

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en
Ciencias Biológicas

**“Estudio de los mecanismos de acción de
factores de transcripción vegetales de la
familia TCP”.**

Lic. Lucía Victoria Ferrero

Director de Tesis: Dr. Daniel H. González

Co-directora de Tesis: Dra. Ivana L. Viola

Laboratorio de Biología Molecular
Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)

-2019-

AGRADECIMIENTOS

Después de estos 5 añitos de *love and despair*, quiero agradecer...

a la Universidad Nacional del Litoral y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por darme la posibilidad de realizar mis estudios de posgrado, en donde además puedo desempeñarme como docente, tarea que disfruto muchísimo. Sigamos defendiendo la Universidad Pública y Gratuita.

a CONICET y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por financiar este postgrado de forma integral. Es mi deseo que volvamos a tener un Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva en Argentina pronto.

al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral por brindarme un espacio de trabajo y por acercarme a la comunidad científica. Al Dr. Daniel González por darme la posibilidad de formar parte del LBM, así como también por compartir su experiencia y conocimientos durante el desarrollo de la Tesis. A la Dra. Ivana Viola y al resto de lxs integrantes del LBM, por sus aportes no solo a nivel científico, por su apoyo y motivación, y más que nada por soportarme todos estos años con mis ciclotimias y mis quejas. Es que tengo un par de problemas y obsesiones, creo que ya se dieron cuenta. A toda la comunidad científica del IAL y en especial al Dr. Federico Ariel, por estar siempre dispuesto a colaborar, por promover el trabajo en equipo y por abrir puertas.

a la peña de INTENSES por los almuerzos en el IAL, las birras y los graaandes debates. Somos un grupo muy heterogéneo y multifacético y eso está muy biennnnn. Gracias por hacer el camino del doctorado menos tedioso. Por los cursos compartidos, los congresos, seminarios y más que nada gracias por los barriles y las pintas, las hamburguesas y los choris...

a mis viejxs y a mi hermana, porque siempre me escuchan, me motivan y me re bancan en todas. Me hacen sentir que puedo hacer cualquier cosa que me proponga y eso no es poco, es un montonnnnn. Muchas muchas gracias, les quiero una banda, a ustedes y a toda mi familia que siempre unida tira para adelante.

a mis amigos *all over the world*, en Alemania, Holanda, Brasil, Perú, y acá nomas Misiones, Buenos Aires, Rosario y Sanca, siempre juntas por más que pase el tiempo. Cuando nos reencontramos parece que fue ayer que nos saludamos con un abrazo y un hasta pronto. Son lo más del mundo, y hace muy bien que estén desparramadxs y a las vueltas tirando su magia.

al feminismo y a todas las pibas que conocí en este último tiempo, juntas somos poderosas, juntas podemos hacer todo lo que queramos... y por qué no ahora solas también, porque lo vamos a tirar. A las Martas, a las Mantis, a las Lluvias, y también a todo el fuchi de pibxs.

LUGAR DE REALIZACIÓN DE LA TESIS Y PUBLICACIONES

El presente trabajo de tesis fue llevado a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (Universidad Nacional del Litoral-CONICET). Los resultados obtenidos dieron lugar a la siguiente publicación científica en una revista internacional con referato estricto:

LV Ferrero, IL Viola, FD Ariel, DH Gonzalez (2019) Class I TCP transcription factors target the gibberellin biosynthesis gene *GA20ox1* and the growth promoting genes *HBI1* and *PRE6* during thermomorphogenic growth in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 60(8):1633-1645.

1. ÍNDICE

1. ÍNDICE.....	3
2. ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA.....	7
2.1. Abreviaturas y símbolos	7
2.2. Nomenclatura para genes y proteínas	10
3. RESUMEN	11
3.1. RESUMEN	11
3.2. SUMMARY	14
4. INTRODUCCIÓN	18
4.1. Arabidopsis como modelo.....	19
4.2. Hormonas como reguladores del crecimiento.....	22
4.2.1. Auxinas	22
4.2.2. Giberelinas	25
4.2.3. Brasinosteroides.....	27
4.3. Fotomorfogénesis y escotomorfogénesis	30
4.4. Termomorfogénesis	33
4.4.1. Percepción y respuesta a la temperatura	34
4.4.2. PIF4 como regulador central de la termomorfogénesis	36
4.4.3. Módulo BAP.....	40
4.5. Las proteínas TCP	42
4.5.1. Interacciones proteína-ADN del dominio TCP.....	44
4.5.2. Interacciones proteína-proteína	46
4.5.3. Funciones de los factores de transcripción TCP.....	47
5. OBJETIVOS	55
5.1. Objetivos específicos.....	55
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57

6.1. Cepas utilizadas	57
6.2. Material Vegetal.....	57
6.3. Vectores utilizados	58
6.4. Medios de cultivos para <i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	59
6.5. Medios de cultivo para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
6.6. Medios de cultivos para <i>Arabidopsis thaliana</i>	60
6.7. Condiciones generales de crecimiento de plantas en cámara de cultivo	60
6.8. Análisis de secuencias	61
6.9. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	61
6.10. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	61
6.11. Purificación de fragmentos de ADN	61
6.12. Digestión con endonucleasas de restricción.....	62
6.13. Ligación de moléculas de ADN	62
6.14. Generación de construcciones génicas	62
6.15. Determinación de la secuencia de moléculas de ADN.....	63
6.16. Transformación de <i>Escherichia coli</i> con ADN plasmídico por electroporación.....	63
6.17. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con ADN plasmídico por electroporación	64
6.18. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en presencia de acetato de litio	64
6.19. Preparación de ADN plasmídico.....	65
6.20. Preparación de ADN genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	65
6.21. Transformación estable de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
6.22. Análisis de plantas transformadas	67
6.23. Medición de la longitud del hipocotilo y del pecíolo	67
6.24. Preparación y análisis de ARN.....	67
6.25. Extracción de proteínas e inmunotransferencia.....	68
6.26. Microscopía electrónica de barrido	68

6.27. Ensayo de actividad β -glucuronidasa	68
6.28. Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa	69
6.29. Ensayos de interacción proteína-proteína en levaduras	69
6.30. Transformación transitoria de <i>Nicotiana benthamiana</i>	70
6.31. Ensayo de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC)	71
6.32. Inmunoprecipitación de la cromatina	71
7. RESULTADOS	73
7.1. Estudio del papel de los factores de transcripción TCP de clase I durante la elongación del hipocotilo de Arabidopsis.....	73
7.1.1. Elongación del hipocotilo frente a cambios en las condiciones de luz	73
7.1.2. Elongación del hipocotilo frente a cambios en la temperatura ambiente	75
7.1.3. Las plantas <i>tcp14-4 tcp15-3</i> presentan defectos en la elongación de las células del hipocotilo durante el crecimiento en alta temperatura	77
7.2. Las proteínas TCP de clase I participan en respuestas de desarrollo dependientes de la temperatura en Arabidopsis	78
7.3. Estudio de los mecanismos moleculares mediante los cuales las proteínas TCP modulan la elongación del hipocotilo frente a alta temperatura	80
7.3.1. TCP14 y TCP15 están involucradas en la inducción de la expresión de genes <i>SAUR</i> en respuesta a un incremento en la temperatura ambiente.....	81
7.3.2. Relación entre las proteínas TCP de clase I y la vía hormonal de auxinas	85
7.3.3. Relación entre las proteínas TCP de clase I y la vía hormonal de giberelinas.....	89
7.3.4. Estudio de la relación entre las proteínas TCP de clase I y PIF4 durante la termomorfogénesis.....	93
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	107
8.1. Las proteínas TCP de clase I están involucradas en procesos de elongación celular en respuesta a estímulos externos como luz y temperatura.....	107
8.2. TCP14 y TCP15 son blancos directos de PIF4 y modulan la expresión de genes relacionados con el crecimiento en alta temperatura	108
8.3. La homeostasis de auxinas no está afectada en plantas mutantes en <i>TCP14</i> y <i>TCP15</i> .	109

8.4. Las proteínas TCP de clase I forman parte de un bucle de retroalimentación positiva a altas temperaturas, integrándose así a la vía de las giberelinas.....	110
8.5. La interacción entre TCP15 y PIF4 refuerza el accionar de PIF4, mejorando la unión de éste a los promotores de algunos de sus genes blanco.....	111
8.6. Las proteínas TCP de clase I podrían integrarse al módulo BAP	112
8.7. Las proteínas TCP de clase I y de clase II regulan de manera directa distintos genes involucrados en la biosíntesis de hormonas durante la termomorfogénesis.....	113
9. BIBLIOGRAFÍA	116
10. ANEXOS	140
10.1. ANEXO I: Lista de oligonucleótidos usados	140
10.1.1. Oligonucleótidos usados para clonado	140
10.1.2. Oligonucleótidos usados para RT-qPCR y CHIP-qPCR.....	140
10.1.3. Oligonucleótidos usados para analizar plantas <i>tcp15-3 DR5::GUS</i>	142
10.2. ANEXO II: Niveles de expresión de las plantas transgénicas obtenidas y utilizadas durante el trabajo de Tesis	143
10.3. ANEXO III: Genes <i>SAUR</i> regulados negativamente en plantas <i>p15::TCP15-EAR</i>	144
10.4. ANEXO IV: Genes <i>SAUR</i> con sitios TCP en sus promotores.....	145
10.5. ANEXO V: Lista de genes blancos de PIF4 con expresión reducida en plantas <i>p15::TCP15-EAR</i>	146
10.6. ANEXO VI: Lista de secuencias consenso enriquecidas en los promotores de los genes blancos de PIF4 con expresión reducida en plantas <i>p15::TCP15-EAR</i>	152
10.7. ANEXO VII: Ubicación de los sitios de unión para PIF4 y proteínas TCP en los promotores de los genes blancos de PIF4 con expresión reducida en plantas <i>p15::TCP15-EAR</i>	154
10.7.1. Genes con motivos de unión para proteínas TCP y PIF4 en sus promotores	154
10.7.2. Genes con motivos de unión sólo para PIF4 en sus promotores	159
10.7.3. Genes con motivos de unión sólo para proteínas TCP en sus promotores	161
10.7.4. Genes sin motivos de unión para proteínas TCP o PIF4 en sus promotores.....	162
10.8. ANEXO VIII: Lista de los sitios de unión de PIF4 y proteínas TCP más cercanos en los promotores de los genes blancos de PIF4 con expresión reducida en plantas <i>p15::TCP15-EAR</i>	164

2. ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA

2.1. Abreviaturas y símbolos

3AT	3-amino-1,2,4-triazol
A	adenina
ABA	ácido abscísico
ABRC	<i>Arabidopsis Biological Resource Center</i>
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ADN-T	ADN de transferencia
AGI	<i>Arabidopsis Genome Initiative</i>
amiARN	micro ARN artificial
ANOVA	análisis de la varianza
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa A	ribonucleasa A
BiFC	Complementación Bimolecular de la Fluorescencia
BL	brasinólido
BR	brasinosteroides
C	citosina
CaMV	virus del mosaico de la coliflor
ChIP	inmunoprecipitación de la cromatina
CK	citoquininas
cm	centímetros
col.	colaboradores
dNTP	desoxinucleótidostrifosfato (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

DO	densidad óptica
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Ej.	ejemplo
ET	etileno
FAA	formaldehído, alcohol, acético
Fig.	figura
g	gravedad
G	guanina
GA	giberelinas
GFP	proteína fluorescente verde
GUS	β -glucuronidasa
h	hora / horas
His	histidina
IAA	ácido indolacético
JA	ácido jasmónico
LB	Luria-Bertani
Leu	leucina
M	molar
MQ	agua mili-Q
min	minuto
ml	mililitro/s
mM	milimolar
mm	milímetros
MS	medio de cultivo Murashige-Skoog
MUG	4-metilumbeliferil β -D-glucurónido

NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Centre</i>
ng	nanogramos
nm	nanometros
nM	nanomolar
PAC	paclobutrazol
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
PVDF	fluoruro de polivinilideno
p/v	peso en volumen
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PM	peso molecular
OE	sobreexpresante
ON	<i>over night</i> (durante la noche)
RAM	<i>Root Apical Meristem</i> – meristema apical de la raíz
rpm	revoluciones por minuto
RT-qPCR	retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa en tiempo real
s	segundos
SA	ácido salicílico
SAM	<i>Shoot Apical Meristem</i> – meristema apical del tallo
SDS	dodecil sulfato de sodio
SL	estrigolactonas
SOB	<i>Super Optimal Broth</i> (caldo súper óptimo)
T	timina
TAE	tris, acetato, EDTA
Tm	temperatura de fusión

Trp	triptófano
U	unidad / es
Ura	uracilo
UV	ultravioleta
V	voltio
v/v	volumen en volumen
vol	volumen/es
WT	genotipo salvaje
X-gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-glucurónido
Y2H	Doble Híbrido en levaduras
ZT	<i>Zeitgeber Time</i>
μE	microeinstein
μg	microgramos
μl	microlitros
μm	micrometros
μM	micromolar
°C	grados centígrados

2.2. Nomenclatura para genes y proteínas

A lo largo de este manuscrito se ha adoptado la siguiente convención al referirnos a proteínas y genes:

- **Proteínas:** se escriben en mayúscula. Ej.: TCP15
- **Genes:** se escriben en mayúscula e itálica. Ej.: *TCP15*.
- **Líneas mutantes:** Se escriben en minúscula e itálica. Ej.: *tcp14-4 tcp15-3*: mutante en los genes *TCP14* y *TCP15*

3. RESUMEN

3.1. RESUMEN

El término termomorfogénesis hace referencia a los cambios en los patrones de crecimiento, desarrollo y morfología de las plantas que se producen como consecuencia de un incremento moderado en la temperatura ambiente, que supera la temperatura ideal de crecimiento de las plantas, pero no alcanza niveles para producir estrés por calor. Dentro de estos cambios se encuentra una mayor elongación del hipocotilo y de los pecíolos de las hojas. En *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), cuya temperatura normal de crecimiento es de alrededor de 23°C, estos cambios se observan cuando las plantas crecen entre 28°C y 29°C. A partir de diversos estudios se ha propuesto que PIF4, un factor de transcripción de la familia bHLH de *Arabidopsis*, es un actor central en la termomorfogénesis. Algunas vías hormonales, como las de giberelinas, brasinosteroides y auxinas, también están involucradas en esta respuesta. Durante la elongación del hipocotilo, PIF4 actúa promoviendo la síntesis de auxinas, giberelinas y brasinosteroides mediante la regulación directa de la expresión de genes que codifican enzimas de biosíntesis de estas hormonas. Por otro lado, se ha reportado que varios miembros de la familia de genes *SAUR* (*SMALL AUXIN UP RNA*), cuya expresión se induce en forma temprana por auxinas, también son requeridos para la respuesta al aumento en la temperatura y son inducidos en forma directa por PIF4. Además, los genes *PRE*, *PAR*, *IBL1*, *HBI1* y *BEE*, que codifican proteínas con dominio HLH, están involucrados en la regulación de la expansión celular en respuesta al ambiente mediante vías relacionadas con las del factor de transcripción PIF4.

Los factores de transcripción de la familia TCP son específicos de plantas. Su nombre se debe a que sus miembros poseen un dominio proteico conservado, denominado TCP, involucrado en la unión al ADN y en la interacción con otros miembros de la familia. Esta familia se divide a su vez en dos clases, denominadas I y II, de acuerdo a características presentes dentro y fuera del dominio TCP. Las proteínas TCP participan en múltiples aspectos del desarrollo vegetal, de la germinación a la formación de flores y frutos, modulando la respuesta a estímulos tanto internos como externos. En general, estas proteínas actúan a través de la regulación, ya sea positiva o negativa, de la proliferación, el crecimiento y la diferenciación celular, y participan en diversas vías hormonales y en la regulación del ritmo circadiano. En *Arabidopsis*, la familia TCP está constituida por 24 miembros, 13 pertenecientes a la clase I y 11 pertenecientes a la clase II. Dentro de la clase I, los miembros más estudiados hasta el momento son *TCP14* y *TCP15*. Estos factores de transcripción actúan en forma redundante regulando la germinación, la estatura de la planta y el desarrollo de hojas y órganos florales. Las proteínas TCP de clase I también participan de la respuesta a las hormonas giberelinas, ya que se ha encontrado que la

actividad de las mismas es inhibida por los reguladores negativos de la respuesta a giberelinas DELLA, cuya destrucción mediada por la acumulación de esta hormona permitiría que las proteínas TCP sean liberadas para ejercer su acción.

Durante el desarrollo del presente trabajo de Tesis nos propusimos como objetivo estudiar el funcionamiento de las proteínas TCP de clase I como coordinadores del desarrollo de las plantas en respuesta a señales internas y del ambiente. Hemos determinado que TCP14 y TCP15 son necesarias para la respuesta de Arabidopsis al aumento en la temperatura ambiente. Particularmente, encontramos que las mutantes deficientes en estas proteínas tienen afectado el crecimiento de los pecíolos y de los hipocotilos que ocurre ante un incremento en la temperatura ambiente. TCP14 y TCP15 actuarían modulando procesos de expansión celular relacionados con el crecimiento de estos órganos.

Si bien las plantas deficientes en *TCP14* y *TCP15* presentan un menor crecimiento del hipocotilo en condiciones de alta temperatura, nuestros resultados sugieren que estas proteínas TCP de clase I no mediarían las respuestas a alta temperatura a través de la regulación de la biosíntesis de auxinas. Sin embargo, observamos que la inducción de algunos genes de respuesta a auxinas que son regulados por los factores ARF de respuesta a esta hormona, como *SAUR19*, *SAUR20*, *SAUR21*, *SAUR63* y *SAUR65*, está afectada en las mutantes en *TCP14* y *TCP15*. También encontramos que la expresión de varios de estos genes es inducida normalmente por auxinas en las mutantes *tcp14 tcp15*, aunque esto no ocurre con *SAUR63*. Estos resultados plantean un escenario complejo, ya que sugieren que las proteínas TCP podrían actuar regulando la expresión de los genes *SAUR* tanto de manera independiente como en respuesta a auxinas. Dado que muchos de los genes *SAUR* presentan motivos de unión para las proteínas TCP en sus regiones promotoras, es posible pensar que las proteínas TCP modularían la expresión de estos genes en forma directa. Además, podrían ser requeridas para la correcta inducción de algunos de estos genes por los factores de transcripción ARF.

También observamos que TCP14 y TCP15 son requeridas para la inducción del gen *GA20ox1*, que codifica una enzima que participa en las etapas finales de síntesis de giberelinas, ante un aumento de la temperatura. TCP15 se une *in vivo* al promotor de este gen, lo que sugiere que podría regularlo en forma directa. Además, encontramos que los niveles de la proteína DELLA RGA, que responden en forma inversa a los niveles de giberelinas, se encuentran aumentados en las mutantes en *TCP14* y *TCP15*. Esto sugiere que las proteínas TCP promoverían la biosíntesis de giberelinas durante la respuesta a un aumento de la temperatura. Por otro lado, encontramos que TCP15 se une *in vivo* a los promotores de los genes reguladores del

crecimiento *HBI1* y *PRE6*. Dado que la expresión de estos dos genes se encuentra afectada en las mutantes en *TCP14* y *TCP15* cultivadas a alta temperatura, se puede sugerir que *TCP14* y *TCP15* regularían también en forma directa la expresión de *HBI1* y *PRE6*. Observamos que la sobreexpresión de *HBI1* revierte los defectos en el crecimiento de plantas mutantes en *TCP14* y *TCP15*, lo que sugiere que *HBI1* sería un blanco importante de la acción de las proteínas TCP de clase I durante la termomorfogénesis.

Durante nuestros estudios encontramos que muchos de los genes regulados por *TCP15* también son blancos directos de *PIF4* y que los promotores de estos genes presentan un enriquecimiento en los motivos de unión al ADN de *PIF4* y de las proteínas TCP. La unión de *PIF4* a los promotores de *GA20ox1* y *HBI1* es menos eficiente en ausencia de las proteínas TCP de clase I, lo que sugiere que estas proteínas facilitarían la interacción de *PIF4* con algunos de sus genes blancos. Además, mediante experimentos de doble híbrido en levaduras y de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia determinamos que *TCP15* interacciona con *PIF4*.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que las proteínas *TCP14* y *TCP15* se integran a la compleja vía que conduce a la respuesta de desarrollo de las plantas frente a un aumento de la temperatura, regulando en forma directa la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de giberelinas y en la promoción de la expansión celular e interactuando funcional y físicamente con *PIF4*. Nuestros resultados aportan nuevas evidencias para entender desde un punto de vista molecular las respuestas de las plantas ante un incremento de la temperatura ambiente.

3.2. SUMMARY

The term thermomorphogenesis refers to changes in plant growth, development and morphology that occur as a result of a moderate increase in room temperature, which exceeds the ideal plant growth temperature but does not reach the levels to produce heat stress. Among these changes, an increased elongation of the hypocotyl and leaf petioles is observed. In *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis), whose normal growth temperature is around 23°C, these changes are observed when plants are grown at 28°C - 29°C. Previous studies reported that the transcription factor PIF4 is a central component of this response and that some hormonal pathways, including those of gibberellins, brassinosteroids and auxins, are also involved. During the elongation of the hypocotyl, PIF4 promotes the synthesis of auxins, gibberellins and brassinosteroids through the direct regulation of genes involved in the biosynthesis of these hormones. SAUR family proteins are also required for the response to high temperature and the expression of the corresponding genes is regulated both by auxins and by PIF4 directly. In addition to the SAUR genes, other genes that regulate cellular expansion processes in response to the environment, like *PRE*, *PAR*, *IBL1*, *HBI1*, and *BEE* genes, are also involved. These genes encode proteins with an HLH domain and participate in pathways related to PIF4 action.

TCP transcription factors are exclusively present in plants and contain a highly conserved domain, the TCP domain, responsible for DNA binding and protein-protein interactions. Based on sequence homology, they can be grouped into two major classes, I and II. TCP proteins participate in multiple aspects of plant development, regulating cell growth and proliferation in response to both internal and external cues, the circadian rhythm, germination and senescence, among other processes. In Arabidopsis, the TCP family consists of 24 members, 13 belonging to class I and 11 to class II. Two members of the class I, TCP14 and TCP15, were previously shown to act redundantly in the regulation of germination and plant height, and the development of leaves and floral organs. Class I TCP proteins also participate in the response to gibberellins (GA). It has been found that their activity is inhibited by DELLA proteins, negative regulators of the response to GA whose degradation mediated by this hormone allows TCP proteins to be activated to exert their action.

During the progress of this Thesis, we studied the function of class I TCP proteins as coordinators of plant development in response to internal and environmental signals. We determined that TCP14 and TCP15 are required for an adequate response to an increase in ambient temperature. Particularly, we found that mutants deficient in these proteins show a deficiency in the growth of petioles and hypocotyls at 29°C. TCP14 and TCP15 would act by modulating cell expansion processes related to the growth of these organs.

Even if plants deficient in *TCP14* and *TCP15* show shorter hypocotyls when grown at high temperature, our results suggest that these class I TCP proteins do not mediate high temperature responses through the regulation of auxin biosynthesis. However, we observed that the induction of some auxin response genes that are regulated by ARF proteins, such as *SAUR19*, *SAUR20*, *SAUR21*, *SAUR63* and *SAUR65*, is affected in the *tcp14 tcp15* mutant. We also found that the expression of several of these genes is adequately induced by auxins in the mutant, although this does not occur for *SAUR63*. These results suggest a complex scenario where TCP proteins would act by regulating the expression of the *SAUR* genes either independently or in response to auxins. Since many *SAUR* genes have binding motifs for TCP proteins in their promoters, it is possible that TCP proteins would directly modulate the expression of these genes. In addition, they may be required for the correct induction of some of these genes by ARF transcription factors.

We also observed that *TCP14* and *TCP15* are required at high temperature for the induction of the *GA20ox1* gene, which encodes an enzyme that participates in the final stages of GA biosynthesis. *TCP15* binds *in vivo* to the promoter of this gene, suggesting that it might directly regulate it. Moreover, we found that the levels of the DELLA protein RGA, which respond inversely to GA levels, are increased in the *tcp14 tcp15* mutant. This suggests that TCP proteins would promote GA biosynthesis during the response to an increase in temperature. On the other hand, we found that *TCP15* binds *in vivo* to the promoters of the growth regulatory genes *HBI1* and *PRE6*. Since the expression of these two genes is affected in mutants in *TCP14* and *TCP15* when they are grown at high temperature, it can be suggested that *TCP14* and *TCP15* would also directly target *HBI1* and *PRE6*. We observed that the overexpression of *HBI1* rescues the growth defects of the *tcp14 tcp15* double mutant, suggesting that this gene is a major outcome of regulation by both class I TCPs during thermomorphogenesis.

In addition, we found that several of the genes regulated by *TCP15* are also targets of PIF4 and show an enrichment of PIF4 and TCP binding motifs in their promoters. PIF4 binding to *GA20ox1* and *HBI1* is enhanced in the presence of the TCPs, indicating that *TCP14* and *TCP15* would facilitate the interaction of PIF4 with some of its target genes. Moreover, we determined that *TCP15* interacts with PIF4 in yeast two-hybrid and Bimolecular Fluorescence Complementation experiments.

Together, our findings suggest that *TCP14* and *TCP15* integrate into the complex pathway that leads to the developmental response of plants to high temperature. They directly regulate the expression of genes involved in GA biosynthesis and cellular expansion, functionally

and physically interacting with PIF4. Our results provide new evidence to understand the response of plants to an increase in ambient temperature.

INTRODUCCIÓN

4. INTRODUCCIÓN

La forma y arquitectura de las plantas están definidas por diversos procesos que modulan el crecimiento y la diferenciación de los órganos. El tamaño y la forma de estos órganos, a su vez, depende del número, tamaño y tipo de células que los constituyen. En otras palabras, dependen de los procesos de división, crecimiento y diferenciación celular [1], por lo que mantener una delicada regulación de estos procesos es esencial para producir la correcta estructura de las plantas. A diferencia de la mayoría de los organismos vivos, las plantas no poseen la capacidad de desplazarse. Por esta razón es que presentan una gran plasticidad, es decir, como seres vivos inmóviles (sésiles), tienen que desarrollar estrategias para aclimatarse y/o adaptarse a cualquier cambio en el ambiente en que se encuentran. Así, el número, tamaño, forma y funcionalidad de los órganos de la planta adulta estarán supeditados en gran medida a las condiciones ambientales prevalentes. La supervivencia y el éxito reproductivo de la planta entonces dependerán fuertemente de la precisa percepción de las condiciones externas, y de los mecanismos moleculares, fisiológicos y morfogénicos que éstas desencadenen. El ambiente lumínico y la temperatura no sólo son dos de las variables ambientales que más impacto tienen sobre el desarrollo vegetal, sino también dos de las condiciones más variables del ambiente.

En general, los principales reguladores de los procesos de división, crecimiento y diferenciación celular son proteínas denominadas factores de transcripción, los cuales regulan procesos de expresión de genes que eventualmente determinarán las características de las células y los tejidos en los que se expresan. Asimismo, las fitohormonas (hormonas vegetales) están involucradas en la modulación del desarrollo, actuando tanto corriente arriba como corriente abajo de los factores de transcripción, e integrando los diversos procesos a nivel de órganos o tejidos.

El presente trabajo de Tesis aborda el estudio de un grupo particular de factores de transcripción, denominados TCP, con el fin de determinar el papel que tienen estas proteínas en la regulación del desarrollo vegetal en respuesta a cambios en las condiciones ambientales, utilizando como modelo a *Arabidopsis thaliana*. En esta sección se exponen en una primera parte las características morfológicas de esta planta, así como las razones que nos han llevado a elegirla como especie modelo de estudio. Luego, se presentan algunas de las hormonas involucradas en regular el crecimiento vegetal, así como los mecanismos mediante los cuales las plantas responden a variaciones en las condiciones ambientales, y se continúa con una descripción a nivel estructural y funcional de los factores reguladores de la transcripción de la familia TCP.

4.1. *Arabidopsis* como modelo.

Arabidopsis es un género de plantas herbáceas de la familia de las brassicáceas que ha sido objeto de intenso estudio como modelo para la investigación en biología vegetal. Actualmente cuenta con 9 especies y 8 subespecies, entre las que se encuentra *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana* o *Arabidopsis*). Esta especie puede medir entre diez y treinta centímetros de altura sin incluir la raíz. En la base forma una roseta de hojas anchas mientras que en el tallo las hojas son más delgadas y alargadas (Fig. 1). Las flores son pequeñas, hermafroditas (con órganos reproductores masculinos y femeninos) y de color blanco. Las mismas se agrupan formando pequeños grupos denominados inflorescencias. El fruto es una silicua de un par de centímetros de largo y dos milímetros de ancho que puede llegar a contener cerca de treinta semillas. Éstas se dispersan a través del viento al abrirse la silicua madura. Si bien *Arabidopsis* no es una planta de interés agronómico, ofrece importantes ventajas que la han convertido en la especie más utilizada para la investigación en genética y biología molecular vegetal. Significativos avances en el entendimiento del crecimiento y desarrollo de las plantas se han realizado basándose en la genética molecular de esta simple angiosperma [2]. *Arabidopsis* fue sugerida como un modelo adecuado para estudios biológicos de plantas, especialmente genéticos, debido a sus ventajosas características, como las de ser una planta diploide con un ciclo de vida muy corto (6-8 semanas), de fecundación autógama, y capaz de producir numerosas semillas que permanecen viables durante muchos años. Su rápido crecimiento permite el análisis de un gran número de individuos en un mínimo espacio y, por lo tanto, la consiguiente amplificación rápida de los genotipos útiles para posteriores estudios. Estos factores, sumados a la facilidad de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y, consecuentemente, la posibilidad de introducir genes de interés y mantenerlos de forma estable, la han convertido en la planta modelo favorita. Además, presenta un genoma pequeño (de aproximadamente 125 Mpb) con relativamente escasas secuencias repetidas, el cual fue secuenciado completamente en el año 2000 [3]. Finalmente, varios grupos de investigación han desarrollado mapas físicos de su genoma y los han correlacionado con los mapas genéticos ya disponibles [4]. De esta manera, la comunidad científica tiene acceso tanto a los mapas genéticos como a las secuencias de los genomas nucleares y de organelas de *Arabidopsis*. Asimismo, un gran número de líneas mutantes se encuentran disponibles en centros de almacenamiento en EEUU y en el Reino Unido. Para integrar todo el conocimiento que se genera en miles de laboratorios de todo el planeta se han creado varias herramientas que permiten a los investigadores explorar nuevas conexiones. *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR) es uno de los mayores repositorios *online* de datos y recursos de *Arabidopsis*, mientras que el *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) y el *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC)

son los principales centros de conservación, producción y distribución de plantas de *Arabidopsis* (ecotipos y mutantes) a nivel mundial.

Debido a todas las características enunciadas y a la gran cantidad de estudios genéticos y moleculares que se han publicado sobre diversos aspectos del desarrollo de *Arabidopsis*, el potencial para su uso en la investigación básica de dicotiledóneas resulta evidente y es por esto que la hemos elegido como modelo de estudio en este trabajo de Tesis.

El desarrollo de *Arabidopsis* está definido por cuatro etapas: 1) embrionaria; 2) vegetativa juvenil; 3) vegetativa adulta y 4) reproductiva. El plan de desarrollo general se establece durante la embriogénesis. Sin embargo, gran parte de la arquitectura final de la planta se define durante su crecimiento y es altamente dependiente de las condiciones ambientales, como por ejemplo: disponibilidad de nutrientes, luz, agua, presencia de patógenos, temperatura, entre otros. En la fase embrionaria se define el patrón apical-basal establecido en los meristemas apicales del tallo (SAM: *Shoot Apical Meristem*) y de la raíz (RAM: *Root Apical Meristem*). Estos meristemas son centros de células madre no diferenciadas en continua división celular. El SAM consta de una población de células progenitoras de los órganos aéreos de la planta (hojas, tallos y flores). El RAM define los tejidos que conforman la raíz de la planta. El hipocotilo constituye el primer órgano de expansión de la plántula. Durante la germinación, luego de la salida de la radícula, el hipocotilo emerge elevando el ápice y los cotiledones para separarlos del suelo y elevarlos hacia la luz. Este proceso está regulado por factores internos y condiciones medioambientales como temperatura, oscuridad o baja intensidad lumínica. Luego de la germinación, el SAM da lugar al comienzo de la fase vegetativa juvenil. Durante esta etapa las plántulas desarrollan un par de hojas verdaderas las cuales presentan tricomas (pelos epidermales) sólo en la superficie adaxial de las hojas. En la fase vegetativa adulta comienzan a desarrollarse hojas verdaderas, que parecen estar ubicadas en un solo plano, en torno al eje central de la planta. Estas hojas desarrollan tricomas en ambas superficies de la lámina [5] y son, en general, ovaladas, con un pecíolo largo y un borde marginal continuo. El número de las hojas de roseta está determinado por una serie de factores que incluyen el genotipo, las condiciones ambientales y el tiempo transcurrido desde la germinación hasta el pasaje a floración [6].

El pasaje a estadio reproductivo está determinado por la aparición del botón floral, conocido como "*bolting*". La transición del meristema vegetativo a meristema reproductivo está regulada por señales específicas del desarrollo y del medio ambiente como el fotoperiodo, la vernalización o diferentes estreses ambientales como la deficiencia nutricional, la temperatura y la disponibilidad de agua. La etapa reproductiva se divide en dos fases: en la primera,

denominada “fase reproductiva temprana”, se desarrolla la inflorescencia principal y las hojas caulinares (u hojas reproductivas). En la “fase reproductiva tardía” tendrá lugar la aparición de las inflorescencias secundarias a partir de las yemas axilares de las hojas caulinares y de las yemas axilares de las hojas de roseta [7] (Fig. 1).

En relación a las flores de *Arabidopsis*, las mismas son radialmente simétricas y se componen de cuatro sépalos, cuatro pétalos bilateralmente simétricos, cuatro o seis estambres y dos carpelos fusionados que forman el gineceo central [8]. La autofecundación resulta en el desarrollo de embriones, que luego se convierten en las semillas de la planta que serán más tarde dispersadas.

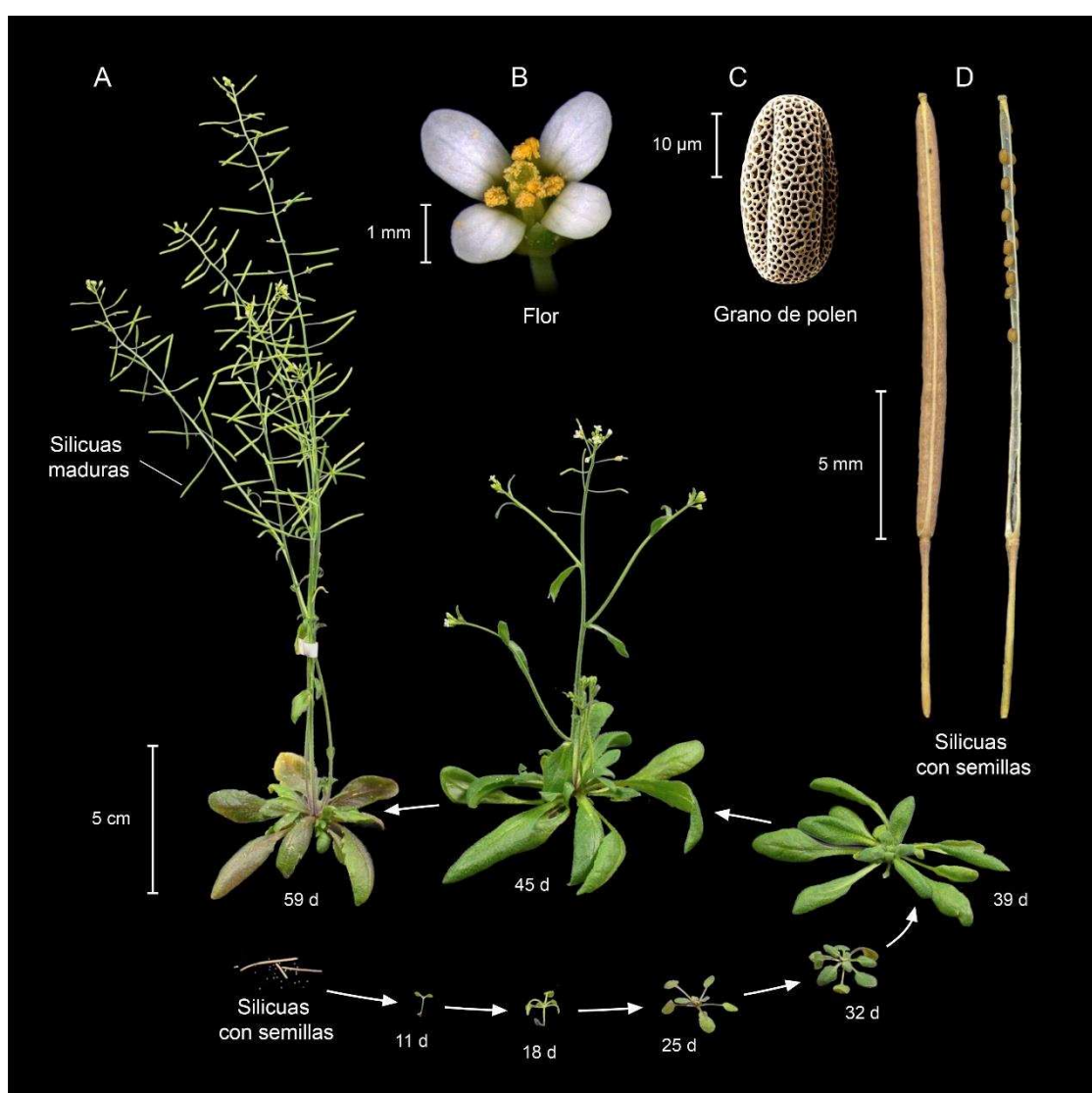


Figura 1. Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. A. Estadios de desarrollo de *A. thaliana* Columbia (Col), desde las semillas (abajo a la izquierda), estableciéndose como plántula (11 días), en estadio vegetativo (36 días) y en estadio reproductivo (45 días). B-D. Fotografías de una flor (B), un grano de polen (C; imagen de microscopía electrónica) y silicuas maduras (D; izquierda: cerrada, derecha: abierta con semillas adheridas). *Figura modificada de Krämer y col., 2015* [9].

4.2. Hormonas como reguladores del crecimiento

Las hormonas son mensajeros químicos que coordinan las funciones celulares de los organismos multicelulares. Los animales producen muchas hormonas, cada una de las cuales, por lo general, se dirige a un pequeño número de células y desencadena una respuesta específica. Por el contrario, las hormonas vegetales son menores en número, afectan a la mayoría de las células y desencadenan diversas respuestas. Sumado a esto, su acumulación y los efectos de cada una de ellas son modulados por factores medioambientales y del desarrollo, así como por otras fitohormonas. Las cinco hormonas vegetales clásicas, que fueron identificadas en la primera mitad del siglo XX, son: auxinas (aislada en 1926 por F. Fui), citoquininas (CK, 1950, F. Skoog), etileno (ET, 1901, D. Neljubow), giberelinas (GA, 1926, E. Kurosawa), y ácido abscísico (ABA, 1950, T. Bennett-Clark y N. Kefford). No obstante, durante los últimos 50 años han sido identificados otros compuestos que cumplen con los criterios de las hormonas vegetales: brasinosteroides (BR), jasmonatos (JA), salicilatos (SA) y estrigolactonas (SL). Dado que durante este trabajo de Tesis se estudiaron procesos relacionados con el accionar de auxinas, giberelinas y brasinosteroides, a continuación se presenta una descripción de los mecanismos de percepción y transducción de la señal de estas hormonas.

4.2.1. Auxinas

Las auxinas son una familia de compuestos que originalmente fueron identificados como promotores del crecimiento. Su nombre deriva de la palabra griega "*auxein*", que significa "crecer". Estas hormonas promueven el crecimiento y la elongación celular, pero también tienen roles críticos en la formación de patrones embrionarios, promoviendo y especificando las posiciones de los tejidos vasculares y el inicio de las raíces laterales y de las hojas, y manteniendo las poblaciones de células madre. Controlan diferentes procesos dentro del desarrollo vegetal, incluyendo la dominancia apical, el desarrollo floral, el crecimiento de la raíz, la senescencia, el fototropismo y el geotropismo [10][11][12][13][14]. La auxina natural más abundante es el ácido indol-3-acético (IAA). Este compuesto es químicamente similar al aminoácido triptofano (Trp), a partir del cual se sintetiza. Diversas vías contribuyen a la acumulación de auxinas en diferentes tipos celulares e incluso en diferentes familias de plantas, con algunas redundancias funcionales entre las vías y los genes que codifican varios pasos enzimáticos. A menudo se hace referencia a estas rutas biosintéticas por sus intermediarios clave: la vía IPA convierte Trp a IAA a través del indol-3-piruvato (IPA), la vía IAM lo hace a través de indol-3-acetamida, y la vía IAOx a través de indol-3-acetaldoximina. La vía IAOx estaría restringida a *Arabidopsis* y sus parientes cercanos. Se cree que la vía IPA de dos pasos representa la mayor parte de la biosíntesis de auxinas en las

plantas (Fig. 2). El primer paso es la conversión de Trp a IPA a través de la actividad de una Trp aminotransferasa, codificada por los genes *TAA*. El segundo paso es la conversión de IPA a IAA por las enzimas flavinas monooxigenasas YUCCA. Ambas familias de genes están conservadas en plantas. En *Arabidopsis*, las proteínas YUCCA están codificadas por 11 genes *YUC* que tienen diferentes patrones de expresión específicos del tipo celular. La regulación de la expresión de estos genes y de la actividad de las enzimas que codifican es extremadamente importante para modular la respuesta a la luz, la temperatura y los nutrientes.

