expression data in *Arabidopsis* root stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(36), E7632-E7640.
- de Simone, A., Hubbard, R., de la Torre, N. V., Velappan, Y., Wilson, M., Considine, M. J., ... & Foyer, C. H. (2017). Redox changes during the cell cycle in the embryonic root meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Antioxidants & redox signaling*, 27(18), 1505-1519.
- De Tullio, M. C., Jiang, K., & Feldman, L. J. (2010). Redox regulation of root apical meristem organization: connecting root development to its environment. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(5), 328-336.

- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., & Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic acids research*, 13(13), 4777-4788.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., & Lamb, C. (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23), 13454-13459.
- Deppmann, C. D., Acharya, A., Rishi, V., Wobbes, B., Smeekens, S., Taparowsky, E. J., & Vinson, C. (2004). Dimerization specificity of all 67 B-ZIP motifs in *Arabidopsis thaliana*: a comparison to *Homo sapiens* B-ZIP motifs. *Nucleic acids research*, 32(11), 3435-3445.
- Després, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., & Fobert, P. R. (2003). The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *The Plant Cell*, 15(9), 2181-2191.
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., & Fobert, P. R. (2000). The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *The Plant Cell*, 12(2), 279-290.
- Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., ... & Benfey, P. N. (1996). The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell*, 86(3), 423-433.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Ding, Z., & Friml, J. (2010). Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 12046-12051.
- Dinneny, J. R., & Benfey, P. N. (2008). Plant stem cell niches: standing the test of time. *Cell*, 132(4), 553-557.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., & Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, 119(1), 71-84.
- Domin, K. (1921). Beiträge zur flora und pflanzengeographie Australiens. *Biblioth Bot* 63: 591.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(13), 39-40.
- Dunand, C., Crèvecoeur, M., & Penel, C. (2007). Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytologist*, 174(2), 332-341.
- Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., & Pikaard, C. S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*, 45(4), 616-629.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.
- Ehlting, J., Mattheus, N., Aeschliman, D. S., Li, E., Hamberger, B., Cullis, I. F., ... & Ritland, K. (2005). Global transcript profiling of primary stems from *Arabidopsis thaliana* identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation. *The Plant Journal*, 42(5), 618-640.
- Ercoli, M. F., Ferrel, A., Debernardi, J. M., Perrone, A. P., Rodriguez, R. E., & Palatnik, J. F. (2018). GIF transcriptional coregulators control root meristem homeostasis. *The Plant Cell*, 30(2), 347-359.
- Fan, W., & Dong, X. (2002). In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14(6), 1377-1389.
- Fang, H., Liu, Z., Long, Y., Liang, Y., Jin, Z., Zhang, L., ... & Pei, Y. (2017). The Ca²⁺/calmodulin-binding transcription factor TGA 3 elevates LCD expression and H₂S production to bolster Cr⁶⁺ tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 91(6), 1038-1050.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B. W., Wang, Y., Pallas, J. A., & Loake, G. J. (2005). A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(22), 8054-8059.
- Fendrych, M., Van Hautegeem, T., Van Durme, M., Olvera-Carrillo, Y., Huysmans, M., Karimi, M., ... & Nowack, M. K. (2014). Programmed cell death controlled by ANAC033/SOMBRERO

- determines root cap organ size in Arabidopsis. *Current Biology*, 24(9), 931-940.
- Feng, J., Wang, C., Chen, Q., Chen, H., Ren, B., Li, X., & Zuo, J. (2013). S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signaling. *Nature Communications*, 4, 1529.
- Fernández-Marcos, M., Sanz, L., Lewis, D. R., Muday, G. K., & Lorenzo, O. (2011). Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), 18506-18511.
- Fernández-Marcos, M., Sanz, L., & Lorenzo, O. (2012). Nitric oxide: an emerging regulator of cell elongation during primary root growth. *Plant signaling & behavior*, 7(2), 196-200.
- Findling, S., Stotz, H. U., Zoeller, M., Krischke, M., Zander, M., Gatz, C., ... & Mueller, M. J. (2018). TGA2 signaling in response to reactive electrophile species is not dependent on cysteine modification of TGA2. *PLoS one*, 13(4), e0195398.
- Fletcher, J. C. (2001). The ULTRAPETALA gene controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Development*, 128(8), 1323-1333.
- Flores, T., Todd, C. D., Tovar-Mendez, A., Dhanoa, P. K., Correa-Aragunde, N., Hoyos, M. E., ... & Polacco, J. C. (2008). Arginase-negative mutants of Arabidopsis exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant physiology*, 147(4), 1936-1946.
- Flores-Pérez, Ú., Sauret-Güeto, S., Gas, E., Jarvis, P., & Rodríguez-Concepción, M. (2008). A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in Arabidopsis plastids. *The Plant Cell*, 20(5), 1303-1315.
- Fode, B., Siemsen, T., Thurow, C., Weigel, R., & Gatz, C. (2008). The Arabidopsis GRAS protein SCL14 interacts with class II TGA transcription factors and is essential for the activation of stress-inducible promoters. *The Plant Cell*, 20(11), 3122-3135.
- Foresi, N., Correa-Aragunde, N., Parisi, G., Caló, G., Salerno, G., & Lamattina, L. (2010). Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *The Plant Cell*, 22(11), 3816-3830.
- Forrester, M. T., Foster, M. W., & Stamler, J. S. (2007). Assessment and application of the biotin switch technique for examining protein S-nitrosylation under conditions of pharmacologically induced oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 13977-13983.
- Forrester, M. T., Thompson, J. W., Foster, M. W., Nogueira, L., Moseley, M. A., & Stamler, J. S. (2009). Proteomic analysis of S-nitrosylation and denitrosylation by resin-assisted capture. *Nature biotechnology*, 27(6), 557.
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2011). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 33(7), 829-837.
- Forzani, C., Aichinger, E., Sornay, E., Willemsen, V., Laux, T., Dewitte, W., & Murray, J. A. (2014). WOX5 suppresses CYCLIN D activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Current Biology*, 24(16), 1939-1944.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2016). Stress-triggered redox signalling: what's in pROSPect?. *Plant, cell & environment*, 39(5), 951-964.
- Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., ... & Dong, X. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486(7402), 228.
- Fusconi, A., Gnani, E., Trotta, A., & Berta, G. (1999). Apical meristems of tomato roots and their modifications induced by arbuscular mycorrhizal and soilborne pathogenic fungi. *The New Phytologist*, 142(3), 505-516.
- Gaillochet, C., & Lohmann, J. U. (2015). The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. *Development*, 142(13), 2237-2249.
- Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., & Scheres, B. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature*, 449(7165), 1053.
- García-Gómez, M. L., Azpeitia, E., & Álvarez-Buylla, E. R. (2017). A dynamic genetic-hormonal regulatory network model explains multiple cellular behaviors of the root apical meristem of Arabidopsis thaliana. *PLoS computational biology*, 13(4), e1005488.
- Garretón, V., Carpinelli, J., Jordana, X., & Holuigue, L. (2002). The as-1 promoter element is an oxidative stress-responsive