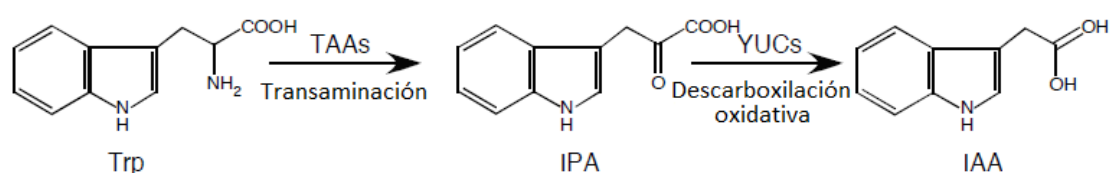


Figura 2. Ruta completa de biosíntesis de auxinas dependiente de Trp en plantas. La auxina se sintetiza a partir del aminoácido Trp en dos pasos. El primer paso es la eliminación del grupo amino por la familia de aminotransferasas TAA para producir IPA. El segundo paso es la descarboxilación oxidativa de IPA catalizada por la familia de proteínas YUCCA (YUCs) para generar IAA, CO₂ y agua. *Figura modificada de "The Arabidopsis Book", 2014 [15].*

Muchos de los efectos de las auxinas están mediados por la regulación transcripcional de genes que controlan el crecimiento y otras vías de señalización [11][16]. Las auxinas son percibidas por una pequeña familia de receptores intracelulares, de los cuales el más caracterizado es TIR1 [17]. Esta familia de proteínas consta de cinco proteínas adicionales, denominadas AFB1-AFB5. Cuando TIR1 se une a auxinas, este complejo interactúa con las proteínas Aux/IAA. Además de funcionar como un receptor de auxinas, TIR1 forma parte del complejo ubiquitin-ligasa SCF^{TIR1/AFB}, por lo que en este contexto transfiere moléculas de ubiquitina a las proteínas Aux/IAA, dirigiéndolas a proteólisis vía proteasoma 26S [17][18]. Las proteínas Aux/IAA son proteínas nucleares que contienen varios dominios altamente conservados y están codificadas por una familia de 29 genes de respuesta temprana a auxinas [19]. Estas proteínas tienen dominios específicos que interactúan con un grupo de proteínas denominadas factores de respuesta a auxinas (ARF, del inglés *auxin response factors*) [20][21]. *Arabidopsis* presenta 23 genes que codifican proteínas ARF. Todos los ARF tienen dominios de unión al ADN y reconocen secuencias de ADN específicas presentes en los promotores de sus genes blanco, denominadas AuxRE [22]. Algunos ARF funcionan como activadores transcripcionales, mientras que otros funcionan como represores transcripcionales. En presencia de niveles bajos de auxinas, las proteínas Aux/IAA forman dímeros con los ARF para inhibir la actividad de éstos reclutando al correpresor TOPLESS (TPL), lo que resulta en la

represión de genes que responden a auxinas [18]. A niveles más altos de auxinas, los represores Aux/IAA se unen al complejo SCF^{TIR1/AFB} y posteriormente son ubiquitinados y degradados vía proteasoma 26S. De esta manera los ARF se liberan y pueden regular la transcripción de sus genes blanco en respuesta a auxinas (Fig. 3).

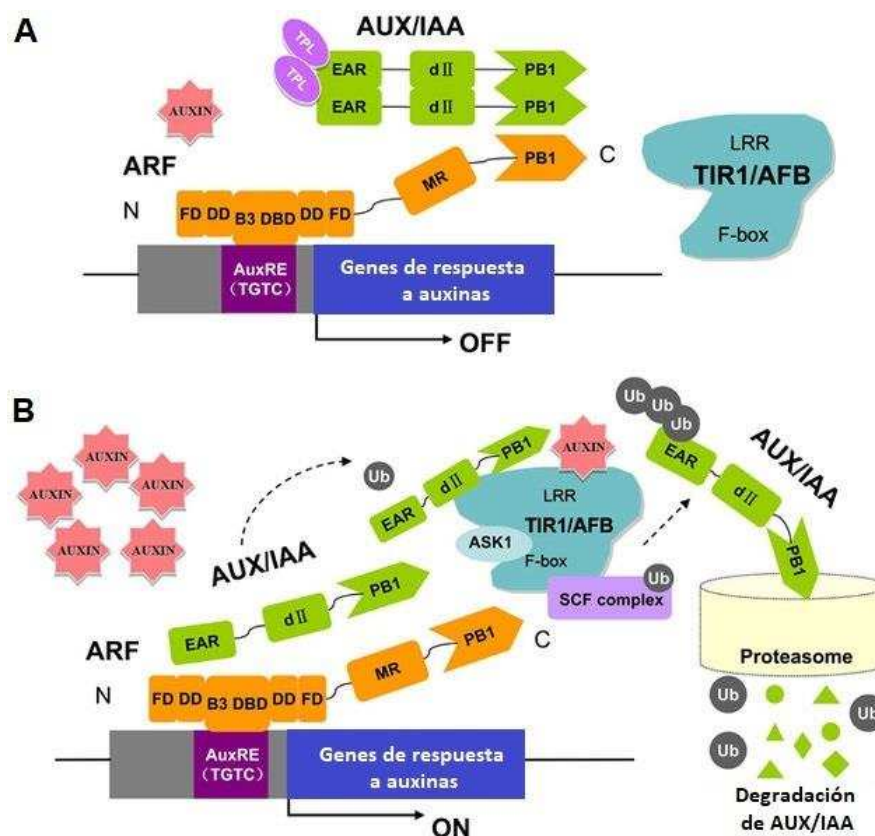


Figura 3. Componentes claves de la percepción y señalización de auxinas en Arabidopsis. Esquemas de los dominios y composición de las proteínas ARF, Aux/IAA y demás proteínas involucradas en la percepción y señalización de auxinas. En esta vía, las proteínas TIR1/AFB son proteínas F-box que, junto con otras proteínas (ASK1, CUL1, RBX), forman el complejo ubiquitin proteína ligasa, SCF^{TIR1/AFB}. A niveles bajos de auxinas (**A**), las proteínas Aux/IAA forman multímeros con ARF y reclutan TPL hacia la cromatina. Los altos niveles de auxinas (**B**) promueven la ubiquitinación y la degradación de Aux/IAA a través de SCF^{TIR1/AFB} y el proteasoma 26S. *Figura modificada de Li y col., 2016 [23].*

Los genes primarios de respuesta a auxinas incluyen miembros de tres familias: *IAA*, *GH3* y *SAUR* [24]. Los genes *IAA* codifican las proteínas Aux/IAA y los genes *GH3* codifican IAA-amido sintetetasas que convierten la forma activa de las auxinas (IAA) a una forma conjugada inactiva [25]. Por lo tanto, estas dos clases de genes de respuesta a auxinas median una retroalimentación negativa sobre dicha respuesta. Los genes *SAUR* se aislaron por primera vez como genes de respuesta primaria a auxinas. Éstos conforman una familia de genes con aproximadamente 60 a 140 miembros en la mayoría de las especies de angiospermas. A pesar del descubrimiento temprano de su capacidad de respuesta a auxinas, su función y modo de

acción permanecieron desconocidos durante mucho tiempo. En los últimos años, la importancia de los genes *SAUR* en la regulación del crecimiento dinámico y adaptativo, y los mecanismos moleculares por los cuales actúan las proteínas SAUR se fueron comprendiendo cada vez más. Los genes *SAUR* desempeñan un papel central en el crecimiento inducido por auxinas, pero también pueden actuar independientemente de auxinas, siendo regulados de manera específica de tejido por otras vías hormonales y por factores de transcripción [26]. Esta familia de genes se desarrollará con más detalle en próximas secciones.

4.2.2. Giberelinas

Las giberelinas (GA) son una familia enorme de compuestos químicamente relacionados entre sí, pero solo algunos de ellos tienen actividad biológica en plantas. En 1926 un grupo de científicos japoneses aisló una sustancia promotora del crecimiento a partir de cultivos de hongos que parasitaban plantas de arroz causando la enfermedad del “bakanoe” o “subida de las plantas”. Este compuesto activo fue aislado del hongo *Gibberella fujikuroi* por Eichi Kurosawa, por lo que se denominó “giberelina”. Existen más de 110 GA diferentes, pero para cada especie vegetal sólo unas pocas son biológicamente activas. El ácido giberélico (GA₃) es el más activo y mejor caracterizado. Estas hormonas regulan múltiples procesos en las plantas, como la germinación, la elongación del hipocotilo, la elongación del tallo, la floración y el desarrollo floral [27][28][29][30].

La vía de biosíntesis de GA en *Arabidopsis* es compleja e involucra múltiples pasos [31]. Un esquema de esta vía se ilustra en la Figura 4. Los primeros pasos están ampliamente conservados en las plantas, pero los pasos posteriores presentan variaciones entre distintas especies. La síntesis comienza con la formación de un compuesto lineal de 20 carbonos llamado geranilgeranilo difosfato (GGDP). Los primeros pasos son la ciclación del GGDP por las enzimas copalil difosfato sintasa (CPS) y ent-kaureno sintasa (KS) para producir ent-kaureno. El siguiente paso es la producción de GA₁₂ por dos citocromo P450 oxidasas: ent-kaureno oxidasa (KO) y ácido ent-kaurenoico oxidasa (KAO). GA₁₂ puede convertirse en GA₅₃ por hidroxilación en la posición C-13 catalizada por la enzima GA13-oxidasa (los números en los nombres de las enzimas se refieren a la posición del carbono que modifican y no a las especies de GA sobre las que actúan). GA₁₂ y GA₅₃ están sujetas a modificaciones adicionales en vías paralelas. GA₄ y GA₁ (GA activas) derivan de GA₁₂ y GA₅₃, respectivamente, después de la modificación secuencial por dos dioxigenasas: GA20-oxidasa (GA20ox) y GA3-oxidasa (GA3ox). Una de las vías por las cuales las GA se desactivan involucra a la enzima dioxigenasa GA2-oxidasa (GA2ox) [32]. Esta enzima actúa

sobre las GA activas (GA_4 y GA_1) o precursores C20 inactivos (GA_{12} y GA_{53}) con diferentes consecuencias en el desarrollo de las plantas. Las dioxigenasas GA_{20ox} , GA_{3ox} y GA_{2ox} son codificadas por familias de genes con diferentes especificidades celulares [33]. Esto contribuye a ajustar la síntesis y desactivación de las GA a través de respuestas diferenciales a diversos estímulos ambientales, como la luz y la temperatura, y frente a hormonas, como las auxinas y el ABA. Además, existe un mecanismo de regulación de la expresión de estas enzimas por GA que es un importante punto de control de retroalimentación negativa [34].

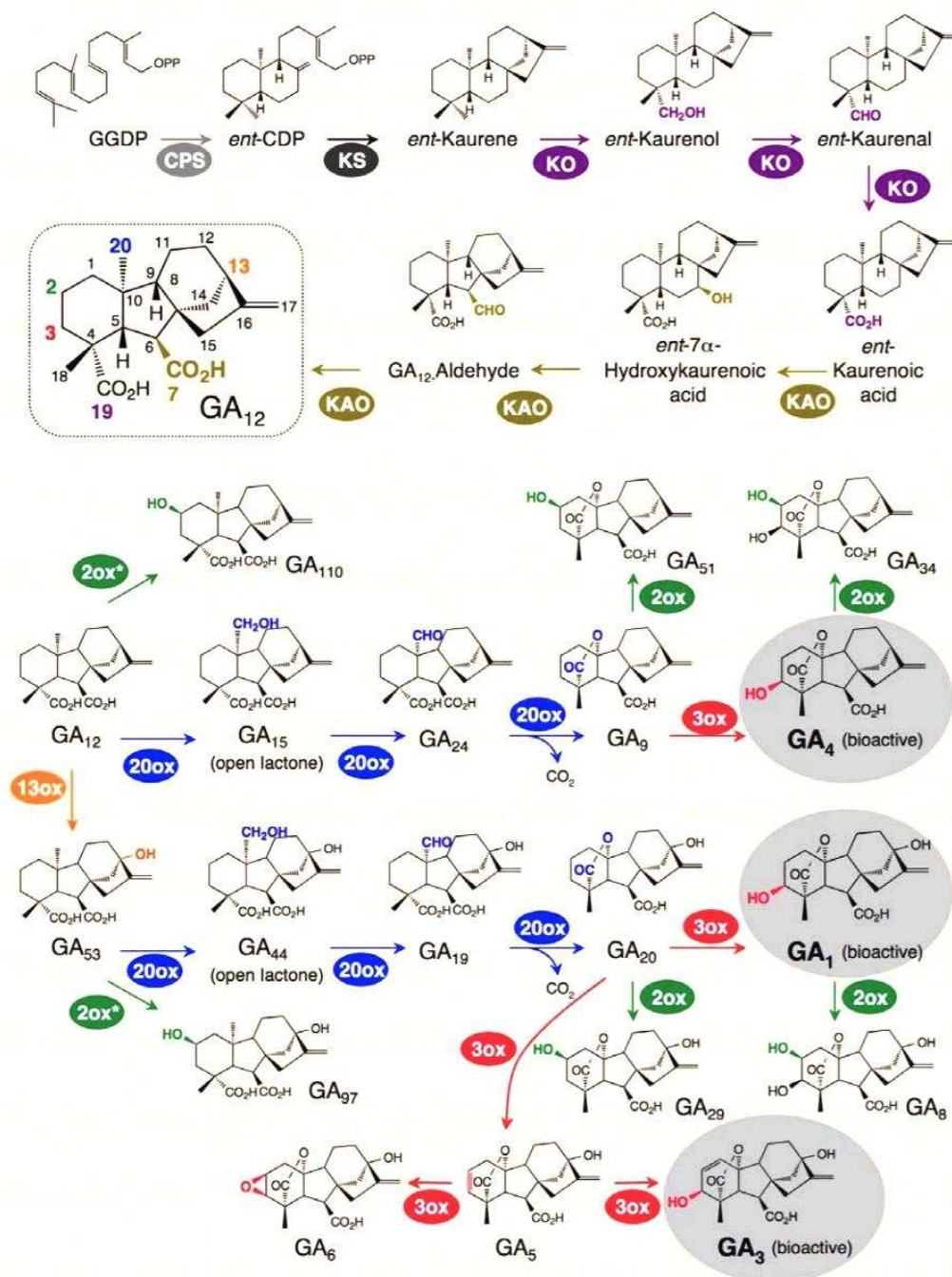


Figura 4. Rutas biosintéticas y catabólicas de GA en plantas. Figura modificada de "The Arabidopsis Book", 2008 [31].

Las GA son percibidas por los receptores *GID1* (*Gibberellin Insensitive Dwarf 1*; *GID1a/b/c*) [35][36][37], los cuales reclutan a las proteínas DELLA y producen su ubiquitinación mediada por el complejo SCF basado en *SLY1* (Fig. 5). El genoma de *Arabidopsis* codifica cinco proteínas DELLA: *GAI*, *RGA*, *RGL1*, *RGL2* y *RGL3*, que muestran funciones parcialmente redundantes pero también distintas en la inhibición de las respuestas de GA [38][39][40][41]. Las DELLA son proteínas nucleares que interactúan con factores de transcripción claves para modular el desarrollo de las plantas, en general inhibiendo su actividad [42][43][44][45]. De esta forma, las proteínas DELLA controlan la expresión de una multitud de genes de distintas vías. Así, cuando las GA se unen al receptor *GID1* se desencadena la degradación específica de las proteínas DELLA a través de la vía del proteasoma dependiente de ubiquitina [46][47][48][49][50]. Entonces, cuando los niveles de GA son bajos, las proteínas DELLA se acumulan e inactivan una serie de factores de transcripción. Como consecuencia de un aumento en GA, se observa una disminución de los niveles de las proteínas DELLA y, en este contexto, los factores de transcripción quedan libres para regular la expresión de sus genes blanco.

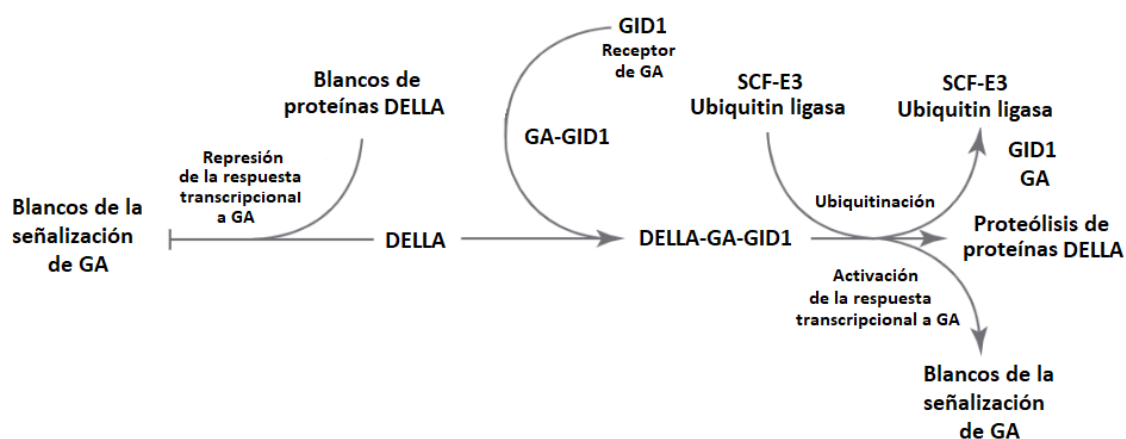


Figura 5. Vía de transducción de señales de GA. Las GA son percibidas por los receptores *GID1*, que posteriormente reclutan a las proteínas DELLA para producir su ubiquitinación mediada por el complejo SCF basado en *SLY1*. La degradación de las proteínas DELLA a través del proteasoma 26S activa las vías ubicadas corriente abajo para promover las respuestas mediadas por las GA. *Figura modificada de Plackett y col., 2011* [51].

4.2.3. Brasinosteroides

En 1979 se purificó un compuesto promotor del crecimiento, previamente identificado en extractos de polen de *Brassica*, y se demostró que era un esteroide, ahora llamado brasinólido. Este compuesto y otras hormonas esteroides vegetales relacionadas se denominaron colectivamente brasinosteroides (BR) para reflejar su caracterización inicial en *Brassica*, aunque están presentes en todas las plantas y también en algunas especies de algas.

Los BR son hormonas promotoras del crecimiento que regulan una amplia gama de eventos de crecimiento y desarrollo, como la elongación celular, la germinación de semillas, la formación de estomas, la diferenciación vascular, la arquitectura de las plantas, la floración, la resistencia al estrés y la senescencia [52][53][54]. En particular, las plantas con defectos en la biosíntesis o señalización de BR muestran un fenotipo enano típico, lo que sugiere que los BR juegan un papel esencial en el crecimiento y el desarrollo normal de la planta. La ruta de biosíntesis de BR es muy compleja, no es estrictamente lineal y tiene muchas vías de intersección, por lo que se ha utilizado el término "rejilla metabólica" para describirla (Fig. 6).

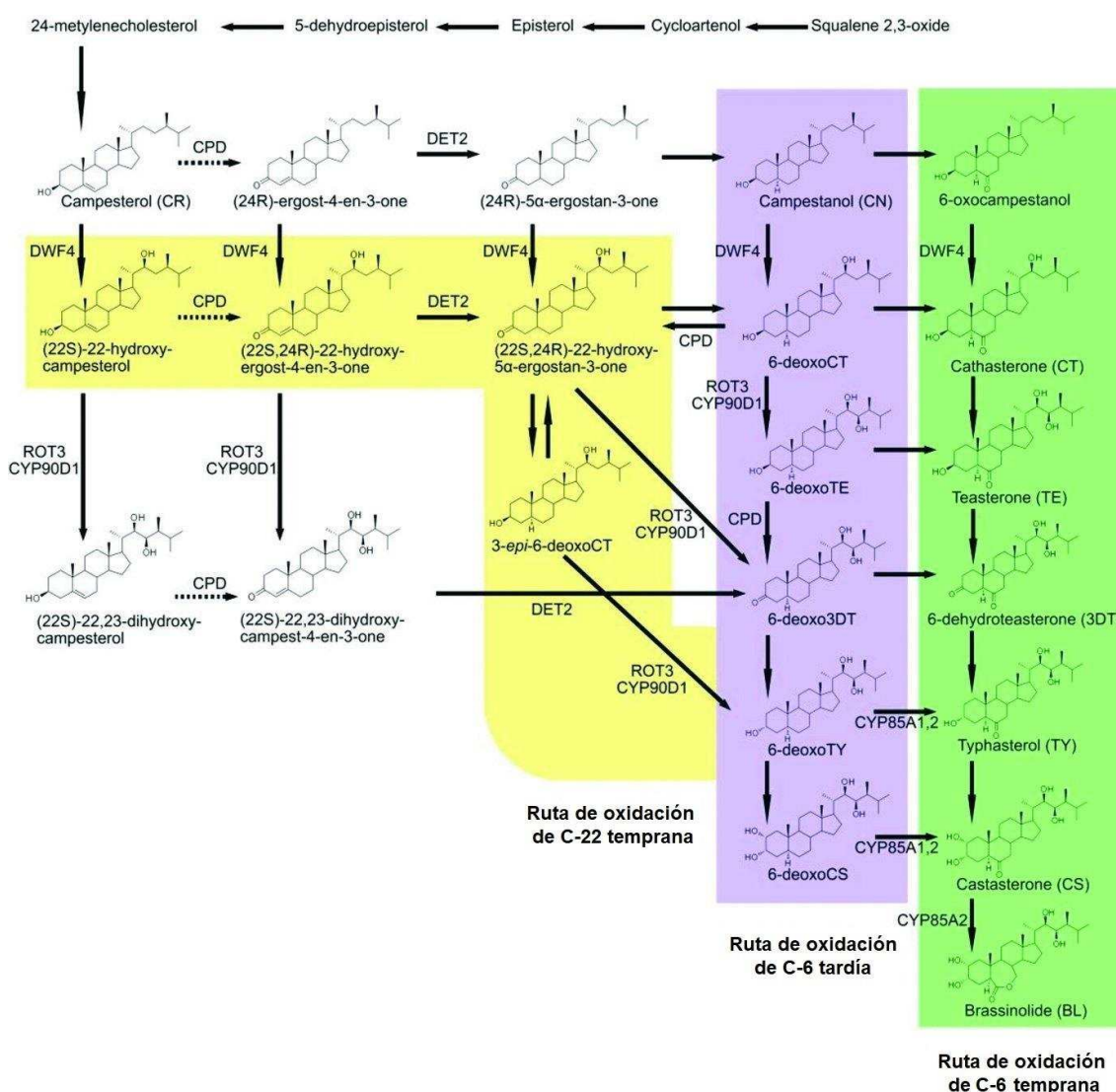


Figura 6. Ilustración de las vías para la biosíntesis de BR. Comenzando con el campesterol (CR) como el precursor principal, las tres vías primordiales de biosíntesis de BR están sombreadas en diferentes colores. La vía de oxidación de C-22 temprana, resaltada en amarillo, hidroxila C-22 a través de la acción de DWF4 y, por lo tanto, es independiente del campestanol. Hay dos vías dependientes de campestanol (CN): las rutas de oxidación de C-6 temprana y tardía. La ruta de oxidación de C-6 temprana involucra la oxidación de C-6 antes que la oxidación de C-22 (en verde). La vía de oxidación de C-6 tardía hidroxila C-22 antes que la oxidación de C-6 (en púrpura). CYP85A es una BR6-oxidasa que cataliza los pasos finales de las vías de síntesis. Las flechas punteadas indican más de un paso enzimático. *Figura modificada de Chung & Choe, 2013 [55].*

La señalización de BR es una de las vías de transducción de señales más caracterizadas en plantas (Fig. 7). Comienza con la unión de la hormona al dominio extracelular de un receptor conformado por las proteínas BRI1 y BAK1, las cuales forman un bolsillo donde se une la hormona. BRI1 forma heterodímeros con una pequeña familia de correceptores que incluye a BAK1 (también conocido como SERK3), SERK1 y SERK4 [56][57][58]. La unión de la hormona al receptor genera un cambio conformacional en los dominios citosólicos de BRI1 y las proteínas SERK y la fosforilación de BRI1, activándolo y promoviendo la disociación del regulador negativo BKI1 [58]. BRI1 activado desencadena una serie de eventos de fosforilación, incluida la fosforilación y activación de dos quinasas ubicadas corriente abajo: BSK1 y CDG1, que activan sucesivamente las fosfatasa de la familia BRI1-SUPPRESSOR 1 (BSU1) [59][60]. A su vez, BSU1 activada desfosforila e inactiva a BIN2, que es el regulador negativo maestro de la vía de señalización de BR [61]. Esto evita que se fosforilen e inactiven los factores de transcripción BZR1 y BES1, dos factores clave que median positivamente las respuestas de BR. Entonces, en presencia de BR, BIN2 es desfosforilada por BSU1 y posteriormente secuestrada por KIB1, una proteína F-box E3 ubiquitin ligasa que termina impidiendo la asociación de BIN2 con sus sustratos BZR1/BES1 y facilitando su ubiquitinación y degradación [62]. Mientras tanto, BZR1 y BES1 son desfosforiladas y activadas por PP2A [63]. BZR1 y BES1 desfosforiladas se translocan desde el citoplasma hasta el núcleo para regular la expresión de sus genes blanco uniéndose directamente a elementos de respuesta a BR (BRRE, CGTGC/TG) y motivos E-box (CANNTG) en los promotores, iniciando así una serie de respuestas celulares [64][65].

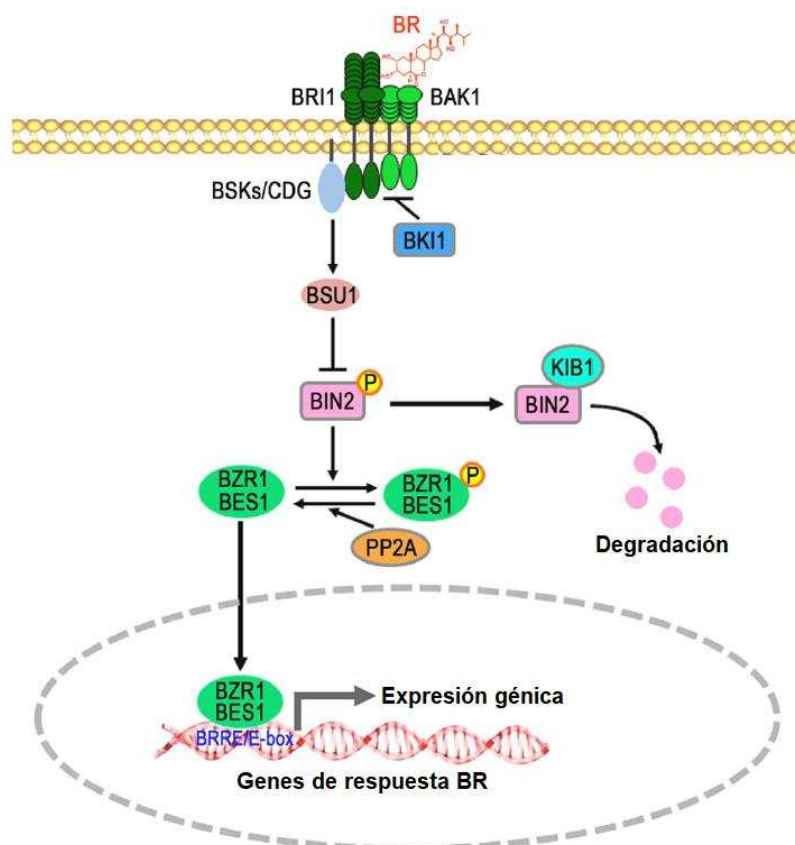


Figura 7. Modelo actual de la vía de señalización de BR en Arabidopsis. Los BR son percibidos por el dominio extracelular del receptor BRI1. BRI1 activado fosforila y activa dos quinasas: BSK1 y CDG1, que activan una fosfatasa de Ser/Thr, BSU1, la cual a su vez inactiva la quinasa BIN2. BIN2 es el regulador negativo de la vía de señalización, que actúa fosforilando e inactivando los factores de transcripción BZR1 y BES1. BIN2 inactivo es posteriormente secuestrado por KIB1, lo que facilita su ubiquitinación y degradación. La señalización de BR también activa la fosfatasa PP2A para desfosforilar BZR1 y BES1. BZR1 y BES1 desfosforilados se translocan al núcleo y se unen al motivo BRRE o al E-box en sus genes blanco para regular su expresión. *Figura modificada de Li y col., 2018 [66].*

4.3. Fotomorfogénesis y escotomorfogénesis

Como organismos sésiles, las plantas deben optimizar su morfología para adaptarse a los estímulos ambientales. La radiación (energía lumínica) emitida por el sol es uno de los principales estímulos exógenos y afecta todo el ciclo de vida de las plantas (Fig. 8) [67][68]. Dependiendo de la longitud de onda y/o la intensidad, esta radiación es esencial para la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas, aunque intensidades de radiación muy bajas o muy altas pueden ser dañinas en ciertas condiciones. Por lo tanto, las plantas han desarrollado mecanismos que les permiten detectar la intensidad y las longitudes de onda de la radiación para optimizar su crecimiento y desarrollo y minimizar un eventual daño por exceso o falta de radiación. Las plantas perciben las señales luminosas del ambiente mediante receptores fotosensoriales, denominados fotorreceptores. En general estos receptores son proteínas unidas a una molécula orgánica, denominada cromóforo, que cambia su configuración

electrónica al absorber fotones de determinadas longitudes de onda. El cambio en el cromóforo repercute en la proteína causando cambios en su actividad biológica. De esta forma estos receptores participan en vías de transducción de señales y permiten que las plantas respondan a los estímulos lumínicos. En base a sus características estructurales y a las longitudes de onda que perciben, se han descrito cinco familias de fotorreceptores en plantas: los criptocromos, las fototropinas y los miembros de la familia ZEITLUPE que perciben la luz azul y UV-A, el receptor UVR8 que percibe la luz UV-B, y los fitocromos que perciben la luz roja y rojo-lejana [69]. Los criptocromos son los principales receptores de la luz azul, regulando la elongación del hipocotilo y la arquitectura de la roseta en respuesta a los cambios en la irradiancia de este tipo de luz [70]. Las fototropinas, en respuesta a la luz azul, regulan la dirección del crecimiento del hipocotilo y los tallos, la curvatura de las hojas, la apertura y el cierre de los estomas y la posición de los cloroplastos [71]. Los miembros de la familia ZEITLUPE son reguladores positivos de la elongación del hipocotilo en respuesta a la luz [72][73][74]. UVR8 fue el último fotorreceptor descrito [75]. Este receptor no une un cromóforo, sino que se vale de los residuos de Trp presentes en su estructura para percibir la luz ultravioleta. Por último, los fitocromos, cuya familia está formada por cinco miembros (phyA, phyB, phyC, phyD, phyE) en *Arabidopsis*, regulan la respuesta a la luz durante la germinación, la de-etiolación, el desarrollo de la planta adulta y la transición entre el estado vegetativo y el reproductivo, en particular en respuesta al fotoperiodo [76][77][78].

Las plántulas de *Arabidopsis* que crecen en la oscuridad siguen un programa de desarrollo denominado escotomorfogénesis. Éste se caracteriza por una elongación exacerbada del hipocotilo para alcanzar la superficie y exponerse a la luz y está acompañado por la formación de un gancho apical que protege el meristema apical del tallo, los cotiledones y los primordios de hojas en desarrollo. Durante el crecimiento escotomorfogénico los cotiledones se encuentran cerrados y sin desarrollo de cloroplastos [79]. Una vez que la plántula se expone a la luz, ésta inhibe la elongación del hipocotilo y estimula la apertura y expansión de los cotiledones, en conjunto con el desarrollo de cloroplastos funcionales, lo que permite la captura de luz para la fotosíntesis [80]. Este crecimiento de la plántula en presencia de luz se denomina fotomorfogénesis [81]. Es vital que las plantas cambien correctamente de escotomorfogénesis a fotomorfogénesis al emerger del suelo [82]. Este proceso se denomina de-etiolación y se caracteriza por una reprogramación transcripcional que involucra cambios morfológicos que son necesarios para el establecimiento de una plántula fotosintéticamente activa [67].

Los factores de transcripción PIF (*Phytochrome-Interacting Factors*), que pertenecen a la familia bHLH y están involucrados en respuestas de desarrollo frente a cambios ambientales,

se acumulan en oscuridad y promueven la escotomorfogénesis, inhibiendo la fotomorfogénesis [83]. Así, las plantas de *Arabidopsis* mutantes en *PIF1*, *PIF3*, *PIF4* y *PIF5* (*pifq*) presentan un fenotipo de fotomorfogénesis constitutiva, es decir que al crecer en oscuridad se desarrollan como las plantas salvajes crecidas en luz [84]. Resumidamente, la exposición de las plantas a la luz provoca la activación de los fitocromos, que interaccionan directamente con las proteínas PIF desencadenando su degradación proteolítica y, por lo tanto, redireccionando la expresión génica con el fin de promover la de-etiolación [85][86].

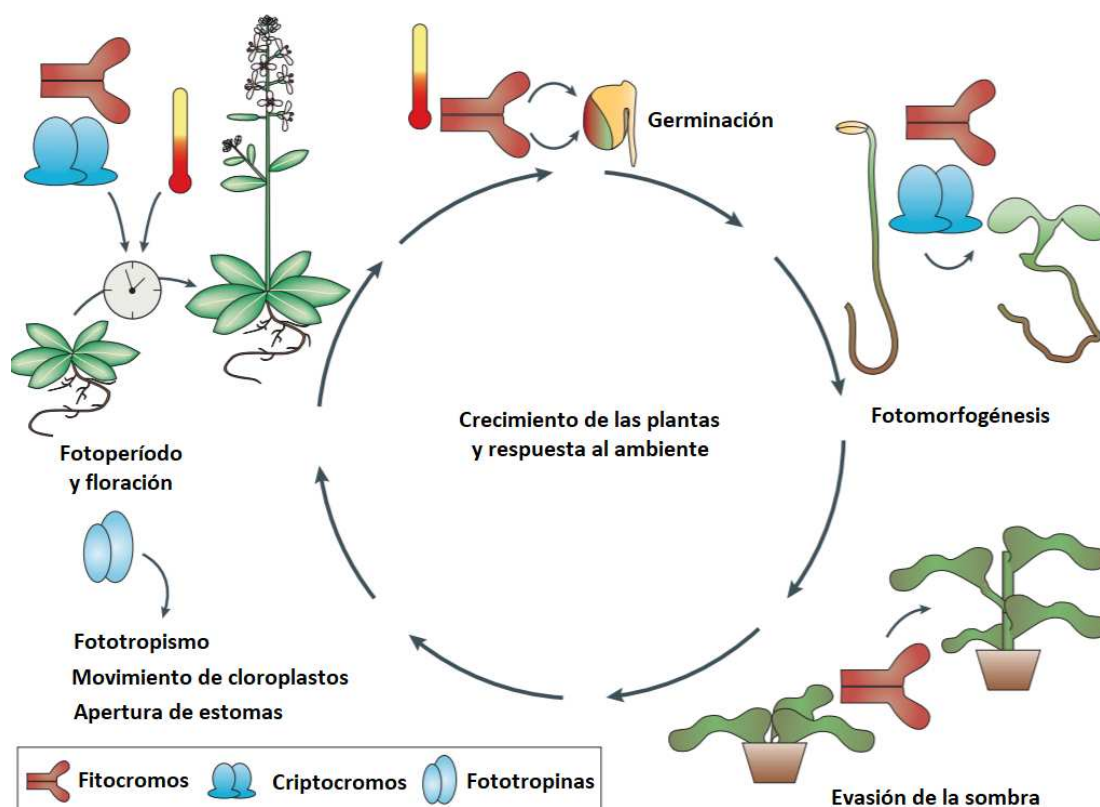


Figura 8. Regulación del desarrollo de las plantas por luz. En *Arabidopsis thaliana*, la latencia de las semillas depende de señales ambientales como la luz, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes y la duración del almacenamiento en estado seco. La luz roja induce la germinación, que puede ser inhibida por el posterior tratamiento con luz rojo-lejana. Después de la germinación, las plántulas siguen uno de los dos patrones de desarrollo: escotomorfogénesis (o etiolación) en oscuridad, o fotomorfogénesis (o de-etiolación) durante el crecimiento en luz. Un amplio espectro de la luz, en particular la luz rojo-lejana, roja, azul y ultravioleta (UV), induce la fotomorfogénesis. Luego, si las plantas crecen cerca unas de otras, éstas compiten por la luz. Las plantas han desarrollado la capacidad de "evitar la sombra" producida por otras plantas. Esto está asociado a una reducción en la proporción de luz roja/luz rojo-lejana. Por otro lado, la percepción del fotoperíodo (o duración del día) es crucial para que las plantas ajusten su desarrollo para adaptarse a los cambios estacionales anuales. La interacción de las señales luminosas con los ritmos circadianos intrínsecos mide los cambios en la duración del día. En *A. thaliana*, tanto los fitocromos como los criptocromos contribuyen a sincronizar el reloj circadiano. Además, la percepción de la duración del día es una señal importante para el control de la floración. Otros procesos de desarrollo transitorios, como el fototropismo, el movimiento de cloroplastos y la apertura de los estomas, también están bajo el control de la luz, principalmente a través de las fototropinas. *Figura modificada de Jiao y col., 2007* [67].

4.4. Termomorfogénesis

El término termomorfogénesis fue acuñado por Erwin y col. [87], en analogía con fotomorfogénesis, para describir los efectos de la temperatura sobre la morfología vegetal. Actualmente se define como el conjunto de cambios morfológicos que pueden contribuir a la aclimatación y crecimiento adaptativo de las plantas frente a condiciones de alta temperatura ambiente, que de otro modo serían perjudiciales [88].

Un aumento moderado en la temperatura ambiente produce cambios en los patrones de crecimiento y desarrollo de las plantas, entre ellos el incremento en la elongación del hipocotilo y de los pecíolos de las hojas. Sin embargo, los cotiledones y la lámina de las hojas no muestran una marcada variación, lo que indica que estos efectos son específicos de órgano. Además, plantas que crecen a temperaturas elevadas presentan termonastía en las hojas de roseta, es decir, un crecimiento más rápido de la cara inferior de las mismas, lo que produce una curvatura hacia arriba [88][89]. Estas respuestas de la planta elevan el meristema y las hojas lejos del suelo, hacia el aire circundante, lo que probablemente lleva a un enfriamiento de los mismos. Se supone que estos cambios arquitectónicos en última instancia mejoran la tasa de transpiración para mantener la hoja fresca a altas temperaturas. De hecho, tanto ensayos de pérdida de agua como experimentos de imagen térmica de la superficie de la hoja respaldan esta hipótesis [90]. Las temperaturas cálidas también reducen el índice estomático, que es la relación entre el número de células estomáticas y epidérmicas [91]. Además, la raíz primaria se hace más larga pero más estrecha con temperaturas más cálidas [92][93][94]. En los ecotipos de *A. thaliana* que no requieren vernalización, un aumento de temperatura de 16°C a 28°C acelera la floración [95][96][97][98]. En *Arabidopsis*, cuya temperatura normal de crecimiento es de alrededor de 23°C, estos cambios se observan al cultivar las plantas a 28-29°C (Fig. 9). Esta respuesta es diferente de la que se produce en condiciones de estrés térmico y que se da bajo temperaturas extremas.

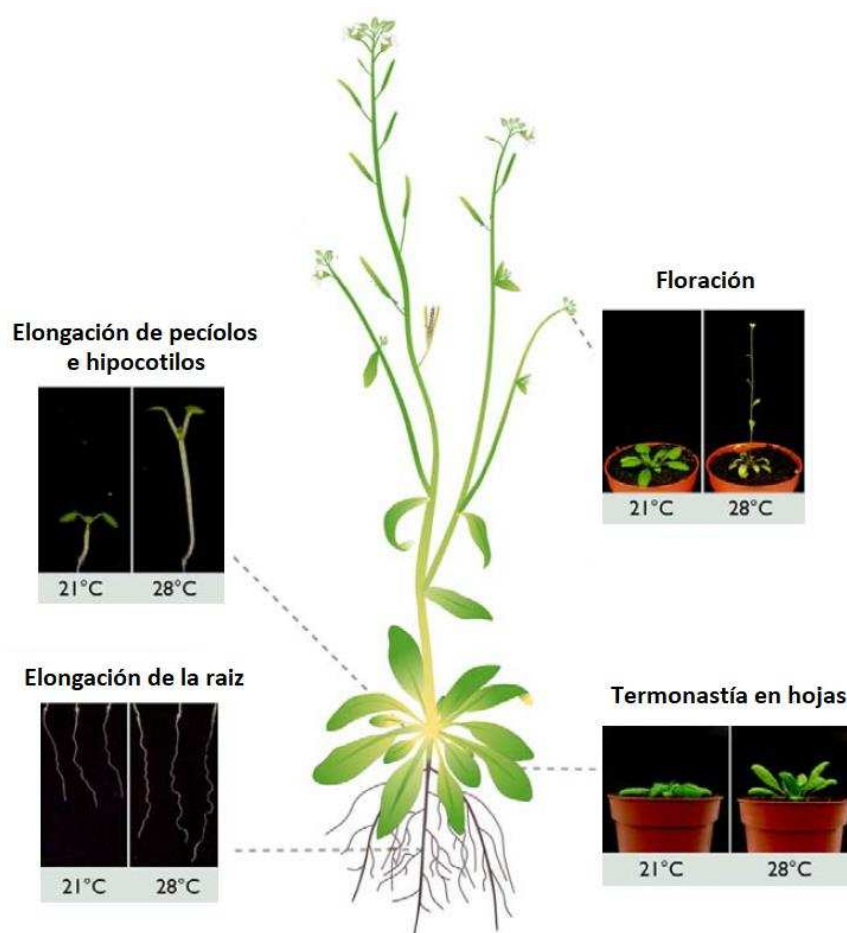


Figura 9. Fenotipos típicos de termomorfogénesis en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Imágenes de los cambios morfológicos y de crecimiento adaptativo que ocurren en *A. thaliana* frente a un incremento en la temperatura. *Figura modificada de Vu y col., 2019 [99].*

4.4.1. Percepción y respuesta a la temperatura

No está del todo claro aún cómo es que las plantas perciben la temperatura. En 2016, dos trabajos demostraron que los fitocromos, fotorreceptores de luz roja/rojo-lejana, serían los “termosensores” que detectan cambios en la temperatura del ambiente y median estas respuestas de señalización [100][101]. *Arabidopsis* presenta cinco fitocromos (phyA–phyE) que existen como formas no funcionales (Pr) en oscuridad y normalmente se encuentran en forma de dímeros. Tras la absorción de luz roja, las formas Pr se convierten en formas activas (Pfr). Sin embargo, la luz rojo-lejana puede conducir la conversión de Pfr a la forma Pr (Fig. 10). Este tipo de fotoconversión permite a las plantas detectar la sombra causada por la reducción de la relación de luz roja/rojo-lejana [102]. Después de la exposición a la luz, los fitocromos se translocan desde el citoplasma al núcleo, donde interactúan directamente con factores de transcripción de la familia PIF y desencadenan la fosforilación, ubiquitinación y posterior

degradación de los mismos. De esta forma se suprimen las funciones de las proteínas PIF, lo que resulta en la inhibición del alargamiento celular [103][104][105].

El fotorreceptor fitocromo B (phyB) ha sido identificado como un sensor de temperatura [100][101]. Además de las reacciones fotoquímicas de conversión de Pfr a Pr, la forma Pfr puede revertir a Pr mediante reversión térmica, una reacción que no requiere luz. Por esta razón, ésta también se denomina reversión oscura (Fig. 10). Es importante distinguir entre la reversión de los dímeros Pfr–Pfr a Pfr–Pr y la de Pfr–Pr a Pr–Pr. La segunda reacción es diez veces más rápida, lo que indica que cuando la forma Pfr dimeriza con la forma Pr se vuelve considerablemente menos estable [106]. La proporción de phyB en forma de homodímeros Pfr–Pfr aumenta con la relación rojo/rojo lejano de la luz y disminuye con la temperatura [107]. La reversión térmica hace que se requiera más luz para lograr un nivel dado de Pfr a temperaturas cálidas, dado que éste se vuelve térmicamente inestable. Por lo tanto, phyB proporciona información sobre la presencia de vegetación vecina, lo que reduce la relación rojo/rojo lejano (la luz roja es fuertemente absorbida por los pigmentos fotosintéticos, mientras que los tejidos verdes reflejan y transmiten la mayor parte de la luz rojo-lejana), la irradiancia y la temperatura del tejido.

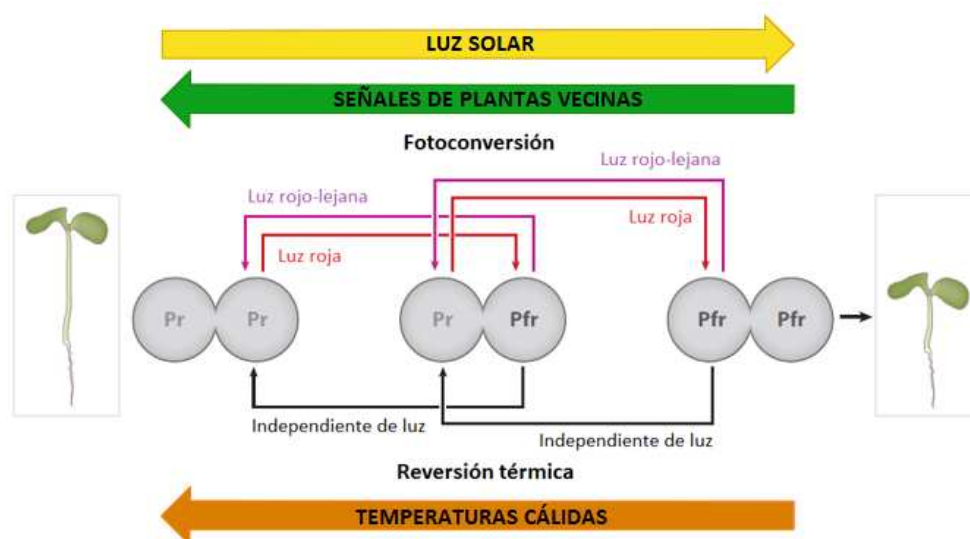


Figura 10. Detección de temperatura y luz por phyB. La proporción de la conformación activa de phyB, Pfr–Pfr, depende de la luz y de las condiciones térmicas. *Figura modificada de Casal y Balasubramanian, 2019 [108].*

Un incremento de la temperatura desencadena entonces la inactivación del sensor de temperatura phyB y provoca la respuesta de termomorfogénesis mediada por PIF4, un miembro de la familia de factores de transcripción PIF mencionados previamente [88][109]. La respuesta a altas temperaturas está relacionada con respuestas a los cambios en las condiciones de luz no sólo porque produce similares alteraciones en el desarrollo, sino porque las señales de

temperatura son percibidas por los fotorreceptores [110]. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta a luz y a altas temperaturas no son los mismos.

4.4.2. PIF4 como regulador central de la termomorfogénesis

Como se menciona más arriba, PIF4 es un miembro de la familia de proteínas PIF. Esta familia, que pertenece a su vez a la familia de factores de transcripción bHLH, presenta 8 miembros en *Arabidopsis* [109][111]. Aunque las proteínas PIF tienen funciones redundantes o específicas durante la fotomorfogénesis [112], solamente PIF4 presenta un papel importante a altas temperaturas, siendo éste un regulador positivo de la termomorfogénesis [109][113][114][115][116]. Las mutantes con pérdida de función *pif4* presentan una marcada inhibición de los procesos de elongación celular e hiponastía foliar frente a un aumento en la temperatura en comparación con las plantas salvajes. Se ha reportado que, frente a un aumento en la temperatura del ambiente, los niveles de PIF4 y su actividad son regulados de manera transcripcional y postraducciona mediante varios mecanismos [88][117][118]. EARLY FLOWERING 3 (ELF3), ELF4 y LUX ARRHYTHMO (LUX) conforman un complejo que, como parte del reloj circadiano, se une al promotor de *PIF4* y reprime su expresión, particularmente durante la primera parte de la noche [119]. Las temperaturas cálidas atenúan la unión de ELF3 y LUX a sus promotores blanco, contribuyendo a una expresión elevada de *PIF4* en estas condiciones [117][120][121]. *PIF4* es, además, un blanco directo de HY5, que regula negativamente la expresión de *PIF4* [115][122][123]. HY5 es un factor de transcripción que promueve la fotomorfogénesis y actúa corriente abajo de los fotorreceptores afectando directamente la transcripción de genes inducidos por la luz [124]. Se ha reportado que la expresión del gen *HY5* y, en algunos casos, la estabilidad de HY5 disminuyen con el aumento de la temperatura [122][124][125]. Además, HY5 y PIF4 aparentemente compiten por los mismos sitios de unión al ADN en los promotores de *YUC8*, que codifica una enzima de la vía de síntesis de auxinas, y otros genes involucrados en las respuestas de crecimiento frente a temperaturas elevadas [115]. Existen otros mecanismos que afectan la unión de PIF4 al ADN: a temperaturas cálidas, PIF4 recluta a la proteína FCA que induce modificaciones en la cromatina que causan la disociación de PIF4 de sus genes blanco con el fin de atenuar la respuesta a la señal de temperatura (Fig. 11) [126].

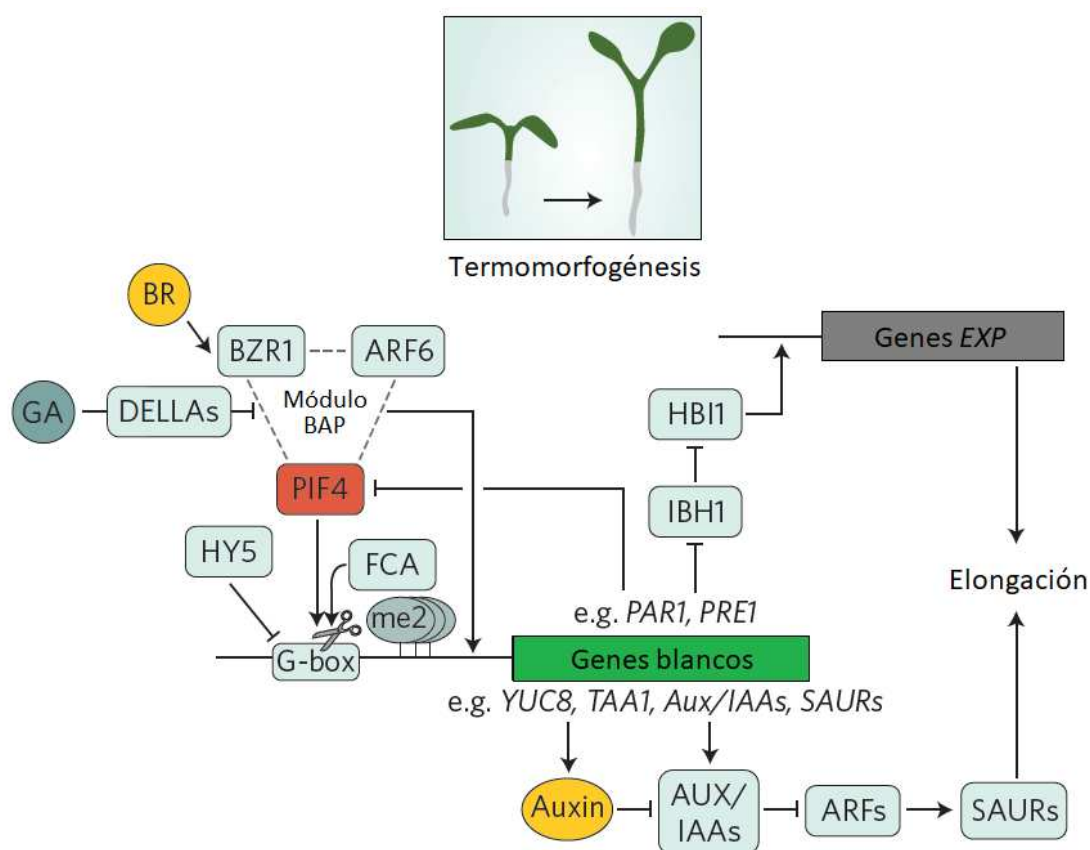


Figura 11. Modelo simplificado del rol de PIF4 en la termomorfogénesis. PIF4 regula la expresión de sus genes blanco a través de la unión a elementos G-box presentes en los promotores. Esta regulación es contrarrestada por HY5, que compite por los mismos sitios de unión. Además, FCA puede atenuar la unión PIF4-G-box mediante la eliminación de las marcas de cromatina H3K4Me2. El crecimiento por elongación celular se desencadena por la inducción, mediada por PIF4, de genes de biosíntesis de auxinas y SAUR, y por una cascada que involucra a las proteínas PAR1, PRE1, IBH1 y HBI1, lo que finalmente resulta en la inducción de expansinas (EXP). Ambas vías implican regulaciones de retroalimentación y, al menos parcialmente, a los factores de transcripción BZR1 y ARF6 (módulo BAP). Otras fitohormonas están involucradas en la termomorfogénesis, entre ellas los brasinosteroides (BR) y las giberelinas (GA). *Figura modificada de Quint y col., 2016 [88].*

Durante las respuestas de elongación del hipocotilo a altas temperaturas, PIF4 actúa promoviendo la síntesis de auxinas uniéndose de manera directa a las regiones promotoras de los genes *TAA1* y *YUC8*, activando su transcripción [127][128] (Fig. 11). Sumado a esto, la señalización de auxinas se ve reforzada a temperaturas elevadas por la estabilización del receptor de auxinas TIR1 [129] y por alteraciones en el sistema de transporte de estas hormonas [92]. Además de estimular la producción de auxinas, PIF4 también regula de manera directa la expresión de genes que responden a auxinas, como los genes *SAUR* [127] y los *Aux/IAA* [130][131][132] (Fig. 11). Los genes *SAUR* se identificaron por primera vez en soja como genes cuya expresión se induce rápidamente por auxinas [133], pero la función de la mayoría de las

proteínas SAUR en plantas es sólo parcialmente conocida. *Arabidopsis* presenta 79 genes *SAUR* [134], que se dividen a su vez en subfamilias y presentan funciones redundantes. Se ha reportado que las proteínas SAUR interactúan físicamente con fosfatasa del tipo PP2C-D reprimiendo su actividad, lo que resulta en la fosforilación y activación de H⁺-ATPasas de la membrana plasmática. De esta forma las auxinas, a través de las proteínas SAUR, promueven la elongación celular mediante un aumento en la concentración de protones en el apoplasto. El bajo pH generado aumenta la actividad de proteínas que modifican la pared celular, denominadas expansinas, haciéndola más lábil. Después de varias horas de temperaturas elevadas aumenta la abundancia de fosfatasa PP2C-D, aparentemente por mecanismos de regulación postranscripcionales, lo que podría prevenir el crecimiento exagerado del hipocotilo [135]. Las proteínas SAUR generalmente comparten la función de inhibir a las fosfatasa PP2C-D, pero se ha observado que las regiones reguladoras de los genes *SAUR* presentan una gran diversidad, lo que permite patrones de expresión específicos de tejido y de estímulos [26]. Esto le proporciona a la planta una gran plasticidad. La mayoría de los genes *SAUR* están entonces involucrados en el alargamiento celular, al menos en las plántulas [136], lo que está relacionado, como mencionamos previamente, con la interacción de las proteínas que codifican con las fosfatasa PP2C-D localizadas en la membrana plasmática (D2, D5 y D6) [137]. Se ha reportado que proteínas SAUR localizadas en el citosol, por otro lado, podrían inhibir a la fosfatasa PP2C-D citosólica denominada SSPP, induciendo así la senescencia [138]. Varios genes *SAUR*, como *SAUR10* y *SAUR36* [139][140], están involucrados en inducir el alargamiento celular y la senescencia, por lo que se piensa las proteínas que codifican estarían localizadas tanto en la membrana plasmática como en el citosol. Curiosamente, algunas proteínas SAUR exhiben localización nuclear [141][142] y posiblemente interactúen con las fosfatasa PP2C-D localizadas en el núcleo: D1, D3 y D4 [137]. *SAUR32*, de localización nuclear, inhibe el alargamiento celular y no responde a auxinas [142], lo que sugiere que las proteínas SAUR con localización nuclear pueden cumplir una función diferente a la de promover el alargamiento celular. *SAUR51*, que se expresa en células meristemáticas, tampoco responde a auxinas, y se ha observado que se regula de manera positiva por citoquininas [143]. Aún está en discusión si la localización de las proteínas SAUR es realmente predictiva de su función, y si esto también se correlaciona con su respuesta frente a estímulos particulares. Líneas de plantas transgénicas que expresan construcciones de microARN artificiales que silencian la expresión de una subfamilia de genes *SAUR* (*SAUR61-SAUR68* y *SAUR75*) presentan una menor elongación del hipocotilo y del filamento de los estambres [144]. En contraste, las plantas transgénicas que expresan *SAUR63-GFP* o *SAUR63-GUS* presentan hipocotilos, pétalos y filamentos de estambre más largos. Las proteínas SAUR son degradadas de manera muy rápida dentro de la célula, pero se ha

encontrado que su fusión a GFP y/o GUS las estabilizan, generando una ganancia de función [144][145]. También se ha reportado que los genes de la subfamilia *SAUR19* desempeñan un rol crítico en el crecimiento del hipocotilo inducido por altas temperaturas de manera dependiente de PIF4 [127]. Además, la sobreexpresión de *SAUR19* fusionado a *GFP* es suficiente para rescatar el defecto en el crecimiento del hipocotilo de la mutante *pif4* a alta temperatura [127].

También se ha reportado la participación de los brasinosteroides (BR) en la elongación del hipocotilo a altas temperaturas [146][147]. Los factores de transcripción BES1 y BZR1 son los reguladores centrales de la vía de señalización de estas hormonas y representan un nodo de integración de numerosas cascadas de señalización. La regulación de BZR1/BES1 es dinámica y multifacética, incluyendo el estado de fosforilación, la actividad y la estabilidad de estas proteínas [66]. Además de promover la transcripción de genes de biosíntesis de auxinas, PIF4, junto con BES1, induce la expresión de los genes de síntesis de BR *CPD*, *DWF4* y *BR6ox2* en respuesta a temperaturas cálidas, particularmente al final de la noche (Fig. 12A) [148]. Esto genera un aumento de BR endógenos, lo que promueve el crecimiento de las plantas al inactivar a la quinasa BIN2, regulador negativo de la señalización de BR. Esta quinasa del tipo GSK3 fosforila a PIF4 y BES1. Por lo tanto, en un contexto de altos niveles de BR se promueve la acumulación de las proteínas PIF4 y BES1 en sus formas activas desfosforiladas [149]. En respuesta a la luz, phyB desestabiliza a PIF4. En ausencia de PIF4, BES1 actúa como un represor, ya que recluta al correpresor TOPLESS, lo que resulta en la represión de la expresión de genes de biosíntesis de BR conduciendo a niveles disminuidos de BR endógenos. Como consecuencia, BIN2 se reactiva y fosforila a PIF4 y BES1, inactivando estos factores. Es por esto que hay una mayor transcripción de genes de biosíntesis de BR durante la noche. Las señales de luz y temperatura controlan de esta forma los niveles de PIF4 y BES1. El equilibrio entre ambos factores proporciona un mecanismo altamente sensible para la rápida modulación del crecimiento y el desarrollo de las plantas en respuesta a las señales ambientales [148]. Otro factor de la vía de señalización de BR, BZR1, también está regulado dinámicamente por BIN2 [150]. La forma inactiva de BZR1, la cual está fosforilada, es incapaz de desencadenar respuestas a BR. Temperaturas elevadas aumentan la localización nuclear de BZR1, aunque no afectan de manera significativa los niveles de transcritos de este gen o la abundancia de la proteína [146][151]. La versión activa de BZR1, desfosforilada, induce la expresión de *PIF4* frente a un aumento en la temperatura, definiendo así un potencial bucle de retroalimentación positiva [151]. Existe evidencia de que la señalización de BR tendría un rol corriente abajo del módulo PIF4-auxinas (Fig. 12B). Se ha observado que la aplicación exógena de BR rescata la deficiencia en la elongación del hipocotilo frente a altas temperaturas de la mutante *pif4* y de mutantes en

la síntesis y percepción de auxinas, mientras que la aplicación de auxinas exógenas no rescata la deficiencia en termomorfogénesis de mutantes en la síntesis o señalización de BR [151].

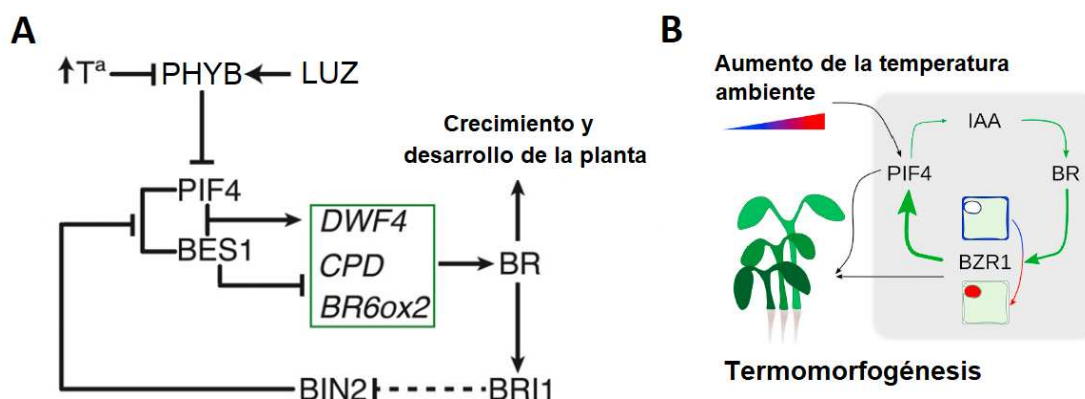


Figura 12. Control de las respuestas de desarrollo y crecimiento a altas temperaturas por la vía de BR. (A) Las señales de luz y temperatura modulan los niveles de PIF4 y BES1 activos. El equilibrio en el núcleo de ambos factores de transcripción proporciona un mecanismo altamente sensible para la rápida modulación del crecimiento y el desarrollo de las plantas en respuesta a las señales ambientales. *Figura modificada de Martínez y col., 2018 [148]. (B)* Los BR actúan corriente abajo de PIF4 y de las auxinas para regular el crecimiento en respuesta a un aumento de la temperatura ambiente a través de BZR1. Un bucle de retroalimentación positiva amplifica la respuesta. *Figura modificada de Ibáñez y col., 2018 [151].*

4.4.3. Módulo BAP

Las auxinas y los BR convergen con la actividad de PIF4 a través de la acción de los factores ARF6/8 y BZR1, respectivamente, con los cuales PIF4 comparte muchos genes blancos. Además, estos factores de transcripción interactúan entre ellos, conformando lo que se conoce como módulo BAP [147][152] (Fig. 11 y 13). La regulación de la expansión celular se basa, por consiguiente, en la acción coordinada de estos factores de transcripción que promueven el crecimiento y que podrían formar un complejo trimérico capaz de unirse a regiones promotoras del ADN [153]. Sin embargo, la presencia de tal complejo aún no se ha demostrado. En particular, el 42% de los genes blancos de ARF6 son también blancos de BZR1 y PIF4 [152]. Dentro de éstos, encontramos aquellos relacionados con el control del crecimiento celular vinculados principalmente con las modificaciones de la pared celular y la respuesta a auxinas, incluyendo *EXPANSINAS*, genes *SAUR* y genes *Aux/IAA* [152]. También activan de manera directa la expresión de genes que codifican una serie de pequeñas proteínas HLH de la familia PRE (PRE1, PRE2, PRE5 y PRE6). Una disminución en los niveles de transcritos de los cuatro genes *PRE* produce insensibilidad a altas temperaturas en la respuesta de elongación del hipocotilo [147]. La proteína PRE1 se une al represor del crecimiento ILI1 BINDING bHLH PROTEIN1 (IBH1), inhibiéndolo [152]. IBH1 no se une al ADN directamente, sino que inhibe a un factor bHLH que

se une al ADN, llamado HOMOLOG OF BEE2 INTERACTING WITH IBH1 (HBI1), con el que interacciona [154]. La sobreexpresión de *HBI1* produce un aumento en la elongación del hipocotilo y de los pecíolos, mientras que la expresión de una versión dominante negativa de *HBI1* causa un fenotipo enano, lo que indica que HBI1 es un regulador positivo de la elongación celular. Mediante experimentos *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que HBI1 se une directamente a los promotores de genes que codifican expansinas, activando su expresión. HBI1 actúa corriente abajo de las vías dependientes de temperatura, BR, GA y luz. Entonces, el equilibrio entre factores antagonistas HLH/bHLH controla la elongación celular corriente abajo de múltiples vías de señalización hormonal y ambientales [154].

Más allá de la regulación en común de ciertos genes por el módulo BAP, existen vías de señalización individuales de cada uno de estos factores de transcripción, que actúan de manera independiente para controlar blancos específicos.

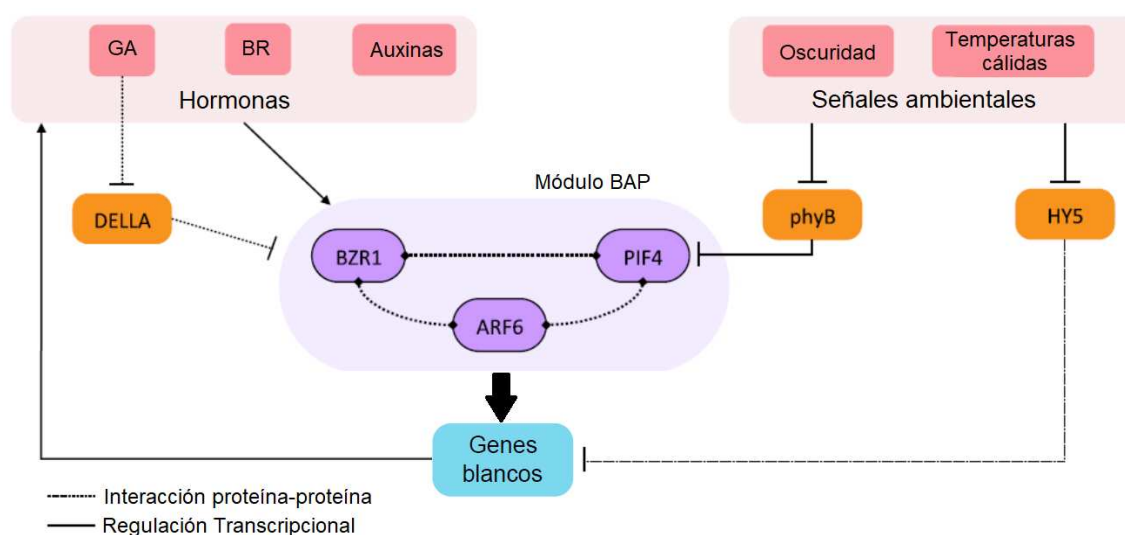


Figura 13. El módulo BAP integra vías ambientales y hormonales para dar lugar a un crecimiento coordinado. *Figura modificada de Bouré y col., 2019 [155].*

También ha sido reportada la inducción de genes de biosíntesis de GA, como *GA20ox1* y *GA3ox1*, frente a un aumento de la temperatura ambiente [146], aunque los mecanismos involucrados todavía son poco claros. Como mencionamos anteriormente, las GA promueven el crecimiento al oponerse a la función de las proteínas DELLA. Cuando los niveles de GA son bajos, las proteínas DELLA se acumulan e inhiben a los factores de transcripción que componen el módulo BAP [146][152][156] (Fig. 14). Estos resultados sugieren que la señalización de GA y las proteínas DELLA podrían actuar como reguladores principales que equilibran la actividad del módulo BAP.

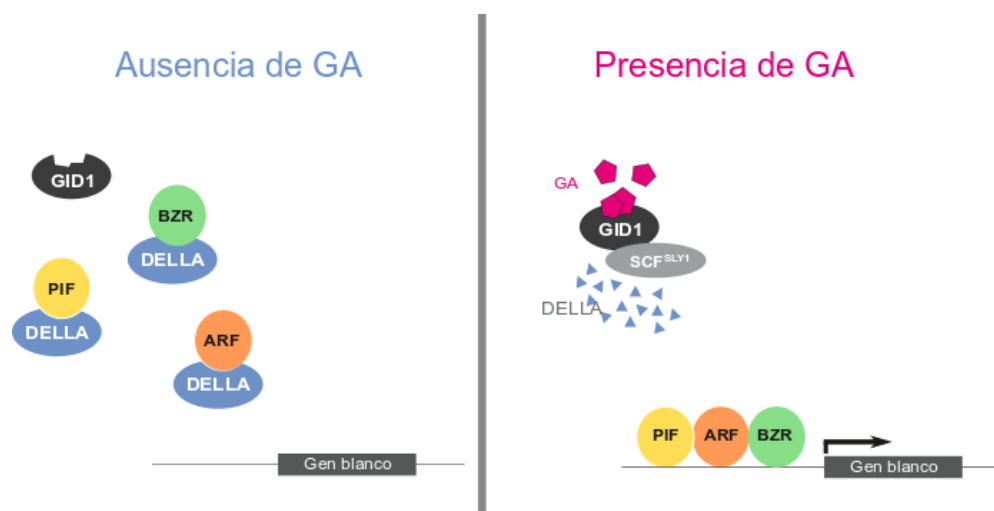


Figura 14. Modelo de acción de las proteínas DELLA en la señalización de GA. En condiciones deficientes de GA, las proteínas DELLA son estables y se localizan en el núcleo, donde se unen a factores de transcripción e inhiben la unión de los mismos al ADN. En presencia de GA, las DELLA se degradan a través de la vía del proteasoma 26S. Los factores de transcripción ahora están libres y activan sus genes blancos. *Figura modificada de Fukazawa y col., 2014 [157].*

4.5. Las proteínas TCP

Las proteínas de la familia TCP (TCP) son factores de transcripción exclusivos de plantas involucrados en la regulación de diversos procesos relacionados con el crecimiento, entre ellos el desarrollo y la senescencia de las hojas, la formación de ramificaciones laterales, la morfogénesis floral, el desarrollo de gametofitos, la germinación, el ritmo circadiano, la regulación del ciclo celular, la señalización hormonal y las respuestas de defensa [158][159]. El nombre de la familia se debe a la presencia de un dominio proteico altamente conservado, denominado TCP, identificado a partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los primeros miembros aislados de la misma: TB1 (*teosinte branched 1*) de maíz (*Zea mays*), CYCLOIDEA (CYC) de *Antirrhinum majus* y PCF1 y 2 (*Proliferating Cell Factor*) de arroz (*Oryza sativa*) [160]. El dominio TCP consiste en una secuencia de 59 aminoácidos localizada hacia el extremo amino terminal de todos los miembros de la familia y presenta la capacidad de unir secuencias específicas de ADN y de establecer interacciones proteína-proteína [160]. Su secuencia de aminoácidos sugiere que el dominio TCP está formado por una región N-terminal rica en aminoácidos básicos, seguida por dos hélices alfa anfipáticas conectadas a través de un bucle desordenado, similar a los que se encuentran en los factores de transcripción eucariotas de la familia bHLH. Los alineamientos de secuencias entre los dominios TCP (Fig. 15) y bHLH muestran que los residuos hidrofóbicos implicados en la dimerización y la formación de la interfaz entre las hélices en las proteínas bHLH se encuentran conservados en el dominio TCP [161]. Sin embargo, las predicciones teóricas sobre las interacciones con el ADN basadas en la

estructura del dominio bHLH no se aplican exactamente al dominio TCP, dado que éste contiene una región básica más larga, así como aminoácidos que rompen la estructura helicoidal. Estas diferencias son las que definen a la familia TCP como una nueva familia de factores de transcripción, separada de la familia bHLH [160][162].

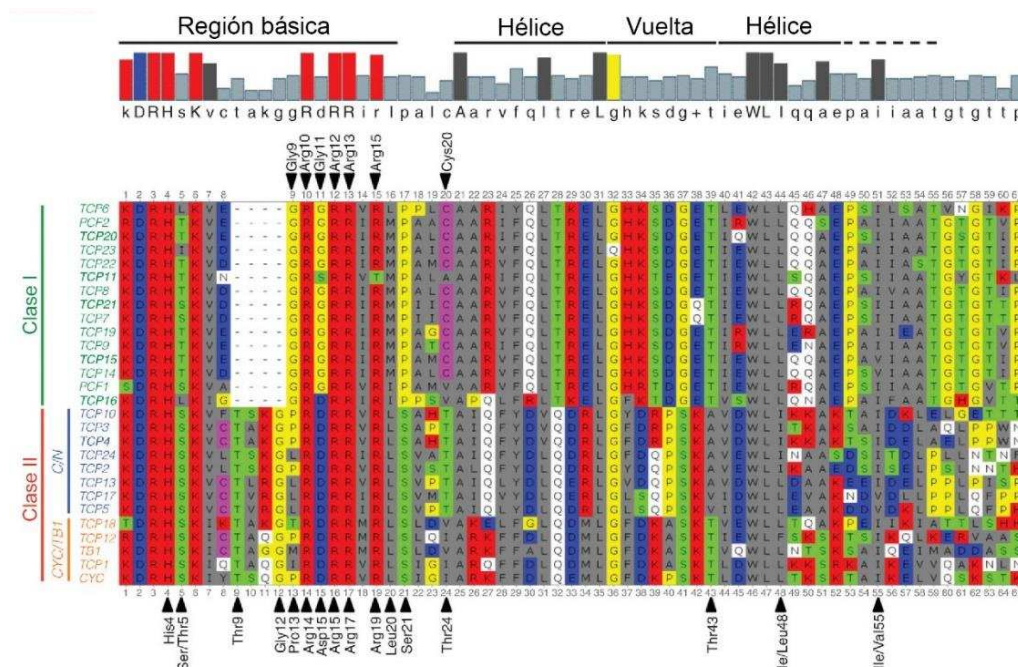


Figura 15. Alineamiento de los dominios TCP de 24 proteínas TCP de Arabidopsis, CYCLOIDEA de *A. majus*, TB1 de *Z. mays* y PCF1 de *O. sativa*. Los residuos con potencial relevancia funcional se marcaron con puntas de flechas. Los aminoácidos cargados positivamente se resaltaron con rojo, los aminoácidos cargados negativamente con azul, los fosforilables con verde, los hidrofóbicos con gris, residuos que rompen la α -hélice (prolina y glicina) en amarillo y las cisteínas en rosado. La secuencia consenso se muestra en la zona superior. Las letras en mayúscula denotan 100% de conservación y el símbolo “+” indica dos aminoácidos con la mayor frecuencia. Las barras verticales representan el grado de conservación; aquellas coloreadas indican los aminoácidos con mayor grado de conservación. *Figura modificada de “Plant transcription factors. Evolutionary, structural, and functional aspects” Capítulo 9, 2015 [163].*

En base a las características presentes tanto dentro como fuera del dominio TCP, las proteínas que lo contienen se dividen en dos subfamilias, denominadas PCF y CYC/TB1 o clase I y II, respectivamente [160][164]. Como ambas clases se detectan incluso en las especies más simples de plantas, no ha sido posible determinar cuál corresponde al tipo ancestral. La clase I está comprendida por proteínas estrechamente relacionadas, mientras que las proteínas de clase II caen en dos grupos bien definidos, CINCINNATA (CIN) y CYC/TB1 (Fig. 16) [165]. Dentro del dominio TCP, las dos clases difieren en tres aspectos principales: 1) el número de residuos de la región básica, ya que las proteínas de clase II contienen una inserción de cuatro aminoácidos en esta región respecto de las de clase I, 2) la composición de los residuos presentes en el bucle y en las caras hidrofílicas de las hélices I y II, 3) la longitud de la hélice II. Por fuera

del dominio TCP, los miembros de la clase I comparten secuencias cortas que lo flanquean [158]. Por su parte, diversos miembros de la clase II tienen un motivo conservado de 18-20 aminoácidos rico en argininas, denominado dominio R, que formaría una α -hélice [160][166]. Adicionalmente, la mayor parte de los miembros del clado CYC/TB1 contiene un motivo ECE poco conservado (ácido glutámico-cisteína-ácido glutámico), no caracterizado funcionalmente hasta el momento y que se encuentra entre los dominios TCP y R [165][167]. Finalmente, el clado CIN presenta dos subclados más, los genes *jaw-TCP* [168] y los genes similares a *TCP5* (*TCP5-like*) [169] (Fig. 16). Los genes *CIN* denominados *jaw-TCP* son regulados negativamente por el microARN *miR319* en todas las angiospermas analizadas hasta la fecha, mientras que los genes pertenecientes al subclado *TCP5-like* no presentan esta regulación.

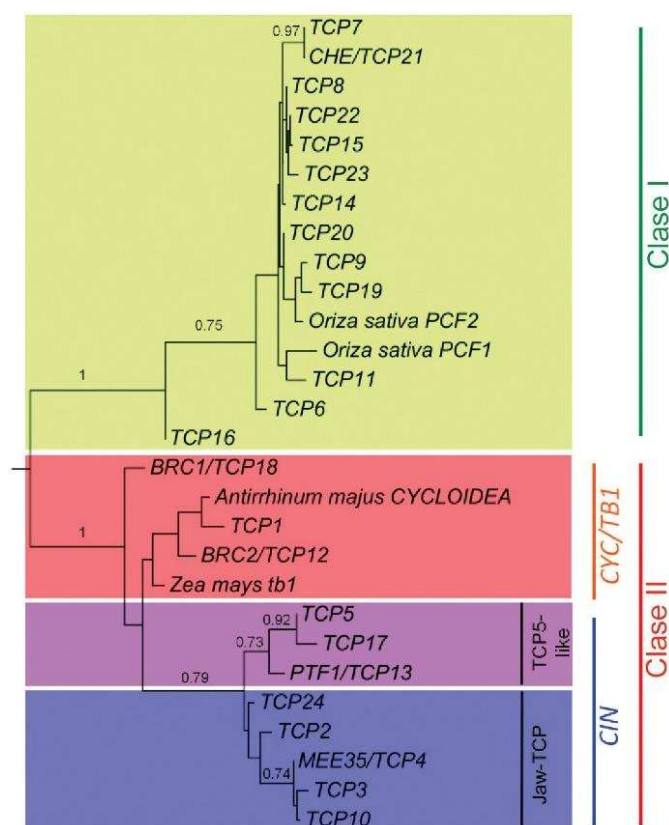


Figura 16. Árbol filogenético de la familia TCP de Arabidopsis. También se incluyen PCF1 y PCF2 de arroz y TB1 de maíz. Figura modificada de "Plant transcription factors. Evolutionary, structural, and functional aspects" Capítulo 9, 2015 [163].

4.5.1. Interacciones proteína-ADN del dominio TCP

Las primeras evidencias sobre la función bioquímica del dominio TCP surgieron del estudio de las proteínas de arroz de clase I PCF1 y PCF2. Estas proteínas se aislaron en base a su capacidad de unir específicamente ciertos elementos presentes en el promotor del gen *PCNA*

(*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) de arroz [162]. Dichas secuencias, denominadas sitio IIa (GTGGGCCCGT) y sitio IIb (ATGGTCCCAC, o GTGGGACCAT en la cadena complementaria), son esenciales para la actividad transcripcional del gen *PCNA* en células en proliferación. Una serie de ensayos de preferencias de unión al ADN, realizados con proteínas TCP de arroz (PCF2 y PCF5) [170] y de Arabidopsis (TCP4, TCP15 y TCP20) [171][172], sugieren que la secuencia consenso de unión de las proteínas TCP de clase I puede definirse como GTGGGNCC, mientras que las proteínas de clase II muestran preferencia por la secuencia GTGGNCCC. A través de diversos estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, se ha podido establecer que el determinante de esta diferencia en las preferencias de unión al ADN es la identidad del aminoácido que se encuentra presente en la posición 11 del dominio TCP de clase I, o de su equivalente, el residuo 15 del dominio TCP de clase II [173]. Mientras que todas las proteínas de clase II contienen un residuo de ácido aspártico (Asp) en dicha posición, una enorme mayoría de las proteínas de clase I presentan una glicina (Gly), y las mutaciones recíprocas de estos residuos conllevan a un cambio en la especificidad por la secuencia de ADN reconocida. En concordancia con estos resultados, TCP16, una proteína de clase I de Arabidopsis que presenta el residuo Asp11, muestra preferencia por la secuencia consenso de las proteínas de clase II [173]. A partir de estos y otros estudios se ha propuesto que la preferencia por secuencias de clase I o II estaría dictada por la orientación de los aminoácidos que contactan el ADN, mayormente argininas, ubicados entre las posiciones 11 y 15 del dominio TCP [173]. Así, cambios sutiles en la orientación de estos aminoácidos, producidos por las interacciones con otras regiones del dominio TCP o con otras proteínas, podrían ser relevantes para el reconocimiento de blancos específicos *in vivo*.

Dado que las secuencias consenso reportadas para las proteínas TCP de clase I y II son distintas, pero se superponen, se ha planteado la hipótesis de que proteínas de ambas clases podrían compartir genes blancos, regulando la expresión de los mismos en forma antagónica [170][174]. Sin embargo, estudios con plantas mutantes o que expresan de manera constitutiva formas nativas o modificadas de estos factores de transcripción sugieren la existencia de una redundancia parcial y funciones específicas para las diversas proteínas TCP. Hasta el momento, la existencia de funciones solapadas entre las proteínas TCP de clase I y II ha sido demostrada en algunos trabajos. En este sentido, se ha reportado en Arabidopsis que *LIPOXYGENASE2* (*LOX2*), un gen relacionado con la biosíntesis de ácido jasmónico (JA), es regulado tanto por TCP20 (proteína TCP de clase I) como por TCP4 (TCP de clase II), aunque la primera inhibe la expresión de *LOX2* y la segunda la induce (Fig. 17D) [172][175]. Aunque la hipótesis de la existencia de funciones antagónicas entre los miembros de las clases I y II plantea que la unión

al ADN se da en los mismos sitios blanco, TCP20 y TCP4 unen regiones diferentes del promotor de *LOX2*, lo cual sugiere la existencia de mecanismos alternativos para la acción antagónica de las proteínas de ambas clases [175]. También se ha observado la existencia de procesos que son regulados de manera conjunta por proteínas TCP de clase I y II, como la inducción de la floración [176] y la inducción de la expresión de genes que participan de la respuesta a auxinas como *IAA3* y *SAUR65* [177][178][179][180] (Fig. 17G). Sin embargo, se ha reportado que hay genes que son blancos para cada clase, como *AS1*, *AGO7* y *TAS3*, que son regulados positivamente por miembros del clado CIN (clase II) [177][181][182], y genes de respuesta a citoquininas, como *ARR7* y *ARR15*, cuya expresión se ve afectada por las proteínas TCP de clase I TCP14 y TCP15 [180], y *ARR16*, que es regulado en forma directa por TCP4 del clado CIN [183] (Fig. 17B).

En conjunto, todos estos reportes sugieren que las diferencias observadas en las preferencias de unión al ADN de las proteínas TCP podrían ser un mecanismo a través del cual estos factores de transcripción adquirirían su especificidad funcional.

4.5.2. Interacciones proteína-proteína

Tal como fue reportado para las proteínas bHLH, los factores de transcripción TCP pueden unir ADN en forma de homo o heterodímeros. Diversos estudios proveen evidencia de que estas proteínas pueden formar heterodímeros con miembros de su misma clase o entre miembros de clases diferentes [169][170][171][184]. Además, existen numerosos ejemplos que demuestran que las proteínas TCP pueden interactuar con proteínas de otras familias. La capacidad de interacción con distintos factores proteicos que poseen las proteínas TCP contribuye en gran medida a la diversidad funcional que poseen. Como ejemplo se pueden citar las interacciones de las proteínas de clase I TCP14 y/o TCP15, estudiadas en esta tesis, con *SRFR1*, un regulador negativo de la inmunidad desencadenada por efectores (ETI, *Effector Trigger Immunity*) [185], *PRR2*, un factor de transcripción específico de plantas que está involucrado tanto en el desarrollo vegetal [186] como en la inmunidad [187], *CCA1* (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1), *PRR3* y *PRR5*, componentes del reloj circadiano [188], *DA1*, *DAR1* y *DAR2*, receptores de ubiquitina que modulan el crecimiento de los órganos a través de la represión de la proliferación celular y la estimulación de la endoreduplicación [189], *DOF6*, un factor de transcripción que modula la germinación [190][191], la MAP quinasa *MPK8*, que participa en la promoción de la germinación [192], la N-acetilglucosamina transferasa *SPYNDLY* (*SPY*) [193], y la enzima *SCE1*, que cataliza la sumoilación de proteínas [194]. Se ha reportado, además, que las proteínas TCP de clase I interactúan con proteínas *DELLA* (Fig. 17A), reguladores negativos de

la respuesta a GA, mediando la respuesta a estas hormonas durante la germinación y el crecimiento del tallo [195][196].

Estos hallazgos sugieren que las proteínas TCP pueden ser modificadas de manera postraduccional y además pueden ser dirigidas a diferentes genes blancos a través de la interacción con una variedad de factores de transcripción. Estas interacciones podrían proporcionar así una especificidad adicional a la acción de las proteínas TCP.

4.5.3. Funciones de los factores de transcripción TCP

Los primeros estudios acerca de la función de las proteínas TCP en plantas las relacionaron con procesos de crecimiento y proliferación celular. Posteriormente, y con el transcurrir de los años, una gran cantidad de estudios han contribuido a esclarecer los roles específicos de los diferentes miembros de cada una de las subfamilias. De modo general, los resultados publicados confirman el papel propuesto inicialmente para las proteínas TCP, pero además muestran de manera evidente que estos factores de transcripción participan en una multiplicidad de procesos a través de diferentes mecanismos.