- element and salicylic acid activates it via oxidative species. *Plant physiology*, 130(3), 1516-1526.
- Gatz, C. (2013). From pioneers to team players: TGA transcription factors provide a molecular link between different stress pathways. *Molecular plant-microbe interactions*, 26(2), 151-159.
- Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y., & Yoshida, S. (2004). Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 134(4), 1555-1573.
- Gonzali, S., Novi, G., Loreti, E., Paolicchi, F., Poggi, A., Alpi, A., & Perata, P. (2005). A turanose-insensitive mutant suggests a role for WOX5 in auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 44(4), 633-645.
- Gouvea, C. M. C. P., Souza, J. F., Magalhaes, A. C. N., & Martins, I. S. (1997). NO⁻-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation*, 21(3), 183-187.
- Grün, S., Lindermayr, C., Sell, S., & Durner, J. (2006). Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 507-516.
- Grunewald, W., De Smet, I., De Rybel, B., Robert, H. S., Van De Cotte, B., Willemsen, V., ... & Beeckman, T. (2013). Tightly controlled WRKY23 expression mediates *Arabidopsis* embryo development. *EMBO reports*, 14(12), 1136-1142.
- Guan, Q., Yue, X., Zeng, H., & Zhu, J. (2014). The protein phosphatase RCF2 and its interacting partner NAC019 are critical for heat stress-responsive gene regulation and thermotolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(1), 438-453.
- Guillaumot, D., Guillon, S., Morsomme, P., & Batoko, H. (2009). ABA, porphyrins and plant TSPO-related protein. *Plant signaling & behavior*, 4(11), 1087-1090.
- Guo, F. Q., Okamoto, M., & Crawford, N. M. (2003). Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 302(5642), 100-103.
- Gupta, K. J., Hebelstrup, K. H., Mur, L. A., & Igamberdiev, A. U. (2011a). Plant hemoglobins: important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide. *FEBS letters*, 585(24), 3843-3849.
- Gupta, K. J., Igamberdiev, A. U., Manjunatha, G., Segu, S., Moran, J. F., Neelawarne, B., ... & Kaiser, W. M. (2011b). The emerging roles of nitric oxide (NO) in plant mitochondria. *Plant Science*, 181(5), 520-526.
- Gutierrez, L., Mauriat, M., Pelloux, J., Bellini, C., & Van Wuytswinkel, O. (2008). Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. *The Plant Cell*, 20(7), 1734-1735.
- Gutsche, N., Holtmannspötter, M., Maß, L., O'Donoghue, M., Busch, A., Lauri, A., ... & Zachgo, S. (2017). Conserved redox-dependent DNA binding of ROXY glutaredoxins with TGA transcription factors. *Plant Direct*, 1(6), e00030.
- Gutsche, N., & Zachgo, S. (2016). The N-terminus of the floral *Arabidopsis* TGA transcription factor PERIANTHIA mediates redox-sensitive DNA-binding. *PLoS one*, 11(4), e0153810.
- Haecker, A., Groß-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M., & Laux, T. (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131(3), 657-668.
- Hampton, C. R., Bowen, H. C., Broadley, M. R., Hammond, J. P., Mead, A., Payne, K. A., ... & White, P. J. (2004). Cesium toxicity in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 136(3), 3824-3837.
- Henry, Y. A., Ducastel, B., & Guissani, A. (1997). Basic chemistry of nitric oxide and related nitrogen oxides. In *Nitric oxide research from chemistry to biology* (pp. 15-46). Springer, Boston, MA.
- Hepworth, S. R., Zhang, Y., McKim, S., Li, X., & Haughn, G. W. (2005). BLADE-ON-PETIOLE-dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(5), 1434-1448.
- Herrera-Vásquez, A., Carvallo, L., Blanco, F., Tobar, M., Villarroel-Candia, E., Vicente-Carbajosa, J., ... & Holuigue, L. (2015). Transcriptional control of glutaredoxin GRXC9 expression by a salicylic acid-dependent and NPR1-independent pathway in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology reporter*, 33(3), 624-637.
- Herrera-Vásquez, A., Salinas, P., & Holuigue, L. (2015b). Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Frontiers in plant science*, 6, 171.

- Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E., & Stamler, J. S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(2), 150.
- Hill, B. G., Dranka, B. P., Bailey, S. M., Lancaster, J. R., & Darley-Usmar, V. M. (2010). What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *Journal of Biological Chemistry*, 285(26), 19699-19704.
- Hill, R., Hargrove, M., & Arredondo-Peter, R. (2016). Phytoglobin: a novel nomenclature for plant globins accepted by the globin community at the 2014 XVIII conference on Oxygen-Binding and Sensing Proteins. *F1000Research*, 5.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., ... & Zimmermann, P. (2008). Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in bioinformatics*, 2008.
- Hsieh, T. F., & Fischer, R. L. (2005). Biology of chromatin dynamics. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, 327-351.
- Hu, X., Neill, S. J., Tang, Z., & Cai, W. (2005). Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology*, 137(2), 663-670.
- Huang, L. J., Li, N., Thurow, C., Wirtz, M., Hell, R., & Gatz, C. (2016). Ectopically expressed glutaredoxin ROXY19 negatively regulates the detoxification pathway in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology*, 16(1), 200.
- Huang, R., Shu, S., Liu, M., Wang, C., Jiang, B., Jiang, J., ... & Zhang, S. (2019). Nuclear PROHIBITIN3 maintains genome integrity and cell proliferation in root meristem through MINICHROMOSOME MAINTENANCE 2. *Plant physiology*, pp-01463.
- Hussain, A., Mun, B. G., Imran, Q. M., Lee, S. U., Adamu, T. A., Shahid, M., ... & Yun, B. W. (2016). Nitric oxide mediated transcriptome profiling reveals activation of multiple regulatory pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, 7, 975.
- Hussain, R. M., Sheikh, A. H., Haider, I., Quareshy, M., & Linthorst, H. J. (2018). *Arabidopsis* WRKY50 and TGA transcription factors synergistically activate expression of PR1. *Frontiers in plant science*, 9.
- Innocenti, G., Pucciariello, C., Le Gleuher, M., Hopkins, J., de Stefano, M., Delledonne, M., ... & Frendo, P. (2007). Glutathione synthesis is regulated by nitric oxide in *Medicago truncatula* roots. *Planta*, 225(6), 1597-1602.
- Jaffrey, S. R., & Snyder, S. H. (2001). The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci. STKE*, 2001(86), p11-p11.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., & Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in plant science*, 7(3), 106-111.
- Janssen-Heininger, Y. M., Mossman, B. T., Heintz, N. H., Forman, H. J., Kalyanaraman, B., Finkel, T., ... & van der Vliet, A. (2008). Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(1), 1-17.
- Jeandroz, S., Wipf, D. J., Lamattina, L., Melkonian, M., Tian, Z., ... & Wendehenne, D. (2016). Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Sci. Signal.*, 9(417), re2-re2.
- Ji, H., Wang, S., Li, K., Szakonyi, D., Koncz, C., & Li, X. (2015). PRL 1 modulates root stem cell niche activity and meristem size through WOX 5 and PLT s in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 81(3), 399-412.
- Jia, Y., Tian, H., Li, H., Yu, Q., Wang, L., Friml, J., & Ding, Z. (2015). The *Arabidopsis thaliana* elongator complex subunit 2 epigenetically affects root development. *Journal of experimental botany*, 66(15), 4631-4642.
- Jiang, K., & Feldman, L. J. (2005). Regulation of root apical meristem development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 485-509.
- Jiang, K., Meng, Y. L., & Feldman, L. J. (2003). Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development*, 130(7), 1429-1438.
- Jin, C. W., Du, S. T., Chen, W. W., Li, G. X., Zhang, Y. S., & Zheng, S. J. (2009). Elevated carbon dioxide improves plant iron nutrition through enhancing the iron-deficiency-induced responses under iron-limited conditions in tomato. *Plant Physiology*, 150(1), 272-280.
- Johnson, C., Boden, E., & Arias, J. (2003). Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a