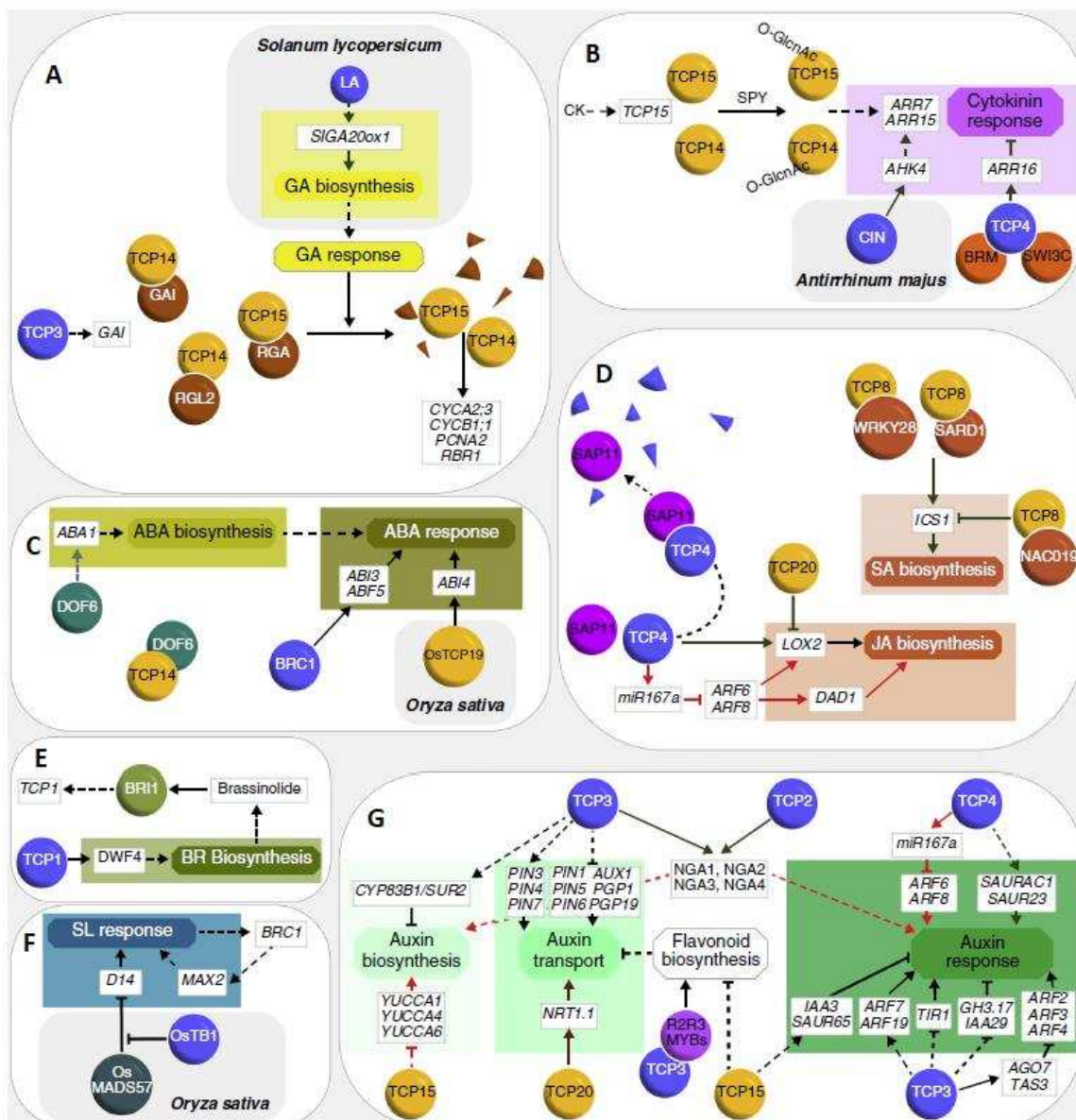


Figura 17. Proteínas TCP y señalización hormonal. Las proteínas TCP de clase I (amarillo) y de clase II (azul) interactúan con las vías de giberelinas (GA), citoquininas (CK), ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA), brasinosteroides (BR), estrigolactonas (SL) y vías de señalización de auxinas. Las proteínas se muestran como esferas, los genes como rectángulos, las vías y los procesos biológicos como octógonos. Las flechas indican la activación de la expresión génica o la promoción de la actividad proteica. Las barras indican la inhibición de la expresión o de la actividad. Las líneas sólidas y punteadas indican interacciones directas e indirectas, respectivamente. Los colores de las líneas indican el tejido en el que se describió la interacción: líneas negras, plantas enteras o plántulas; rojas, flores; verdes, hojas; marrón, raíces. Las interacciones en especies distintas a *Arabidopsis* se incluyen dentro de recintos grises. *Figura modificada de Nicolas y Cubas, 2016 [197].*

Las proteínas de la clase II participan en procesos de morfogénesis en hojas y flores, en la regulación de la simetría floral y en la inhibición del desarrollo de ramificaciones laterales [158][166]. En todos los casos, la acción de estas proteínas parece estar relacionada con la regulación, ya sea positiva o negativa, de la proliferación y el crecimiento celular. En relación

con el papel de las proteínas TCP durante la expansión celular, se ha sugerido que TCP1 estaría involucrada en la regulación de este proceso en hojas [177]. Se ha observado, además, que las proteínas TCP de clase II participan en la regulación de la homeostasis hormonal (Fig. 17). Por ejemplo, la proteína TCP3 activa de manera indirecta la transcripción del gen que codifica la proteína DELLA GAI. En *Solanum lycopersicum*, Lanceolate (LA) activa indirectamente la transcripción de *SlGa20ox1*, que promueve la biosíntesis de GA (Fig. 17A). En *Antirrhinum majus*, la proteína CIN activa el gen que codifica el receptor de CK *AHK4*. En contraste, TCP4 activa la transcripción del gen *ARR16* de manera directa, lo que a su vez inhibe la respuesta a CK (Fig. 17B). Por otro lado, la proteína BRC1 influye positivamente en las respuestas a ABA (Fig. 17C), mientras que TCP4 controla la síntesis de la hormona ácido jasmónico (Fig. 17D) y, a través de ello, la senescencia foliar [172]. TCP3 y proteínas relacionadas modifican la homeostasis de auxinas (Fig. 17G) [177] y TCP1 modula la síntesis de BR (Fig. 17E) [198]. Por último, la expresión de *BRC1* es inducida por estrigolactonas (SL). A su vez, *BRC1*, probablemente en forma indirecta, promueve la expresión de *MAX2*, proteína F-box involucrada en la percepción de SL. En arroz, *FC1/OsTB1* se une y antagoniza a *OsMADS57*, un represor de la expresión del gen *D14*, el cual codifica una proteína que participa en la conversión de SL a su forma activa. Más en la línea con los procesos estudiados en este trabajo de Tesis, dos reportes implican a las TCP CIN de clase II en la regulación de genes de biosíntesis de auxinas durante la elongación del hipocotilo bajo condiciones de luz normal [199] (Fig. 18) y sombra [200] (Fig. 19). En el primer caso estarían involucradas las proteínas del subclado CIN jaw-TCP y en el segundo caso las TCP5-like. Además, se ha visto que proteínas TCP del subclado CIN jaw-TCP regulan negativamente la acción de PIF3 durante la apertura de los cotiledones que ocurre como resultado de la de-etiolación [201].

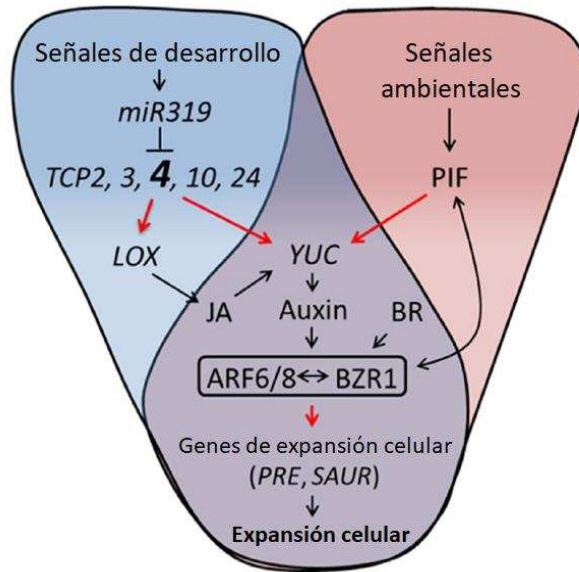


Figura 18. Esquema de la vía de regulación propuesta mediada por proteínas de clase II CIN jaw-TCP en la elongación de células del hipocotilo. Tanto la señal de desarrollo mediada por proteínas TCP (compartimento celeste) como las señales ambientales mediadas por proteínas PIF (compartimento rosa) convergen en la biosíntesis de auxinas dependiente de los genes *YUC* (compartimento gris). TCP4 está ampliado y en negrita, ya que su contribución se ha investigado con mayor detalle. En la respuesta a auxinas resultante participa el módulo BAP mencionado previamente, que incluye a ARF6/8 y BZR1 (que se muestran en una caja), para activar los genes ubicados corriente abajo (como *PRE* y *SAUR*) para promover la elongación de las células del hipocotilo. Las flechas rojas indican activación transcripcional directa, la barra T indica un efecto negativo y las flechas dobles indican interacciones proteína-proteína. *Figura modificada de Challa y col., 2016 [199].*

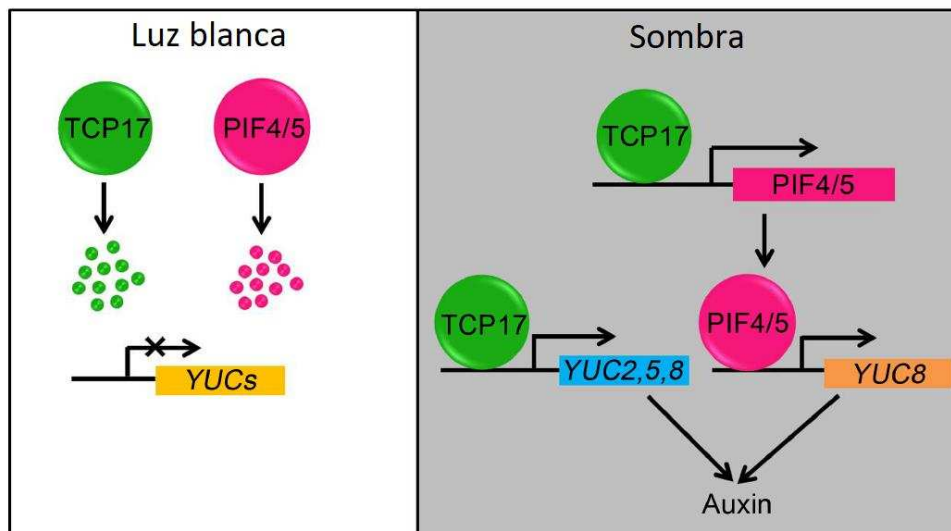


Figura 19. Modelo hipotético del rol de TCP17 (CIN TCP5-like) en la regulación del crecimiento del hipocotilo en sombra. Bajo una condición de luz blanca, TCP17 y las proteínas PIF son inestables y degradados, lo que resulta en niveles de expresión disminuidos de los genes *YUC*. Bajo una condición de sombra, la proteína TCP17 se estabiliza y se acumula, lo que resulta en expresiones elevadas de *PIF4*, *PIF5* y *YUC*. Como resultado, los niveles de auxinas endógenas aumentan. *Figura modificada de Zhou y col., 2018 [200].*

En cuanto a las proteínas TCP de clase I, también existen evidencias que vinculan a algunas de ellas con la regulación de la proliferación y el crecimiento celular. Los primeros miembros de la clase I (PCF1 y PCF2) fueron identificados en arroz a partir de su interacción con una región requerida para la expresión del gen *PCNA*, regulador del ciclo celular en tejidos meristemáticos [162]. Con posterioridad se estableció la interacción de una proteína de clase I de *Arabidopsis* (TCP20) con motivos presentes en promotores de genes expresados durante la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular, como *PCNA2* y genes de proteínas ribosomales [202]. La proteína TCP20 también ha sido relacionada con la regulación de la expresión del gen de ciclina *CYCB1;1* durante la transición G₂/M [174] y se ha informado que TCP15 modula la expresión de genes reguladores del ciclo celular (Fig. 17A) [203]. Li y colaboradores [174] sugirieron que el crecimiento de los órganos estaría regulado por actividades antagónicas de proteínas TCP de las clases I y II sobre la proliferación y el crecimiento celular y que esto se daría a través de la interacción de estas proteínas con un mismo grupo de genes. De esta manera, proteínas de la clase I estimularían la proliferación celular en determinadas regiones del meristema o primordio y, subsecuentemente, proteínas de la clase II reprimirían estos procesos a medida que las células van saliendo de la zona de proliferación. Sin embargo, este modelo no parece tener validez general, ya que en algunos casos las funciones de las proteínas TCP de las clases I y II no parecen ser antagónicas, sino ir en el mismo sentido. Además, la participación de proteínas de las clases I y II en un determinado proceso no siempre parece implicar la interacción con los mismos genes.

En cuanto al papel de las proteínas TCP de clase I en el desarrollo de las hojas, se ha observado que la mutación simultánea de los genes *TCP14* y *TCP15* de *Arabidopsis* genera alteraciones en el desarrollo de este órgano. La lámina se ensancha hacia la base, las hojas tienen pecíolos más cortos y anchos y los márgenes tienden a curvarse hacia arriba a medida que las hojas maduran [204]. Este fenotipo se ve considerablemente aumentado cuando *TCP14* o *TCP15* se expresan fusionadas al dominio represor EAR [204]. Steiner y colaboradores [193] observaron que las hojas de las mutantes en *TCP14* y *TCP15* poseen márgenes lisos y son menos sensibles a la acción de las CK. Estos autores observaron que *TCP14* y *TCP15* regulan la respuesta a esta hormona en hojas y flores mediante la unión a SPLINDY, mencionada en la sección anterior, una N-acetilglucosamina transferasa de *Arabidopsis* que promueve la respuesta a CK y reprime la vía de señalización de GA [193]. Además, las CK promueven la transcripción de *TCP15* (Fig. 17B). Se ha propuesto que *TCP14* y *TCP15* actúan de manera redundante en el control de la proliferación celular durante el desarrollo de hojas y otros tejidos. El efecto más importante se observa sobre la longitud de los entrenudos de los tallos, que es menor en las plantas mutantes dobles *tcp14*

tcp15 [204]. De hecho, mutantes cuádruples en *TCP8*, *TCP14*, *TCP15* y *TCP22* presentan fenotipos más severos aún [195].

Los factores de transcripción TCP de clase I también han sido relacionados con la regulación del desarrollo de los órganos florales [193][204]. *TCP14* y *TCP15* parecen regular el tamaño, la forma y la proliferación celular en los cuatro verticilos. Lucero y colaboradores [180] reportaron que plantas que sobreexpresan *TCP15* desarrollan flores con defectos en la fusión de los carpelos y un reducido número de papilas estigmáticas. En contraste, la expresión de *TCP15* fusionada al dominio represor EAR genera el desarrollo de estructuras ectópicas formadas por papilas estigmáticas en el replum, un tabique membranoso que divide la cavidad del ovario en dos y que persiste en los frutos al caer las valvas después de la dehiscencia. La comparación de los fenotipos observados en plantas con niveles alterados de *TCP15* luego de tratamientos con CK y el análisis en estas plantas de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de auxinas, sugiere que *TCP15* modula el desarrollo del gineceo regulando la homeostasis de auxinas (Fig. 17G).

También se ha reportado que las TCP de clase I reprimen indirectamente la biosíntesis de ABA (Fig. 17C) y que median la respuesta a GA durante la germinación y el crecimiento del tallo de la inflorescencia [195][196]. Esto ocurre a través de la inhibición de las proteínas TCP por interacción con proteínas DELLA, reguladores negativos de la respuesta a GA (Fig. 17A). Como mencionamos antes, algunas proteínas TCP de clase I también están involucradas en vías de ácido jasmónico, regulando la expresión de *LOX2* de manera antagónica con TCP de clase II. Por otro lado, *TCP8*, *TCP9* y *TCP20* interactúan con *WRKY28* y *SARD1*, o con *NAC019*, lo que activa o reprime la transcripción de *ICS1*, involucrado en la biosíntesis de ácido salicílico (Fig. 17D).

En función de lo descrito hasta aquí, resulta evidente que las proteínas de la familia TCP participan en múltiples aspectos del desarrollo vegetal, tanto a nivel de los meristemas como del desarrollo de órganos laterales y estructuras reproductivas y que varios de estos procesos están regulados no sólo a través del control del crecimiento y la proliferación celular, sino de la modulación de las vías de señalización de hormonas y del ritmo circadiano. También sabemos que las proteínas TCP participan de la respuesta a señales ambientales. En base a esto, nos hemos planteado como objetivo general de este trabajo de Tesis estudiar cómo las plantas modulan su crecimiento y desarrollo en respuesta a cambios en las condiciones ambientales y dilucidar en este contexto las funciones que las proteínas TCP de clase I cumplen en la

determinación de la morfología y la arquitectura vegetal, como así también los mecanismos moleculares involucrados en su acción.

OBJETIVOS

5. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de Tesis es realizar estudios funcionales de los factores de transcripción vegetales de la familia TCP, de modo de determinar su papel específico en la regulación del desarrollo vegetal, utilizando como modelo *Arabidopsis thaliana*. La idea es obtener información sobre los mecanismos moleculares involucrados en la acción de este grupo de proteínas, sobre los grupos de genes regulados por las mismas, ya sea directa o indirectamente, y sobre las redes regulatorias en las que se hallan implicadas.

5.1. Objetivos específicos

1. Analizar la posible función de proteínas TCP de clase I en la modulación del crecimiento en respuesta a cambios en las condiciones ambientales.
2. Establecer las vías regulatorias a través de las cuáles las proteínas TCP cumplen esta función.
3. Identificar blancos directos del accionar de las proteínas TCP durante la regulación del crecimiento en respuesta al ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepas utilizadas

Los clonados fueron realizados utilizando la cepa de *Escherichia coli* DH5 α [supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 (Na1r) thi-1 relA1] [205]. Para la transformación de *Arabidopsis* se empleó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LB4404. Esta cepa presenta resistencia cromosómica al antibiótico rifampicina (50 μ g/ml), utiliza el sistema binario de transformación de *Agrobacterium* y posee el plásmido pTi/pRi desarmado pAL4404 (cuyo agente selectivo es la estreptomina (300 μ g/ml)) en la cepa *Ach5*. Esta cepa además posee el plásmido pTi/pRi pTiAch5 [206]. Para los ensayos de doble híbrido en levaduras se utilizó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Mav203 (Invitrogen): MAT α ; leu2-3,112; trp1-901; his3 Δ 200; ade2-101; cyh2R; can1R; gal4 Δ ; gal80 Δ ; GAL1::lacZ; HIS3UASGAL1::HIS3@LYS2; SPAL10::URA3 [207].

6.2. Material Vegetal

Los ensayos realizados durante este trabajo de Tesis se llevaron a cabo utilizando *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) como planta salvaje, que fue provista por Lehle Seeds (Tucson, AZ, USA). Se emplearon líneas de plantas mutantes *tcp14-4*; *tcp15-3*; *tcp14-4 tcp15-3* [204] que fueron cedidas gentilmente por el Dr. Martin Kieffer (University of Leeds, UK), *tcp14-4 tcp15-3 amiR27* [195] que fueron cedidas gentilmente por los Dres. Jean-Michel Davière y Patrick Achard (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Estrasburgo, Francia), y *35S::PIF4-HA* [208] cedidas gentilmente por Salomé Prat (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España). La línea *DR5::GUS* [209] fue cedida gentilmente por la Dra. Claudia Casalongué (Instituto de Investigaciones Biológicas, Mar del Plata). Las líneas *tcp14-6* (SAIL_1145_H03, CS878107); *pif4-2* (SAIL_1288_E07, CS66043); *tcp15-2* (WiscDSLox442E5, CS864607); y *tcp15-4* (WiscDSLoxHS112_04G, CS865298) fueron solicitadas al *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) de la Ohio State University, USA. La construcción para obtener plantas *p15::TCP15-EAR* [178] que expresan a TCP15 fusionada al dominio represor EAR [210] bajo el control de su propio promotor, las plantas *35S::SAUR63-GFP* y las plantas transformadas con *pBI121 (121)* [211] se encontraban disponibles en el laboratorio.

Las plantas *tcp15 DR5::GUS* se obtuvieron mediante cruce de la línea mutante *tcp15-3* con plantas *DR5::GUS*, seguida de una selección basada en la resistencia a higromicina y posterior genotipado. La presencia de la construcción *DR5::GUS* en el genoma fue confirmada

por ensayos histoquímicos de actividad del gen reportero *GUS* (sección 6.28). Para verificar la presencia del fragmento de T-DNA en la región codificante para *TCP15* de la mutante *tcp15-3*, se realizaron reacciones de amplificación a partir de ADN genómico (sección 6.20), de acuerdo a lo descrito en la sección 6.9, utilizando los oligonucleótidos detallados en el ANEXO I (sección 10.1.3). El resto de las líneas de plantas transgénicas utilizadas se obtuvieron durante el trabajo experimental de esta Tesis de acuerdo a lo descrito en las siguientes secciones.

6.3. Vectores utilizados

pENTR-3C. Vector de entrada (Entry Vector) para el sistema Gateway (Life Technologies). Este vector permite el clonado de una secuencia de ADN de interés entre los sitios denominados attL. La secuencia clonada entre estos sitios puede recombinarse entre los sitios attR del vector de destino (Destination Vector). Este vector genera resistencia a kanamicina (50 µg/ml) en bacterias.

pAS-054. Vector de destino para el sistema Gateway. Permite expresar en plantas un gen de interés fusionado a la secuencia N-terminal de mCitrina, bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*35SCaMV*). Confiere resistencia a espectinomicina (100 µg/ml) en bacterias y a kanamicina (40 µg/ml) en plantas.

pAS-059. Vector de destino para el sistema Gateway. Permite expresar en plantas el gen de interés fusionado a la secuencia C-terminal de mCitrina, bajo el control del promotor *35SCaMV*. Este vector confiere resistencia a espectinomicina (100 µg/ml) en bacterias y a BASTA (10 µg/ml) en plantas.

pFK-210. Vector de destino para el sistema Gateway. Permite expresar en plantas el gen de interés bajo el control del promotor *35SCaMV*. Este vector confiere resistencia a espectinomicina (100 µg/ml) en bacterias y a BASTA (10 µg/ml) en plantas.

pFK-248. Vector de destino para el sistema Gateway. Permite expresar en plantas el gen de interés fusionado a la proteína fluorescente verde, GFP, en el extremo C-terminal bajo el control del promotor *35SCaMV*. Confiere resistencia a espectinomicina (100 µg/ml) en bacterias y a BASTA (10 µg/ml) en plantas.

pSoup. Vector requerido para la transformación eficiente de *Agrobacterium tumefaciens* al utilizar los vectores pAS y pFK mencionados anteriormente.

pFAST-R07. Vector de destino para el sistema Gateway. Permite expresar en plantas el gen de interés fusionado a GFP en el extremo C-terminal. Este vector confiere resistencia a espectinomomicina (100 µg/ml) en bacterias y a higromicina (25 µg/ml) en plantas.

pBI121. Derivado del vector pBI101 que contiene un fragmento de 800 pb del promotor 35S*CaMV* dirigiendo la expresión del gen reportero *GUS* [211]. Este vector confiere resistencia a kanamicina tanto en bacterias como en plantas.

pGAD-T7. Vector de expresión en levaduras, diseñado para expresar la proteína de interés fusionada al dominio de activación de GAL4 (AD). La transcripción de la fusión a GAL4 AD está dirigida por el promotor constitutivo *ADH1*. Contiene una señal de localización nuclear (SV40 NLS) que dirige la proteína al núcleo de la levadura. Este vector se replica tanto en *E. coli* como en *S. cerevisiae* a partir de los orígenes de replicación pUC y 2µ, respectivamente. Presenta un gen de resistencia a ampicilina para su selección en *E. coli* y un marcador nutricional *LEU2* para su selección en levaduras. Origen: CLONTECH; [212].

pGBK-T7. Vector de expresión de proteínas fusionadas al dominio de unión al ADN de GAL4 (BD). En levaduras, estas proteínas de fusión son expresadas en altos niveles a partir del promotor constitutivo *ADH1*. Este vector se replica tanto en *E. coli* como en *S. cerevisiae* a partir de los orígenes de replicación pUC y 2µ, respectivamente. También presenta un gen de resistencia a kanamicina para su selección en *E. coli* y un marcador nutricional *TRP1* para su selección en levaduras. Origen: CLONTECH; [212].

6.4. Medios de cultivos para *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*

Medio Luria-Bertani (LB): Peptona de carne 10 g/l; NaCl 5 g/l; extracto de levadura 5 g/l. Para preparar medio LB sólido se adicionó agar-agar como agente solidificante a una concentración final de 15 g/l (1,5% p/v).

6.5. Medios de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae*

Medio YPAD: peptona de carne 20 g/l; extracto de levadura 10 g/l; glucosa 20 g/l; adenina (sulfato) 0,02 g/l.

Medio mínimo: (NH₄)₂SO₄ 5 g/l; glucosa 20 g/l; K₂HPO₄ 1 g/l; MgSO₄ 0,5 g/l; NaCl 0,1 g/l; CaCl₂ 0,1 g/l; inositol 0,1 g/l; piridoxina-HCl 1mg/l; ácido nicotínico 1 mg/l; tiamina-HCl 10 mg/l. En función de la cepa de *S. cerevisiae* empleada y las transformantes a seleccionar, el medio mínimo fue suplementado con las siguientes concentraciones finales de aminoácidos y bases:

uracilo 20 mg/l; adenina (sulfato) 40 mg/l; L-histidina 20 mg/l. En los medios sólidos se adicionó agar-agar como agente solidificante a una concentración final de 15 g/l.

6.6. Medios de cultivos para *Arabidopsis thaliana*

Medio Murashige y Skoog (MS): Para el crecimiento y selección de plantas en placas se empleó el medio comercial MS basal suplementado con vitaminas (M519) de PhytoTechnology Laboratories. En los medios sólidos se adicionó agar-agar como agente solidificante a una concentración final de 8 g/l.

6.7. Condiciones generales de crecimiento de plantas en cámara de cultivo

Las semillas fueron esterilizadas en la superficie mediante un primer lavado con etanol 70% (v/v) (2 min) y luego con una solución de lavandina 5% y SDS 1% (15 min). Luego de este paso de desinfección, las semillas se lavaron 5 veces con agua destilada estéril y finalmente se resuspendieron en agar-agar 0,1% (p/v) estéril. A continuación, se colocaron a 4°C durante 7 días en oscuridad para sincronizar la germinación.

Las plantas fueron cultivadas en tierra o en placas de cultivo que contenían medio MS 0,5X y agar-agar 0,8% (p/v) en condiciones de temperatura normal (23°C) o alta temperatura (29°C) simulando un fotoperiodo de día largo, el cual consiste en 16 h de luz ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 8 h de oscuridad, o un fotoperiodo de día corto de 8 h de luz ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 16 h de oscuridad, en cámaras de crecimiento (Fitoclima 600, Aralab). En los tratamientos de alta temperatura las plantas se cultivaron a 23°C y posteriormente se pasaron a 29°C en ZT4.

Para evaluar el crecimiento en presencia de hormonas, las semillas fueron cultivadas en medio MS 0,5X sólido con GA₃ 10 μM (Sigma), PAC 100 nM (Sigma), brasinólido 100 nM (Sigma) o picloram 5 μM (Duchefa Biochemie) durante 4 días. Para el caso de tratamientos con la auxina IAA (Sigma) las plantas se cultivaron durante 5 días y luego se pasaron a placas con diferentes concentraciones de IAA y se mantuvieron durante 2 días más. Los tratamientos con hormonas para evaluar niveles de expresión se describen para cada caso a lo largo del trabajo de Tesis. Las soluciones de IAA, GA₃, PAC, brasinólido y picloram fueron preparadas de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Todas las líneas de plantas se cultivaron en nuestro laboratorio en las mismas condiciones y se cosecharon al mismo tiempo. Las semillas utilizadas en los ensayos provenían de varias plantas.

6.8. Análisis de secuencias

Todas las secuencias nucleotídicas analizadas en este trabajo se obtuvieron de la base de datos proporcionada por *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR). Los estudios de alineamientos de secuencias nucleotídicas y proteicas se realizaron utilizando el programa BLAST (blastn o blastp, respectivamente [213]).

6.9. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 o 20 μ l, según el caso. Brevemente, en cada reacción se empleó solución amortiguadora, $MgCl_2$ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, oligonucleótidos específicos (500 ng) y 1,5 U de la enzima *Taq* ADN polimerasa. A esta mezcla de reacción se le adicionó el ADN molde, o se picó una colonia con un escarbadietes estéril en caso de PCR de colonias, y se procedió a la reacción de amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador PxE 0,2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation) utilizando los programas apropiados para cada caso y la temperatura de hibridización se estableció de acuerdo a la secuencia de los oligonucleótidos utilizados [$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$].

6.10. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los productos de amplificación obtenidos por PCR fueron separados y visualizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa [214]. Para esto, se preparó agarosa en solución amortiguadora TAE 1x a la concentración correspondiente al tamaño del ADN que debía separarse. Los productos de amplificación se diluyeron en solución amortiguadora de siembra de ADN con el agente intercalante Gel Red, se sembraron en la matriz de agarosa y se corrieron a 80 V hasta obtener buena resolución de las bandas. Como marcador de tamaño de los fragmentos de ADN se empleó ADN del bacteriófago λ (Promega) digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Finalizada la corrida electroforética, se procedió a la visualización del ADN mediante exposición a luz UV.

6.11. Purificación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN se purificaron a partir de geles de agarosa, empleándose el kit comercial "Gel Purification" (Thermo Scientific).

6.12. Digestión con endonucleasas de restricción

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones de reacción recomendadas por los proveedores de cada enzima en particular. En todos los casos fueron utilizadas entre 1 y 5 U de enzima por cada μg de ADN a digerir en un volumen final que varió entre 20 y 30 μl , dependiendo de la cantidad de ADN. Para la digestión de los vectores provenientes de mini preparaciones de ADN, se adicionó a la reacción de corte la enzima ARNasa A (Promega) en una concentración final de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

6.13. Ligación de moléculas de ADN

La ligación de fragmentos de ADN se realizó empleando 1 U de la enzima T4 ADN ligasa (Promega) en un volumen final de reacción de 10 μl . En la mezcla de reacción se incorporaron la solución amortiguadora y los fragmentos a ligar en las proporciones sugeridas por el fabricante.

6.14. Generación de construcciones génicas

Con el fin de obtener la construcción *35S::TCP15-GFP*, se amplificó la región codificante para *TCP15*, obviando el codón de terminación, utilizando oligonucleótidos específicos (ANEXO I) y el fragmento obtenido se clonó en los sitios *KpnI* y *XhoI* del vector de entrada pENTR-3C (Thermo Fisher Scientific). Luego se realizó una recombinación LR en el vector binario pFK-248 [215], según recomienda el proveedor de la enzima.

Para expresar *TCP15-GFP* bajo el promotor de *TCP15*, una región de aproximadamente 1500 pb situada corriente arriba del sitio de inicio de la traducción, utilizada previamente para analizar la expresión de *TCP15* [178], fue amplificada utilizando oligonucleótidos específicos (ANEXO I) y clonada en los sitios *Sall* y *KpnI* del vector pENTR-3C que contenía la región codificante de *TCP15*. El fragmento que contiene el promotor de *TCP15* y la región codificante se recombinó luego en el vector pFAST-R07 [216].

Para la expresión de *PIF4* bajo el control del promotor *35SCaMV*, la secuencia codificante completa de *PIF4* se amplificó a partir de ADN genómico de plantas *35S::PIF4-HA* [208] utilizando oligonucleótidos específicos (ANEXO I) y se clonó en los sitios *EcoRI* y *XhoI* del vector pENTR-3C, seguido de recombinación en el vector binario pFK210 [215] que utiliza el sistema Gateway de clonado.

Para la sobreexpresión de *HBI1*, el clon TOPOU03-D08 (solicitado al ABRC), que contiene la secuencia codificante completa de *HBI1*, se recombinó en el vector binario pFK210.

Para obtener las construcciones para la realización de los ensayos de BiFC, en una primera etapa la secuencia codificante de *PIF4* sin el codón de terminación se clonó en los sitios *EcoRI* y *XhoI* del vector pENTR-3C. Para las reacciones de amplificación del fragmento a clonar se utilizaron los oligonucleótidos descritos en el ANEXO I. A continuación, las construcciones de *PIF4* y *TCP15* en pENTR-3C se recombinaron en los vectores pAS-054 y pAS-059 [215] para generar las fusiones C-terminales a las regiones N- y C-terminal de la mCitrina.

Todas las construcciones descritas hasta aquí fueron introducidas en *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 de acuerdo a la metodología descrita en la sección 6.17. Las líneas transgénicas de *Arabidopsis* fueron generadas por el método de transformación por inmersión floral mediada por *Agrobacterium* (descrito en la sección 6.21) [217].

Para los ensayos de doble híbrido en levadura, la secuencia codificante de *PIF4* se amplificó a partir de ADN genómico de plantas *35S::PIF4-HA* [8] con cebadores específicos (ANEXO I) y se insertó en los sitios *EcoRI* y *Sall* del vector pGBKT7 (Clontech) para generar la construcción *pGBKT7-PIF4* (PIF4-BD). La construcción *pGADT7-TCP15* (TCP15-AD) se encontraba disponible en el laboratorio [171].

6.15. Determinación de la secuencia de moléculas de ADN

Para determinar la secuencia de ADN de los distintos fragmentos clonados se utilizó el servicio provisto por *Macrogen Sequencing System* en Seúl, Corea. Para usar este servicio se enviaron 10 µl de plásmido (100 ng/µl) y 5 µl de un oligonucleótido específico (5 µM). Las muestras fueron procesadas en un secuenciador automático ABI3730XL. Los datos de las secuencias y sus respectivos cromatogramas fueron recibidos en forma electrónica.

6.16. Transformación de *Escherichia coli* con ADN plasmídico por electroporación

La preparación de células de *E. coli* competentes para transformación por electroporación se realizó según las recomendaciones del fabricante del equipo de electroporación (Micro Pulser™, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). Luego de la electroporación, las células de *E. coli* se recuperaron en 1 ml de medio SOB, se incubaron durante 1 h a 37°C y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en 100 µl de medio LB y se sembró en placas de Petri con LB-agar suplementado con el antibiótico adecuado. Las placas se incubaron

toda la noche a 37°C. Luego de la aparición de colonias, las mismas se utilizaron para realizar PCR de colonia, como se describió anteriormente. Cuando la PCR fue positiva (presencia de un amplicón del tamaño adecuado) se procedió al repique de la colonia correspondiente para realizar posteriormente mini-preparación de ADN plasmídico.

6.17. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con ADN plasmídico por electroporación

La preparación de células competentes de *A. tumefaciens* se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante del equipo de electroporación para *E. coli*, modificando la solución amortiguadora en la que se conservan las bacterias. Luego del disparo eléctrico las bacterias se recuperaron en 1 ml de LB, se incubaron durante 2 h a 28°C y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 100 µl de LB y se sembró en placas de Petri con LB-agar suplementado con estreptomicina (300 µg/ml), rifampicina (50 µg/ml) y el antibiótico correspondiente al plásmido con el que se procedió a la transformación. Las placas se incubaron durante 2 días (o hasta la aparición de colonias) a 28°C. Luego de la aparición de colonias, las mismas se utilizaron para realizar PCR de colonia, como se describió anteriormente.

6.18. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de acetato de litio

Las transformaciones de levaduras se realizaron según el método descrito por Gietz y col. [218] con algunas modificaciones tomadas de Ausubel y col. [219].

Con el fin de obtener células competentes las levaduras se cultivaron en 20 ml de medio líquido de cultivo YPAD (punto 6.5) durante toda la noche a 30°C con agitación. Posteriormente, se diluyó el cultivo en 300 ml de medio fresco y se dejó crecer en las mismas condiciones hasta $DO_{600} = 0,25-0,5$ (aproximadamente 3 h). Las células se cosecharon por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min a 20°C y el precipitado celular se lavó con 50 ml de agua estéril. Luego de centrifugar las células nuevamente, se las resuspendió en 1 ml de una solución de TE/LiAc [TE 1X, LiAc 100 mM (pH 7,5)], preparada a partir de soluciones madres 10X. A continuación, se realizó una centrifugación a 12000 rpm, 30 segundos, y el precipitado se resuspendió en 250 µl de solución TE/LiAc.

Para la transformación se emplearon 50 µl de células competentes que se incubaron con un volumen no mayor a 10 µl del ADN correspondiente (5 µl de cada construcción para los ensayos de Doble Híbrido en levaduras Y2H) y 300 µl de solución PEG 40%/TE 1X/LiAc 100 mM, durante 30 min a 30°C con agitación. Posteriormente las células se sometieron a un shock térmico de 42°C durante 15 min e inmediatamente se las centrifugó a 12000 rpm durante 30 segundos. El sedimento celular se lavó con 200 µl de solución TE 1X estéril y se resuspendió en

100 µl de TE para ser sembrado en placas de Petri que contenían el medio de cultivo mínimo suplementado con los aminoácidos y bases correspondientes.

6.19. Preparación de ADN plasmídico

Las preparaciones de plásmidos a partir de células de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* transformadas se realizaron según el protocolo de Birboim y Doly [220]. Se centrifugaron 1,5 ml de un cultivo saturado de células cultivadas en medio LB con el antibiótico adecuado, a 5000 x g durante 5 min. El sedimento celular fue resuspendido en 100 µl de solución de miniprep I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 8,0). Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente se agregaron 200 µl de solución de miniprep II (NaOH 0,2 M, SDS 0.1% (p/v)), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente, se agregaron 150 µL de acetato de potasio 5 M (pH 5,2) y se incubó nuevamente en hielo durante 15 min, se centrifugó a 12000 x g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se trató con 400 µL de una mezcla de fenol saturado en Tris-HCl (pH 8,0) y cloroformo (1:1) a fin de remover las proteínas de la muestra. Luego se centrifugó durante 5 min a 8000 x g a temperatura ambiente y el ADN de la fase acuosa se precipitó durante 2 h a -20°C con 2 vol. de etanol absoluto frío en medio acetato de sodio 0,3 M (pH 5,2). El ADN plasmídico se recuperó mediante centrifugación a 12000 x g durante 10 min a 4°C y se lavó con etanol 70% (v/v) para eliminar sales. Se centrifugó, se secó el precipitado y se resuspendió en 30 µl de agua destilada estéril. Cuando se necesitó preparar ADN plasmídico de alta calidad, se utilizó el kit comercial “Mini-preps DNA Purification” (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.20. Preparación de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*

La extracción de ADN genómico se realizó sobre una hoja de roseta, la cual fue disgregada durante 10 segundos con un pilón plástico a temperatura ambiente. Luego, se adicionaron 700 µl de solución de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 8,0; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5%), se mezcló en vórtex durante 15 segundos y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se precipitó con 600 µl de isopropanol y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, el precipitado con el ADN genómico se secó y se resuspendió en 50 µl de agua MQ estéril. Las preparaciones de ADN genómico de *A. thaliana* se guardaron hasta su uso a -20°C.

6.21. Transformación estable de plantas de *Arabidopsis thaliana*

El método utilizado para transformar de manera estable plantas de *A. thaliana* fue el de inmersión floral (*floral dip*) descrito por Clough y Bent [217]. Se prepararon, aproximadamente, 4 macetas con tierra para cada una de las construcciones a introducir en las plantas. Se sembraron alrededor de 10 semillas por maceta, lo que permitió luego seleccionar las que mostraban un aspecto más saludable y reducir el número de plantas por maceta a 4. Las plantas se cultivaron en una cámara de temperatura, humedad y fotoperíodo controlados, según las condiciones de cultivo antes descritas, hasta la floración (aproximadamente 4 semanas). A partir de este momento, se empezaron a cortar las inflorescencias para aumentar el número de flores por planta a ser sometida al evento de transformación.

Para preparar la suspensión de transformación se cultivaron células de *A. tumefaciens* previamente transformadas según se describe en el apartado 6.17. Se realizó un pre-inóculo de 30 ml de medio LB suplementado con rifampicina 50 µg/ml y estreptomina 300 µg/ml para seleccionar la cepa de *A. tumefaciens* y un antibiótico adecuado para seleccionar el plásmido utilizado en la transformación. Este pre-inóculo se cultivó hasta saturación durante 24 h a 28°C y una agitación de 160 rpm. Con este cultivo, se inoculó un Erlenmeyer con 300 ml de medio LB suplementado de la misma manera que en el paso anterior, dejándose crecer los cultivos hasta llegar a la fase estacionaria (12-16 h, 28°C, con agitación). Las células fueron cosechadas por centrifugación a 5000 rpm durante 20 min. Los sedimentos se resuspendieron cuidadosamente en 500 ml de solución de infiltración (sacarosa 5%), a la que se le adicionaron 250 µl del detergente Silwet L-77 (OSI Specialties, Inc.) al momento de hacer la transformación. Esta suspensión de *A. tumefaciens* se colocó en un vaso de precipitado sobre un agitador magnético de manera de lograr una agitación suave. Las plantas fueron sumergidas durante 1 minuto tratando de evitar que el líquido entre en contacto con la tierra. Luego, las macetas se ubicaron en forma horizontal en una bandeja, se taparon con nylon para conservar un ambiente húmedo y se llevaron a cámara de cultivo. Transcurridas 24-48 h, se colocaron las macetas en posición vertical y se les agregó abundante agua, permitiendo que las plantas se desarrollaran hasta la formación y maduración de las semillas (4-5 semanas aproximadamente para nuestras condiciones de cultivo). Finalmente, se recolectaron las semillas de cada maceta por separado, se limpiaron de los restos de vainas y tierra y se guardaron a 4°C hasta su posterior análisis.

A partir de las semillas obtenidas se seleccionaron entre diez y quince líneas independientes para buscar plantas T3 y T4 homocigotas. Las plántulas transgénicas fueron seleccionadas en placas o en tierra dependiendo de la resistencia aportada por el ADN-T.

6.2.2. Análisis de plantas transformadas

Con el objetivo de confirmar que las plantas transformantes contenían las inserciones de interés, se procedió al análisis de la presencia del transgén mediante PCR. Para ello se realizó una preparación de ADN genómico a partir de una o dos hojas de cada planta, siguiendo el protocolo que se describe en el punto 6.20. El ADN obtenido fue utilizado como molde en una reacción de PCR (sección 6.9). Para verificar la presencia de los transgenes en las plantas, se utilizaron oligonucleótidos específicos según las inserciones analizadas. Las plantas que dieron resultado positivo en la reacción de PCR se dejaron crecer hasta maduración de las vainas, se colectaron las semillas y se repitió el proceso de sembrado en un medio selectivo, trabajando de esta manera con filiales sucesivas según los genotipos estudiados.

6.2.3. Medición de la longitud del hipocotilo y del pecíolo

Para medir la longitud del hipocotilo, las plántulas se dispusieron horizontalmente en una placa y se fotografiaron utilizando una cámara digital (Panasonic DMC-FZ35). Las mediciones fueron realizadas con el *software* Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij>; National Institutes of Health). Para medir la longitud del pecíolo, se diseccionó la cuarta hoja de la roseta de al menos 8 plantas y se determinó la longitud de los pecíolos con un calibre.

El *software* GraphPad Prism 6 se utilizó para analizar los datos y generar los gráficos. Se compararon todas las combinaciones de tratamientos y genotipos utilizando ANOVA de dos vías seguido de la prueba *post-hoc* de Tukey para analizar si las diferencias eran estadísticamente significativas.

6.2.4. Preparación y análisis de ARN

La preparación de ARN se realizó a partir de plantas aisladas utilizando el reactivo *TRIzol* seguido de precipitación con LiCl. La retrotranscripción (RT) se realizó con un cebador oligo (dT)₁₈ y la enzima MMLV transcriptasa reversa (Promega) utilizando 1,5-2,0 µg de ARN total. La PCR en tiempo real (qPCR) se realizó en un aparato StepOne (Applied Biosystems) usando los cebadores específicos enumerados en el ANEXO I y SYBR Green. La expresión de los genes se calculó en relación con *ACTINA* (*ACT2* y *ACT8*; [221]), utilizando el método $\Delta\Delta Ct$. Los resultados presentados son de tres réplicas biológicas, cada una de las cuales consta de un conjunto de 15 plántulas. El *software* GraphPad Prism 6 se utilizó para analizar los datos y producir los gráficos. Se compararon todas las combinaciones de tratamientos y genotipos utilizando ANOVA de dos vías seguido de la prueba *post-hoc* de Tukey para analizar si las diferencias eran estadísticamente significativas.

6.2.5. Extracción de proteínas e inmunotransferencia

Para la extracción total de proteínas, las plántulas de Arabidopsis se cosecharon y se pulverizaron en un mortero enfriado previamente con nitrógeno líquido. Luego, se recogieron 100 mg de polvo en un tubo Eppendorf con 50 μ l de Tris-HCl 125 mM (pH 8,8), 1% (p/v) SDS, glicerol 10%, Na₂S₂O₅ 50 mM y PMSF 0,2 mM y se centrifugaron a velocidad máxima en una microcentrífuga durante 10 min. El sobrenadante se guardó en un tubo nuevo con 1/10 de Tris-HCl 125 mM (pH 6.9), 12% (p/v) SDS, 15% (v/v) glicerol, 22% (v/v) β -mercaptoetanol y azul de bromofenol 0,001% (p/v). Se separaron las proteínas (40 μ g) mediante una corrida electroforética en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de PVDF (Roche). Las transferencias se hibridaron con anticuerpos policlonales de conejo contra RGA (Agrisera, dilución 1:1000) y fueron revelados con anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo (Agrisera, dilución 1:30000) conjugados con peroxidasa de rábano picante usando el reactivo de detección de Agrisera ECL SuperBright.

Para la detección de PIF4, se prepararon extractos de proteínas nucleares de acuerdo a lo descrito por Ariel y col. [222]. Las transferencias se hibridaron con anticuerpos contra PIF4 (Agrisera, AS16 3157, dilución 1:1000) o histona H3 (Diagenode, C15200011, dilución 1:6000) y fueron revelados utilizando anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón (Thermo, dilución 1:10000), respectivamente, conjugados con peroxidasa de rábano picante, usando el reactivo de detección de Agrisera ECL SuperBright.

6.2.6. Microscopía electrónica de barrido

Las plántulas se fijaron en FAA (formaldehído: alcohol etílico: ácido acético: agua, 10:50:5:35) y se transfirieron a etanol 70% durante 24 h. Después de la deshidratación con una serie de soluciones de etanol (80%, 96% y 100%), las muestras se transfirieron a acetona para desecación utilizando CO₂ en un secador de punto crítico (Emitech K850). Finalmente, las muestras fueron recubiertas con oro-paladio y fotografiadas con un microscopio electrónico de barrido Philips XL30 TMP New Look (Eindhoven, Países Bajos) del Museo Bernardino Rivadavia (Buenos Aires, Argentina).

6.2.7. Ensayo de actividad β -glucuronidasa

La actividad de la enzima β -glucuronidasa en extractos de proteínas se midió utilizando el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil β -D-glucurónido (MUG) como se describe en Jefferson y col. [223]. La concentración de proteínas de los extractos se determinó según lo

descrito por Sedmak y Grossberg [224]. La intensidad de la fluorescencia se midió en un fluorómetro Fluoroskan Ascent™ FL (Thermo Fisher Scientific). Los resultados presentados son de tres réplicas biológicas, cada una de las cuales consta de un grupo de 10 plántulas.

6.28. Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa

Para analizar la actividad β -glucuronidasa en forma histoquímica, las plántulas fueron transferidas a una solución de citrato de sodio 50 mM (pH 7,0), Tritón X-100 0,1% y X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucurónido) 2 mM. A continuación, se sometieron a vacío entre 5-15 min y se incubaron a 37°C en oscuridad durante 2-16 h [223]. Para el caso de los tratamientos con auxinas del reportero *DR5::GUS*, se incubaron plántulas de 4 días cultivadas a 29°C durante 24 h con IAA 5 μ M, y luego se dejaron 6 h a 37°C para dar lugar a la reacción de GUS. Para el caso de los tratamientos a altas temperaturas, se incubaron las plántulas de 4 días cultivadas a 23°C durante 18 h a 23°C o 29°C y luego se dejaron a 37°C para dar lugar a la reacción de GUS durante toda la noche. Luego de la incubación, se agregó etanol 70% para decolorar los tejidos y las muestras se guardaron en esta solución a 4°C hasta ser fotografiadas. Las imágenes digitalizadas se tomaron con una cámara LUMIX DMC-FZ35 (Panasonic) sobre microscopio óptico o lupa estereoscópica y se procesaron con el software Adobe Photoshop CS5.

6.29. Ensayos de interacción proteína-proteína en levaduras

Los experimentos se llevaron a cabo empleando la metodología descrita por Ausubel y col. [219] con algunas modificaciones [225]. Para cada ensayo se inocularon 10 ml de medio selectivo SD/-Leu-Trp con 8 colonias de levadura y se incubaron a 30°C, con agitación de 200 rpm, hasta una DO_{600} de 0,5 a 1. A continuación, 1 ml de cultivo se utilizó para determinar la DO_{600} y el mismo volumen se centrifugó a 12000 rpm durante 15 segundos. Luego de eliminar el sobrenadante, el precipitado celular fue congelado en N_2 líquido y resuspendido en 665 μ l de solución Z ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 16,1 g/l; $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 5,5 g/l; KCl 0,75 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25 g/l; β -mercaptoetanol 50 mM). Después, se adicionaron 55 μ l de cloroformo y 55 μ l de SDS al 0,1 % y la suspensión se sometió a agitación en vórtex durante 60 segundos. Posteriormente se adicionaron 200 μ l de *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) 8 mg/ml (disuelto en solución Z) y se incubó a 30°C hasta aparición de color amarillo. La reacción se detuvo por agregado de 400 μ l de Na_2CO_3 1 M. La suspensión se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se midió la DO_{420} .

Las unidades de β -galactosidasa se definen como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ mol de ONPG a *o*-nitrofenol y D-galactosa por minuto y se calcularon utilizando la siguiente fórmula [226]:

$$\text{Unidades } \beta - \text{galactosidasa} = \frac{1000 \times DO_{420}}{(t \times V \times DO_{600})}$$

t: tiempo de incubación (min); V: volumen (ml)

Los ensayos se realizaron en condiciones en que la DO_{420} obtenida fue de 0,02-1 para permanecer dentro del rango de linealidad. Finalmente, en todos los casos, se calculó el valor promedio de 3 ensayos realizados con colonias independientes.

Para evaluar la expresión de los genes reporteros *HIS3* y *URA3*, las levaduras se cultivaron en un medio mínimo sin Leu, Trp e His y en presencia de 3-amino-1,2,4-triazol 10 mM (3AT), o en un medio sin Leu, Trp y Ura, respectivamente. En estos ensayos se sembraron 7 μ l de suspensiones de células de levadura en las placas control y selectivas a diluciones seriadas al décimo (a partir de $DO_{600} = 1$) y se incubaron a 30°C durante 3 días.

6.30. Transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana*

La transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana* se realizó adaptando el protocolo de Waadt y col. [227]. Para ello, se cultivaron durante toda la noche las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con las construcciones deseadas (incluyendo un clon para expresar la proteína viral p19) en 10 ml de medio LB, a 28°C. Con estos cultivos, se inocularon 30 ml de medio LB y se incubó en las mismas condiciones durante toda la noche. Luego se centrifugaron los cultivos a 6000 rpm durante 15 min y las células precipitadas fueron resuspendidas en solución amortiguadora de infiltración ($MgCl_2$ 10 mM, MES 10 mM pH 5,7, acetosiringona 150 μ M) e incubadas durante 3 h a temperatura ambiente. Seguido a esto, se llevaron todos los cultivos a una $DO_{600} = 0.5$ y se realizaron las diferentes combinaciones de los mismos en una relación 2:2:1 (Construcción A:Construcción B:p19). Finalmente, la cara abaxial de hojas de plantas de 15 a 20 días de *Nicotiana benthamiana* se infiltró con jeringas sin agujas. Luego de la infiltración, las plantas fueron mantenidas en cámara de cultivo durante 48-72 h y en ellas se analizó la fluorescencia según se describe en el apartado siguiente.

6.31. Ensayo de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC)

Para este fin, se generaron las construcciones descritas en la sección 6.14 que permiten expresar a TCP15 y PIF4 fusionadas a los fragmentos no fluorescentes N- y C-terminal de la mCitrina. Con estas construcciones se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* (sección 6.17) y con los clones obtenidos se transformaron de manera transitoria hojas de *Nicotiana benthamiana* de acuerdo a la metodología descrita en el punto anterior. Las hojas de las plantas transformadas se analizaron mediante microscopía de escaneo láser confocal (CLSM). Las imágenes se adquirieron con el software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) usando configuraciones idénticas para todas las muestras. Las muestras fueron excitadas con el láser de 514 nm (intensidad 3%) y los detectores fueron colocados en 524-560 nm con una ganancia de 653 (para Citrina) y 640-670 nm con una ganancia de 627 (para clorofila). El procesamiento de las imágenes se realizó con el software Fiji [228]. Se registraron al menos 15 imágenes de distintas hojas de *N. benthamiana* infiltradas con las distintas construcciones.

6.32. Inmunoprecipitación de la cromatina

Para los experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), plantas de Arabidopsis del ecotipo Col-0, *tcp14-4 tcp15-3 AmiR* y *35S::TCP15-GFP* se cultivaron en medio MS 0,5X a 29°C durante 15 días. El ensayo de ChIP se realizó como se describe en Ariel y col. [222] utilizando anticuerpos anti-PIF4 (Agrisera, AS16 3157), anti-GFP (Abcam ab6556) o anti-IgG (Abcam ab6702). Después del entrecruzamiento y la extracción y lisis de los núcleos, la cromatina se sonicó en un baño de agua Bioruptor Pico (Diagenode; 10 ciclos de: 30 s prendido / 30 s apagado, pulsos de baja intensidad, en microtubos Bioruptor). Para la inmunoprecipitación, las muestras se incubaron durante 12 h a 4°C con Proteína A Dynabeads (Invitrogen) recubiertas con los anticuerpos correspondientes. El ADN inmunoprecipitado se recuperó mediante extracción con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitación con etanol. La cuantificación de las regiones genómicas inmunoprecipitadas se realizó mediante qPCR usando los cebadores enumerados en el ANEXO I y el kit comercial iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Una fracción de cromatina sonicada sin inmunoprecipitar se procesó en paralelo y se consideró como la muestra de entrada (input).

RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1. Estudio del papel de los factores de transcripción TCP de clase I durante la elongación del hipocotilo de *Arabidopsis*

Durante el proceso de germinación de las semillas primero emerge la radícula y luego el vástago. En *Arabidopsis* este último consiste de un tallo embrionario, denominado hipocotilo, y de dos cotiledones no expandidos, sin pigmentos fotosintéticos. Durante los primeros estadios de desarrollo, la plántula generalmente se encuentra debajo del suelo, en oscuridad, y para su crecimiento se nutre de las reservas contenidas en la semilla. Las células del hipocotilo se expanden debido al aumento de la turgencia en su vacuola y al ablandamiento de las paredes celulares, permitiéndole a la plántula atravesar el suelo. Una vez que alcanza la superficie, la plántula percibe por primera vez la luz. En consecuencia, la elongación celular en el hipocotilo se detiene, se produce la expansión de los cotiledones y el desarrollo del aparato fotosintético, pasando de un crecimiento escotomorfogénico a uno fotomorfogénico. Este proceso ya lo hemos mencionado en la introducción y se denomina des-etiolación [79]. La elongación del hipocotilo, a su vez, se encuentra modulada por la temperatura. En un rango de temperaturas no estresantes, entre 10°C y 30°C, mayores temperaturas promueven la elongación del hipocotilo [88]. Este cambio morfológico es ventajoso para la plántula ya que aleja al meristema y a los tejidos fotosintéticos del suelo caliente y los lleva hacia una zona donde hay más corriente de aire, promoviendo la transpiración y la consecuente refrigeración de los tejidos [229]. La luz, como se mencionó anteriormente, tiene el efecto contrario. Esto pone de manifiesto una fuerte interacción entre los mecanismos moleculares de respuesta a la luz y a la temperatura en el control de la elongación del hipocotilo.

En base a esto nos propusimos evaluar si las proteínas TCP de clase I están involucradas en modular la elongación del hipocotilo frente a cambios en condiciones ambientales como la luz y la temperatura. Para llevar esto a cabo elegimos como representantes de la clase I de factores de transcripción TCP de *Arabidopsis* a TCP14 y TCP15, dado que éstos venían siendo estudiados en nuestro laboratorio y contábamos con evidencia preliminar de que podrían estar involucrados en los procesos mencionados al momento del inicio de este trabajo de Tesis.

7.1.1. Elongación del hipocotilo frente a cambios en las condiciones de luz

Como primera aproximación para estudiar la función de las proteínas TCP de clase I durante la elongación del hipocotilo frente a cambios en las condiciones de luz, y teniendo en cuenta que la elongación del hipocotilo aumenta en oscuridad [1], decidimos analizar el

crecimiento de plantas mutantes en los genes TCP de clase I *TCP14* y *TCP15*, en comparación con plantas salvajes (ecotipo Col-0, WT) en luz normal ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y en oscuridad. Se empleó la mutante doble *tcp14-4 tcp15-3*, que presenta muy bajos niveles de transcritos truncos de *TCP14* y carece de transcritos detectables de *TCP15* [204]. Luego de 4 días de crecimiento en las condiciones mencionadas, se midió la longitud del hipocotilo de las plántulas y se observó que las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* cultivadas en luz normal (control) no presentaron diferencias con respecto a las plantas salvajes, pero sí se observaron diferencias significativas cuando crecieron en oscuridad (Fig. 20). En esta condición las plántulas mutantes en *TCP14* y *TCP15* fueron incapaces de elongar el hipocotilo como las plantas salvajes. Estos resultados sugieren que *TCP14* y/o *TCP15* serían necesarios para el proceso de elongación del hipocotilo en oscuridad.

A fin de determinar si uno o ambos genes están involucrados en este proceso, decidimos evaluar el crecimiento de plántulas mutantes simples en *TCP14* (*tcp14-4*) y *TCP15* (*tcp15-3*) en oscuridad. De modo similar a lo observado con la mutante doble *tcp14-4 tcp15-3*, encontramos que las mutantes simples presentaron hipocotilos más cortos que las plantas salvajes al ser cultivadas en oscuridad (Fig. 20). Por otra parte, este defecto en la capacidad de elongación del hipocotilo fue mayor en las mutantes dobles que en las simples (Fig. 20). En conjunto, estos resultados sugieren que tanto *TCP14* como *TCP15* son necesarios para que ocurra la correcta elongación del hipocotilo durante el crecimiento de *Arabidopsis* en oscuridad.

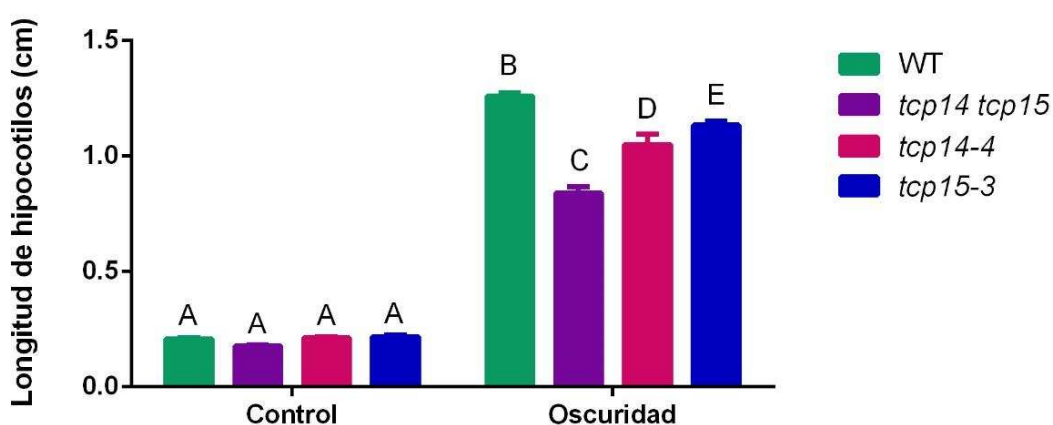


Figura 20. TCP14 y TCP15 están involucradas en la elongación del hipocotilo en oscuridad. Longitud del hipocotilo de plantas salvajes ecotipo Col-0 (WT), *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*), *tcp14-4* y *tcp15-3* ($n = 30$) cultivadas durante 4 días bajo diferentes condiciones: $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (control) u oscuridad. En el caso de crecimiento en luz se utilizó un fotoperíodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA). El experimento se repitió 3 veces con resultados similares.

7.1.2. Elongación del hipocotilo frente a cambios en la temperatura ambiente

Como se mencionó anteriormente, un aumento en la temperatura ambiente también estimula la elongación del hipocotilo, siendo este uno de los fenotipos más característicos del crecimiento de las plantas en estas condiciones [88][108]. Para analizar si *TCP14* y *TCP15* participan en la elongación del hipocotilo frente a un aumento en la temperatura, plantas mutantes en estos genes fueron cultivadas durante 4 días a 23°C (condición control) y a 29°C (alta temperatura) en fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad (día corto). Encontramos que las mutantes simples *tcp14-4* y *tcp15-3* presentan hipocotilos menos elongados que las plantas salvajes cuando crecen a 29°C (Fig. 21A) y que este fenotipo se encuentra más acentuado en la mutante doble *tcp14-4 tcp15-3* (Fig. 21A). Esto sugiere que *TCP14* y *TCP15* son necesarias durante la elongación del hipocotilo frente a un aumento en la temperatura ambiente en condiciones de día corto. A continuación, decidimos evaluar la elongación del hipocotilo de las mutantes en los genes *TCP* cuando son cultivadas en un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (día largo). En este caso, se emplearon las mutantes *tcp14-6*, *tcp15-2* y *tcp15-4* y se observó que en estas condiciones las mutantes en *TCP14* y *TCP15* también muestran hipocotilos menos elongados que las plantas salvajes al ser cultivadas a 29°C (Fig. 21B). En conjunto, estos resultados sugieren que *TCP14* y *TCP15* son necesarias para la elongación del hipocotilo frente a un aumento en la temperatura ambiente tanto en condiciones de día corto como de día largo. A partir de esta observación, decidimos realizar el resto de los experimentos en condiciones de día largo.

Teniendo en cuenta que los factores de transcripción *TCP* forman parte de una familia con numerosos miembros y que se ha encontrado para algunos de ellos que regulan varios procesos de manera redundante, nos preguntamos si, además de *TCP14* y *TCP15*, otros genes *TCP* de clase I estarían involucrados en modular la elongación del hipocotilo frente a alta temperatura. Para responder a este interrogante decidimos analizar plantas *tcp14-4 tcp15-3* que expresan un microARN artificial dirigido contra los genes *TCP* de clase I de *Arabidopsis* *TCP8* y *TCP22* (*tcp14-4 tcp15-3 amiR*, [195]), por lo que además de una reducción de los niveles de transcritos funcionales de *TCP15* y *TCP14*, estas plantas presentan una marcada disminución de los niveles de transcritos de *TCP8* y *TCP22* [195]. Cuando estas plantas fueron cultivadas a 29°C observamos una elongación del hipocotilo menor que la de las plantas *tcp14-4 tcp15-3* (Fig. 21C), lo que sugiere que *TCP8* y/o *TCP22* también participarían del crecimiento del hipocotilo inducido por temperatura.

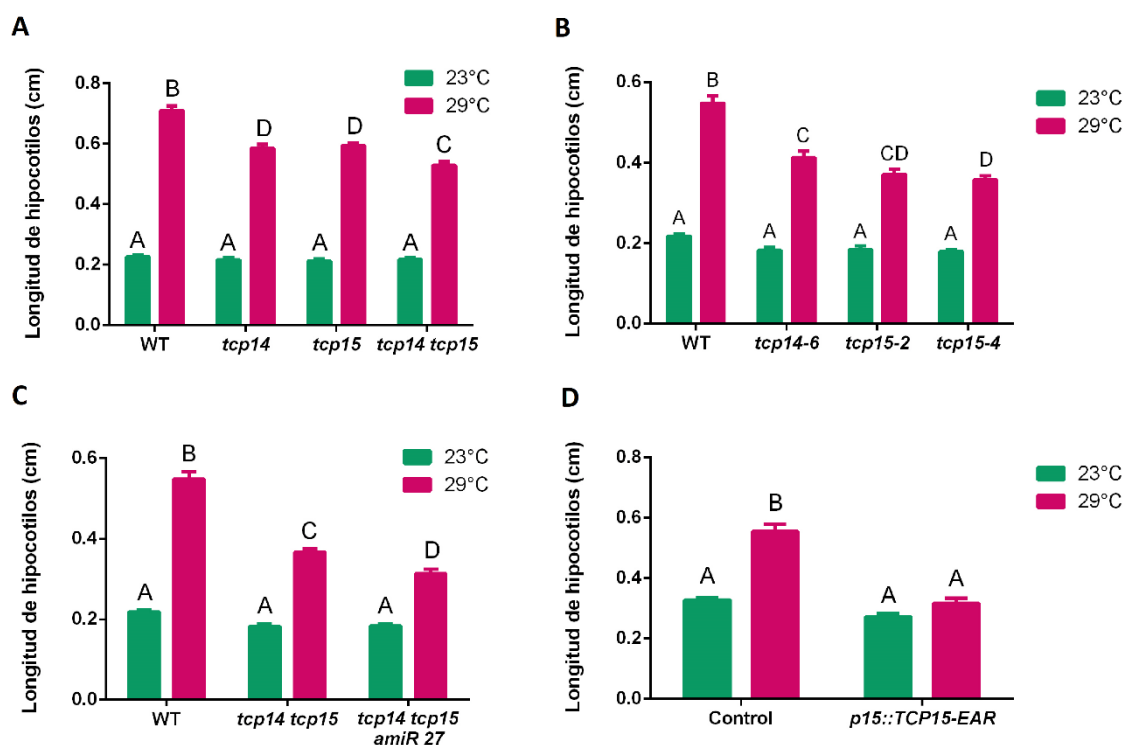


Figura 21. TCP14 y TCP15 participan en la elongación del hipocotilo a altas temperaturas. (A) Longitud del hipocotilo de plantas salvajes ecotipo Col-0 (WT), *tcp14-4* (*tcp14*), *tcp15-3* (*tcp15*) y *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) ($n = 30$) cultivadas durante 4 días a 23°C o 29°C. (B) Longitud del hipocotilo de plantas salvajes ecotipo Col-0 (WT), *tcp14-6*, *tcp15-2* y *tcp15-4* cultivadas durante 4 días a 23°C o 29°C ($n = 15$). (C) Longitud del hipocotilo de plantas salvajes ecotipo Col-0 (WT), *tcp14-4 tcp15-3 amiR* (*tcp14 tcp15 amiR 27*) y *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) cultivadas durante 4 días a 23°C o 29°C ($n = 15$). (D) Longitud del hipocotilo de plantas transformadas con el vector *pBI121* (control) y con la construcción *p15::TCP15-EAR* cultivadas durante 16 días a 23°C o 29°C ($n = 15$). Las distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA). Las plántulas fueron cultivadas bajo fotoperíodo de 8 h de luz/16 h de oscuridad en (A) y de 16 h de luz/8h de oscuridad en (B), (C) y (D). Todos los experimentos se repitieron 3 veces con resultados similares.

Por otra parte, analizamos plantas que expresan una forma dominante negativa de TCP15 capaz de afectar la expresión de sus genes blanco aún en presencia de otros factores de transcripción que actúen en forma redundante con TCP15. Estas plantas, denominadas *p15::TCP15-EAR*, expresan a TCP15 fusionada al dominio represor dominante EAR [210] bajo el control del promotor de *TCP15* y han sido utilizadas previamente de manera exitosa en nuestro laboratorio [178][180][230][231]. Fusiones del dominio EAR a distintos factores de transcripción, incluso de varios factores TCP, han sido ampliamente usadas para estudiar la función de los mismos [177][203][204][232][233][234].

Debido a que las plantas que expresan *TCP15-EAR* desarrollan flores que no logran ser fecundadas, no es posible obtener descendencia y, en consecuencia, los estudios con plantas *p15::TCP15-EAR* deben realizarse con líneas T1. De modo que las semillas de plantas

transformadas con la construcción *p15::TCP15-EAR* fueron cultivadas durante 16 días en placas en presencia del agente de selección kanamicina a 23°C o 29°C. Luego de este período de crecimiento, las líneas transformantes pudieron ser identificadas por su capacidad de crecer en presencia del antibiótico y se evaluó la longitud de los hipocotilos. Como control se utilizaron plantas transformadas con el vector *pBI121*, que contiene el gen reportero *GUS* bajo el control del promotor constitutivo *35SCaMV*, confiere resistencia a kanamicina y es el mismo tipo de vector utilizado para obtener la construcción *p15::TCP15-EAR*. Observamos que las plántulas *p15::TCP15-EAR* son incapaces de elongar el hipocotilo frente a alta temperatura (Fig. 21D). Este fenotipo es más severo que el observado en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* y en las líneas *tcp14-4 tcp15-3 amiR* (Fig. 21A, B y C), lo que sugiere que además de TCP14, TCP15, TCP8 y TCP22, otros factores de transcripción TCP también estarían involucrados en modular la elongación del hipocotilo en respuesta a un aumento en la temperatura ambiente.

7.1.3. Las plantas *tcp14-4 tcp15-3* presentan defectos en la elongación de las células del hipocotilo durante el crecimiento en alta temperatura

Se ha descrito que la mayor longitud que alcanzan los hipocotilos de *Arabidopsis* frente al crecimiento en alta temperatura se debe a un aumento en la longitud de sus células [229]. Por este motivo, decidimos analizar la longitud de las células del hipocotilo de las plantas *tcp14-4 tcp15-3* en relación con las plantas salvajes cultivadas a 23°C o a 29°C. Así, mediante microscopia electrónica de barrido observamos que a 29°C las células de la epidermis del hipocotilo de las plantas salvajes son significativamente más largas que a 23°C (Fig. 22A). Por su parte, las células de la epidermis del hipocotilo de las plantas *tcp14-4 tcp15-3* presentaron una longitud similar a la de las células de las plantas salvajes al ser cultivadas a 23°C, pero fueron significativamente más cortas que las de las plantas salvajes a 29°C (Fig. 22A). Esto sugiere que la elongación celular que ocurre en el hipocotilo en respuesta a un aumento en la temperatura ambiente está afectada en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3*.

Finalmente, para confirmar que el defecto en la elongación del hipocotilo a altas temperaturas observado en las plantas mutantes en *TCP15* se debe a la falta de transcritos funcionales de este gen, se transformaron plantas *tcp15-3* con una construcción que permite expresar a TCP15 fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del promotor de *TCP15*. Observamos en diferentes líneas obtenidas que estas plantas elongaron el hipocotilo en forma similar a las plantas salvajes a 29°C (Fig. 22B), lo que confirma que los defectos observados en la mutante *tcp15-3* se deben a la ausencia de TCP15.

En conjunto, los resultados presentados hasta aquí sugieren que TCP14 y TCP15 participarían en la estimulación de la elongación del hipocotilo frente a un aumento de la temperatura ambiente.

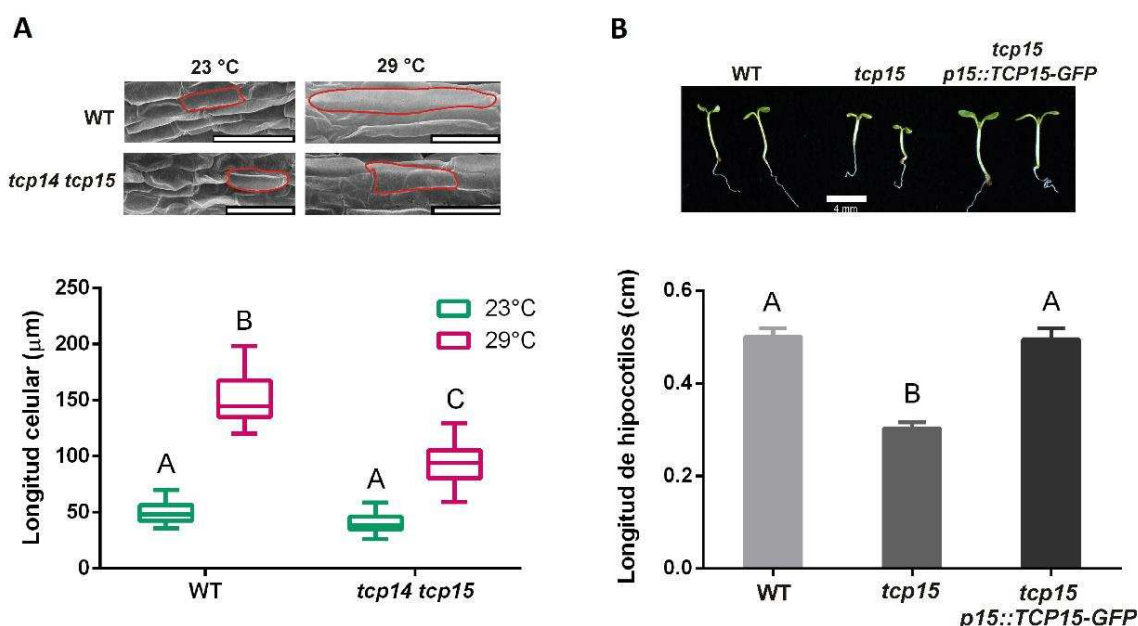


Figura 22. TCP14 y TCP15 son necesarias para una eficiente elongación celular a alta temperatura. (A) Longitud de células de plantas salvajes ecotipo Col-0 (WT) y *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) cultivadas a 23°C o 29°C. La longitud se midió utilizando el programa informático *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>; National Institutes of Health) en imágenes obtenidas utilizando un microscopio electrónico de barrido ($n = 15-30$ células) tomadas de la parte media del hipocotilo. Se muestran imágenes representativas. **(B)** Longitud del hipocotilo de plantas salvajes ecotipo Col-0 (WT), *tcp15-3* (*tcp15*) y *tcp15-3* que expresan *TCP15-GFP* bajo el control del promotor de *TCP15* (*tcp15 p15::TCP15-GFP*) cultivadas a 29°C. Se muestran imágenes representativas. En los gráficos, distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA). Los experimentos se repitieron 3 veces con resultados similares.

7.2. Las proteínas TCP de clase I participan en respuestas de desarrollo dependientes de la temperatura en *Arabidopsis*

En forma notoria observamos que, si bien los niveles de transcritos de *TCP15* en las plantas *tcp15-3 p15::TCP15-GFP* eran similares a los de las plantas salvajes (ANEXO II), las plantas complementadas presentaron cotiledones de mayor tamaño (Fig. 22B). Esto podría deberse a una mayor estabilidad o actividad de la proteína de fusión TCP15-GFP y nos sugiere que TCP15 podría estar involucrada en modular la expansión de los cotiledones. Si bien no observamos diferencias en el tamaño de los cotiledones de las mutantes *tcp15-3* o *tcp14-4 tcp15-3* en relación con las plantas salvajes, cuando analizamos la longitud de la lámina de las hojas observamos que la misma se encuentra significativamente disminuida en las plantas mutantes cultivadas a 29°C (Fig. 23). Notoriamente, el aumento de temperatura no afecta la longitud de la lámina en plantas salvajes, pero sí lo hace en la mutante *tcp15-3*. Esto indica que TCP15

tendría un papel particularmente importante en el crecimiento de la lámina a alta temperatura. En la mutante doble *tcp14-4 tcp15-3*, la longitud de la lámina ya se halla afectada a 23°C, lo que revela que las TCP de clase I también son requeridas para el crecimiento a esta temperatura.

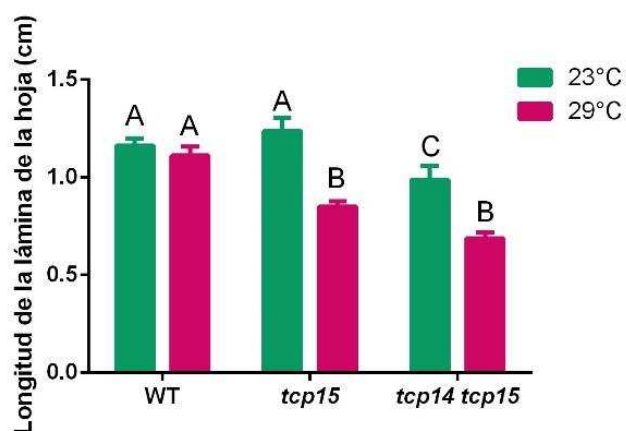


Figura 23. TCP14 y TCP15 son necesarias para una eficiente elongación de las hojas a alta temperatura. Longitud de la lámina de la 4^{ta} hoja de plantas salvajes ecotipo Col-0 (WT), *tcp15-3* (*tcp15*) y *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) cultivadas a 23°C o 29°C durante 16 días ($n = 8$). Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA). El experimento se repitió 3 veces con resultados similares.

Se sabe que durante el desarrollo vegetativo de la planta adulta, mayores temperaturas promueven la elongación de los pecíolos [88][108]. Esto permitiría una mejor aireación de las hojas, aumentando el flujo transpiratorio y la consecuente disminución de la temperatura [90]. En trabajos previos realizados en el laboratorio se observó que las plantas *p15::TCP15-EAR* presentan pecíolos más cortos que las plantas salvajes [178]. Esto nos llevó a la idea de que TCP15 podría tener un rol durante la elongación de los pecíolos de las hojas de roseta frente a un aumento en la temperatura ambiente. Para analizar con más detalle esta hipótesis, medimos la longitud de los pecíolos en plantas mutantes *tcp15-3* cultivadas a 23°C y a 29°C. A 23°C no detectamos diferencias significativas en la longitud de los pecíolos entre plantas salvajes (WT) y mutantes *tcp15-3*, pero a 29°C la elongación de los pecíolos en las plantas mutantes fue significativamente menor (Fig. 24A), denotando un rol importante de TCP15 a altas temperaturas en este proceso. También analizamos la elongación de los pecíolos en plantas dobles mutantes *tcp14-4 tcp15-3*, ya que, como se ha mencionado, ambos genes tienen funciones redundantes en diferentes procesos [195][204]. Las plantas dobles mutantes presentaron pecíolos más cortos que las plantas WT a ambas temperaturas y la elongación de los pecíolos a 29°C fue aún menor que en la mutante simple *tcp15-3*. De acuerdo con esto, la mutante *tcp14-4* presentó una menor elongación de los pecíolos a ambas temperaturas (Fig. 24B). Estos resultados sugieren que ambas proteínas TCP son requeridas para una óptima elongación de los pecíolos y que la función de TCP15 es particularmente importante en respuesta a un aumento de la temperatura.

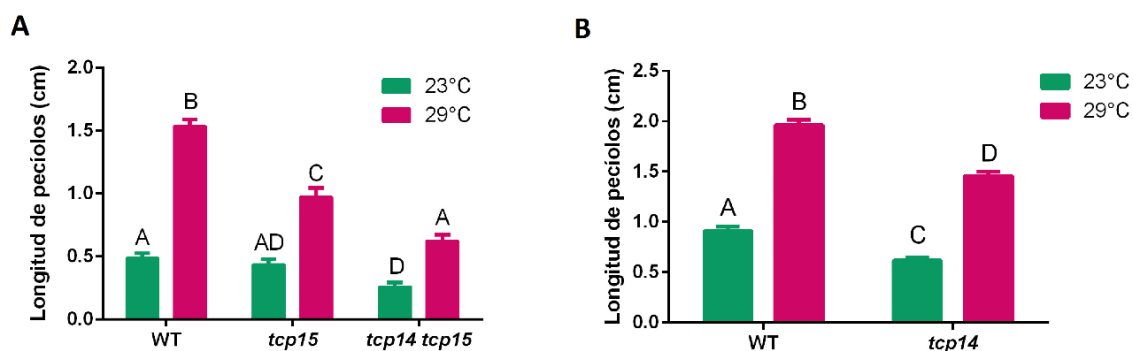


Figura 24. TCP14 y TCP15 participan en la elongación de peciolo a altas temperaturas. (A) Longitud del peciolo de la 4^a hoja de plantas salvajes ecotipo Col-0 (WT), *tcp15-3* (*tcp15*) y *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) cultivadas durante 16 días a 23°C o 29°C ($n = 8$). **(B)** Longitud del peciolo de la 4^a hoja de plantas de 16 días salvajes ecotipo Col-0 (WT) y mutantes *tcp14-4* (*tcp14*) ($n = 15$) cultivadas a 23°C o 29°C. En (A) y (B), distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA). Los experimentos se repitieron 3 veces con resultados similares.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que TCP14 y TCP15 participan en diversos procesos característicos del crecimiento en termomorfogénesis, como la elongación de peciolo e hipocotilos, y que además son requeridas para la correcta elongación de la lámina de la hoja, especialmente a 29°C. Sumado a esto, observamos que estas proteínas estarían involucradas también en la elongación del hipocotilo en oscuridad, lo cual nos lleva a pensar que modularían respuestas relacionadas con la elongación celular en diferentes procesos y frente a diversos cambios en las condiciones ambientales. Para continuar con nuestro estudio sobre el papel de las proteínas TCP de clase I en la respuesta de las plantas a cambios en la temperatura ambiente y analizar las vías moleculares en las cuales participan elegimos como modelo de estudio la elongación del hipocotilo en las plantas dobles mutantes en *TCP14* y *TCP15*.

7.3. Estudio de los mecanismos moleculares mediante los cuales las proteínas TCP modulan la elongación del hipocotilo frente a alta temperatura

Se ha reportado que un aumento en la temperatura activa la transcripción de *PIF4*, un gen que codifica un factor de transcripción del tipo bHLH [127][128]. *PIF4* se une a los promotores de genes que codifican enzimas de la biosíntesis de auxinas, como *YUC8*, dando lugar a un aumento en los niveles de estas hormonas en la planta. Esta acumulación de auxinas gatilla la degradación de los represores Aux/IAA, los cuales liberan de la represión a factores de transcripción de respuesta a auxinas, denominados ARF. Todo esto lleva a un aumento en la expresión de varios miembros de la subfamilia de genes *SAUR* que dirigen la respuesta de elongación del hipocotilo a altas temperaturas [109]. *PIF4*, además, regula de manera directa a

los genes *SAUR*, *Aux/IAA* y a genes involucrados en la elongación celular, como los *PRE* y *HBI1* [88]. Sumado a esto, se ha reportado que un aumento en la temperatura también promueve la transcripción de genes que codifican enzimas de biosíntesis de GA [146] y BR [148]. En las siguientes secciones describiremos los experimentos que llevamos a cabo para dilucidar cómo las proteínas TCP de clase I se integran a esta compleja vía de regulación del desarrollo a altas temperaturas.

7.3.1. TCP14 y TCP15 están involucradas en la inducción de la expresión de genes *SAUR* en respuesta a un incremento en la temperatura ambiente.

Como una primera aproximación para dilucidar los mecanismos moleculares a través de los cuáles actúan las proteínas TCP de clase I durante la elongación a altas temperaturas, analizamos los resultados de un análisis global de la expresión de genes en plantas *p15::TCP15-EAR* realizado en nuestro laboratorio [178][180]. Notamos que la expresión de numerosos genes *SAUR* se encontraba reprimida en estas plantas (ANEXO III), entre ellos los pertenecientes a la subfamilia de *SAUR63* que están involucrados en el crecimiento del hipocotilo [146]. Además, observamos que varios genes *SAUR* presentan motivos TCP en sus promotores (ANEXO IV). En base a esto, decidimos analizar la expresión de *SAUR63* y *SAUR65*, elegidos como miembros representativos de esta subfamilia, en plantas mutantes *tcp14-4 tcp15-3* cultivadas a 23°C y luego expuestas a una temperatura de 29°C. Encontramos que la expresión de *SAUR63* estaba disminuida tanto en plántulas como en los pecíolos de las hojas de roseta de plantas mutantes cultivadas a 23°C, no observándose inducción de la expresión a 29°C, como sí ocurrió en las plantas salvajes (Fig. 25A, B). En el caso de *SAUR65*, no observamos diferencias en los niveles de transcripto en los pecíolos de mutantes *tcp14-4 tcp15-3* y plantas salvajes a 23°C. Sin embargo, la inducción observada en las plantas salvajes a 29°C no se observó en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* (Fig. 25A). Conjuntamente, analizamos la expresión de algunos miembros de la subfamilia de *SAUR19*, como *SAUR19*, *SAUR20* y *SAUR21*, también involucrados en la elongación del hipocotilo de manera dependiente de la temperatura [127]. No encontramos diferencias significativas cuando evaluamos su expresión en pecíolos (Fig. 25A). En el caso de las plántulas, observamos que a 23°C los niveles de transcriptos detectados para estos genes en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* fueron similares a los de las plántulas salvajes (Fig. 25B). Sin embargo, la inducción de la expresión por temperatura fue, en general, menor en las plántulas mutantes que en las plántulas salvajes (Fig. 25B). En comparación, la expresión de *SAUR63* y *SAUR65* parece estar más afectada que la de los genes de la subfamilia de *SAUR19* analizados en la mutante *tcp14-4 tcp15-3*. Esto está en concordancia con los resultados del transcriptoma de las plantas

p15::TCP15-EAR, en las cuales se encuentra particularmente afectada la expresión de los genes *SAUR* de la subfamilia de *SAUR63* (ANEXO III).

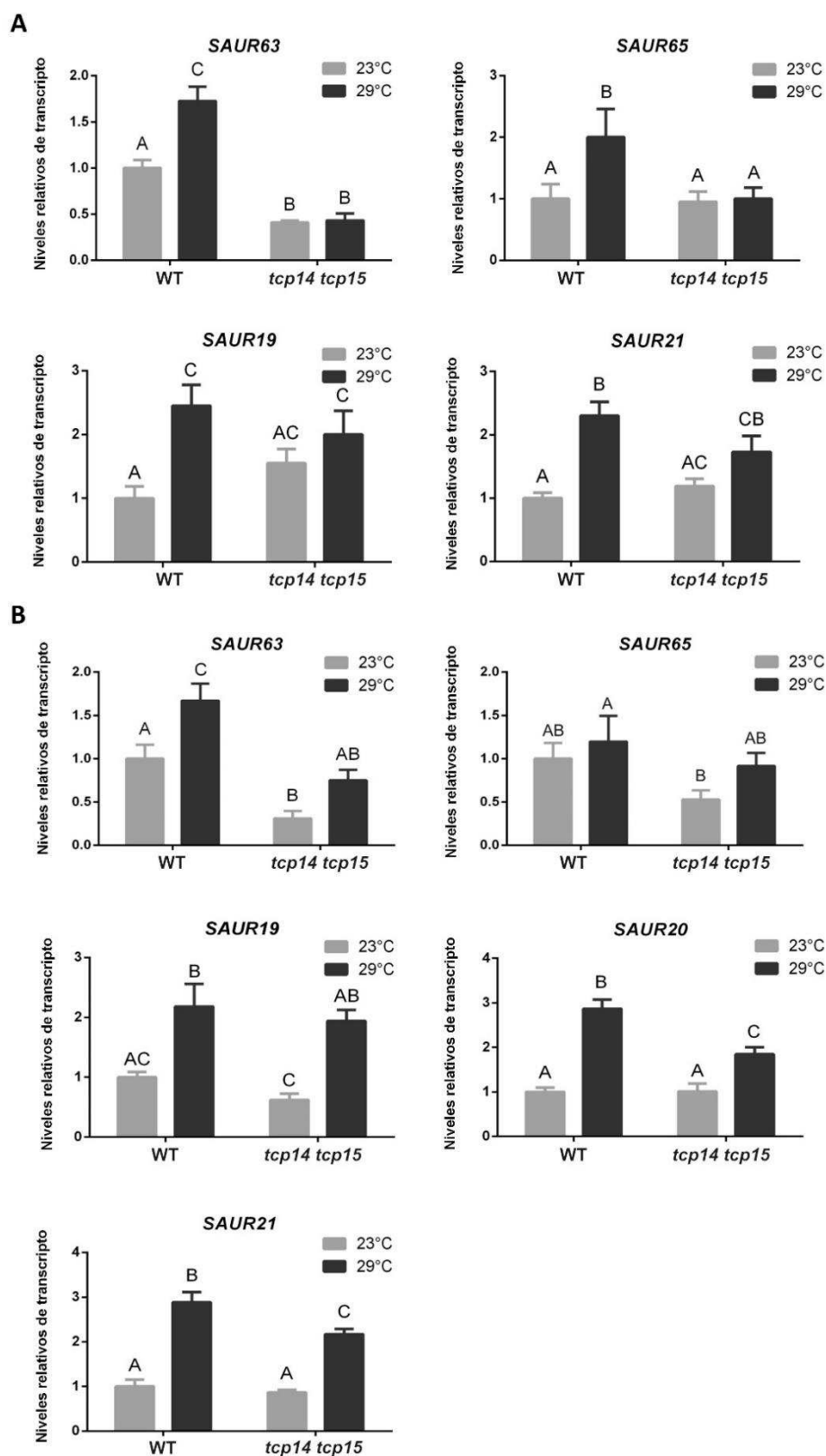


Figura 25. TCP14 y TCP15 participan en la inducción de los genes SAUR por alta temperatura. (A y B) Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de transcritos de genes SAUR en peciolo de hojas de roseta (A) y plántulas de 4 días

(B) de ecotipo Col-0 (WT) y mutantes *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) cultivadas a 23°C e incubadas a 23°C o 29°C durante 3 horas (A) o 1 hora (B). Las plantas usadas en (A) fueron cultivadas durante 16 días. Los valores son relativos a los de plantas salvajes a 23°C. En todos los casos, distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA). Todos los experimentos se repitieron 3 veces con resultados similares.