- defense gene promoter in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(8), 1846-1858.
- Johnson, C., Boden, E., Desai, M., Pascuzzi, P., & Arias, J. (2001). In vivo target promoter-binding activities of a xenobiotic stress-activated TGA factor. *The Plant Journal*, 28(2), 237-243.
- Jun, J. H., Ha, C. M., & Fletcher, J. C. (2010). BLADE-ON-PETIOLE1 coordinates organ determinacy and axial polarity in Arabidopsis by directly activating ASYMMETRIC LEAVES2. *The Plant Cell*, 22(1), 62-76.
- Kang, H. G., & Klessig, D. F. (2005). Salicylic acid-inducible Arabidopsis CK2-like activity phosphorylates TGA2. *Plant molecular biology*, 57(4), 541-557.
- Katagiri, F., Lam, E., & Chua, N. H. (1989). Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature*, 340(6236), 727.
- Kawata, T., Imada, T., Shiraishi, H., Okada, K., Shimura, Y., & Iwabuchi, M. (1992). A cDNA clone encoding HBP-1b homologue in Arabidopsis thaliana. *Nucleic acids research*, 20(5), 1141.
- Kazan, K. (2018). A new twist in SA signalling. *Nature plants*, 4(6), 327.
- Kesarwani, M., Yoo, J., & Dong, X. (2007). Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in Arabidopsis. *Plant physiology*, 144(1), 336-346.
- Khan, M., Xu, H., & Hepworth, S. R. (2014). BLADE-ON-PETIOLE genes: setting boundaries in development and defense. *Plant Science*, 215, 157-171.
- Kidner, C., Sundaresan, V., Roberts, K., & Dolan, L. (2000). Clonal analysis of the Arabidopsis root confirms that position, not lineage, determines cell fate. *Planta*, 211(2), 191-199.
- Kim, H. S., & Delaney, T. P. (2002). Over-expression of TGA5, which encodes a bZIP transcription factor that interacts with NIM1/NPR1, confers SAR-independent resistance in Arabidopsis thaliana to Peronospora parasitica. *The Plant Journal*, 32(2), 151-163.
- Kim, N. Y., Jang, Y. J., & Park, O. K. (2018). AP2/ERF Family Transcription Factors ORA59 and RAP2.3 Interact in the Nucleus and Function Together in Ethylene Responses. *Frontiers in plant science*, 9.
- Kim, T. W., Lee, S. M., JOO, S. H., Yun, H. S., Lee, Y. E. W., Kaufman, P. B., ... & Chang, S. C. (2007). Elongation and gravitropic responses of Arabidopsis roots are regulated by brassinolide and IAA. *Plant, cell & environment*, 30(6), 679-689.
- Kirchsteiger, K., Ferrández, J., Pascual, M. B., González, M., & Cejudo, F. J. (2012). NADPH thioredoxin reductase C is localized in plastids of photosynthetic and nonphotosynthetic tissues and is involved in lateral root formation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(4), 1534-1548.
- Kirschner, G. K., Stahl, Y., Von Korff, M., & Simon, R. (2017). Unique and conserved features of the barley root meristem. *Frontiers in plant science*, 8, 1240.
- Klatt, P., & Lamas, S. (2000). Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *European journal of biochemistry*, 267(16), 4928-4944.
- Kneeshaw, S., Gelineau, S., Tada, Y., Loake, G. J., & Spoel, S. H. (2014). Selective protein denitrosylation activity of thioredoxin-h5 modulates plant immunity. *Molecular cell*, 56(1), 153-162.
- Kolbert, Z., Bartha, B., & Erdei, L. (2008). Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in Arabidopsis thaliana root primordia. *Journal of plant physiology*, 165(9), 967-975.
- Kong, X., Tian, H., Yu, Q., Zhang, F., Wang, R., Gao, S., ... & Zhou, G. (2018). PHB3 maintains root stem cell niche identity through ROS-responsive AP2/ERF transcription factors in Arabidopsis. *Cell reports*, 22(5), 1350-1363.
- Koprivova, A., Mugford, S. T., & Kopriva, S. (2010). Arabidopsis root growth dependence on glutathione is linked to auxin transport. *Plant cell reports*, 29(10), 1157-1167.
- Kovacs, I., & Lindermayr, C. (2013). Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *Frontiers in plant science*, 4, 137.
- Kramer, E. M., & Bennett, M. J. (2006). Auxin transport: a field in flux. *Trends in plant science*, 11(8), 382-386.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kwon, E., Feechan, A., Yun, B. W., Hwang, B. H., Pallas, J. A., Kang, J. G., & Loake, G. J. (2012). AtGSNOR1 function is required

- for multiple developmental programs in Arabidopsis. *Planta*, 236(3), 887-900.
- La Camera, S., L'Haridon, F., Astier, J., Zander, M., Abou-Mansour, E., Page, G., ... & Lamotte, O. (2011). The glutaredoxin ATGRXS13 is required to facilitate *Botrytis cinerea* infection of Arabidopsis thaliana plants. *The Plant Journal*, 68(3), 507-519.
- Lam, E., Benfey, P. N., Gilmartin, P. M., Fang, R. X., & Chua, N. H. (1989). Site-specific mutations alter in vitro factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(20), 7890-4.
- Lam, E., & Lam, Y. K. P. (1995). Binding site requirements and differential representation of TGA factors in nuclear ASF-1 activity. *Nucleic acids research*, 23(18), 3778-3785.
- Lamotte, O., Bertoldo, J. B., Besson-Bard, A., Rosnoblet, C., Aimé, S., Hichami, S., ... & Wendehenne, D. (2015). Protein S-nitrosylation: specificity and identification strategies in plants. *Frontiers in chemistry*, 2, 114.
- Landrein, B., Formosa-Jordan, P., Malivert, A., Schuster, C., Melnyk, C. W., Yang, W., ... & Jönsson, H. (2018). Nitrate modulates stem cell dynamics in Arabidopsis shoot meristems through cytokinins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(6), 1382-1387.
- Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J., & Jurgens, G. (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development*, 122(1), 87-96.
- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J., & Ward, E. (1998). Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 16(2), 223-233.
- Lechón, T. (2018). Genetic and molecular characterization of nitric oxide (NO) homeostasis during early plant development in Arabidopsis thaliana. (Unpublished doctoral thesis). University of Salamanca, Salamanca, Spain.
- Lee, J. Y., Colinas, J., Wang, J. Y., Mace, D., Ohler, U., & Benfey, P. N. (2006). Transcriptional and posttranscriptional regulation of transcription factor expression in Arabidopsis roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(15), 6055-6060.
- Lee, Y., Lee, W. S., & Kim, S. H. (2012). Hormonal regulation of stem cell maintenance in roots. *Journal of experimental botany*, 64(5), 1153-1165.
- Lemaire, S. D. (2004). The glutaredoxin family in oxygenic photosynthetic organisms. *Photosynthesis Research*, 79(3), 305-318.
- Leshem, Y. Y., & Haramaty, E. (1996). Plant aging: the emission of NO and ethylene and effect of NO-releasing compounds on growth of pea (*Pisum sativum*) foliage. *J Plant Physiol*, 148(3-4), 258-263.
- Levesque, M. P., Vernoux, T., Busch, W., Cui, H., Wang, J. Y., Blilou, I., ... & Scheres, B. (2006). Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in Arabidopsis. *PLoS biology*, 4(5), e143.
- Li, N., Muthreich, M., Huang, L. J., Thurow, C., Sun, T., Zhang, Y., & Gatz, C. (2018). TGACG-BINDING FACTORS (TGAs) and TGA-interacting CC-type glutaredoxins modulate hyponastic growth in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist*.
- Li, S., Gutsche, N., & Zachgo, S. (2011). The ROXY1 C-terminal L**LL motif is essential for the interaction with TGA transcription factors. *Plant physiology*, 157(4), 2056-2068.
- Li, S., Lauri, A., Ziemann, M., Busch, A., Bhave, M., & Zachgo, S. (2009). Nuclear activity of ROXY1, a glutaredoxin interacting with TGA factors, is required for petal development in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, 21(2), 429-441.
- Lindermayr, C., & Durner, J. (2009). S-Nitrosylation in plants: pattern and function. *Journal of Proteomics*, 73(1), 1-9.
- Lindermayr, C., Sell, S., Müller, B., Leister, D., & Durner, J. (2010). Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of Arabidopsis thaliana by nitric oxide. *The Plant Cell*, 22(8), 2894-2907.
- Liso, R., Calabrese, G., Bitonti, M. B., & Arrigoni, O. (1984). Relationship between ascorbic acid and cell division. *Experimental cell research*, 150(2), 314-320.
- Liso, R., De Tullio, M. C., Ciraci, S., Balestrini, R., La Rocca, N., Bruno, L., ... & Arrigoni, O. (2004). Localization of ascorbic acid, ascorbic acid oxidase, and glutathione in roots of *Cucurbita maxima* L. *Journal of experimental botany*, 55(408), 2589-2597.
- Liso, R., Innocenti, A. M., Bitonti, M. B., & Arrigoni, O. (1988). Ascorbic acid-induced progression of quiescent centre cells from G1 to S phase. *New Phytologist*, 110(4), 469-471.