Por otra parte, analizamos la expresión de *SAUR63* y *SAUR19* en plantas cultivadas durante 4 días a 23°C o 29°C. Encontramos que la inducción por alta temperatura observada para estos genes en las plantas salvajes fue considerablemente mayor cuando las plantas se cultivaron a 29°C que cuando fueron sometidas sólo durante 1 hora a esta temperatura (Fig. 26). En estas condiciones, las diferencias en los niveles de transcritos de *SAUR63* y *SAUR19* observadas al comparar las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* con plantas salvajes fueron significativamente mayores (Fig. 26).

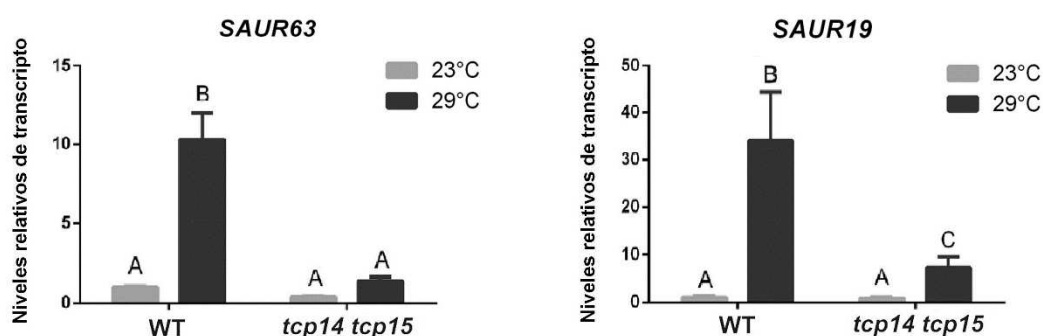


Figura 26. TCP14 y TCP15 son necesarias para una óptima expresión de los genes SAUR a alta temperatura. Niveles relativos de transcritos de *SAUR63* y *SAUR19* analizados por RT-qPCR en plántulas de 4 días de ecotipo Col-0 (WT) y mutantes *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) cultivadas a 23°C o 29°C. Los valores se expresan relativos a las plantas salvajes cultivadas a 23°C. Las distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA). El experimento se repitió 3 veces con resultados similares.

De modo general, podemos decir que las diferencias en los niveles de transcritos de los genes *SAUR63*, *SAUR65*, *SAUR19*, *SAUR20* y *SAUR21* observados en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* en relación con las plantas salvajes fueron más pronunciadas a 29°C que a 23°C. Esto sugiere que TCP14 y TCP15 tendrían un papel relevante durante la inducción de la expresión de estos genes que ocurre en respuesta a altas temperaturas. En conjunto, estos resultados nos indican que las plantas mutantes en *TCP14* y *TCP15* tienen comprometida la respuesta de los genes *SAUR* frente a un aumento en la temperatura. Esta podría ser la causa de la deficiencia en las respuestas de elongación que observamos en estas plantas. Para analizar si efectivamente los defectos en la inducción de los genes *SAUR* frente a un aumento en la temperatura son la causa de los defectos en la elongación del hipocotilo que presentan las plántulas *tcp14-4 tcp15-3*

cuando son expuestas a alta temperatura, decidimos expresar en esta mutante el gen *SAUR63* de forma constitutiva y analizar el fenotipo resultante.

Se ha descrito que las proteínas SAUR son degradadas rápidamente dentro de la célula [144]. Sin embargo, se ha demostrado que su expresión como proteínas de fusión a GFP y/o GUS las estabiliza y aumenta su vida media, generando una ganancia de función. Así, plantas que expresan *SAUR63-GFP* o *SAUR63-GUS* presentan hipocotilos, pétalos y filamentos de estambres más largos [144][145]. En consecuencia, para probar nuestra hipótesis decidimos expresar *SAUR63* fusionado a *GFP* bajo el control del promotor constitutivo *35SCaMV*. Con esta construcción, denominada *35S::SAUR63-GFP*, se transformaron plantas salvajes y mutantes *tcp14-4 tcp15-3* y se aislaron líneas que expresaban niveles similares de transcritos de *SAUR63-GFP* en ambos genotipos (ANEXO II). En estas líneas se evaluó la elongación del hipocotilo frente a una temperatura normal (23°C) y a alta temperatura (29°C). Como se muestra en la Figura 27, la sobreexpresión de *SAUR63-GFP* produjo un aumento en la elongación de los hipocotilos tanto en las plantas salvajes como en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3*, ya sea a 23°C o a 29°C. Sin embargo, las plantas *35S::SAUR63-GFP tcp14-4 tcp15-3* presentaron hipocotilos más cortos que las plantas *35S::SAUR63-GFP* en ambas condiciones. Esto sugiere que otros factores, además de los genes *SAUR*, serían responsables del defecto en la elongación del hipocotilo observado en las mutantes en *TCP14* y *TCP15*. Además, las plantas salvajes que sobreexpresan *SAUR63-GFP* elongan el hipocotilo a 29°C en mayor medida que a 23°C (Fig. 27), lo que indica que la sobreexpresión de *SAUR63* no es capaz de reemplazar a otros factores que estimulan el crecimiento del hipocotilo a alta temperatura.

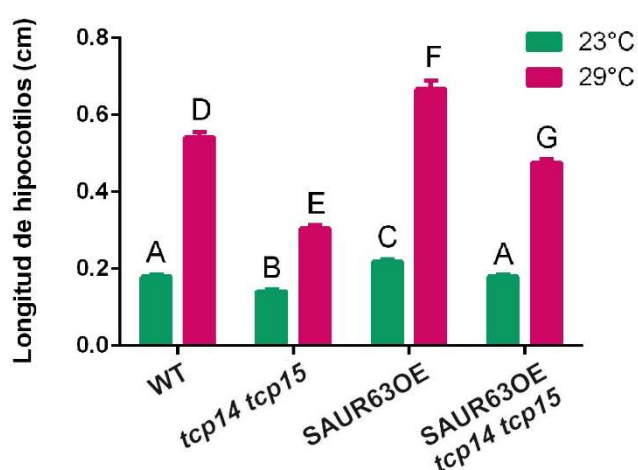


Figura 27. Efecto de la sobreexpresión de *SAUR63* en plantas mutantes *tcp14 tcp15*. Longitud de los hipocotilos de plantas salvajes ecotipo Col-0 (WT) y *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*), y plantas salvajes o *tcp14-4 tcp15-3* que expresan *SAUR63-GFP* bajo el control del promotor *35SCaMV* (*SAUR63OE* y *SAUR63OE tcp14 tcp15*, respectivamente), cultivadas durante 4 días a 23°C o 29°C. Resultados similares a los mostrados se obtuvieron con otras 2 líneas independientes que sobreexpresan niveles similares de *SAUR63*. Las distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA). El experimento se repitió 3 veces con resultados similares.

7.3.2. Relación entre las proteínas TCP de clase I y la vía hormonal de auxinas

Las auxinas participan en la inducción del crecimiento por alta temperatura [229]. La expresión de los genes *SAUR* está modulada por auxinas y se ha propuesto que el aumento en los niveles de esta hormona es parcialmente responsable de la inducción de la expresión de los genes *SAUR* que ocurre a altas temperaturas [88][109][127]. Particularmente, la expresión de *YUC8*, que codifica una enzima de la vía de biosíntesis de auxinas, se induce luego de un aumento en la temperatura ambiente dando lugar a un incremento en los niveles de auxinas endógenas [128]. En base a esto, decidimos analizar si la expresión de *YUC8* se encontraba afectada en las mutantes en *TCP14* y *TCP15*. Como control utilizamos una mutante en el factor de transcripción *PIF4*, *pif4-2* [208], que regula de forma directa la expresión de *YUC8* [128]. De acuerdo a lo esperado, observamos que los niveles de transcripto de *YUC8* estaban disminuidos en las plantas *pif4-2* cultivadas a 23°C y que, frente a un incremento en la temperatura, no se producía el aumento en la expresión de *YUC8* que ocurre en las plantas salvajes (Fig. 28A). Por otro lado, mediante estos ensayos de RT-qPCR encontramos que durante el crecimiento a 23°C las plántulas *tcp14-4 tcp15-3* presentaron niveles de transcripto de *YUC8* similares a los de plantas salvajes (Fig. 28A). Además, al exponer las plantas mutantes a alta temperatura los niveles de expresión de *YUC8* aumentaron aún más que en las plantas salvajes (Fig. 28A). Esto sugiere que la deficiencia en la inducción de la transcripción de los genes *SAUR* a alta temperatura que presentan las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* no sería causada por un defecto en la inducción de genes de biosíntesis de auxinas.

Para continuar con el estudio de la relación entre las auxinas y las proteínas TCP de clase I durante la respuesta a alta temperatura, decidimos analizar la actividad de la construcción reportera *DR5::GUS* en plantas deficientes en *TCP15*. La construcción *DR5::GUS* contiene el gen *GUS*, que codifica la enzima β -glucuronidasa de *E. coli*, bajo el control de un promotor artificial que posee sitios de reconocimiento para los factores ARF de respuesta a auxinas [209]. De modo que analizando la actividad de la β -glucuronidasa puede determinarse la actividad de la vía de respuesta a esta hormona. En las plantas *DR5::GUS*, observamos que la actividad del gen reportero es mayor a 29°C que a 23°C (Fig. 28B), lo que está de acuerdo con el incremento en los niveles de auxinas que, según se sabe, ocurre a altas temperaturas [128]. En las cruces entre plantas *tcp15-3* y *DR5::GUS* (*tcp15 DR5::GUS*), la actividad del gen reportero fue similar a la detectada en las plantas salvajes *DR5::GUS* a 23°C y se observó una actividad aumentada con respecto a estas plantas a 29°C (Fig. 28B). Estos resultados concuerdan con los mayores niveles de transcriptos del gen *YUC8* observados en las mutantes a alta temperatura. Para evaluar la respuesta a auxinas de la construcción *DR5::GUS* en las plantas mutantes, tratamos las plantas

con la auxina ácido indolacético (IAA). El tratamiento con la hormona generó un aumento en la actividad del gen reportero tanto en plantas salvajes como en las mutantes en *TCP15* y el aumento fue mayor en las plantas mutantes (Fig. 28C, D). Al analizar el patrón de expresión del gen reportero mediante tinción histoquímica de la actividad β -glucuronidasa, no se observaron diferencias significativas entre las mutantes *tcp15-3* y las plantas salvajes (Fig. 28B, D). Teniendo en cuenta que el promotor *DR5* contiene los elementos AuxRE que son reconocidos por las proteínas ARF [209], estos resultados sugieren que la respuesta a auxinas mediada por los factores de transcripción ARF no se encuentra afectada en las plantas *tcp15-3* en ninguna de las condiciones ensayadas.

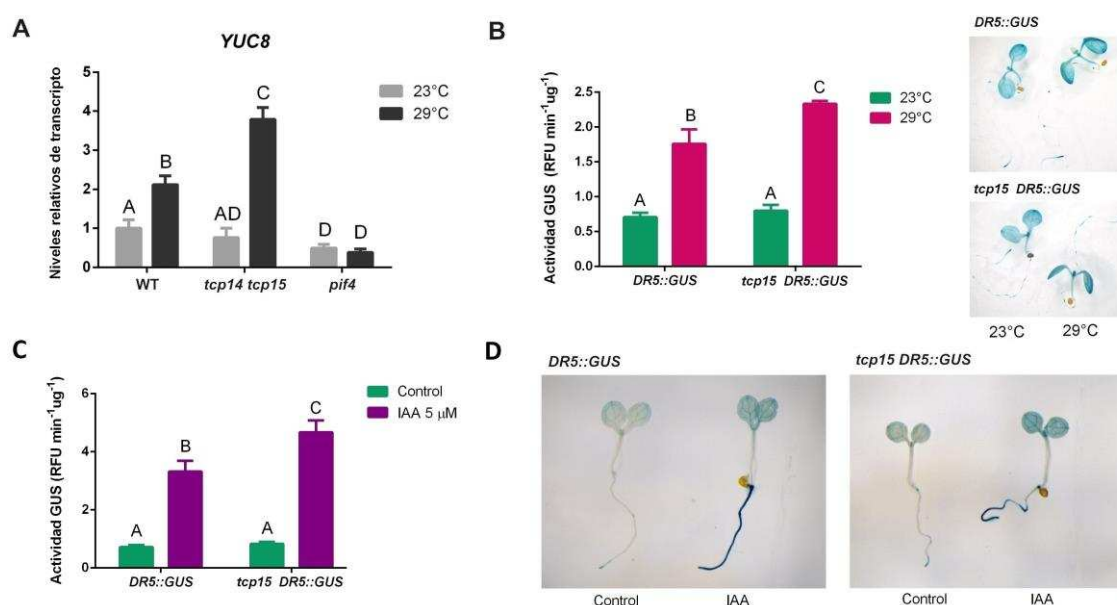


Figura 28. Análisis de la vía de auxinas en plantas mutantes en *TCP14* y *TCP15* frente a un aumento en la temperatura. (A) Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de transcritos del gen de biosíntesis de auxinas *YUC8* en plántulas salvajes ecotipo Col-0 (WT), *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) y *pif4-2* (*pif4*) cultivadas a 23°C y luego incubadas a 23°C o 29°C durante 3 horas. Los valores son relativos a plantas WT a 23°C. (B) Actividad GUS en plantas salvajes ecotipo Col-0 (*DR5::GUS*) o *tcp15-3* (*tcp15 DR5::GUS*) que expresan el reportero de auxinas *DR5::GUS* cultivadas a 23°C o 29°C durante 4 días. Imágenes representativas de la expresión del gen reportero *DR5::GUS* en plantas cultivadas a 23°C durante 4 días e incubadas a 23°C o 29°C durante 18 horas. Reacción de GUS durante toda la noche. (C) Actividad GUS en las plantas descritas en (B) cultivadas a 23°C durante 4 días y luego tratadas o no (control) con IAA 5 μ M durante 24 horas. (D) Imágenes representativas de la expresión del gen reportero *DR5::GUS* en plantas cultivadas a 29°C durante 4 días y tratadas o no (control) con IAA 5 μ M durante 24 horas. Reacción de GUS durante 6 horas. Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA). Todos los experimentos se repitieron 3 veces con resultados similares.

Los resultados obtenidos sugieren que el incremento en los niveles de auxinas que se da como consecuencia de un aumento en la temperatura no está afectado en las mutantes en *TCP14* y *TCP15*. Sin embargo, la expresión de varios genes *SAUR*, que responden a auxinas, sí está afectada. Por lo tanto, decidimos evaluar si el aumento en la expresión de los genes *SAUR*

observado luego de un tratamiento con auxinas se encontraba afectado en las mutantes. Para los genes *SAUR20* y *SAUR21*, ambos de la subfamilia de *SAUR19*, observamos que, luego del tratamiento con auxinas, los transcritos alcanzaron niveles similares en las mutantes y en las plantas salvajes (Fig. 29A). Para el caso de *SAUR63*, en cambio, no se observó una inducción en las plantas *tcp14-4 tcp15-3* luego del tratamiento con auxinas (Fig. 29A). Además de los genes *SAUR*, evaluamos la expresión de dos genes IAA que son inducidos por auxinas. La expresión de estos genes mostró un comportamiento diferente luego del tratamiento con auxinas en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3*. Mientras que los niveles de transcritos de *IAA29* aumentaron aún más que en las plantas salvajes, la expresión de *IAA19* no alcanzó los niveles de estas últimas luego del tratamiento con la hormona (Fig. 29B). Concluimos que la inducción de determinados genes por auxinas se encuentra afectada en las mutantes en *TCP14* y *TCP15*, mientras que otros genes presentan una respuesta normal o incluso aumentada, tal como ocurre con la construcción reportera *DR5::GUS*. Esto podría afectar parcialmente el crecimiento en respuesta al aumento de auxinas que ocurre al incrementarse la temperatura, aunque dicho aumento ocurra normalmente en las mutantes.

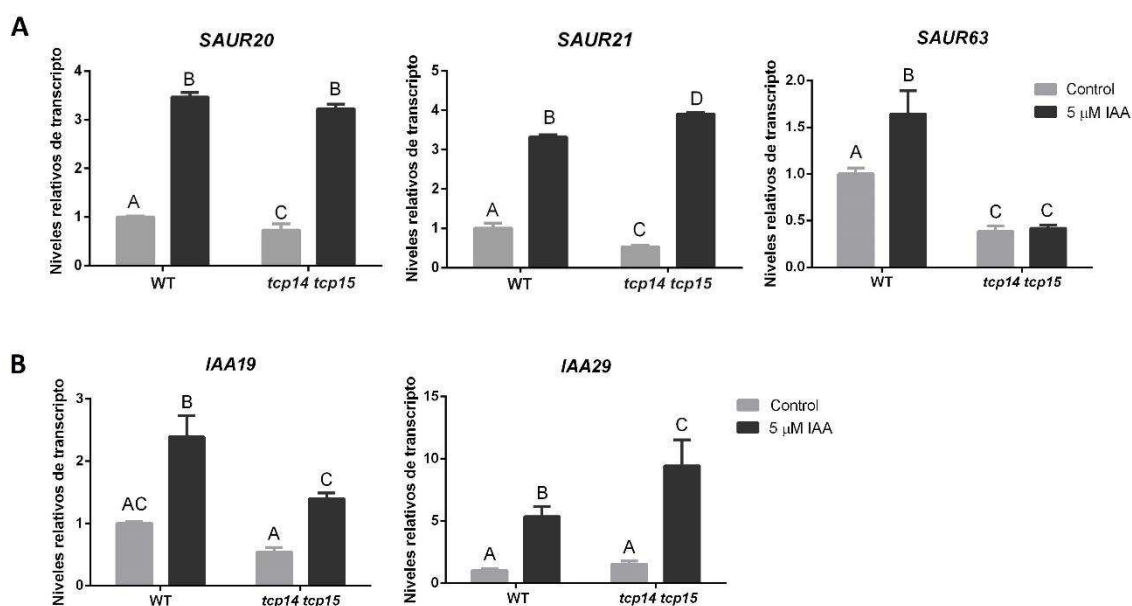


Figura 29. Efecto del tratamiento con auxinas sobre la expresión de genes *SAUR* e *IAA* en mutantes en *TCP14* y *TCP15*. (A) Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de transcritos de *SAUR20*, *SAUR21* y *SAUR63* en plántulas salvajes ecotipo Col-0 (WT) y *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) cultivadas a 23°C y tratadas luego con IAA5 μ M durante 15 min. (B) Niveles relativos de transcritos de *IAA19* e *IAA29* analizados por RT-qPCR en plántulas salvajes ecotipo Col-0 (WT) y *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) cultivadas a 23°C y tratadas luego con IAA5 μ M durante 30 min. Los valores son relativos a los de plantas WT no tratadas. Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA). En todos los casos los experimentos se repitieron 3 veces con resultados similares.

En consecuencia, analizamos el efecto de un tratamiento con auxinas sobre el crecimiento del hipocotilo de las mutantes *tcp14-4 tcp15-3*. Observamos que el tratamiento con la auxina IAA promueve el crecimiento de los hipocotilos de plantas salvajes cultivadas a 23°C, mientras que las plantas mutantes no responden a la hormona (Fig. 30A). Obtuvimos resultados similares cuando cultivamos las plantas en presencia de la auxina sintética picloram (PIC) tanto a 23°C como a 29°C (Fig. 30B). En este caso, se observó una respuesta leve en la elongación del hipocotilo de las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* frente al tratamiento con PIC a las dos temperaturas ensayadas, pero las diferencias con las plantas salvajes se mantuvieron en ambas condiciones (Fig. 30B). Dado que la biosíntesis de auxinas no parece estar afectada en las plantas *tcp14-4 tcp15-3*, esta respuesta parcial de elongación frente a tratamientos con auxinas podría deberse a que la inducción de ciertos genes como consecuencia del tratamiento ocurre normalmente, mientras que la respuesta de otros está afectada, como se observó para los genes *SAUR20*, *SAUR21* e *IAA29*, por un lado, y *SAUR63* e *IAA19*, por el otro (Fig. 29A, B).

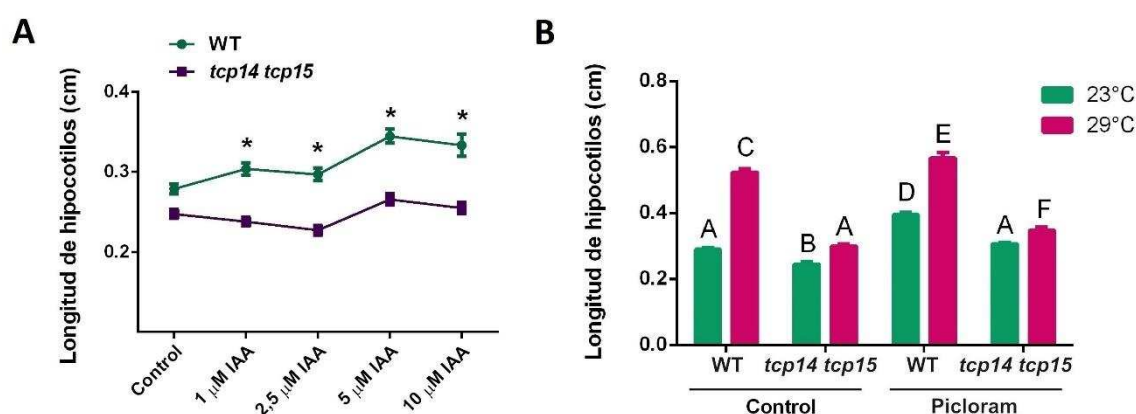


Figura 30. Efecto del tratamiento con auxinas sobre el crecimiento del hipocotilo en mutantes en *TCP14* y *TCP15*. (A) Longitud de los hipocotilos de plantas salvajes (WT) y *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) ($n = 30$) cultivadas durante 5 días a 23°C y luego 2 días adicionales en presencia de diferentes concentraciones de IAA. (B) Longitud de los hipocotilos de plantas salvajes (WT) y *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) ($n = 30$) cultivadas a 23°C o 29°C en presencia o ausencia de la auxina sintética picloram (5 µM). Las distintas letras en (B) indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA). Los asteriscos en (A) indican diferencias significativas con plantas WT en la misma condición ($P < 0.05$; ANOVA). Los experimentos se repitieron 3 veces con resultados similares.

También nos preguntamos si la expresión a nivel transcripcional de *TCP14* y *TCP15* se encontraba modulada por auxinas. Para responder a esta pregunta analizamos los niveles de transcripto de estos genes en plantas salvajes tratadas durante 30 min con la auxina IAA. Encontramos que no se producen cambios significativos en la expresión de *TCP14* y *TCP15* frente al tratamiento con IAA (Fig. 31).

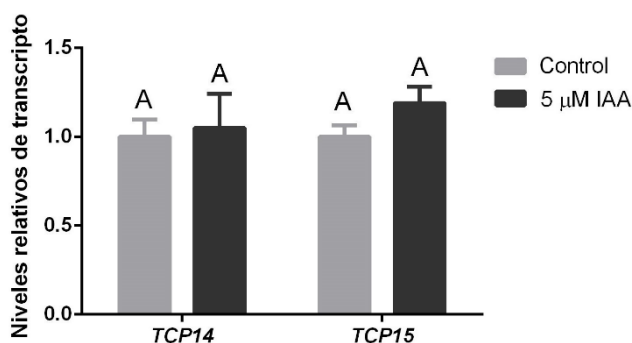


Figura 31. Efecto del tratamiento con auxinas sobre la expresión de los genes *TCP14* y *TCP15*. Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de transcritos de *TCP14* y *TCP15* en plántulas salvajes (WT) cultivadas a 23°C y tratadas con IAA 5 μ M durante 30 min. Los valores son relativos a los de plantas sin tratar. Letras iguales indican diferencias no significativas ($P > 0.05$; ANOVA). El experimento se repitió 3 veces con resultados similares.

En base a los experimentos descritos en esta sección, podemos postular que la biosíntesis de auxinas que se da ante un aumento de la temperatura no estaría afectada en las plantas deficientes en *TCP14* y *TCP15*. Los experimentos en los que se analizó la expresión del reportero *DR5::GUS* indicarían que tampoco la actividad de los factores de transcripción ARF de respuesta a auxinas está significativamente afectada. Sin embargo, la inducción de la expresión de algunos genes en respuesta a auxinas, como *SAUR63* e *IAA19*, se encuentra afectada en las plantas mutantes, a pesar de que son blancos directos del accionar de los factores de transcripción ARF. Esto sugiere que para que ocurra un aumento en la expresión de estos genes se requiere, además de los factores ARF, la acción de las proteínas TCP. Un razonamiento similar puede hacerse para la inducción de la expresión de varios genes *SAUR* por un aumento en la temperatura: las proteínas TCP serían necesarias, además de los factores ARF, para la correcta inducción de estos genes. Hemos observado que un número importante de genes *SAUR* presenta posibles sitios de unión de proteínas TCP en sus promotores (ANEXO IV). En nuestro laboratorio se ha observado que *TCP15* es capaz de unirse a la región que contiene el sitio TCP del promotor de *SAUR63*, al menos en flores (Victoria Gastaldi, resultados no publicados). Quizás la unión directa de las proteínas TCP a los promotores de algunos genes *SAUR* es necesaria para la correcta respuesta a un aumento en la temperatura y/o en los niveles de auxinas.

7.3.3. Relación entre las proteínas TCP de clase I y la vía hormonal de giberelinas

7.3.3.1. El gen *GA2Ox1* de biosíntesis de giberelinas es regulado de manera directa por *TCP15*

Sumado al incremento en los niveles de auxinas, un aumento en la temperatura ambiente induce la expresión de los genes *GA3ox1* y *GA2Ox1* que codifican enzimas de la vía de biosíntesis de GA [146]. En base a esto, decidimos analizar los niveles de transcritos de estos genes en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* expuestas a 29°C. Si bien no observamos diferencias significativas en los niveles de transcritos de *GA3ox1* entre las plantas mutantes y las salvajes

(Fig. 32A), para el caso de *GA20ox1* observamos que la inducción de la expresión de este gen por alta temperatura estaba afectada en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* (Fig. 32B). Estos resultados sugieren que las proteínas TCP de clase I bajo estudio estarían involucradas en regular la expresión de *GA20ox1*, y probablemente la síntesis de GA, durante la respuesta a alta temperatura en *Arabidopsis*.

Cuando analizamos el promotor de *GA20ox1* encontramos dos probables sitios para la unión de proteínas TCP, TGGGTCC y GGGGCC, a unos 2300 pb del sitio de inicio de la transcripción (Fig. 32C). Por este motivo, decidimos evaluar si TCP15 se une al promotor de *GA20ox1* mediante experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina seguido de PCR en tiempo real (ChIP-qPCR). Para llevar esto a cabo, se utilizaron plantas que expresan a *TCP15* fusionado a *GFP* bajo el control del promotor constitutivo *35SCaMV* (*35S::TCP15-GFP*) cultivadas a 29°C durante 15 días. Una vez realizado el entrecruzamiento *in vivo* de las interacciones proteína-ADN y proteína-proteína y obtenidos los extractos nucleares correspondientes, se realizó una fragmentación de la cromatina y los complejos ADN/TCP15-GFP fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-GFP. Finalmente, se determinó el grado de enriquecimiento de diferentes regiones del promotor de *GA20ox1* mediante qPCR. Como control negativo se realizó una inmunoprecipitación con anti-IgG. Luego de analizar las reacciones de qPCR observamos un enriquecimiento del fragmento del promotor que contiene los sitios TCP (fragmento P2) en la muestra inmunoprecipitada con anti-GFP en comparación con la muestra inmunoprecipitada con anti-IgG (Fig. 32C). También se observó enriquecimiento, aunque en menor medida, de un fragmento localizado corriente arriba en el promotor (fragmento P1) (Fig. 32C). Para el fragmento P3, localizado cerca del sitio de inicio de la transcripción, no se observó enriquecimiento, así como tampoco se observó para un fragmento correspondiente al gen *PP2A*, utilizado como control negativo (Fig. 32C). En conjunto, estos resultados señalan que TCP15 se une *in vivo* al promotor de *GA20ox1* en la región que contiene los sitios de reconocimiento de proteínas TCP. Esto indica que *GA20ox1* sería un blanco directo de TCP15, y probablemente también de TCP14, teniendo en cuenta la similitud entre estas dos proteínas. Dado que no se produce una inducción de la expresión de *GA20ox1* en respuesta a alta temperatura en plantas deficientes en TCP14 y TCP15, esto nos lleva a pensar que, frente a un aumento en la temperatura, las proteínas TCP inducirían en forma directa la expresión de *GA20ox1* promoviendo la síntesis de GA activas.

Como se describe en la Introducción, las proteínas DELLA son reguladores negativos de la vía de respuesta a GA y su degradación es promovida por GA activas [44]. Para evaluar la participación de TCP14 y TCP15 en la modulación de la actividad de la vía de las GA, decidimos

analizar los niveles de la proteína DELLA RGA en las plantas *tcp14-4 tcp15-3*. Así, extractos proteicos de plantas dobles mutantes y plantas salvajes cultivadas durante 7 días a 23°C o 29°C fueron utilizados en ensayos de Western blot para determinar los niveles de RGA. Encontramos que tanto a 23°C como a 29°C las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* presentaron mayores niveles de RGA que las plantas salvajes (Fig. 32D), lo que sugiere que la actividad de la vía de GA está disminuida en las mutantes. Junto con los estudios de expresión del gen *GA20ox1* realizados, se puede postular que las plantas mutantes en *TCP14* y *TCP15* poseen una deficiencia en los niveles de GA activas.

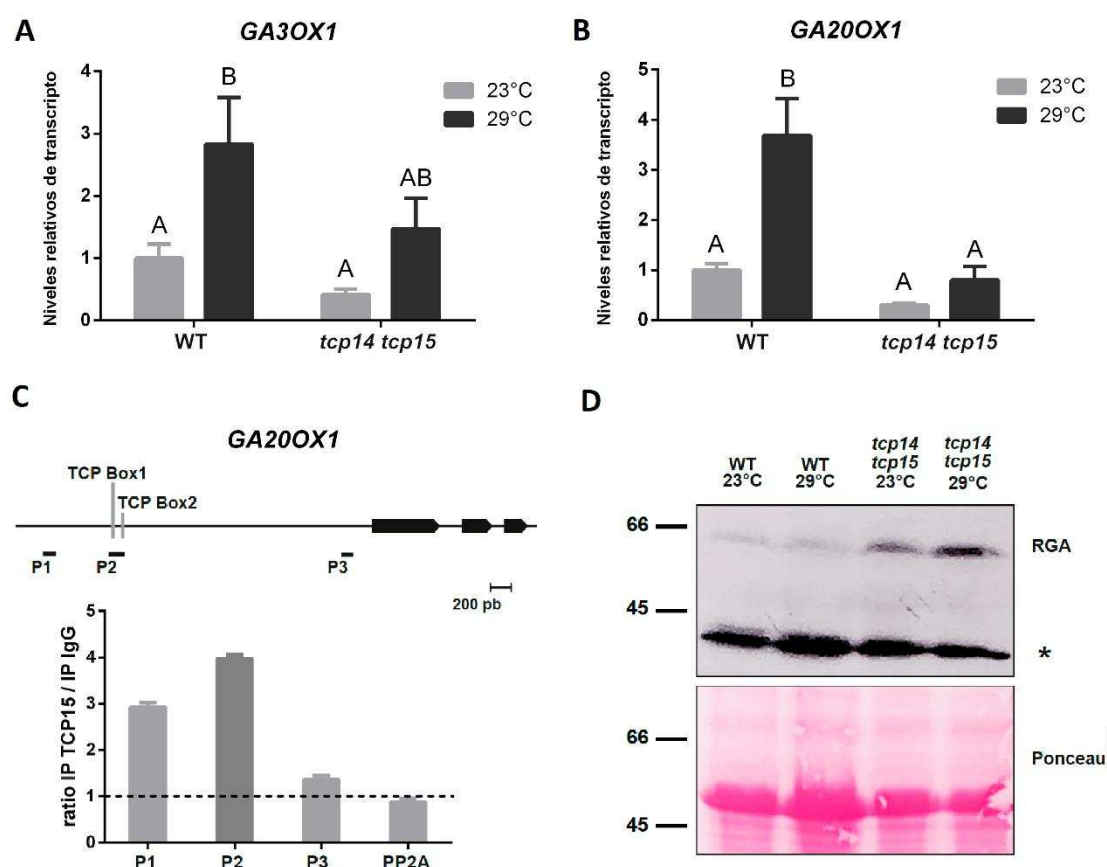


Figura 32. El gen de biosíntesis de GA *GA20ox1* es un blanco directo de TCP15. (A) y (B) Niveles relativos de transcripto de los genes de biosíntesis de GA *GA3ox1* (A) y *GA20ox1* (B), medidos por RT-qPCR en plantas salvajes ecotipo Col-0 (WT) y mutantes *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) cultivadas a 23°C o a 29°C. Los valores son relativos a los de las plantas WT a 23°C. (C) Análisis de la unión de TCP15-GFP a diferentes regiones del promotor de *GA20ox1* por ChIP-qPCR. El gen *PP2A* se utilizó como control negativo. En la parte superior se muestra un esquema del gen *GA20ox1* con la ubicación de los fragmentos amplificados y los sitios de unión putativos para proteínas TCP. (D) Análisis por Western blot de los niveles de proteína RGA en plantas salvajes ecotipo Col-0 (WT) y mutantes *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) cultivadas a 23°C o a 29°C. Se indica la banda correspondiente a RGA (RGA) y una banda inespecífica (*). En (A) y (B) las distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA). En todos los casos los experimentos se repitieron 3 veces con resultados similares.

7.3.3.2. Análisis de la respuesta a giberelinas en plantas mutantes *tcp14 tcp15*

En base a estos hallazgos, decidimos evaluar el efecto de un tratamiento con GA sobre el crecimiento del hipocotilo en plantas *tcp14-4 tcp15-3*. Observamos que, en presencia de GA₃ 10 μM, las plantas salvajes mostraron un mayor crecimiento del hipocotilo que las plantas sin tratar al ser cultivadas a 23°C o a 29°C (Fig. 33A). En cuanto a las mutantes dobles, se observó un efecto significativo de GA₃ a 29°C (Fig. 33A). En ningún caso, sin embargo, los hipocotilos de las plantas mutantes alcanzaron la longitud de los de las plantas salvajes tratadas con GA₃ (Fig. 33A). Teniendo en cuenta la ineficiente inducción de *GA20ox1* en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3*, postulamos que estas plantas tendrían afectada la biosíntesis de GA a 29°C. Esto explicaría el aumento en la elongación observado al tratar las plantas con GA₃ a esta temperatura. Sin embargo, el defecto en la elongación del hipocotilo de las plantas *tcp14-4 tcp15-3* se revirtió sólo parcialmente por el agregado de GA₃. Esto sugiere que existen otros factores, además de los niveles de GA, que estarían involucrados en la elongación del hipocotilo a 29°C y que son modulados por las proteínas TCP. Los resultados observados sugieren, además, que la respuesta a GA también estaría afectada en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3*, ya que las mismas no responden como las plantas salvajes al tratamiento con la hormona. Esta hipótesis adquiere más sentido si se tiene en cuenta que las proteínas TCP de clase I interaccionan con proteínas DELLA, las que inhiben su actividad [195][196]. De hecho, TCP14 y TCP15 median la respuesta a GA durante la germinación y el crecimiento del tallo [195][196]. Probablemente, la estimulación del crecimiento del hipocotilo por GA en plantas salvajes esté dada, al menos en forma parcial, por la activación de proteínas TCP debida a la degradación de proteínas DELLA. En las plantas mutantes en *TCP14* y *TCP15*, esta activación no podría darse, ocasionando una respuesta deficiente. Para analizar el efecto de las GA en la elongación del hipocotilo de manera independiente de los niveles de GA endógenas, las plantas salvajes y mutantes fueron cultivadas en presencia del inhibidor de la síntesis de GA paclobutrazol (PAC) y luego se analizó la capacidad de elongación del hipocotilo en respuesta a GA₃. En nuestros experimentos encontramos que, de acuerdo a lo reportado [146], el tratamiento con PAC 100 nM inhibió el crecimiento del hipocotilo y afectó la respuesta a alta temperatura de las plantas salvajes (Fig. 33B). En las plantas mutantes *tcp14-4 tcp15-3*, observamos que la inhibición por PAC fue menos pronunciada que en las plantas salvajes (Fig. 33B). Esto concuerda con la idea de que estas mutantes presentan mayores niveles de proteínas DELLA y que tendrían menores niveles de GA activas. Las plantas salvajes y mutantes tratadas con PAC y GA₃ desarrollaron hipocotilos más largos que las plantas sin tratar, tanto a 23°C como a 29°C (Fig. 33B). Sin embargo, la respuesta de crecimiento a alta temperatura fue menor en las plantas *tcp14-4 tcp15-3* que en las plantas

salvajes (Fig. 33B), lo que nuevamente indica que TCP14 y TCP15 son necesarias para que ocurra una elongación eficiente del hipocotilo en presencia de GA a altas temperaturas.

En base a estos resultados, puede plantearse un escenario en el que, ante un aumento de la temperatura, TCP14 y TCP15 incrementarían los niveles de GA activas, principalmente mediante la inducción de *GA20ox1*. De esta manera, al disminuir los niveles de proteínas DELLA, se activarían las cascadas de señalización de esta hormona. Por otra parte, dado que la actividad de las proteínas TCP es inhibida por las proteínas DELLA [195], puede pensarse en la existencia de un bucle de retroalimentación positiva donde, luego de quedar libres de la inhibición por las proteínas DELLA, las proteínas TCP activarían la expresión de genes involucrados en la elongación del hipocotilo, entre ellos *GA20ox1*. La interrupción de este bucle en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* explicaría por qué el crecimiento del hipocotilo de estas plantas no se reestablece luego del tratamiento con GA activas. Además, TCP14 y TCP15 podrían estar involucradas en la regulación de otros procesos ubicados corriente abajo de las GA durante el crecimiento inducido por temperatura.

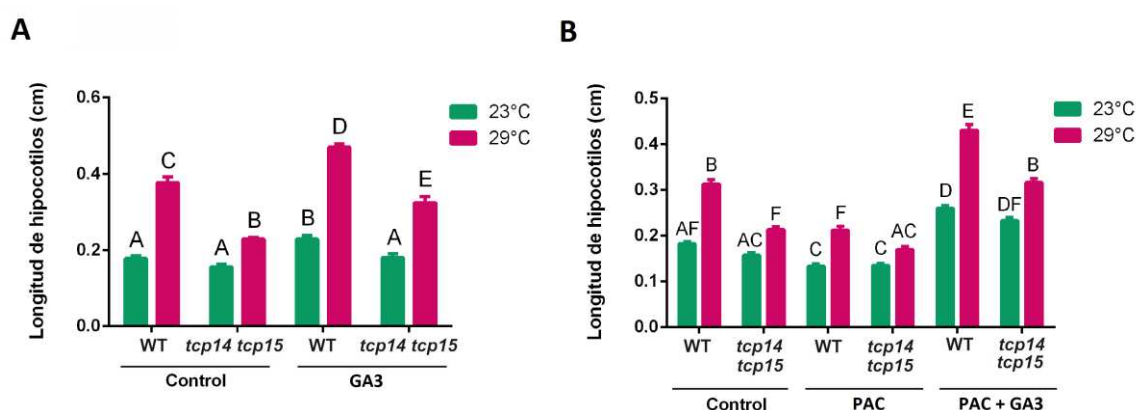


Figura 33. Efecto del tratamiento con giberelinas sobre el crecimiento del hipocotilo en mutantes en TCP14 y TCP15. (A) Longitud de los hipocotilos de plantas salvajes ecotipo Col-0 (WT) y mutantes *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) (n = 10) cultivadas a 23°C o a 29°C en presencia de GA₃ 10 μM. (B) Longitud de los hipocotilos de plantas salvajes ecotipo Col-0 (WT) y mutantes *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) (n = 20) cultivadas a 23°C o a 29°C en presencia de PAC 100 nM, GA₃ 10 μM, o ambos compuestos. Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0.05; ANOVA). Los experimentos se repitieron 3 veces con resultados similares.

7.3.4. Estudio de la relación entre las proteínas TCP de clase I y PIF4 durante la termomorfogénesis.

El factor de transcripción PIF4 es un regulador central en la elongación del hipocotilo en condiciones de alta temperatura [88][89][109]. Durante esta respuesta, PIF4 actúa promoviendo la síntesis de auxinas, GA y BR. Además, regula de manera directa la transcripción de genes *SAUR*, *IAA* y varios genes relacionados con la elongación celular como los genes *PRE* y *HBI1*. En

base a esto, nos propusimos analizar la relación entre PIF4 y las proteínas TCP bajo estudio durante la respuesta a cambios en la temperatura ambiente.

7.3.4.1. TCP14 y TCP15 son necesarias para un crecimiento máximo en respuesta a PIF4

En primer lugar, evaluamos si los niveles de transcritos de *TCP14* y *TCP15* están regulados por un aumento en la temperatura. Para esto, plántulas salvajes cultivadas a 23°C fueron sometidas a una temperatura de 29°C durante 1 hora. Encontramos que tanto los niveles de transcritos de *TCP14* como los de *TCP15* aumentaron luego de la exposición a alta temperatura (Fig. 34A, B). Realizamos la misma evaluación en las mutantes en *PIF4*, *pif4-2*, y no observamos inducción de *TCP14* y *TCP15* por temperatura en las mismas (Fig. 34A, B). Para *TCP14*, los niveles de transcritos en las mutantes *pif4-2* también resultaron disminuidos en las plantas cultivadas a 23°C (Fig. 34A). De manera opuesta a lo observado en las mutantes en *PIF4*, al analizar los niveles de transcritos de ambos genes *TCP* en plantas que sobreexpresan *PIF4* fusionado al epítipo HA (*PIF4-HA OE*, [208]) encontramos que los niveles de transcritos se encontraban aumentados en comparación con plantas salvajes (Fig. 34C). En sintonía con esta observación, tanto *TCP14* como *TCP15* podrían ser blancos directos de PIF4, de acuerdo a un análisis de ensayos de CHIP seguida de secuenciación masiva (CHIP-seq) [147]. En conjunto, nuestros ensayos indican que la expresión a nivel transcripcional de *TCP14* y *TCP15* es inducida en alta temperatura y que PIF4 regularía esta inducción. A continuación, dado que se sabe que la expresión a nivel transcripcional de *PIF4* aumenta por alta temperatura [128], decidimos analizar si esta inducción se encontraba afectada en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3*. Encontramos que, en efecto, las plantas mutantes en *TCP14* y *TCP15* presentan niveles de expresión de *PIF4* menores que las plantas salvajes luego de un tratamiento a 29°C (Fig. 34D), lo que sugiere la existencia de una regulación recíproca entre PIF4 y las proteínas TCP.

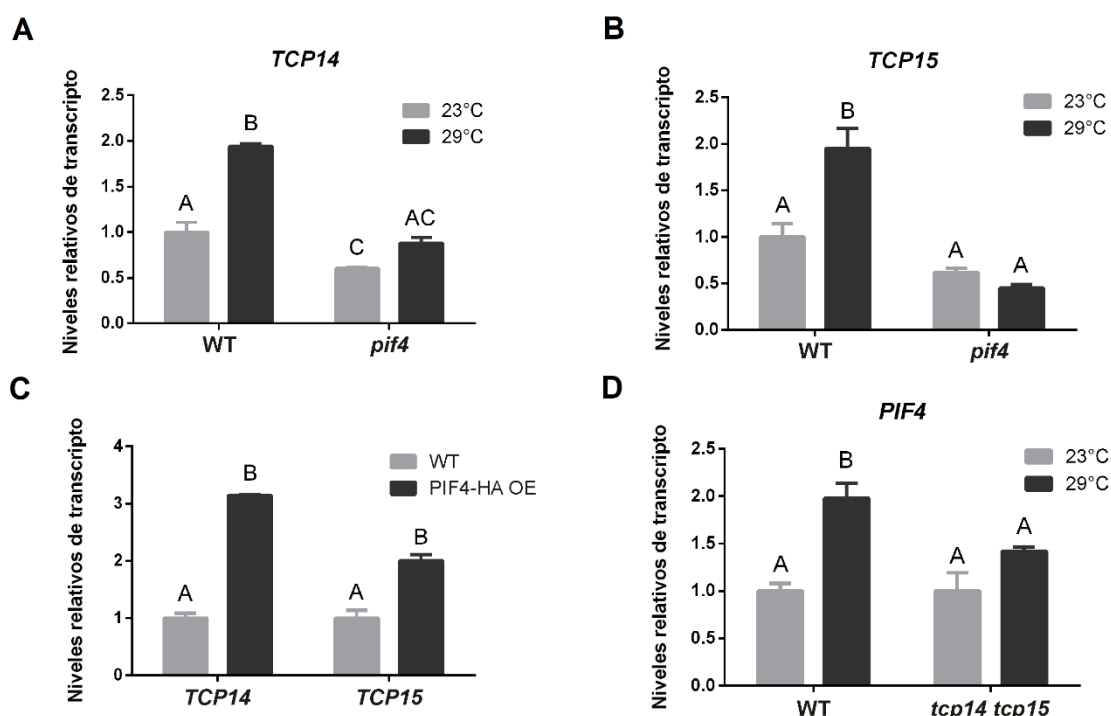


Figura 34. *TCP14* y *TCP15* se inducen frente a un aumento en la temperatura de manera dependiente de *PIF4*. **(A, B)** Niveles relativos de transcritos de *TCP14* (A) y *TCP15* (B) medidos por RT-qPCR en plántulas salvajes ecotipo Col-0 (WT) y mutantes *pif4-2* (*pif4*) cultivadas a 23°C y transferidas a 23°C o 29°C durante 1 hora. Los valores son relativos a los de plantas WT a 23°C. **(C)** Niveles relativos de transcritos de *TCP14* y *TCP15* analizados por RT-qPCR en plántulas salvajes ecotipo Col-0 (WT) o plántulas que expresan *PIF4-HA* bajo el control del promotor *35SCaMV* (*PIF4-HA OE*) [208] cultivadas a 23°C. Los valores son relativos a los de las plantas salvajes. **(D)** Niveles relativos de transcritos de *PIF4* medidos por RT-qPCR en plántulas salvajes ecotipo Col-0 (WT) y *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) cultivadas a 23°C y transferidas a 23°C o 29°C durante 1 hora. Los valores son relativos a los de las plantas salvajes. Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA). En todos los casos los experimentos se repitieron 3 veces con resultados similares.

Analizamos luego el efecto de la sobreexpresión de *PIF4* en plantas salvajes y mutantes *tcp14-4 tcp15-3*. Para esto, se transformaron plantas con una construcción que permite expresar a *PIF4* bajo el control del promotor constitutivo *35SCaMV* (*PIF4OE*). Entre las líneas obtenidas, se seleccionaron aquellas que presentaban niveles similares de transcritos de *PIF4* tanto en las plantas salvajes como en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* (ANEXO II). A continuación, analizamos la longitud del hipocotilo de estas plantas al ser cultivadas a 23°C y a 29°C. Observamos que la sobreexpresión de *PIF4* causa un aumento en la longitud del hipocotilo a ambas temperaturas, tanto en plantas salvajes como en plantas mutantes (Fig. 35A). Sin embargo, las diferencias entre las plantas mutantes y las salvajes se mantuvieron a 29°C y se hicieron evidentes también a 23°C. Esto indica que *TCP14* y *TCP15* son requeridas para un crecimiento máximo en respuesta a *PIF4*, aún al cultivar las plantas a temperatura normal.

Trabajos recientes postularon que los BR actúan corriente abajo de PIF4 y de las auxinas durante el crecimiento del hipocotilo a altas temperaturas [146][151]. Por lo tanto, decidimos analizar el efecto de un tratamiento con el BR brasinólido (BL) sobre el crecimiento del hipocotilo en las plantas mutantes *tcp14-4 tcp15-3*. Observamos que el agregado de BL al medio produce un efecto similar al de la sobreexpresión de *PIF4* (Fig. 35B). El tratamiento con este compuesto promueve la elongación del hipocotilo en las plantas salvajes y mutantes, pero en ningún caso los hipocotilos de las mutantes alcanzan longitudes similares a los de las plantas salvajes (Fig. 35B). Estos resultados se corresponden con lo reportado hasta el momento por otros autores, que demostraron que los BR pueden reemplazar la acción de PIF4 durante la respuesta a alta temperatura [151]. Por otra parte, indican que los BR no son capaces de reemplazar de manera completa la acción de las proteínas TCP.

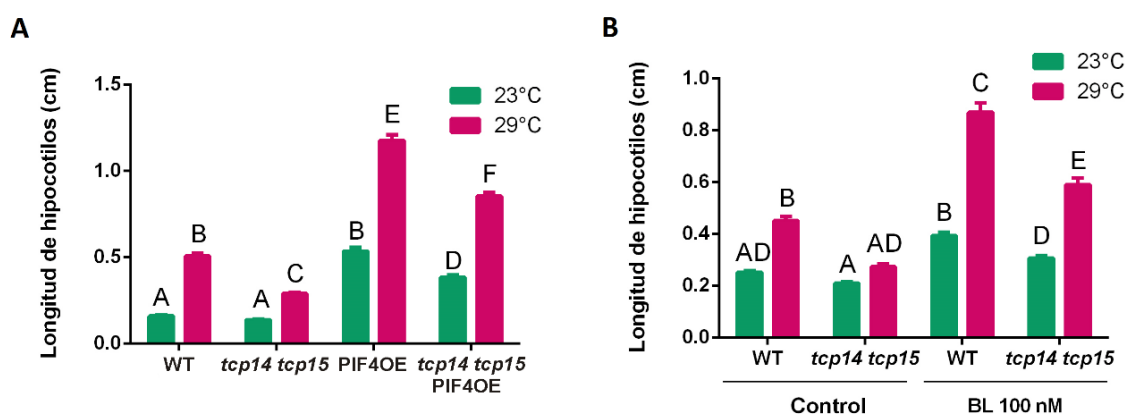


Figura 35. TCP14 y TCP15 son necesarias para un crecimiento máximo en respuesta a PIF4 y BR. (A) Longitud del hipocotilo de plantas salvajes (WT), *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) y líneas de estas plantas que expresan *PIF4* bajo el control del promotor *35SCaMV* (*PIF4OE*), cultivadas a 23°C o a 29°C ($n = 20$). (B) Longitud del hipocotilo de plantas salvajes (WT) y mutantes *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) ($n = 20$) cultivadas a 23°C o a 29°C en presencia o ausencia de BL 100 nM. Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA). Los experimentos se repitieron 3 veces con resultados similares.

7.3.4.2. TCP15 regula de manera directa algunos genes blancos de PIF4 involucrados en la elongación celular

Al analizar el transcriptoma de las plantas *p15::TCP15-EAR* [180] encontramos que un número significativo de genes que son blancos de PIF4 [147] están reprimidos en estas plantas (Fig. 36A y ANEXO V). Además, al analizar las secuencias de ADN de las regiones promotoras de los blancos de PIF4 con expresión disminuida en las plantas *p15::TCP15-EAR*, encontramos sobrerrepresentados los motivos de unión de PIF4 (tCACATG) y de las proteínas TCP (tGGGTCCa) (Fig. 36B, ANEXO VI y VII). Esto sugiere que muchos de estos genes podrían ser blancos comunes de PIF4 y las proteínas TCP. Entre los genes que conforman este grupo, se encuentran *HBI1*,

PRE1 y *PRE6* que, como se describió en la Introducción, son parte de un módulo regulatorio del crecimiento controlado por PIF4 [152][154]. En base a esto, decidimos analizar la expresión de estos genes en las plantas *tcp14-4 tcp15-3* mediante RT-qPCR. Encontramos que en las mutantes no se produce el aumento en los niveles de transcritos de *HBI1*, *PRE1* y *PRE6* que ocurre en las plantas salvajes cuando son cultivadas a alta temperatura (Fig. 36C-E). Este módulo de regulación influye directamente sobre la expresión de un grupo de genes relacionados con procesos de expansión celular. La expresión de uno de estos genes, *EXP8*, que codifica una expansina y está regulado por *HBI1* [235], también fue menor en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* que en las plantas salvajes (Fig. 36F).

Considerando que *PRE1*, *PRE6* y *HBI1* contienen posibles sitios de unión de proteínas TCP en sus promotores, decidimos realizar experimentos de ChIP-qPCR a fin de determinar si TCP15 se une a los promotores de estos genes *in vivo* en Arabidopsis. El promotor de *HBI1* contiene dos posibles sitios de unión para proteínas TCP: GGGTCC, localizado a 330 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, y GGGACC, localizado a unos pocos pb corriente abajo del mismo (Fig. 36G). Como se describió para el caso del gen *GA20ox1*, utilizamos plantas *35S::TCP15-GFP* cultivadas durante 15 días a 29°C y la inmunoprecipitación se realizó con un anticuerpo anti-GFP, utilizando una inmunoprecipitación con anti-IgG como control negativo. Se realizaron reacciones de qPCR con oligonucleótidos que permiten amplificar los fragmentos indicados en la Fig. 36G (P1-P4). Observamos un enriquecimiento de aproximadamente 10 veces de las regiones P2 y P3, que contienen los sitios de reconocimiento de proteínas TCP, en las muestras inmunoprecipitadas con anti-GFP (Fig. 36G). Los fragmentos genómicos localizados corriente arriba (P1) o corriente abajo (P4) de estos motivos mostraron un enriquecimiento menor y no se detectó enriquecimiento del fragmento que permite amplificar una porción del gen *PP2A*, utilizado como control negativo (Fig. 36G). En el caso de *PRE6*, el posible sitio de unión de proteínas TCP (TGGGACC) se localiza 860 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (Fig. 36H). Cuando realizamos los ensayos de ChIP-qPCR sobre la región promotora de este gen, encontramos que la región que contiene la caja TCP (P2 en la Fig. 36H) y una región localizada corriente arriba (P1) fueron preferencialmente inmunoprecipitadas en comparación con la región P3, ubicada corriente abajo (Fig. 36H). Por otra parte, el fragmento del control negativo *PP2A* no mostró enriquecimiento (Fig. 36H). Tampoco observamos enriquecimiento de la región del promotor de *PRE1* que contiene un posible sitio de unión de proteínas TCP (GGGTCC), localizado unos 2000 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, en las muestras inmunoprecipitadas con anti-GFP (Fig. 36H). En conjunto, estos resultados indican que *HBI1* y *PRE6*, pero probablemente no *PRE1*, son blancos directos de TCP15. Dado que los niveles

de transcritos de estos genes no aumentan en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* cuando son cultivadas a 29°C, puede postularse que TCP15, y probablemente también TCP14, modulan las respuestas de elongación del hipocotilo frente a alta temperatura a través de la regulación en forma directa de la expresión de *HBI1* y *PRE6*, entre otros genes.

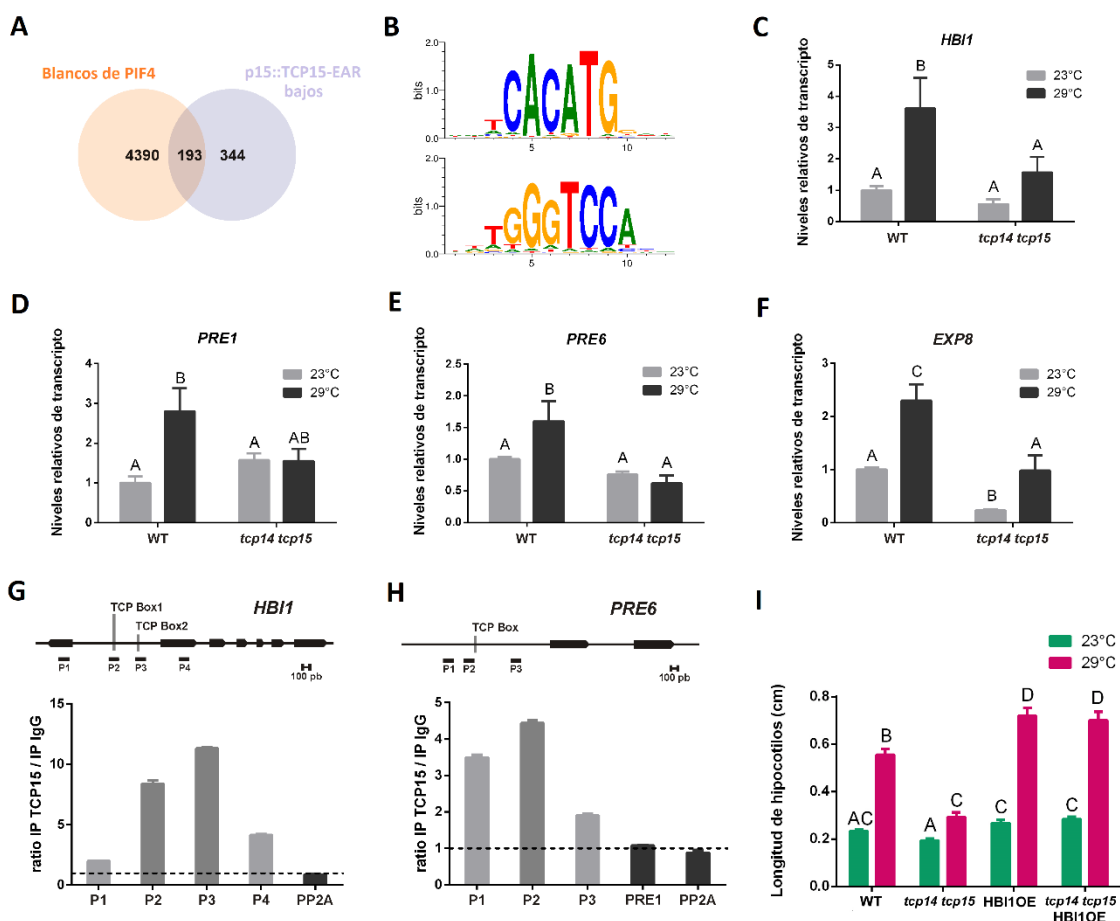


Figura 36. TCP15 regula de manera directa algunos genes blancos de PIF4 involucrados en la elongación celular. (A) Diagrama de Venn de los genes blancos de PIF4 y genes con expresión reducida en plantas que expresan una forma represora de *TCP15* bajo el control del promotor de *TCP15* (*p15::TCP15-EAR*). **(B)** Logo de secuencias enriquecidas en las regiones promotoras de los genes blancos de PIF4 con expresión reducida en las plantas *p15::TCP15-EAR*. Las secuencias enriquecidas se analizaron utilizando la herramienta RSAT (*Regulatory Sequence Analysis Tools*; <http://rsat.eead.csic.es/plants/>) en regiones ubicadas hasta 3 kpb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, evitando solapamiento con genes vecinos. **(C)** a **(F)** Niveles relativos de transcritos de los genes *HBI1* **(C)**, *PRE1* **(D)**, *PRE6* **(E)** y *EXP8* **(F)**, medidos por RT-qPCR, en plantas salvajes ecotipo Col-0 (WT) y *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) cultivadas a 23°C o 29°C. Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA). **(G)** y **(H)** Análisis de la unión de TCP15-GFP a los promotores de *HBI1* **(G)** y *PRE6* **(H)** por ChIP-qPCR. El gen *PP2A* se utilizó como control negativo. En la parte superior se muestran esquemas de los genes *HBI1* y *PRE6* con la ubicación de los fragmentos amplificados y los posibles sitios de unión de proteínas TCP. Se muestran los datos de promedio \pm SD de dos réplicas técnicas. El experimento se repitió dos veces con resultados similares. **(I)** Longitud del hipocotilo de plantas salvajes (WT), mutantes *tcp14-4 tcp15-3* (*tcp14 tcp15*) y líneas de estas plantas que expresan *HBI1* bajo el control del promotor *35SCaMV* (*HBI1OE*), cultivadas a 23°C o a 29°C ($n = 15$). Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA).

HBI1 codifica un factor de transcripción bHLH que modula de manera directa la expresión de genes involucrados en la expansión celular y es un punto de convergencia de vías regulatorias relacionadas con el crecimiento [154][236]. Para evaluar en qué medida la incapacidad de elongar el hipocotilo que presentan las mutantes en *TCP14* y *TCP15* se debe a la expresión reducida de *HBI1*, decidimos analizar el fenotipo de plantas dobles mutantes que sobreexpresen este factor de transcripción. Para llevar esto a cabo, se transformaron plantas salvajes y *tcp14-4 tcp15-3* con la construcción *35S::HBI1*. A partir de las líneas transformantes obtenidas, se seleccionaron aquellas que presentaban niveles similares de transcripto de *HBI1* para los ensayos subsiguientes (ANEXO II). Como se observa en la Figura 36I, la sobreexpresión de *HBI1* anula las diferencias en la longitud del hipocotilo entre las plantas salvajes y las mutantes cultivadas a 29°C. Esto indica que la deficiencia en la expresión de *HBI1* es un factor importante que condiciona la respuesta de los hipocotilos de las mutantes en *TCP14* y *TCP15* a un aumento de la temperatura.

7.3.4.3. Las proteínas TCP serían requeridas para una unión efectiva de PIF4 a los promotores de *GA2Ox1* y *HBI1*.

Asumiendo que existe un grupo de genes que son regulados en común por *TCP15* y *PIF4*, consideramos la posibilidad de que estos factores de transcripción interactúen con regiones cercanas en los promotores de estos genes. De acuerdo con esta idea, observamos que existe una correlación positiva entre la localización de los motivos de unión de las proteínas TCP y la de los sitios de unión de *PIF4* a lo largo de los promotores de los genes blancos de *PIF4* que tienen expresión reducida en las plantas *p15::TCP15-EAR* (Fig. 37A y ANEXO VIII). De hecho, en un 40% de los casos los motivos de unión de las proteínas TCP están ubicados a menos de 100 pb de los sitios de unión de *PIF4* (Fig. 37B). De manera complementaria, analizamos las secuencias enriquecidas en las regiones de unión de *PIF4* reportadas a partir de un experimento de *ChIP-seq* realizado por Oh y col. [147]. En este caso, también encontramos enriquecimiento en una secuencia relacionada con el sitio de unión para factores de transcripción de la familia TCP (Fig. 37C), además de la secuencia CACGTG, reportada previamente para *PIF4* [147]. Asimismo, un análisis de la distribución de estas dos secuencias indicó que están mayoritariamente presentes a muy corta distancia de los picos de unión de *PIF4* determinados por *ChIP-Seq* (Fig. 37D). Todo esto indicaría que *TCP15*, y/u otras proteínas TCP, se unirían en regiones muy cercanas a las que se une *PIF4* en determinados promotores, quizás evidenciando una relación funcional entre estas dos proteínas.

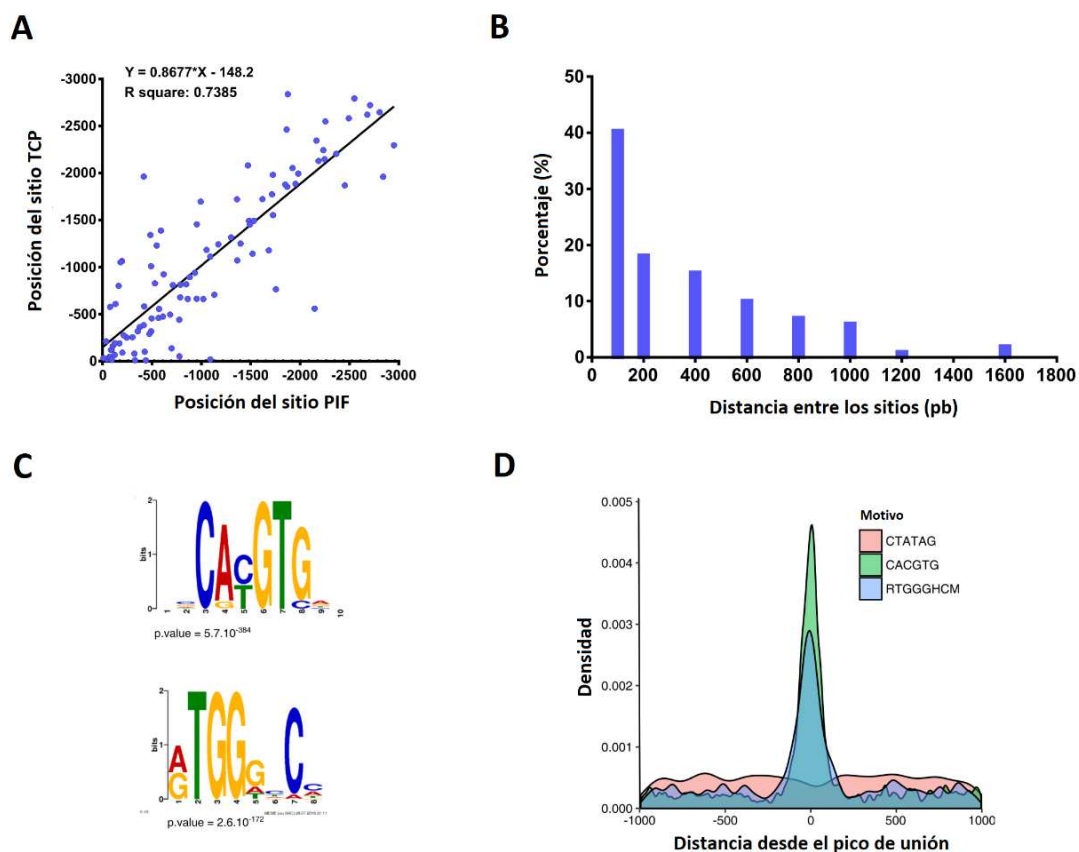


Figura 37. Las secuencias consenso para las proteínas TCP se encuentran cerca de los sitios de unión de PIF4. (A) Gráfico que muestra la posición de los motivos de unión de proteínas TCP y PIF4 en los promotores de los genes blancos de PIF4 con expresión reducida en plantas *p15::TCP15-EAR*. Los números indican la ubicación relativa al sitio de inicio de la transcripción. En los casos en donde había más de un sitio de unión para los factores de transcripción TCP y/o PIF4 se consideraron los más cercanos entre sí. **(B)** Histograma de las distancias entre las secuencias consenso de unión para PIF4 y proteínas TCP en los promotores de los genes blancos de PIF4 con expresión reducida en plantas *p15::TCP15-EAR*. **(C)** Secuencias enriquecidas en las regiones de unión de PIF4 determinadas experimentalmente [147]. Las regiones de unión de PIF4 [237] se utilizaron para realizar un análisis de las secuencias enriquecidas usando MEME-ChIP [238]. **(D)** Frecuencia relativa de las secuencias consenso mostradas en **(C)** a diferentes distancias de los picos de unión de PIF4. Se extrajeron de TAIR (TAIR9; <http://www.arabidopsis.org>) regiones del genoma de Arabidopsis localizadas 1000 pb corriente arriba y corriente abajo de los respectivos picos de unión de PIF4. Los motivos se mapearon usando el paquete Biostring y la densidad se graficó usando el paquete ggplot. La secuencia CTATAG, que no mostró enriquecimiento, se utilizó como control negativo.

Considerando todo esto, nos planteamos la hipótesis de que las proteínas TCP serían requeridas para una unión efectiva de PIF4 a estos promotores. Con esto en mente, realizamos un ensayo de ChIP-qPCR para analizar la unión de PIF4 a las regiones de los promotores de *HBI1* y *GA20ox1* que mostraban un pico de unión de PIF4 y que contenían un sitio de unión de proteínas TCP cercano al mismo (Fig. 38A). Elegimos estos dos genes, ya que demostramos que TCP15 se une a sus promotores en las regiones que contienen los sitios TCP. Además, el promotor de *HBI1* contiene un sitio de reconocimiento de PIF4 cercano al pico de unión del

mismo, pero esto no pasa con el promotor de *GA20ox1*, en el que no hallamos una secuencia consenso para PIF4 cercana a la zona de unión observada mediante CHIP-seq (Fig. 38A). Utilizamos plantas con expresión reducida de varias proteínas TCP de clase I (*tcp14-4 tcp15-3 amiR*, que expresan un micro ARN artificial dirigido contra *TCP8* y *TCP22*; [195]) y plantas salvajes cultivadas durante 15 días a 29°C y analizamos el enriquecimiento obtenido al inmunoprecipitar la cromatina con anticuerpos anti-PIF4. Observamos que las regiones analizadas, llamadas P2, fueron inmunoprecipitadas más eficientemente con anticuerpos anti-PIF4 a partir de extractos nucleares de plantas salvajes en comparación con los de plantas *tcp14-4 tcp15-3 amiR* (Fig. 38B). Por otra parte, no observamos diferencias en el enriquecimiento de otra región del promotor de *GA20ox1* (P3) o de *PP2A*, utilizados como controles negativos (Fig. 38B). En paralelo, realizamos ensayos de Western Blot a fin de analizar los niveles de PIF4 en las plantas *tcp14-4 tcp15-3 amiR*. Este ensayo de Western Blot se realizó con extractos nucleares de plantas salvajes y mutantes *tcp14-4 tcp15-3 amiR* cultivadas durante 15 días a 29°C, es decir, en las mismas condiciones en las que se analizó la unión de PIF4 a los promotores. No observamos diferencias significativas en los niveles de PIF4 entre plantas *tcp14-4 tcp15-3 amiR* y plantas salvajes (Fig. 38C). Esto sugiere que la menor unión de PIF4 a las regiones promotoras en las plantas mutantes se debería a que las proteínas TCP de clase I son necesarias para la unión eficaz de PIF4 a estas regiones y no a una diferencia en los niveles de PIF4.

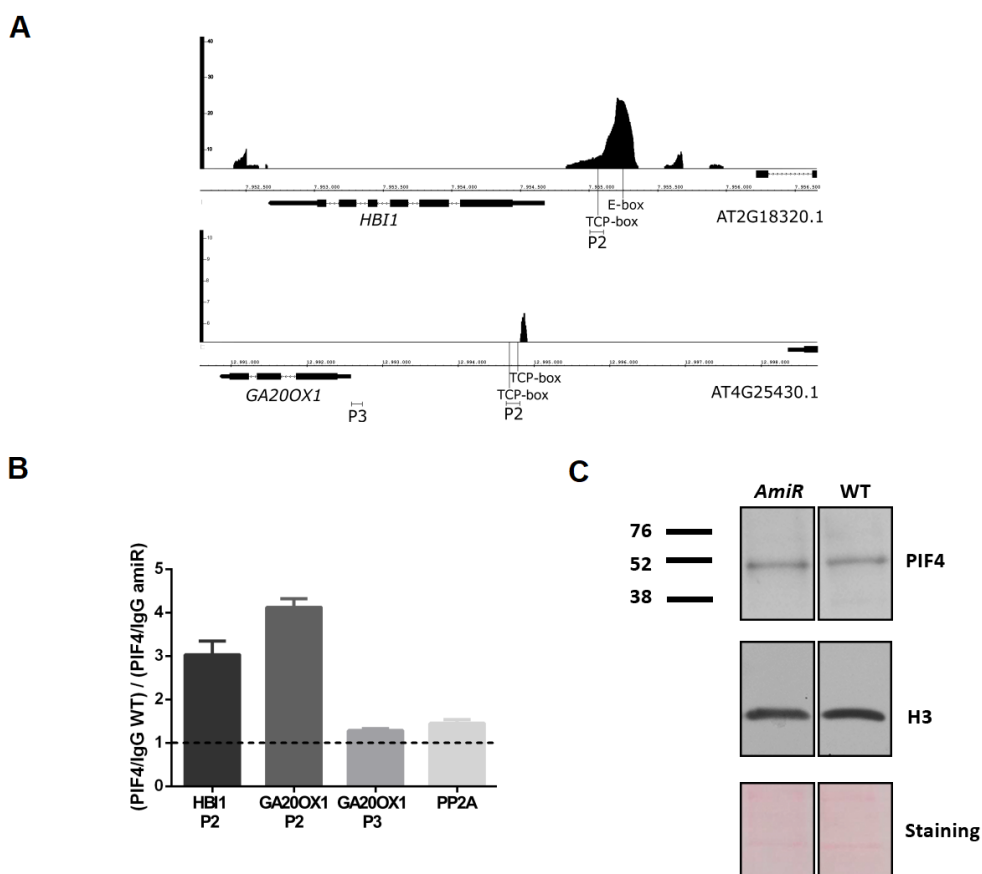


Figura 38. Interacción funcional entre PIF4 y TCP15. (A, B) Análisis de la unión de PIF4 a los promotores de *HBI1* y *GA20ox1* mediante ChIP-qPCR en plantas salvajes (WT) y *tcp14-4 tcp15-3 amiR* (*AmiR*). Se ensayó la unión de PIF4 a las regiones genómicas de *HBI1* y *GA20ox1* que contienen motivos de unión a proteínas TCP (P2) utilizando anticuerpos anti-PIF4. Una región proximal del promotor de *GA20ox1* (P3) y el gen *PP2A* se utilizaron como controles negativos. (A) Esquema de los genes *HBI1* y *GA20ox1*, con la ubicación de los fragmentos analizados, los sitios de unión de proteínas TCP (TCP-box) y de PIF4 (E-box) y los picos de unión de PIF4 [147]. (B) Enriquecimiento relativo observado al utilizar el anticuerpo anti-PIF4 en plantas salvajes respecto de plantas *tcp14-4 tcp15-3 amiR*. (C) Análisis mediante Western blot de los niveles de PIF4 en plantas WT y *tcp14-4 tcp15-3 amiR*. Anticuerpos contra la histona H3 y una tinción con rojo Ponceau se utilizaron como controles de carga. Todas las imágenes son del mismo ensayo y corresponden a una misma corrida electroforética.

7.3.4.4. TCP15 y PIF4 forman complejos proteína-proteína

El hallazgo de la existencia de posibles sitios de unión de proteínas TCP cercanos a las regiones en las que se une PIF4 en una fracción significativa de genes, sumado a la evidencia de que las proteínas TCP serían importantes para la unión eficiente de PIF4 a los promotores de algunos de estos genes, nos llevó a pensar que estas proteínas podrían formar complejos proteicos e interactuar a través de éstos con el ADN para regular la expresión de sus genes blancos. Para determinar si PIF4 es capaz de interactuar físicamente con TCP15, realizamos ensayos de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (o BiFC por sus siglas en inglés, [239]) en plantas de *N. benthamiana*. Como se describe en *Materiales y Métodos*, esta técnica consiste en expresar en plantas de manera transitoria fusiones traduccionales de las proteínas

en estudio con las porciones N-terminal y C-terminal de una proteína fluorescente. En caso de que las proteínas en estudio interactúen entre sí, acercando las dos mitades de la proteína fluorescente, se restaura la fluorescencia [239]. En nuestro ensayo, utilizamos fusiones en el extremo C-terminal de las proteínas PIF4 y TCP15 a las porciones N- o C-terminales de la proteína fluorescente mCitrina. Como se muestra en la Fig. 39A, observamos fluorescencia de mCitrina en las células de hojas de *N. benthamiana* que fueron cotransformadas con las construcciones que expresan TCP15 y PIF4. Más específicamente, la fluorescencia se observó en corpúsculos ubicados dentro de los núcleos de las células. También observamos reconstitución de la fluorescencia en corpúsculos en los núcleos de células coinfiltradas con las construcciones que permiten expresar a PIF4 fusionada a ambas porciones de la mCitrina (Fig. 39A), lo que refleja la capacidad de PIF4 de formar homodímeros. Esta localización de PIF4 en corpúsculos dentro del núcleo ha sido reportada en trabajos anteriores [149]. Para TCP15, la coinfiltración con construcciones que permiten expresar a TCP15 fusionada a las porciones N- y C-terminal de la mCitrina permitió observar que los homodímeros que forma esta proteína se localizan de manera uniforme en todo el nucleoplasma (Fig. 39A). En contraste con estas observaciones, detectamos baja señal de fluorescencia cuando coinfiltramos las construcciones que expresan PIF4 o TCP15 junto con construcciones que permiten expresar a HaHB11 fusionada a las porciones N- o C-terminal de la mCitrina. HaHB11 es un factor de transcripción de girasol que pertenece a la familia HD-Zip [240] y que no está relacionado funcionalmente con PIF4 o TCP15, por lo que fue utilizado como control negativo (Fig. 39A). En conjunto, este experimento permite concluir que TCP15 y PIF4 forman complejos proteína-proteína *in vivo* al ser expresados en células de *N. benthamiana*. Dichos complejos parecen localizarse en corpúsculos dentro de los núcleos celulares, lugares de localización de PIF4.

También analizamos la capacidad de interacción entre TCP15 y PIF4 mediante ensayos de doble híbrido en levaduras. Como se ha explicado en detalle en *Materiales y Métodos*, la utilización del sistema de doble híbrido en levaduras permite determinar, o comprobar, la interacción entre dos proteínas, a través de la detección de la activación transcripcional de un gen reportero. GAL4 es un factor de transcripción que regula la expresión de las enzimas del metabolismo de la galactosa en levaduras [241]. Esta proteína juega un rol central y, como otros activadores transcripcionales, es una proteína modular que posee tanto un dominio de unión al ADN (BD) como un dominio de activación de la transcripción (AD). Ambos dominios son funcionales en forma separada, pero la activación de la expresión se dará sólo si los dos dominios se hallan próximos uno del otro. De esta manera, las proteínas para las cuales se desea evaluar su capacidad de interacción se expresan como proteínas de fusión a los dominios AD y BD de

GAL4 en una cepa apropiada que contiene un promotor con la secuencia reconocida por el BD de GAL4 dirigiendo la expresión de un gen reportero. Así, si hay interacción entre las proteínas, se produce el reclutamiento del dominio AD al promotor y la consecuente inducción del gen reportero. En este caso, las levaduras con las construcciones reporteras fueron transformadas con ADN de los clones TCP15-pGADT7 (TCP15-AD) y PIF4-pGBKT7 (PIF4-BD), que permiten expresar las proteínas de interés fusionadas al AD y BD de GAL4, respectivamente. Cuando se analizó la expresión del gen reportero *LacZ*, que codifica la enzima β -galactosidasa, en las levaduras transformadas con los clones TCP15-AD y PIF4-BD se observó un aumento significativo de la actividad de esta enzima en comparación con los observados en los controles negativos transformados con una sola de las construcciones y el vector complementario vacío (TCP15-AD + BD o AD + PIF4-BD) (Fig. 39B). Esto indica la existencia de interacciones proteína-proteína entre TCP15 y PIF4 en levaduras. Este resultado se revalidó en ensayos de crecimiento empleando los genes *HIS3* y *URA2* como reporteros. La inducción de estos genes permite a las levaduras crecer en medios que no contienen histidina (*HIS3*) o uracilo (*URA2*). Observamos que las levaduras transformadas con las construcciones TCP15-AD y PIF4-BD, pero no las transformadas con los controles negativos, adquirieron la capacidad de crecer en medios de cultivo carentes de histidina o de uracilo (Fig. 39C). En el caso del medio sin histidina se adicionó el reactivo 3-aminotriazol (3AT), a una concentración de 10 mM, al medio de cultivo. Este es un inhibidor de la enzima codificada por el gen *HIS3* y es habitualmente utilizado ya que bajos niveles de esta enzima, como los que suelen estar presente en los controles negativos, son suficiente para permitir el crecimiento de las levaduras en ausencia del aminoácido. El crecimiento de las levaduras transformadas con las construcciones TCP15-AD y PIF4-BD en presencia de 3AT indica que los niveles de expresión del gen *HIS3* eran superiores a los observados en los controles negativos. En consecuencia, los resultados obtenidos mediante el análisis de los tres genes reporteros evidencian que TCP15 y PIF4 interactúan al ser expresadas en levaduras.

Los resultados descritos en esta sección sugieren, entonces, que PIF4 y las proteínas TCP de clase I interactúan entre sí para modular de manera conjunta la expresión de un grupo de genes en respuesta a altas temperaturas. Las proteínas TCP serían necesarias para una eficiente unión de PIF4 a algunos genes blancos, probablemente mediante la unión en sitios cercanos a los reconocidos por PIF4 en los promotores de estos genes. Considerando que PIF4 es un regulador central en la respuesta de las plantas a altas temperaturas, el papel de las proteínas TCP, que están bajo la regulación de PIF4, podría ser reforzar la actividad de este factor de transcripción.

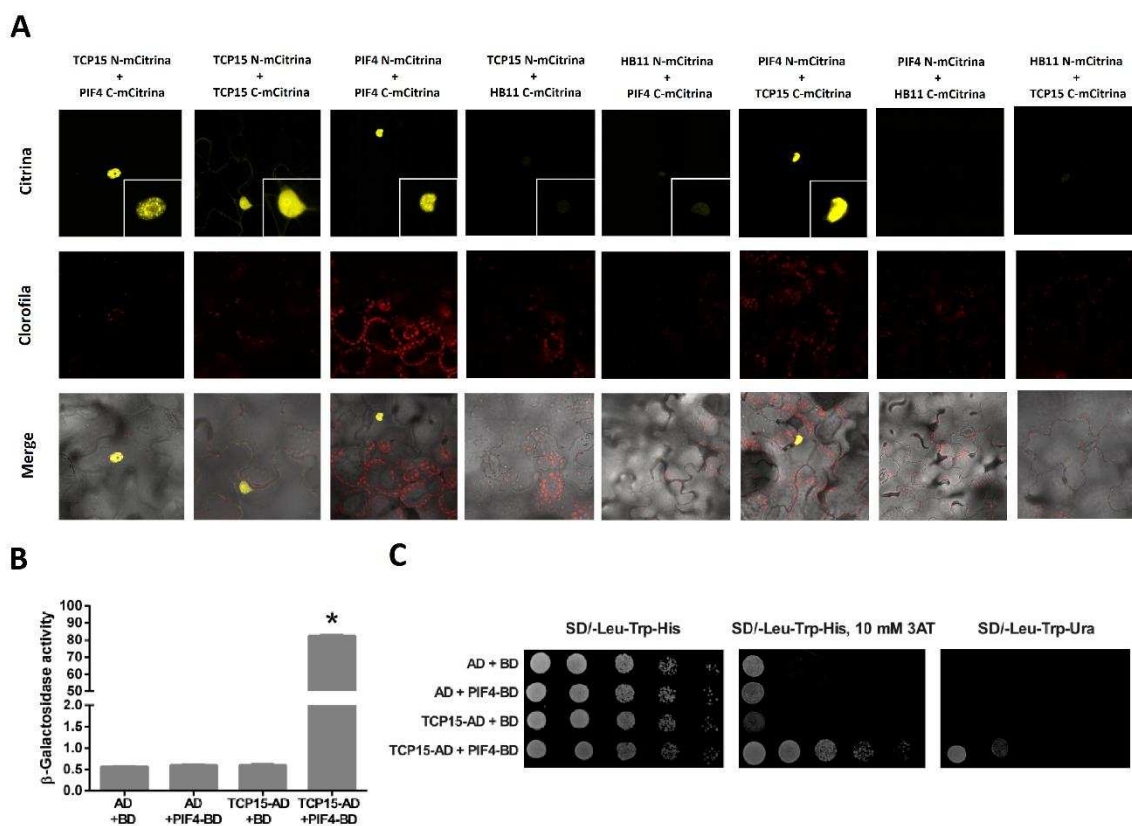


Figura 39. Análisis de la interacción entre PIF4 y TCP15. (A) Análisis de la interacción entre TCP15 y PIF4 *in vivo* en plantas mediante un ensayo de BiFC. El primer par de hojas de plantas de *N. benthamiana* se infiltró con las construcciones indicadas en la parte superior. Luego de 3 días se analizó, mediante microscopía confocal, la fluorescencia de mCitrina (paneles superiores) y de clorofila (paneles centrales). Los paneles inferiores (Merge) muestran imágenes combinadas de campo claro, fluorescencia de mCitrina y fluorescencia de clorofila. Las imágenes son representativas de al menos 20 imágenes analizadas en 4-5 hojas diferentes. **(B, C)** Análisis de la interacción entre PIF4 y TCP15 mediante un ensayo de doble híbrido en levaduras. Las fusiones de PIF4 al dominio de unión al ADN de GAL4 (PIF4-BD) y de TCP15 al dominio de activación de GAL4 (TCP15-AD) se expresaron en una cepa de levadura que contiene los genes reporteros *LacZ*, *HIS3* y *URA3* bajo el control de promotores con sitios de unión para GAL4. La activación de estos reporteros se analizó mediante la medición de la actividad de la β -galactosidasa **(B)** y la capacidad de los diferentes clones de levadura de crecer en medios de cultivo que carecen de histidina en presencia de 3AT o de uracilo **(C)**. Como controles, se utilizaron las construcciones que expresan solamente los dominios de activación o de unión al ADN de GAL4 (AD y BD, respectivamente).