- Liszskay, A., van der Zalm, E., & Schopfer, P. (2004). Production of reactive oxygen intermediates (O₂⁻, H₂O₂, and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant physiology*, 136(2), 3114-3123.
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J., & Stamler, J. S. (2001). A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature*, 410(6827), 490.
- Liu, W. C., Zheng, S. Q., Yu, Z. D., Gao, X., Shen, R., & Lu, Y. T. (2018). WD 40-REPEAT 5a represses root meristem growth by suppressing auxin synthesis through changes of nitric oxide accumulation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 93(5), 883-893.
- Ljung, K., Hull, A. K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., & Sandberg, G. (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell*, 17(4), 1090-1104.
- Lombardo, M. C., Graziano, M., Polacco, J. C., & Lamattina, L. (2006). Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signaling & Behavior*, 1(1), 28-33.
- Lombardo, M. C., & Lamattina, L. (2012). Nitric oxide is essential for vesicle formation and trafficking in *Arabidopsis* root hair growth. *Journal of experimental botany*, 63(13), 4875-4885.
- Long, Y., Stahl, Y., Weidtkamp-Peters, S., Postma, M., Zhou, W., Goedhart, J., ... & Blilou, I. (2017). In vivo FRET-FLIM reveals cell-type-specific protein interactions in *Arabidopsis* roots. *Nature*, 548(7665), 97.
- Lorenzo O. (2019). bZIP edgetic mutations: in the frontier of plant metabolism, development and stress trade-off. *Journal of Experimental Botany*. In press.
- Lozano-Elena, F., Planas-Riverola, A., Vilarrasa-Blasi, J., Schwab, R., & Caño-Delgado, A. I. (2018). Paracrine brassinosteroid signaling at the stem cell niche controls cellular regeneration. *J Cell Sci*, 131(2), jcs204065.
- Lozano-Juste, J., Colom-Moreno, R., & León, J. (2011). In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3501-3517.
- Ma, J., Liu, Y., Zhou, W., Zhu, Y., Dong, A., & Shen, W. H. (2018). Histone chaperones play crucial roles in maintenance of stem cell niche during plant root development. *The Plant Journal*, 95(1), 86-100.
- Maia, L. B., & Moura, J. J. (2015). Nitrite reduction by molybdoenzymes: a new class of nitric oxide-forming nitrite reductases. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 20(2), 403-433.
- Maier, A. T., Stehling-Sun, S., Offenburger, S. L. & Lohmann, J. (2011). The bZIP transcription factor PERIANTHIA: a multifunctional hub for meristem control. *Frontiers in plant science*, 2, 79.
- Maier, A. T., Stehling-Sun, S., Wollmann, H., Demar, M., Hong, R. L., Haubeiß, S., ... & Lohmann, J. U. (2009). Dual roles of the bZIP transcription factor PERIANTHIA in the control of floral architecture and homeotic gene expression. *Development*, 136(10), 1613-1620.
- Malik, S. I., Hussain, A., Yun, B. W., Spoel, S. H., & Loake, G. J. (2011). GSNOR-mediated de-nitrosylation in the plant defence response. *Plant Science*, 181(5), 540-544.
- Matsuzaki, Y., Ogawa-Ohnishi, M., Mori, A., & Matsubayashi, Y. (2010). Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Science*, 329(5995), 1065-1067.
- McKim, S. M., Stenvik, G. E., Butenko, M. A., Kristiansen, W., Cho, S. K., Hepworth, S. R., ... & Haughn, G. W. (2008). The BLADE-ON-PETIOLE genes are essential for abscission zone formation in *Arabidopsis*. *Development*, 135(8), 1537-1546.
- Meng, T. C., Fukada, T., & Tonks, N. K. (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Molecular cell*, 9(2), 387-399.
- Meng, Y., Shuai, H., Luo, X., Chen, F., Zhou, W., Yang, W., & Shu, K. (2017). Karrikins: regulators involved in phytohormone signaling networks during seed germination and seedling development. *Frontiers in plant science*, 7, 2021.
- Meyer, Y., Buchanan, B. B., Vignols, F., & Reichheld, J. P. (2009). Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annual review of genetics*, 43, 335-367.
- Meyer, Y., Siala, W., Bashandy, T., Riondet, C., Vignols, F., & Reichheld, J. P. (2008). Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(4), 589-600.
- Miao, Z. H., Liu, X., & Lam, E. (1994). TGA3 is a distinct member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 25(1), 1-11.

- Mira, M. M., Huang, S., Kapoor, K., Hammond, C., Hill, R. D., & Stasolla, C. (2017). Expression of Arabidopsis class 1 phytoalbumin (AtPgb1) delays death and degradation of the root apical meristem during severe PEG-induced water deficit. *Journal of experimental botany*, 68(20), 5653-5668.
- Mockler, T. C., Michael, T. P., Priest, H. D., Shen, R., Sullivan, C. M., Givan, S. A., ... & Chory, J. (2007, January). The DIURNAL project: DIURNAL and circadian expression profiling, model-based pattern matching, and promoter analysis. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 72, pp. 353-363). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Monte, I., Ishida, S., Zamarréno, A. M., Hamberg, M., Franco-Zorrilla, J. M., García-Casado, G., ... & Nishihama, R. (2018). Ligand-receptor co-evolution shaped the jasmonate pathway in land plants. *Nature chemical biology*, 14(5), 480.
- Moreau, M., Lee, G. I., Wang, Y., Crane, B. R., & Klessig, D. F. (2008). AtNOS/AtNOA1 is a functional Arabidopsis thaliana cGTPase and not a nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32957-32967.
- Moreno-Risueno, M. A., Sozzani, R., Yardımcı, G. G., Petricka, J. J., Vernoux, T., Blilou, I., ... & Benfey, P. N. (2015). Transcriptional control of tissue formation throughout root development. *Science*, 350(6259), 426-430.
- Mou, Z., Fan, W., & Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113(7), 935-944.
- Moubayidin, L., Perilli, S., Ioio, R. D., Di Mambro, R., Costantino, P., & Sabatini, S. (2010). The rate of cell differentiation controls the Arabidopsis root meristem growth phase. *Current Biology*, 20(12), 1138-1143.
- Mu, R. L., Cao, Y. R., Liu, Y. F., Lei, G., Zou, H. F., Liao, Y., ... & Yuan, M. (2009). An R2R3-type transcription factor gene AtMYB59 regulates root growth and cell cycle progression in Arabidopsis. *Cell research*, 19(11), 1291.
- Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Mueller, M. J., & Berger, S. (2008). General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20(3), 768-785.
- Munné-Bosch, S., Simancas, B., & Müller, M. (2018). Ethylene signaling cross-talk with other hormones in Arabidopsis thaliana exposed to contrasting phosphate availability: Differential effects in roots, leaves and fruits. *Journal of plant physiology*, 226, 114-122.
- Mur, L. A., Mandon, J., Persijn, S., Cristescu, S. M., Moshkov, I. E., Novikova, G. V., ... & Gupta, K. J. (2013). Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB plants*, 5.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murmu, J., Bush, M. J., DeLong, C., Li, S., Xu, M., Khan, M., ... & Hepworth, S. R. (2010). Arabidopsis basic leucine-zipper transcription factors TGA9 and TGA10 interact with floral glutaredoxins ROXY1 and ROXY2 and are redundantly required for anther development. *Plant Physiology*, 154(3), 1492-1504.
- Nakagawa, T., Ishiguro, S., & Kimura, T. (2009). Gateway vectors for plant transformation. *Plant biotechnology*, 26(3), 275-284.
- Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T., & Benfey, P. N. (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature*, 413(6853), 307.
- Nawy, T., Lee, J. Y., Colinas, J., Wang, J. Y., Thongrod, S. C., Malamy, J. E., ... & Benfey, P. N. (2005). Transcriptional profile of the Arabidopsis root quiescent center. *The Plant Cell*, 17(7), 1908-1925.
- Nardmann, J., Reisewitz, P., & Werr, W. (2009). Discrete shoot and root stem cell-promoting WUS/WOX5 functions are an evolutionary innovation of angiosperms. *Molecular biology and evolution*, 26(8), 1745-1755.
- Ndamukong, I., Abdallat, A. A., Thurow, C., Fode, B., Zander, M., Weigel, R., & Gatz, C. (2007). SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *The Plant Journal*, 50(1), 128-139.
- Neill, S. J., Desikan, R., & Hancock, J. T. (2003). Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist*, 159(1), 11-35.
- Nelson, D. C., Flematti, G. R., Riseborough, J. A., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Smith, S. M. (2010). Karrikins enhance light responses during germination and seedling development in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), 7095-7100.

- Noshi, M., Mori, D., Tanabe, N., Maruta, T., & Shigeoka, S. (2016). Arabidopsis clade IV TGA transcription factors, TGA10 and TGA9, are involved in ROS-mediated responses to bacterial PAMP flg22. *Plant Science*, 252, 12-21.
- Ohlstein, B., Kai, T., Decotto, E., & Spradling, A. (2004). The stem cell niche: theme and variations. *Current opinion in cell biology*, 16(6), 693-699.
- Orozco-Nunnally, D. A., Muhammad, D., Mezzich, R., Lee, B. S., Jayathilaka, L., Kaufman, L. S., & Warpeha, K. M. (2014). Pirin1 (PRN1) is a multifunctional protein that regulates quercetin, and impacts specific light and UV responses in the seed-to-seedling transition of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 9(4), e93371.
- Ortega-Martínez, O., Pernas, M., Carol, R. J., & Dolan, L. (2007). Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science*, 317(5837), 507-510.
- Oshchepkova, E. A., Omelyanchuk, N. A., Savina, M. S., Pasternak, T., Kolchanov, N. A., & Zemlyanskaya, E. V. (2017). Systems biology analysis of the WOX5 gene and its functions in the root stem cell niche. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 7(4), 404-420.
- Pagnussat, G. C., Lanteri, M. L., & Lamattina, L. (2003). Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiology*, 132(3), 1241-1248.
- Pagnussat, G. C., Simontacchi, M., Puntarulo, S., & Lamattina, L. (2002). Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology*, 129(3), 954-956.
- Palavan-Unsal, N., & Arisan, D. (2009). Nitric oxide signalling in plants. *The Botanical Review*, 75(2), 203-229.
- Parani, M., Rudrabhatla, S., Myers, R., Weirich, H., Smith, B., Leaman, D. W., & Goldman, S. L. (2004). Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*, 2(4), 359-366.
- Paris, R., Iglesias, M. J., Terrile, M. C., & Casalougué, C. A. (2013). Functions of S-nitrosylation in plant hormone networks. *Frontiers in plant science*, 4, 294.
- Paris, R., Vazquez, M. M., Graziano, M., Terrile, M. C., Miller, N. D., Spalding, E. P., ... & Casalougué, C. A. (2018). Distribution of endogenous NO regulates early gravitropic response and PIN2 localization in *Arabidopsis* roots. *Frontiers in plant science*, 9, 495.
- Passardi, F., Tognolli, M., De Meyer, M., Penel, C., & Dunand, C. (2006). Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation. *Planta*, 223(5), 965-974.
- Pasternak, T., Groot, E. P., Kazantsev, F., Teale, W., Omelyanchuk, N., Kovrizhnykh, V., ... & Mironova, V. V. (2019). Salicylic acid affects root meristem patterning via auxin distribution in a concentration-dependent manner. *Plant physiology*, pp-00130.
- Pautler, M., Eveland, A. L., LaRue, T., Yang, F., Weeks, R., Je, B. I., ... & Jackson, D. (2015). FASCIATED EAR4 encodes a bZIP transcription factor that regulates shoot meristem size in maize. *The Plant Cell*, 27(1), 104-120.
- Penel, C., Gaspar, T., & Greppin, H. (1992). *Plant peroxidases, 1980-1990*. University of Geneva.
- Pérez-Ruiz, J. M., Spinola, M. C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawy, M., & Cejudo, F. J. (2006). Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *The Plant Cell*, 18(9), 2356-2368.
- Pesquet, E., Zhang, B., Gerber, L., Puhakainen, T., Courtois-Moreau, C., Alatalo, E., Gardestrom, P., Paulin, L., Kangasjarvi, J., Sundberg, B., Tuominen, H. (2010). Using the *Arabidopsis* information resource (TAIR) to find information about *Arabidopsis* genes. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 1:Unit1.11*.
- Pi, L., Aichinger, E., van der Graaff, E., Llavata-Peris, C. I., Weijers, D., Hennig, L., ... & Laux, T. (2015). Organizer-derived WOX5 signal maintains root columella stem cells through chromatin-mediated repression of CDF4 expression. *Developmental cell*, 33(5), 576-588.
- Pieterse, C. M., & Van Loon, L. C. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current opinion in plant biology*, 7(4), 456-464.
- Pieterse, C. M., Van Wees, S. C., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., ... & Van Loon, L. C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10(9), 1571-1580.
- Polverari, A., Molesini, B., Pezzotti, M., Buonauro, R., Marte, M., & Delledonne, M. (2003). Nitric oxide-mediated transcriptional

- changes in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(12), 1094-1105.
- Ponce, G., Barlow, P. W., Feldman, L. J., & Cassab, G. I. (2005). Auxin and ethylene interactions control mitotic activity of the quiescent centre, root cap size, and pattern of cap cell differentiation in maize. *Plant, cell & environment*, 28(6), 719-732.
- Pontier, D., Privat, I., Trifa, Y., Zhou, J. M., Klessig, D. F., & Lam, E. (2002). Differential regulation of TGA transcription factors by post-transcriptional control. *The Plant Journal*, 32(5), 641-653.
- Potters, G., Horemans, N., Bellone, S., Caubergs, R. J., Trost, P., Guisez, Y., & Asard, H. (2004). Dehydroascorbate influences the plant cell cycle through a glutathione-independent reduction mechanism. *Plant Physiology*, 134(4), 1479-1487.
- Potters, G., Horemans, N., & Jansen, M. A. (2010). The cellular redox state in plant stress biology—a charging concept. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(5), 292-300.
- Prado, A. M., Porterfield, D. M., & Feijó, J. A. (2004). Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development*, 131(11), 2707-2714.
- Prigge, M. J., Otsuga, D., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Drews, G. N., & Clark, S. E. (2005). Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *The Plant Cell*, 17(1), 61-76.
- Rahni, R., & Birnbaum, K. D. (2018). Week-long imaging of cell divisions in the *Arabidopsis* root meristem. *bioRxiv*, 268102.
- Rasbery, J. M., Shan, H., LeClair, R. J., Norman, M., Matsuda, S. P., & Bartel, B. (2007). *Arabidopsis thaliana* squalene epoxidase 1 is essential for root and seed development. *Journal of Biological Chemistry*, 282(23), 17002-17013.
- Rédei, G. P. (1992). A heuristic glance at the past of *Arabidopsis* genetics. *Methods in Arabidopsis research*, 1-15.
- Reichheld, J. P., Khafif, M., Riondet, C., Droux, M., Bonnard, G., & Meyer, Y. (2007). Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in *Arabidopsis* development. *The Plant Cell*, 19(6), 1851-1865.
- Reid, M. E. (1937). Localization of ascorbic acid in the cowpea plant at different periods of development. *American Journal of Botany*, 445-447.
- Reid, M. E. (1941). Relation of vitamin C to cell size in the growing region of the primary root of cowpea seedlings. *American Journal of Botany*, 28(5), 410-415.
- Riechmann, J. L., & Ratcliffe, O. J. (2000). A genomic perspective on plant transcription factors. *Current opinion in plant biology*, 3(5), 423-434.
- Rochon, A., Boyle, P., Wignes, T., Fobert, P. R., & Després, C. (2006). The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *The Plant Cell*, 18(12), 3670-3685.
- Roe, J. L., Nemhauser, J. L., & Zambryski, P. C. (1997). TOUSLED participates in apical tissue formation during gynoecium development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 9(3), 335-353.
- Romero-Puertas, M. C., Laxa, M., Matte, A., Zaninotto, F., Finkemeier, I., Jones, A. M., ... & Delledonne, M. (2007). S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *The Plant Cell*, 19(12), 4120-4130.
- Romero-Puertas, M. C., Perazzolli, M., Zago, E. D., & Delledonne, M. (2004). Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cellular microbiology*, 6(9), 795-803.
- Rosa, S., Ntoukakis, V., Ohmido, N., Pendle, A., Abranches, R., & Shaw, P. (2014). Cell differentiation and development in *Arabidopsis* are associated with changes in histone dynamics at the single-cell level. *The Plant Cell*, 26(12), 4821-4833.
- Rosso, M. G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., & Weisshaar, B. (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant molecular biology*, 53(1-2), 247-259.
- Röszer, T. (2014). Biosynthesis of nitric oxide in plants. In *Nitric oxide in plants: metabolism and role in stress physiology* (pp. 17-32). Springer, Cham.
- Rouhier, N. (2010). Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly. *New Phytologist*, 186(2), 365-372.
- Rouhier, N., Couturier, J., & Jacquot, J. P. (2006). Genome-wide analysis of plant glutaredoxin systems. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1685-1696.

- Rouhier, N., Gelhaye, E., & Jacquot, J. P. (2004). Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(11), 1266-1277.
- Rouhier, N., Lemaire, S. D., & Jacquot, J. P. (2008). The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 143-166.
- Running, M. P., Fletcher, J. C., & Meyerowitz, E. M. (1998). The WIGGUM gene is required for proper regulation of floral meristem size in Arabidopsis. *Development*, 125(14), 2545-2553.
- Running, M. P., & Meyerowitz, E. M. (1996). Mutations in the PERIANTHIA gene of Arabidopsis specifically alter floral organ number and initiation pattern. *Development*, 122(4), 1261-1269.
- Růžička, K., Šimášková, M., Duclercq, J., Petrášek, J., Zažímalová, E., Simon, S., ... & Benková, E. (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(11), 4284-4289.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., ... & Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell*, 99(5), 463-472.
- Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., & Scheres, B. (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes & development*, 17(3), 354-358.
- Saleh, O., Issman, N., Seumel, G. I., Stav, R., Samach, A., Reski, R., ... & Arazi, T. (2011). MicroRNA534a control of BLADE-ON-PETIOLE 1 and 2 mediates juvenile-to-adult gametophyte transition in *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal*, 65(4), 661-674.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Sánchez-Vicente, I., Fernández-Espinosa, M.G., Lorenzo, O. (2019). Nitric Oxide (NO) Molecular Targets: Reprogramming Plant Development Upon Stress. *Journal of Experimental Botany*. In press.
- Sang, Y., Silva-Ortega, C. O., Wu, S., Yamaguchi, N., Wu, M. F., Pfluger, J., ... & Wagner, D. (2012). Mutations in two non-canonical Arabidopsis SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPases cause embryogenesis and stem cell maintenance defects. *The plant journal*, 72(6), 1000-1014.
- Santuari, L., Sanchez-Perez, G. F., Luijten, M., Rutjens, B., Terpstra, I., Berke, L., ... & Maeo, K. (2016). The PLETHORA gene regulatory network guides growth and cell differentiation in Arabidopsis roots. *The Plant Cell*, 28(12), 2937-2951.
- Sanz, L., Albertos, P., Mateos, I., Sánchez-Vicente, I., Lechón, T., Fernández-Marcos, M., & Lorenzo, O. (2015). Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2857-2868.
- Sanz, L., Fernández-Marcos, M., Modrego, A., Lewis, D. R., Muday, G. K., Pollmann, S., ... & Lorenzo, O. (2014). Nitric oxide plays a role in stem cell niche homeostasis through its interaction with auxin. *Plant physiology*, 166(4), 1972-1984.
- Sarkar, A. K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., ... & Laux, T. (2007). Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature*, 446(7137), 811.
- Sarkar, S., Das, A., Khandagale, P., Maiti, I. B., Chattopadhyay, S., & Dey, N. (2018). Interaction of Arabidopsis TGA3 and WRKY53 transcription factors on *Cestrum yellow leaf curling virus* (CmYLCV) promoter mediates salicylic acid-dependent gene expression in planta. *Planta*, 247(1), 181-199.
- Scheres, B., Benfey, P., & Dolan, L. (2002). Root development. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 1.
- Schippers, J. H., Foyer, C. H., & van Dongen, J. T. (2016). Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering. *Current opinion in plant biology*, 29, 121-128.
- Schnaubelt, D., Queval, G., Dong, Y., DIAZ-VIVANCOS, P. E. D. R. O., Makgopa, M. E., Howell, G., ... & Foyer, C. H. (2015). Low glutathione regulates gene expression and the redox potentials of the nucleus and cytosol in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment*, 38(2), 266-279.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671.

- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*, 4(1-2), 7-25.
- Sedgwick, S. G., & Smerdon, S. J. (1999). The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends in biochemical sciences*, 24(8), 311-316.
- Serrato, A. J., Pérez-Ruiz, J. M., Spínola, M. C., & Cejudo, F. J. (2004). A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 43821-43827.
- Sessions, A., Nemhauser, J. L., McColl, A., Roe, J. L., Feldmann, K. A., & Zambryski, P. C. (1997). ETTIN patterns the *Arabidopsis* floral meristem and reproductive organs. *Development*, 124(22), 4481-4491.
- Shahid, M., Imran, Q. M., Hussain, A., Khan, M., Lee, S. U., Mun, B. G., & Yun, B. W. (2019). Comprehensive Analyses of Nitric Oxide-Induced Plant Stem Cell-Related Genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genes*, 10(2), 173.
- Shapiro, A. D. (2005). Nitric oxide signaling in plants. *Vitamins & Hormones*, 72, 339-398.
- Shearer, H. L., Cheng, Y. T., Wang, L., Liu, J., Boyle, P., Després, C., ... & Fobert, P. R. (2012). *Arabidopsis* clade I TGA transcription factors regulate plant defenses in an NPR1-independent fashion. *Molecular plant-microbe interactions*, 25(11), 1459-1468.
- Shen, Q., Wang, Y. T., Tian, H., & Guo, F. Q. (2013). Nitric oxide mediates cytokinin functions in cell proliferation and meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 6(4), 1214-1225.
- Shimada, S., Komatsu, T., Yamagami, A., Nakazawa, M., Matsui, M., Kawaide, H., ... & Nakano, T. (2015). Formation and dissociation of the BSS1 protein complex regulates plant development via brassinosteroid signaling. *The Plant Cell*, 27(2), 375-390.
- Shimotohno, A., Heidstra, R., Blilou, I., & Scheres, B. (2018). Root stem cell niche organizer specification by molecular convergence of PLETHORA and SCARECROW transcription factor modules. *Genes & development*, 32(15-16), 1085-1100.
- Silva-Navas, J., Moreno-Risueno, M. A., Manzano, C., Téllez-Robledo, B., Navarro-Neila, S., Carrasco, V., ... & del Pozo, J. C. (2016). Flavonols mediate root phototropism and growth through regulation of proliferation-to-differentiation transition. *The Plant Cell*, 28(6), 1372-1387.
- Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. *In Vitro, Symp. Soc. Exp. Biol* (No. 11).
- Song, Y. H., Song, N. Y., Shin, S. Y., Kim, H. J., Yun, D. J., Lim, C. O., ... & Hong, J. C. (2008). Isolation of CONSTANS as a TGA4/OBF4 interacting protein. *Molecules & Cells* (Springer Science & Business Media BV), 25(4).
- Sozzani, R., Cui, H., Moreno-Risueno, M. A., Busch, W., Van Norman, J. M., Vernoux, T., ... & Benfey, P. N. (2010). Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature*, 466(7302), 128.
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., ... & Van Loon, L. C. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, 15(3), 760-770.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., & Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature*, 414(6859), 98.
- Stahl, Y., Wink, R. H., Ingram, G. C., & Simon, R. (2009). A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Current Biology*, 19(11), 909-914.
- Stamler, J. S., Singel, D. J., & Loscalzo, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258(5090), 1898-1902.
- Steeves, T. A., & Sussex, I. M. (1989). *Patterns in plant development*. Cambridge University Press.
- Steimer, A., Schöb, H., & Grossniklaus, U. (2004). Epigenetic control of plant development: new layers of complexity. *Current opinion in plant biology*, 7(1), 11-19.
- Stöhr, C. (2006). Nitric oxide—a product of plant nitrogen metabolism. In *Nitric Oxide in Plant Growth, Development and Stress Physiology* (pp. 15-34). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Stöhr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W. R., & Rockel, P. (2001). A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta*, 212(5-6), 835-841.

- Stotz, H. U., Mueller, S., Zoeller, M., Mueller, M. J., & Berger, S. (2013). TGA transcription factors and jasmonate-independent COI1 signalling regulate specific plant responses to reactive oxylipins. *Journal of experimental botany*, 64(4), 963-975.
- Subczynski, W. K., Lomnicka, M., & Hyde, J. S. (1996). Permeability of nitric oxide through lipid bilayer membranes. *Free radical research*, 24(5), 343-349.
- Sun, T., Busta, L., Zhang, Q., Ding, P., Jetter, R., & Zhang, Y. (2018). TGACG-BINDING FACTOR 1 (TGA1) and TGA4 regulate salicylic acid and piperolic acid biosynthesis by modulating the expression of SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE DEFICIENT 1 (SARD1) and CALMODULIN-BINDING PROTEIN 60g (CBP60g). *New Phytologist*, 217(1), 344-354.
- Sunilkumar, G., Mohr, L., Lopata-Finch, E., Emani, C., & Rathore, K. S. (2002). Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. *Plant molecular biology*, 50(3), 463-479.
- Swarup, R., Perry, P., Hagenbeek, D., Van Der Straeten, D., Beemster, G. T., Sandberg, G., ... & Bennett, M. J. (2007). Ethylene upregulates auxin biosynthesis in Arabidopsis seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *The Plant Cell*, 19(7), 2186-2196.
- Szymanski, D. B., Liao, B., & Zielinski, R. E. (1996). Calmodulin isoforms differentially enhance the binding of cauliflower nuclear proteins and recombinant TGA3 to a region derived from the Arabidopsis Cam-3 promoter. *The Plant Cell*, 8(6), 1069-1077.
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajeroska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., ... & Dong, X. (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, 321(5891), 952-956.
- Tejedo, J. R., Tapia-Limonchi, R., Mora-Castilla, S., Cahuana, G. M., Hmadcha, A., Martin, F., ... & Soria, B. (2010). Low concentrations of nitric oxide delay the differentiation of embryonic stem cells and promote their survival. *Cell death & disease*, 1(10), e80.
- Teotia, S., Muthuswamy, S., & Lamb, R. (2010). Radical-induced cell death1 and similar to RCD one1 and the stress-induced morphogenetic response. *Plant signaling & behavior*, 5(2), 143-145.
- Terrile, M. C., París, R., Calderón-Villalobos, L. I., Iglesias, M. J., Lamattina, L., Estelle, M., & Casalongué, C. A. (2012). Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the Arabidopsis TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor. *The Plant Journal*, 70(3), 492-500.
- Thurrow, C., Schiermeyer, A., Krawczyk, S., Butterbrodt, T., Nikolov, K., & Gatz, C. (2005). Tobacco bZIP transcription factor TGA2. 2 and related factor TGA2. 1 have distinct roles in plant defense responses and plant development. *the plant journal*, 44(1), 100-113.
- Tomlinson, P. B. (1990). *The structural biology of palms*. Oxford University Press.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., ... & Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and cufflinks. *Nature protocols*, 7(3), 562.
- Tsukagoshi, H. (2016). Control of root growth and development by reactive oxygen species. *Current Opinion in Plant Biology*, 29, 57-63.
- Tsukagoshi, H., Busch, W., & Benfey, P. N. (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell*, 143(4), 606-616.
- Tyburski, J., Dunajska, K., & Tretyn, A. (2009). Reactive oxygen species localization in roots of Arabidopsis thaliana seedlings grown under phosphate deficiency. *Plant Growth Regulation*, 59(1), 27-36.
- Uhrig, J. F., Huang, L. J., Barghahn, S., Willmer, M., Thurrow, C., & Gatz, C. (2017). CC-type glutaredoxins recruit the transcriptional co-repressor TOPLESS to TGA-dependent target promoters in Arabidopsis thaliana. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(2), 218-226.
- Van Aken, O., Pečenková, T., Van De Cotte, B., De Rycke, R., Eeckhout, D., Fromm, H., ... & Van Breusegem, F. (2007). Mitochondrial type-I prohibitins of Arabidopsis thaliana are required for supporting proficient meristem development. *The Plant Journal*, 52(5), 850-864.
- van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., & Scheres, B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature*, 390(6657), 287.

- Van Leene, J., Eeckhout, D., Cannoot, B., De Winne, N., Persiau, G., Van De Slijke, E., ... & Martens, L. (2015). An improved toolbox to unravel the plant cellular machinery by tandem affinity purification of Arabidopsis protein complexes. *Nature protocols*, 10(1), 169.
- Van Ree, K., Gehl, B., Wassim Chehab, E., Tsai, Y. C., & Braam, J. (2011). Nitric oxide accumulation in Arabidopsis is independent of NOA1 in the presence of sucrose. *The Plant Journal*, 68(2), 225-233.
- Veit, B. (2006). Stem cell signalling networks in plants. *Plant molecular biology*, 60(6), 793-810.
- Vellosillo, T., Martínez, M., López, M. A., Vicente, J., Cascón, T., Dolan, L., ... & Castresana, C. (2007). Oxylinins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *The Plant Cell*, 19(3), 831-846.
- Vernoux, T., Sánchez-Fernández, R., & May, M. (2002). Glutathione biosynthesis in plants. In *Oxidative stress in plants*(pp. 297-311). Routledge.
- Vernoux, T., Wilson, R. C., Seeley, K. A., Reichheld, J. P., Muroy, S., Brown, S., ... & May, M. J. (2000). The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *The Plant Cell*, 12(1), 97-109.
- Vilarrasa-Blasi, J., González-García, M. P., Frigola, D., Fàbregas, N., Alexiou, K. G., López-Bigas, N., ... & Ibañes, M. (2014). Regulation of plant stem cell quiescence by a brassinosteroid signaling module. *Developmental cell*, 30(1), 36-47.
- Vinson, C. R., Sigler, P. B., & McKnight, S. L. (1989). Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*, 246(4932), 911-916.
- Wang, J. W., Wang, L. J., Mao, Y. B., Cai, W. J., Xue, H. W., & Chen, X. Y. (2005). Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(8), 2204-2216.
- Wang, L., & Fobert, P. R. (2013). Arabidopsis clade I TGA factors regulate apoplastic defences against the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* through endoplasmic reticulum-based processes. *PLoS One*, 8(9), e77378.
- Wang, R., Okamoto, M., Xing, X., & Crawford, N. M. (2003). Microarray analysis of the nitrate response in Arabidopsis roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant physiology*, 132(2), 556-567.
- Wang, Y., Ries, A., Wu, K., Yang, A., & Crawford, N. M. (2010). The Arabidopsis prohibitin gene PHB3 functions in nitric oxide-mediated responses and in hydrogen peroxide-induced nitric oxide accumulation. *The Plant Cell*, 22(1), 249-259.
- Wang, Y., Salasini, B. C., Khan, M., Devi, B., Bush, M., Subramaniam, R., & Hepworth, S. R. (2019). Clade I TGA bZIP transcription factors mediate BLADE-ON-PETIOLE-dependent regulation of development. *Plant Physiology*, pp-00805.
- Wang, Y., Yun, B. W., Kwon, E., Hong, J. K., Yoon, J., & Loake, G. J. (2006). S-nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. *Journal of experimental botany*, 57(8), 1777-1784.
- Wany, A., Foyer, C. H., & Gupta, K. J. (2018). Nitrate, NO and ROS signaling in stem cell homeostasis. *Trends in plant science*, 23(12), 1041-1044.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191.
- Waters, M. T., Scaffidi, A., Sun, Y. K., Flematti, G. R., & Smith, S. M. (2014). The karrikin response system of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 79(4), 623-631.
- Welch, D., Hassan, H., Blilou, I., Immink, R., Heidstra, R., & Scheres, B. (2007). Arabidopsis JACKDAW and MAGPIE zinc finger proteins delimit asymmetric cell division and stabilize tissue boundaries by restricting SHORT-ROOT action. *Genes & Development*, 21(17), 2196-2204.
- Whippo, C. W., Khurana, P., Davis, P. A., DeBlasio, S. L., DeSloover, D., Staiger, C. J., & Hangarter, R. P. (2011). THRUMIN1 is a light-regulated actin-bundling protein involved in chloroplast motility. *Current Biology*, 21(1), 59-64.
- Wildwater, M., Campilho, A., Perez-Perez, J. M., Heidstra, R., Blilou, I., Korthout, H., ... & Scheres, B. (2005). The RETINOBLASTOMA-RELATED gene regulates stem cell maintenance in Arabidopsis roots. *Cell*, 123(7), 1337-1349.

- Willemsen, V., Bauch, M., Bennett, T., Campilho, A., Wolkenfelt, H., Xu, J., ... & Scheres, B. (2008). The NAC domain transcription factors FEZ and SOMBRERO control the orientation of cell division plane in Arabidopsis root stem cells. *Developmental cell*, 15(6), 913-922.
- Woerlen, N., Allam, G., Popescu, A., Corrigan, L., Pautot, V., & Hepworth, S. R. (2017). Repression of BLADE-ON-PETIOLE genes by KNOX homeodomain protein BREVIPEDICELLUS is essential for differentiation of secondary xylem in Arabidopsis root. *Planta*, 245(6), 1079-1090.
- Wu, X. M., Yu, Y., Han, L. B., Li, C. L., Wang, H. Y., Zhong, N. Q., ... & Xia, G. X. (2012). The tobacco BLADE-ON-PETIOLE2 gene mediates differentiation of the corolla abscission zone by controlling longitudinal cell expansion. *Plant physiology*, 159(2), 835-850.
- Wysocka-Diller, J. W., Helariutta, Y., Fukaki, H., Malamy, J. E., & Benfey, P. N. (2000). Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development*, 127(3), 595-603.
- Xiang, C., Miao, Z., & Lam, E. (1997). DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in Arabidopsis thaliana. *Plant molecular biology*, 34(3), 403-415.
- Xing, S., Rosso, M. G., & Zachgo, S. (2005). ROXY1, a member of the plant glutaredoxin family, is required for petal development in Arabidopsis thaliana. *Development*, 132(7), 1555-1565.
- Xu, M., Hu, T., McKim, S. M., Murmu, J., Haughn, G. W., & Hepworth, S. R. (2010). Arabidopsis BLADE-ON-PETIOLE1 and 2 promote floral meristem fate and determinacy in a previously undefined pathway targeting APETALA1 and AGAMOUS-LIKE24. *The Plant Journal*, 63(6), 974-989.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., & Takahashi, S. (1999). An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in plant science*, 4(4), 128-129.
- Yang, F., Bui, H. T., Pautler, M., Llaca, V., Johnston, R., Lee, B. H., ... & Jackson, D. (2015). A maize glutaredoxin gene, Abphy12, regulates shoot meristem size and phyllotaxy. *The Plant Cell*, 27(1), 121-131.
- Yemets, A. I., Krasnylenko, Y. A., Lytvyn, D. I., Sheremet, Y. A., & Blume, Y. B. (2011). Nitric oxide signalling via cytoskeleton in plants. *Plant Science*, 181(5), 545-554.
- Yoshida, T., Ohama, N., Nakajima, J., Kidokoro, S., Mizoi, J., Nakashima, K., ... & Osakabe, Y. (2011). Arabidopsis HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Molecular Genetics and Genomics*, 286(5-6), 321-332.
- Yu, X., Pasternak, T., Eiblmeier, M., Ditengou, F., Kochersperger, P., Sun, J., ... & Zhou, W. (2013). Plastid-localized glutathione reductase2-regulated glutathione redox status is essential for Arabidopsis root apical meristem maintenance. *The Plant Cell*, 25(11), 4451-4468.
- Zander, M., Chen, S., Imkampe, J., Thurow, C., & Gatz, C. (2012). Repression of the Arabidopsis thaliana jasmonic acid/ethylene-induced defense pathway by TGA-interacting glutaredoxins depends on their C-terminal ALWL motif. *Molecular plant*, 5(4), 831-840.
- Zander, M., La Camera, S., Lamotte, O., Métraux, J. P., & Gatz, C. (2010). Arabidopsis thaliana class-II TGA transcription factors are essential activators of jasmonic acid/ethylene-induced defense responses. *The Plant Journal*, 61(2), 200-210.
- Zander, M., Thurow, C., & Gatz, C. (2014). TGA transcription factors activate the salicylic acid-suppressible branch of the ethylene-induced defense program by regulating ORA59 expression. *Plant physiology*, 165(4), 1671-1683.
- Zhang, B., Foley, R. C., & Singh, K. B. (1993). Isolation and characterization of two related Arabidopsis ocs-element bZIP binding proteins. *The Plant Journal*, 4(4), 711-716.
- Zhang, H., Han, W., De Smet, I., Talboys, P., Loya, R., Hassan, A., ... & Wang, M. H. (2010). ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the Arabidopsis primary root meristem. *The Plant Journal*, 64(5), 764-774.
- Zhang, Y., Cheng, Y. T., Qu, N., Zhao, Q., Bi, D., & Li, X. (2006). Negative regulation of defense responses in Arabidopsis by two NPR1 paralogs. *The Plant Journal*, 48(5), 647-656.
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X., & Dong, X. (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for

- salicylic acid induction of the PR-1 gene. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(11), 6523-6528.
- Zhang, Y., Jiao, Y., Liu, Z., & Zhu, Y. X. (2015). ROW1 maintains quiescent centre identity by confining WOX5 expression to specific cells. *Nature communications*, 6, 6003.
- Zhang, Y., Tessaro, M. J., Lassner, M., & Li, X. (2003). Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 15(11), 2647-2653.
- Zhang, Z. W., Luo, S., Zhang, G. C., Feng, L. Y., Zheng, C., Zhou, Y. H., ... & Liu, W. J. (2017). Nitric oxide induces monosaccharide accumulation through enzyme S-nitrosylation. *Plant, cell & environment*, 40(9), 1834-1848.
- Zhou, J. M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., & Klessig, D. F. (2000). NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(2), 191-202.
- Zhou, W., Lozano-Torres, J. L., Blilou, I., Zhang, X., Zhai, Q., Smant, G., ... & Scheres, B. (2019). A Jasmonate Signaling Network Activates Root Stem Cells and Promotes Regeneration. *Cell*.
- Zhou, W., Wei, L., Xu, J., Zhai, Q., Jiang, H., Chen, R., ... & Liu, C. M. (2010). Arabidopsis tyrosylprotein sulfotransferase acts in the auxin/PLETHORA pathway in regulating postembryonic maintenance of the root stem cell niche. *The Plant Cell*, 22(11), 3692-3709.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., & Gruissem, W. (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant physiology*, 136(1), 2621-2632.