DISCUSIÓN DE
RESULTADOS Y
CONCLUSIONES

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

8.1. Las proteínas TCP de clase I están involucradas en procesos de elongación celular en respuesta a estímulos externos como luz y temperatura

Es sabido que luego de un aumento en la temperatura ambiente por sobre los valores óptimos, las plantas responden modificando su arquitectura. Entre los fenotipos más característicos de termomorfogénesis podemos mencionar el incremento en la elongación de los pecíolos de las hojas y de los hipocotilos [88]. Este proceso sería importante para alejar el meristema y las hojas del suelo y así minimizar el calentamiento de la planta. Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis demostramos que las plantas mutantes en los genes que codifican los factores de transcripción TCP de clase I TCP14 y TCP15 tienen una respuesta deficiente a altas temperaturas en cuanto a la elongación de los pecíolos y de los hipocotilos. Además, estas plantas tienen afectado el desarrollo de la lámina de las hojas en estas condiciones, cosa que no ocurre en las plantas salvajes. Observamos, particularmente, que la elongación de los pecíolos está afectada en la mutante doble *tcp14-4 tcp15-3* también cuando crece a 23°C, lo que indica que TCP14 y TCP15 están involucradas en modular este proceso también bajo condiciones normales de temperatura. Las diferencias con las plantas salvajes se incrementan a 29°C y, en este caso, se puede observar un crecimiento deficiente en la mutante simple *tcp15-3*, que muestra pecíolos normales a 23°C. En hipocotilos, observamos una elongación similar o levemente menor a 23°C en las mutantes dobles, dependiendo del experimento, pero en todos los casos observamos hipocotilos significativamente más cortos cuando estas plantas crecieron a 29°C. Algo similar observamos cuando analizamos el crecimiento de las mutantes simples *tcp14-4* y *tcp15-3* y la mutante doble en oscuridad. Estos resultados indican que las proteínas TCP participan en procesos que involucran la expansión celular.

Se ha reportado que existe un alto grado de redundancia funcional entre los genes que codifican distintas proteínas TCP de clase I [175][204]. En base a esto, podríamos especular que otras proteínas TCP de clase I reemplazarían de manera parcial o total a TCP14 y TCP15 en la promoción de la elongación del hipocotilo y de los pecíolos a temperatura ambiente normal o bajo condiciones de luz normal. El papel de estas dos proteínas sería más importante a 29°C y en oscuridad. Es decir que la importancia de estas proteínas TCP podría ser revelada preferentemente bajo condiciones que inducen el crecimiento. Por ejemplo, notamos que la mutante doble *tcp14-4 tcp15-3* también muestra deficiencia en la elongación del hipocotilo en respuesta a otros estímulos que inducen la elongación, como la sobreexpresión de *PIF4* y

tratamientos con hormonas, aún a 23°C. Se puede postular que, más allá del proceso de termomorfogénesis estudiado en este trabajo de Tesis, las proteínas TCP de clase I participarían en forma general en respuestas que involucran el aumento de la elongación celular. Sin embargo, de acuerdo a las vías de señalización involucradas en cada caso, los mecanismos de acción de las proteínas TCP podrían no ser idénticos.

8.2. TCP14 y TCP15 son blancos directos de PIF4 y modulan la expresión de genes relacionados con el crecimiento en alta temperatura

Los defectos en el desarrollo que presentan las plantas mutantes *tcp14-4 tcp15-3* serían consecuencia de una inducción deficiente de la expresión de genes involucrados en la estimulación de la elongación celular, como los genes *SAUR*, *EXP*, *PRE* y *HBI1*, entre otros. La mayoría de estos genes muestran expresión normal en las plantas *tcp14-4 tcp15-3* a 23°C, pero no se inducen de manera apropiada luego de un incremento en la temperatura. Notablemente, muchos de estos genes, como otros genes relacionados con el crecimiento, muestran una expresión reducida en plantas *p15::TCP15-EAR* a 23°C. Como estas plantas expresan una versión dominante negativa de TCP15, podemos pensar que estos genes ya están bajo el control de TCP15 y/u otras proteínas TCP de clase I relacionadas a 23°C, pero no ocurren cambios en su expresión en las mutantes dobles a 23°C por la redundancia funcional de esta familia de proteínas. De todos modos, si bien las proteínas TCP de clase I actúan para regular el crecimiento bajo diferentes condiciones, nuestros análisis indican que TCP14 y TCP15 tendrían un papel particularmente relevante durante la respuesta a alta temperatura. De acuerdo con esto, ambos genes *TCP* son inducidos por alta temperatura y esta inducción requiere de la acción de PIF4, un regulador central de la respuesta de plantas a estas condiciones.

Mediante un análisis de un experimento de CHIP-Seq de PIF4 realizado por Oh y col. [147] se evidenció que *TCP14* y *TCP15* serían blancos directos de este factor de transcripción. Esto refuerza la idea de que estos genes *TCP* están bajo la regulación de PIF4. Por otra parte, mientras que algunos datos de transcriptoma sugieren que *TCP15* sería regulado de manera positiva por PIF4 y otras proteínas PIF [84][147], se ha observado una regulación negativa para *TCP14* en un estudio global de la expresión en respuesta a cambios en las condiciones lumínicas de mutantes *pifq*, deficientes en cuatro proteínas PIF diferentes, entre ellas PIF4 [84]. Este resultado, en principio, es contradictorio con los resultados aquí obtenidos que sugieren que PIF4 induce la expresión de *TCP14*. Una posibilidad es que *TCP14* sea regulado de manera diferente por distintos factores PIF y/o que la regulación no sea la misma en respuesta a la

temperatura y a las condiciones de iluminación. Se deberán realizar más estudios para analizar esto. De todos modos, nuestros estudios de expresión indican que ambos genes *TCP* son inducidos por PIF4 y que éste es requerido para la inducción de los mismos por calor, lo que está de acuerdo con los fenotipos observados en las mutantes. Sumado a esto, *TCP14* y *TCP15* son requeridas para dar lugar a una respuesta completa de elongación en plantas que sobreexpresan *PIF4*. Basándonos en toda esta información, podemos sugerir que *TCP14* y *TCP15* son blancos directos de PIF4 durante la respuesta a altas temperaturas. Como las mutantes dobles *tcp14-4 tcp15-3* responden a la sobreexpresión de *PIF4*, aunque no en los mismos niveles de las plantas salvajes, podemos concluir que las proteínas TCP afectan sólo una porción de las respuestas que dependen de PIF4 o que, aunque importantes, no son esenciales para el accionar de PIF4.

8.3. La homeostasis de auxinas no está afectada en plantas mutantes en *TCP14* y *TCP15*

Uno de los blancos directos del accionar de PIF4 durante la respuesta a altas temperaturas es el gen de biosíntesis de auxinas *YUC8* [128]. Esto causa un aumento en las auxinas endógenas con la consecuente activación de los factores de transcripción ARF y la inducción de genes de respuesta a auxinas involucrados en la elongación celular. Sumado a esto, dos reportes recientes implican a proteínas TCP de clase II del clado CIN en la regulación de la expresión de genes de biosíntesis de auxinas durante la elongación de hipocotilos bajo condiciones de luz normal [199] y sombra [200]. Nuestros resultados indican que la función de las proteínas TCP de clase I bajo estudio no está relacionada con cambios en la biosíntesis de auxinas, ya que los niveles de expresión de *YUC8* y del gen reportero de auxinas *DR5::GUS* no están afectados en las mutantes correspondientes, en las que incluso se observa una respuesta exacerbada de estos genes frente a un aumento en la temperatura. Esto refuerza la idea de que las proteínas TCP de clase I afectan sólo un conjunto de las respuestas que dependen de PIF4 y además diferencia el accionar de las proteínas TCP de clase I de las de clase II, ya que estas últimas sí regulan la biosíntesis de auxinas [199][200]. Dos trabajos muy recientes, incluso, indicaron que las proteínas TCP de clase II *TCP5*, *TCP13* y *TCP17* participan en la inducción del gen *YUC8* por alta temperatura en conjunto con PIF4 [242][243]. Se deberán estudiar en más detalle los mecanismos moleculares que explican este comportamiento diferencial entre proteínas de ambas clases.

Si bien la biosíntesis de auxinas no parece estar afectada en las mutantes en *TCP14* y *TCP15*, la inducción de algunos genes de respuesta a auxinas, como los genes *SAUR*, importantes frente a un aumento de temperatura [88], es deficiente en estas mutantes. Esto implica que el

aumento en los niveles de auxinas que ocurre debido al aumento de la temperatura no es suficiente para una inducción adecuada de algunos genes *SAUR*, y que las proteínas TCP son también requeridas para este proceso. Esto podría estar relacionado con que los genes *SAUR* serían blancos directos de las proteínas TCP [177][178] (Victoria Gastaldi, resultados no publicados). Estos genes *SAUR*, además, son blancos directos de PIF4 [147] y su activación completa requiere de PIF4, junto con auxinas [152]. Teniendo en cuenta esto, se puede postular que una correcta activación de los genes *SAUR* por alta temperatura necesitaría de la acción coordinada de las auxinas (que actuarían a través de los factores de transcripción ARF, que se unen directamente a los promotores de estos genes), PIF4 y proteínas TCP de clase I. Sumado a esto, PIF4 regularía la actividad de las proteínas ARF a través de la modificación de los niveles de auxinas y regularía *TCP14* y *TCP15* a nivel transcripcional. Esto reforzaría las respuestas de crecimiento a alta temperatura. Entonces, postulamos que las proteínas TCP de clase I regulan la expresión de genes relacionados con el crecimiento que responden a auxinas, sin afectar la homeostasis de auxinas. Se ha observado que PIF4 también puede estimular el crecimiento en ausencia de cambios en los niveles de auxinas bajo condiciones de luz azul limitante y de sombra persistente [244][245]. Esto indica que PIF4 puede estimular el crecimiento a través de vías dependientes e independientes de auxinas, probablemente porque PIF4 regula de manera directa muchos genes relacionados con el crecimiento. Un razonamiento similar sería aplicable a las proteínas TCP de clase I.

8.4. Las proteínas TCP de clase I forman parte de un bucle de retroalimentación positiva a altas temperaturas, integrándose así a la vía de las giberelinas

Las GA también participan en el crecimiento inducido por temperatura [146], probablemente actuando a dos niveles diferentes. Por un lado, controlan la cantidad de proteínas DELLA, las que inhiben la actividad de PIF4 a través de interacciones proteína-proteína [208]. Por otro lado, se observa una inducción de los genes de biosíntesis de GA *GA3ox1* y *GA20ox1* luego de un incremento de la temperatura [146]. La inducción de la biosíntesis de GA luego del aumento de la temperatura podría ser importante para permitir la activación de PIF4 a través de la degradación de las proteínas DELLA. Dado que la actividad de las proteínas TCP de clase I también es inhibida por las proteínas DELLA [195][196], el aumento en los niveles de GA también activaría a estas proteínas TCP. Un análisis de datos de expresión global sugiere que los genes *GA20ox1* y *GA3ox1* son modulados de manera positiva por las proteínas PIF [84][147][246][247]. Esto podría conformar un bucle regulatorio de retroalimentación positiva para activar de manera más robusta a PIF4 luego de un aumento de temperatura. Nosotros

demostramos durante este trabajo de Tesis que la inducción del gen *GA20ox1* por alta temperatura requiere de *TCP14* y *TCP15* y que, en concordancia con esto, las mutantes dobles tienen niveles aumentados de la proteína DELLA RGA. Además, los ensayos de ChIP-qPCR indicaron que *TCP15* se une al promotor de *GA20ox1*, lo que sugiere que la inducción de la biosíntesis de GA por un aumento de la temperatura se halla bajo control directo de las proteínas TCP. De acuerdo a esto, podríamos postular la existencia de un bucle regulatorio similar al propuesto en el caso de *PIF4* en el que participan las proteínas TCP de clase I.

8.5. La interacción entre *TCP15* y *PIF4* refuerza el accionar de *PIF4*, mejorando la unión de éste a los promotores de algunos de sus genes blanco

Las similitudes existentes entre las vías moleculares relacionadas con el accionar de *PIF4* y de *TCP15* se extienden a un grupo de genes que son regulados por estos factores de transcripción. En efecto, una proporción significativa de genes con expresión reducida en plantas *p15::TCP15-EAR* son blancos directos de *PIF4* y muchos de estos genes contienen sitios TCP en sus promotores, lo que sugiere que *PIF4* y las proteínas TCP podrían actuar en conjunto para regular la expresión los mismos. Esto se ve respaldado por el hecho de que *PIF4* y *TCP15* pueden interactuar entre sí *in vivo* en levaduras y en *N. benthamiana*. Además del caso de los genes *SAUR* que se discutió previamente, demostramos durante este trabajo de Tesis que al menos dos genes blancos de *PIF4* involucrados en la promoción de la elongación celular, *HBI1* y *PRE6* [154][236], son también blancos directos de *TCP15*. Esto sugiere que el accionar de estas proteínas durante la respuesta a altas temperaturas converge en la regulación directa de la expresión de genes que promueven el crecimiento, como los genes *SAUR*, *PRE6* y *HBI1*. Considerando que *PIF4* es el regulador central de la respuesta a altas temperaturas, el papel de las proteínas TCP, que están bajo el control de *PIF4*, podría ser reforzar la actividad de *PIF4* a través de una acción concertada. Esta hipótesis es respaldada por nuestros experimentos que demuestran que *PIF4* une a dos de sus genes blancos de manera menos eficiente en plantas que presentan niveles reducidos de expresión de varios genes *TCP* de clase I muy relacionados entre sí (como *TCP14*, *TCP15*, *TCP8* y *TCP22*, plantas *tcp14-4 tcp15-3 amiR*). La actividad reducida de *PIF4* en las plantas *tcp14-4 tcp15-3 amiR* podría ser causada por el aumento observado en los niveles de la proteína DELLA RGA, que inhibe a *PIF4*. En forma alternativa, la interacción con las proteínas TCP de clase I podría mejorar la unión de *PIF4* a ciertos sitios en los promotores de los genes estudiados. El hecho de que la sobreexpresión de *PIF4* en plántulas *tcp14 tcp15* no restaure completamente el crecimiento al nivel de las plantas salvajes concuerda más con la segunda hipótesis. Además, sólo algunos de los genes blancos de *PIF4* durante la respuesta a

alta temperatura son afectados por la acción de las proteínas TCP de clase I. El hecho de que los genes regulados de manera directa por PIF4 que también son regulados por TCP15 muestren un enriquecimiento de sitios de unión TCP en sus promotores sugiere que la interacción de TCP15 con estos genes podría promover la asociación más eficiente de PIF4. Además, la falta de un sitio canónico de reconocimiento de PIF4 en el promotor de *GA20ox1*, reconocido por PIF4 en forma más eficiente en presencia de las proteínas TCP, sugiere que la unión de PIF4 a algunos genes podría estar mediada por las proteínas TCP. Se requieren más estudios para analizar esto.

8.6. Las proteínas TCP de clase I podrían integrarse al módulo BAP

Nuestros experimentos indicaron que las plantas mutantes en *TCP14* y *TCP15* presentan una respuesta de crecimiento deficiente al ser tratadas con auxinas. Esto podría deberse a que las proteínas TCP son requeridas para la inducción de algunos genes de respuesta a auxinas, como *SAUR63*, por la hormona. Dado que la respuesta a auxinas depende de los factores de transcripción ARF [23][24], y especialmente de ARF6 y ARF8 en el caso del hipocotilo [152][248], se podría especular que las proteínas TCP son requeridas para la inducción de determinados genes de respuesta a auxinas por estos factores ARF. Como muchos de estos genes son blancos directos de ARF6 [152], se podría seguir un razonamiento similar al aplicado para PIF4, es decir que las proteínas TCP podrán facilitar la unión de ARF6 a los promotores de determinados genes.

Los BR también están involucrados en el crecimiento dependiente de temperatura [146]. Se reportó recientemente que estas hormonas participan corriente abajo de las auxinas a través del factor de transcripción BZR1 [151]. Tratamientos con brasinólido reestablecen la elongación de los hipocotilos de plantas mutantes *pif4-2* a altas temperaturas [151]. Nosotros observamos un efecto similar al de la sobreexpresión de *PIF4* cuando tratamos las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* con brasinólido, es decir un incremento en la elongación que no llegó a alcanzar los valores de las plantas salvajes. Esto indica que las proteínas TCP serían necesarias para una respuesta completa a BR. BZR1 media la respuesta dependiente de BR a altas temperaturas [151] y además interactúa con PIF4 con quien comparte un gran número de genes blanco [147]. Ambas proteínas, además, interactúan con ARF6, conformando lo que se denomina el módulo BAP, involucrado en la regulación de genes que promueven el crecimiento bajo diferentes condiciones [152]. Hemos observado que una proporción significativa de genes que son blancos comunes de PIF4, ARF6 y BZR1 tiene expresión reducida en las plantas *p15::TCP15-EAR*. Una pregunta pertinente, que requiere más estudio, es si TCP14 y TCP15 también se integran a este módulo bajo ciertas condiciones, más específicamente en respuesta a un aumento de la

temperatura del ambiente. En forma notoria, todos los componentes de este módulo, tal como las proteínas TCP de clase I, son inhibidos por proteínas DELLA [152].

8.7. Las proteínas TCP de clase I y de clase II regulan de manera directa distintos genes involucrados en la biosíntesis de hormonas durante la termomorfogénesis

Muy recientemente, se encontró que otras tres proteínas TCP (TCP5, TCP13 y TCP17), de clase II, participan en la termomorfogénesis asociadas a PIF4 [242][243]. Esto indica que proteínas TCP de ambas clases podrían ser requeridas para dar lugar a una eficiente respuesta a altas temperaturas, probablemente a través de la formación de complejos TCP-PIF4. De todas maneras, las proteínas de las clases I y II no parecerían tener funciones redundantes. Por un lado, las TCP de clase II son requeridas para la inducción eficiente del gen *YUC8* en respuesta a un aumento en la temperatura [242][243], mientras que las TCP de clase I muestran niveles de expresión normales o aún más altos de *YUC8* y tienen aumentada la expresión de un reportero de auxinas. Esto sugiere que las mutaciones en genes que codifican proteínas TCP de clase I bloquean el crecimiento en respuesta a alta temperatura corriente abajo de las auxinas. En concordancia con esto, la sobreexpresión de *HBI1*, que modula de manera directa genes de expansión celular, reestablece el crecimiento de las mutantes *tcp14-4 tcp15-3*. Además, las proteínas TCP de clase I regulan de manera directa el gen de biosíntesis de giberelinas *GA20ox1*, el cual es inducido cuando aumenta la temperatura. Así, se puede postular que las proteínas TCP de las clases I y II regulan de manera directa distintos genes involucrados en biosíntesis de hormonas para dar lugar a una respuesta robusta. La situación se complica aún más al analizar otro sistema en el que ocurre una estimulación del crecimiento, la apertura de los cotiledones en respuesta a la iluminación. Un trabajo muy reciente mostró que algunas proteínas TCP de clase II regulan negativamente la acción de PIF3 durante este proceso, compitiendo con éste por la unión a sus genes blanco [201]. Esto significa que incluso proteínas TCP de la misma clase pueden influir en forma antagónica sobre la acción de los factores de transcripción PIF. Las bases moleculares de estas diferencias aún no se han dilucidado.

En conclusión, nuestros resultados indican que las proteínas TCP de clase I TCP14 y TCP15 participan en respuestas de elongación frente a un aumento de la temperatura ambiente interactuando funcionalmente con PIF4 para modular la expresión de un conjunto de genes que son blancos directos de las mismas a altas temperaturas (Fig. 35). A su vez, *TCP14* y *TCP15* son blancos directos de PIF4 y las proteínas codificadas por estos genes serían necesarias para que

la interacción de PIF4 con algunos de sus genes blancos sea eficiente, probablemente a través de la unión a regiones cercanas en sus promotores. La interacción proteína-proteína que hemos reportado entre PIF4 y TCP15 también puede tener un papel en este proceso. Al igual que PIF4, las proteínas TCP también participarían en un bucle de retroalimentación positiva vinculado con la acción de GA a través de la inducción de genes de biosíntesis de GA en respuesta a altas temperaturas. Sin embargo, a diferencia de PIF4, no parecen participar en la inducción de los genes de biosíntesis de auxinas, sino que actúan más directamente en la regulación de los genes relacionados con el crecimiento y la expansión celular. Los resultados obtenidos resaltan la complejidad de las respuestas de las plantas a altas temperaturas y sugieren que se requiere la participación de varios actores que interactúan funcionalmente a diferentes niveles para obtener una respuesta robusta.

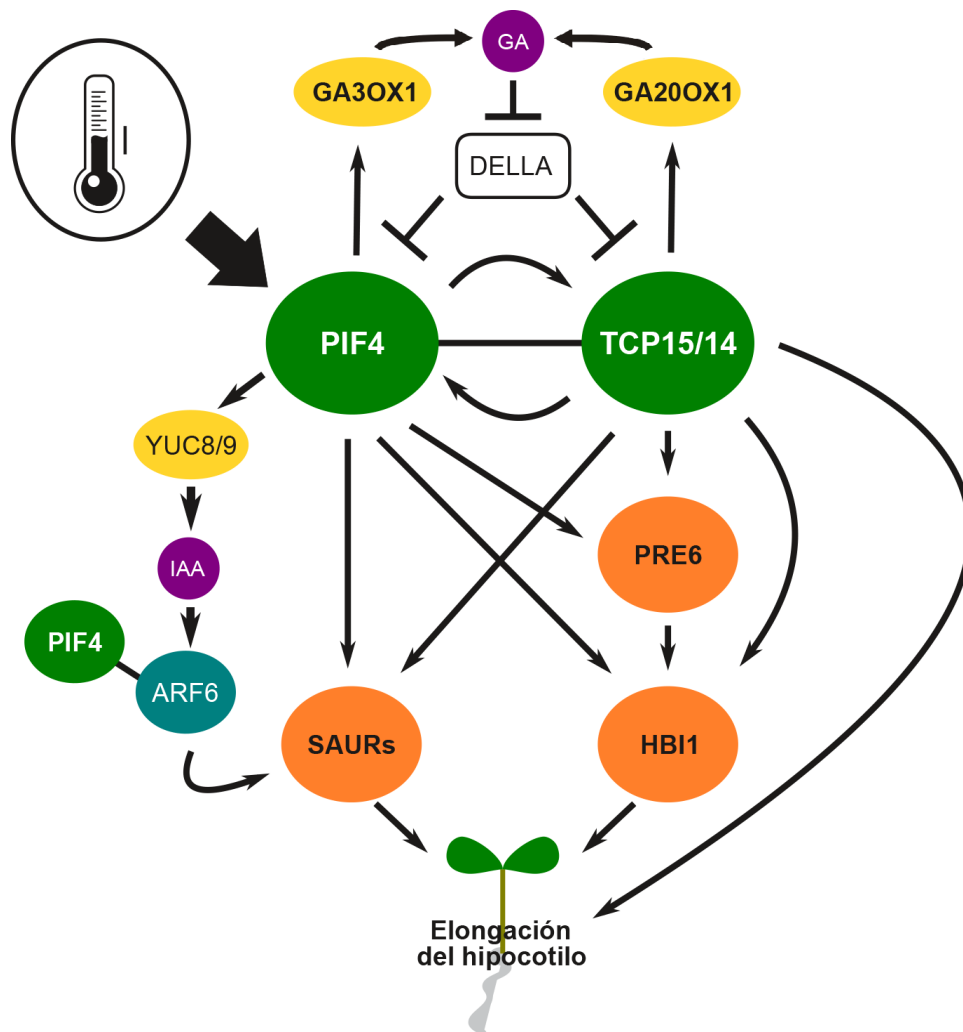


Figura 40. Esquema que muestra el papel de TCP14 y TCP15 durante el crecimiento en respuesta a un aumento en la temperatura ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] GC Ingram, R Waites (2006) Keeping it together: Co-ordinating plant growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9 (1):12–20.
- [2] DW Meinke, JM Cherry, C Dean, SD Rounsley, M Koornneef (1998) Arabidopsis thaliana: A model plant for genome analysis. *Science* 282 (5389):662, 679–82.
- [3] The Arabidopsis genome initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 408 (6814):796–815.
- [4] J DANGL (1993) The emergence of Arabidopsis thaliana as a model for plant-pathogen interactions, En: *Advances in plant pathology*, Springer. p. :127–156.
- [5] T Araki (2001) Transition from vegetative to reproductive phase. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4 (1):63–68.
- [6] M Blümel, N Dally, C Jung (2015) Flowering time regulation in crops-what did we learn from Arabidopsis? *Curr. Opin. Biotechnol.* 32 :121–129.
- [7] DC Boyes, AM Zayed, R Ascenzi, AJ McCaskill, NE Hoffman, KR Davis, J Görlach (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: A model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13 (7):1499–1510.
- [8] DR Smyth, JL Bowman, EM Meyerowitz (1990) Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* 2 (8):755–767.
- [9] U Krämer (2015) Planting molecular functions in an ecological context with Arabidopsis thaliana. *Elife* 4 :e06100.
- [10] S Philosoph-Hadas, H Friedman, S Meir (2005) Gravitropic Bending and Plant Hormones. *Vitam. Horm.* 72 :31–78.
- [11] M Quint, WM Gray (2006) Auxin signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9 (5):448–453.
- [12] WD Teale, IA Paponov, K Palme (2006) Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (11):847–859.
- [13] EJ Chapman, M Estelle (2009) Mechanism of Auxin-Regulated Gene Expression in Plants. *Annu. Rev. Genet.* 43 (1):265–285.
- [14] S Vanneste, J Friml (2009) Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell* 136

- (6):1005–1016.
- [15] Y Zhao (2014) Auxin Biosynthesis. *Arab. B.* 12 :e0173.
- [16] K Mockaitis, M Estelle (2008) Auxin Receptors and Plant Development: A New Signaling Paradigm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24 (1):55–80.
- [17] M Salehin, R Bagchi, M Estelle (2015) ScFTIR1/AFB-based auxin perception: Mechanism and role in plant growth and development. *Plant Cell* 27 (1):9–19.
- [18] H Szemenyei, M Hannon, JA Long (2008) TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science* 319 (5868):1384–1386.
- [19] J Luo, JJ Zhou, JZ Zhang (2018) Aux/IAA gene family in plants: Molecular structure, regulation, and function. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (1):pii: E259.
- [20] J Kim, K Harter, A Theologis (1997) Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (22):11786–11791.
- [21] TJ Guilfoyle, G Hagen (2012) Getting a grasp on domain III/IV responsible for Auxin Response Factor-IAA protein interactions. *Plant Sci.* 190 :82–88.
- [22] DR Boer, A Freire-Rios, WAM Van Den Berg, T Saaki, IW Manfield, S Kepinski, I López-Vidriero, JM Franco-Zorrilla, SC De Vries, R Solano, D Weijers, M Coll (2014) Structural basis for DNA binding specificity by the auxin-dependent ARF transcription factors. *Cell* 156 (3):577–589.
- [23] SB Li, ZZ Xie, CG Hu, JZ Zhang (2016) A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Front. Plant Sci.* 7 :47.
- [24] G Hagen, T Guilfoyle (2002) Auxin-responsive gene expression: Genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol. Biol.* 49 (3–4):373–385.
- [25] PE Staswick, B Serban, M Rowe, I Tiryaki, MT Maldonado, MC Maldonado, W Suza (2005) Characterization of an arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* 17 (2):616–627.
- [26] N Stortenbeker, M Bemer (2019) The SAUR gene family: The plant’s toolbox for adaptation of growth and development. *J. Exp. Bot.* 70 (1):17–27.
- [27] T Sun, F Gubler (2004) Molecular Mechanism of Gibberellin Signaling in Plants. *Annu.*

- Rev. Plant Biol.* 55 (1):197–223.
- [28] NP Harberd, E Belfield, Y Yasumura (2009) The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an “inhibitor of an inhibitor” enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* 21 (5):1328–1339.
- [29] LM Hartweck (2008) Gibberellin signaling. *Planta* 229 (1):1–13.
- [30] K Hirano, M Ueguchi-Tanaka, M Matsuoka (2008) GID1-mediated gibberellin signaling in plants. *Trends Plant Sci.* 13 (4):192–199.
- [31] T Sun (2008) Gibberellin Metabolism, Perception and Signaling Pathways in Arabidopsis. *Arab. B.* 6 :e0103.
- [32] I Rieu, S Eriksson, SJ Powers, F Gong, J Griffiths, L Woolley, R Benlloch, O Nilsson, SG Thomas, P Hedden, AL Phillips (2008) Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 20 (9):2420–2436.
- [33] P Hedden, AL Phillips (2000) Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci.* 5 (12):523–530.
- [34] P Hedden, SG Thomas (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* 444 (1):11–25.
- [35] M Ueguchi-Tanaka, M Ashikari, M Nakajima, H Itoh, E Katoh, M Kobayashi, TY Chow, YIC Hsing, H Kitano, I Yamaguchi, M Matsuoka (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437 (7059):693–698.
- [36] J Griffiths, K Murase, I Rieu, R Zentella, ZL Zhang, SJ Powers, F Gong, AL Phillips, P Hedden, TP Sun, SG Thomas (2006) Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* 18 (12):3399–3414.
- [37] M Ueguchi-Tanaka, M Nakajima, A Motoyuki, M Matsuoka (2007) Gibberellin Receptor and Its Role in Gibberellin Signaling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58 (1):183–198.
- [38] KE King, T Moritz, NP Harberd (2001) Gibberellins are not required for normal stem growth in Arabidopsis thaliana in the absence of GAI and RGA. *Genetics* 159 (2):767–776.
- [39] A Dill, TP Sun (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in Arabidopsis thaliana. *Genetics* 159 (2):777–785.

- [40] S Lee, H Cheng, KE King, W Wang, Y He, A Hussain, J Lo, NP Harberd, J Peng (2002) Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev.* 16 (5):646–658.
- [41] CK Wen, C Chang (2002) Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* 14 (1):87–100.
- [42] JM Davière, P Achard (2013) Gibberellin signaling in plants. *Dev.* 140 (6):1147–1151.
- [43] AL Silverstone, CN Ciampaglio, TP Sun (1998) The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* 10 (2):155–169.
- [44] AL Silverstone, HS Jung, A Dill, H Kawaide, Y Kamiya, TP Sun (2001) Repressing a repressor: Gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell* 13 (7):1555–1565.
- [45] J Peng, P Carol, DE Richards, KE King, RJ Cowling, GP Murphy, NP Harberd (1997) The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* 11 (23):3194–3205.
- [46] A Shimada, M Ueguchi-Tanaka, T Nakatsu, M Nakajima, Y Naoe, H Ohmiya, H Kato, M Matsuoka (2008) Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* 456 (7221):520–523.
- [47] K Murase, Y Hirano, TP Sun, T Hakoshima (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* 456 (7221):459–463.
- [48] A Sasaki, H Itoh, K Gomi, M Ueguchi-Tanaka, K Ishiyama, M Kobayashi, DH Jeong, G An, H Kitano, M Ashikari, M Matsuoka (2003) Accumulation of phosphorylated repressor for Gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* 299 (5614):1896–1898.
- [49] KM McGinnis, SG Thomas, JD Soule, LC Strader, JM Zale, TP Sun, CM Steber (2003) The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* 15 (5):1120–1130.
- [50] A Dill, SG Thomas, J Hu, CM Steber, TP Sun (2004) The arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* 16 (6):1392–1405.
- [51] ARG Plackett, SG Thomas, ZA Wilson, P Hedden (2011) Gibberellin control of stamen

- development: A fertile field. *Trends Plant Sci.* 16 (10):568–578.
- [52] Z-Y Wang, M-Y Bai, E Oh, J-Y Zhu (2012) Brassinosteroid Signaling Network and Regulation of Photomorphogenesis. *Annu. Rev. Genet.* 46 (1):701–724.
- [53] H Guo, L Li, M Aluru, S Aluru, Y Yin (2013) Mechanisms and networks for brassinosteroid regulated gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16 (5):545–553.
- [54] CJ Yang, C Zhang, YN Lu, JQ Jin, XL Wang (2011) The mechanisms of brassinosteroids' action: From signal transduction to plant development. *Mol. Plant* 4 (4):588–600.
- [55] Y Chung, S Choe (2013) The Regulation of Brassinosteroid Biosynthesis in Arabidopsis. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 32 (6):396–410.
- [56] J Li, J Chory (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90 (5):929–938.
- [57] ZY Wang, H Seto, S Fujioka, S Yoshida, J Chory (2001) BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 410 (6826):380–383.
- [58] KH Nam, J Li (2002) BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110 (2):203–212.
- [59] W Tang, TW Kim, JA Oses-Prieto, Y Sun, Z Deng, S Zhu, R Wang, AL Burlingame, ZY Wang (2008) BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in Arabidopsis. *Science* 321 (5888):557–560.
- [60] TW Kim, S Guan, AL Burlingame, ZY Wang (2011) The CDG1 Kinase Mediates Brassinosteroid Signal Transduction from BRI1 Receptor Kinase to BSU1 Phosphatase and GSK3-like Kinase BIN2. *Mol. Cell* 43 (4):561–571.
- [61] TW Kim, S Guan, Y Sun, Z Deng, W Tang, JX Shang, Y Sun, AL Burlingame, ZY Wang (2009) Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat. Cell Biol.* 11 (10):1254–1260.
- [62] JY Zhu, Y Li, DM Cao, H Yang, E Oh, Y Bi, S Zhu, ZY Wang (2017) The F-box Protein KIB1 Mediates Brassinosteroid-Induced Inactivation and Degradation of GSK3-like Kinases in Arabidopsis. *Mol. Cell* 66 (5):648–657.
- [63] W Tang, M Yuan, R Wang, Y Yang, C Wang, JA Oses-Prieto, TW Kim, HW Zhou, Z Deng, SS Gampala, JM Gendron, EM Jonassen, C Lillo, A DeLong, AL Burlingame, Y Sun, ZY Wang (2011) PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant

- growth by dephosphorylating BZR1. *Nat. Cell Biol.* 13 (2):124–131.
- [64] JX He, JM Gendron, Y Sun, SSL Gampala, N Gendron, CQ Sun, ZY Wang (2005) BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 307 (5715):1634–1638.
- [65] Y Yin, D Vafeados, Y Tao, S Yoshida, T Asami, J Chory (2005) A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis. *Cell* 120 (2):249–259.
- [66] QF Li, J Lu, JW Yu, CQ Zhang, JX He, QQ Liu (2018) The brassinosteroid-regulated transcription factors BZR1/BES1 function as a coordinator in multisignal-regulated plant growth. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1861 (6):561–571.
- [67] Y Jiao, OS Lau, XW Deng (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat. Rev. Genet.* 8 (3):217–230.
- [68] C Kami, S Lorrain, P Hornitschek, C Fankhauser (2010) Chapter 2 - Light-regulated plant growth and development, En: *Current Topics in Developmental Biology*, Elsevier. p. :29–66.
- [69] VC Galvão, C Fankhauser (2015) Sensing the light environment in plants: Photoreceptors and early signaling steps. *Curr. Opin. Neurobiol.* 34 :46–53.
- [70] MM Keller, Y Jaillais, U V. Pedmale, JE Moreno, J Chory, CL Ballaré (2011) Cryptochrome 1 and phytochrome B control shade-avoidance responses in Arabidopsis via partially independent hormonal cascades. *Plant J.* 67 (2):195–207.
- [71] WR Briggs, JM Christie (2002) Phototropins 1 and 2: Versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.* 7 (5):204–210.
- [72] DC Nelson, J Lasswell, LE Rogg, MA Cohen, B Bartel (2000) FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in Arabidopsis. *Cell* 101 (3):331–340.
- [73] DE Somers, TF Schultz, M Milnamow, SA Kay (2000) ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from Arabidopsis. *Cell* 101 (3):319–329.
- [74] TF Schultz, T Kiyosue, M Yanovsky, M Wada, SA Kay (2001) A role for LKP2 in the circadian clock of Arabidopsis. *Plant Cell* 13 (12):2659–2670.
- [75] L Rizzini, JJ Favory, C Cloix, D Faggionato, A O'Hara, E Kaiserli, R Baumeister, E Schäfer, F Nagy, GI Jenkins, R Ulm (2011) Perception of UV-B by the arabidopsis UVR8 protein.

- Science* 332 (6025):103–106.
- [76] JW Reed, A Nagatani, TD Elich, M Fagan, J Chory (1994) Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in Arabidopsis development. *Plant Physiol.* 104 (4):1139–1149.
- [77] M V. Arana, M Sánchez-Lamas, B Strasser, SE Ibarra, PD Cerdán, JF Botto, RA Sánchez (2014) Functional diversity of phytochrome family in the control of light and gibberellin-mediated germination in Arabidopsis. *Plant, Cell Environ.* 37 (9):2014–2023.
- [78] M Sánchez-Lamas, CD Lorenzo, PD Cerdán (2016) Bottom-up Assembly of the Phytochrome Network. *PLoS Genet.* 12 (11):e1006413.
- [79] EM Josse, KJ Halliday (2008) Skotomorphogenesis: The Dark Side of Light Signalling. *Curr. Biol.* 18 (24):1144–1146.
- [80] G Martin, P Leivar, D Ludevid, JM Tepperman, PH Quail, E Monte (2016) Phytochrome and retrograde signalling pathways converge to antagonistically regulate a light-induced transcriptional network. *Nat. Commun.* 7 :11431.
- [81] JL Nemhauser (2008) Dawning of a new era: photomorphogenesis as an integrated molecular network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11 (1):4–8.
- [82] S Zhong, H Shi, C Xue, N Wei, H Guo, XW Deng (2014) Ethylene-orchestrated circuitry coordinates a seedling's response to soil cover and etiolated growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (11):3913–3920.
- [83] P Leivar, E Monte (2014) PIFs: Systems Integrators in Plant Development. *Plant Cell* 26 (1):56–78.
- [84] P Leivar, JM Tepperman, E Monte, RH Calderon, TL Liu, PH Quail (2009) Definition of Early Transcriptional Circuitry Involved in Light-Induced Reversal of PIF-Imposed Repression of Photomorphogenesis in Young Arabidopsis Seedlings. *Plant Cell* 21 (11):3535–3553.
- [85] NC Rockwell, Y-S Su, JC Lagarias (2006) Phytochrome Structure and Signaling Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57 (1):837–858.
- [86] W Ni, SL Xu, JM Tepperman, DJ Stanley, DA Maltby, JD Gross, AL Burlingame, ZY Wang, PH Quail (2014) A mutually assured destruction mechanism attenuates light signaling in Arabidopsis. *Science* 344 (6188):1160–1164.

- [87] JE Erwin, RD Heins, MG Karlsson (1989) Thermomorphogenesis in *Lilium longiflorum*. *Am. J. Bot.* 76 (1):47.
- [88] M Quint, C Delker, KA Franklin, PA Wigge, KJ Halliday, M Van Zanten (2016) Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nat. Plants* 2 :15190.
- [89] PA Wigge (2013) Ambient temperature signalling in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16 (5):661–666.
- [90] AJ Crawford, DH McLachlan, AM Hetherington, KA Franklin (2012) High temperature exposure increases plant cooling capacity. *Curr. Biol.* 22 (10):R396-7.
- [91] OS Lau, Z Song, Z Zhou, KA Davies, J Chang, X Yang, S Wang, D Lucyshyn, IHZ Tay, PA Wigge, DC Bergmann (2018) Direct Control of SPEECHLESS by PIF4 in the High-Temperature Response of Stomatal Development. *Curr. Biol.* 28 (8):1273–1280.
- [92] T Hanzawa, K Shibasaki, T Numata, Y Kawamura, T Gaude, A Rahman (2013) Cellular auxin homeostasis under high temperature is regulated through a SORTING NEXIN1-dependent endosomal trafficking pathway. *Plant Cell* 25 (9):3424–3433.
- [93] X Yang, G Dong, K Palaniappan, G Mi, TI Baskin (2017) Temperature-compensated cell production rate and elongation zone length in the root of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 40 (2):264–276.
- [94] J Zhu, KX Zhang, WS Wang, W Gong, WC Liu, HG Chen, HH Xu, YT Lu (2015) Low temperature inhibits root growth by reducing auxin accumulation via ARR1/12. *Plant Cell Physiol.* 56 (4):727–736.
- [95] S Balasubramanian, S Sureshkumar, J Lempe, D Weigel (2006) Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genet.* 2 (7):0980–0989.
- [96] MA Blázquez, JH Ahn, D Weigel (2003) A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 33 (2):168–171.
- [97] KJ Halliday, MG Salter, E Thingnaes, GC Whitelam (2003) Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT. *Plant J.* 33 (5):875–885.
- [98] C Ibañez, Y Poeschl, T Peterson, J Bellstädt, K Denk, A Gogol-Döring, M Quint, C Delker (2017) Ambient temperature and genotype differentially affect developmental and

- phenotypic plasticity in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 17 (1):114.
- [99] LD Vu, X Xu, K Gevaert, I De Smet (2019) Developmental Plasticity at High Temperature. *Plant Physiol.* 181 (2):399–411.
- [100] JH Jung, M Domijan, C Klose, S Biswas, D Ezer, M Gao, AK Khattak, MS Box, V Charoensawan, S Cortijo, M Kumar, A Grant, JCW Locke, E Schäfer, KE Jaeger, PA Wigge (2016) Phytochromes function as thermosensors in *Arabidopsis*. *Science* 354 (6314):886–889.
- [101] M Legris, C Klose, ES Burgie, CC Rojas, M Neme, A Hiltbrunner, PA Wigge, E Schäfer, RD Vierstra, JJ Casal (2016) Phytochrome B integrates light and temperature signals in *Arabidopsis*. *Science* 354 (6314):897–900.
- [102] DP Fraser, S Hayes, KA Franklin (2016) Photoreceptor crosstalk in shade avoidance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33 :1–7.
- [103] Y Shen, R Khanna, CM Carle, PH Quail (2007) Phytochrome induces rapid PIF5 phosphorylation and degradation in response to red-light activation. *Plant Physiol.* 145 (3):1043–1051.
- [104] H Shen, L Zhu, A Castillon, M Majee, B Downie, E Huq (2008) Light-induced phosphorylation and degradation of the negative regulator phytochrome-interacting factor1 from *Arabidopsis* depend upon its direct physical interactions with photoactivated phytochromes. *Plant Cell* 20 (6):1586–1602.
- [105] S Lorrain, T Allen, PD Duek, GC Whitelam, C Fankhauser (2008) Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant J.* 53 (2):312–323.
- [106] C Klose, F Venezia, A Hussong, S Kircher, E Schäfer, C Fleck (2015) Systematic analysis of how phytochrome B dimerization determines its specificity. *Nat. Plants* 1 :15090.
- [107] M Legris, C Nieto, R Sellaro, S Prat, JJ Casal (2017) Perception and signalling of light and temperature cues in plants. *Plant J.* 90 (4):683–697.
- [108] JJ Casal, S Balasubramanian (2019) Thermomorphogenesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 70 (1):321–346.
- [109] MCG Proveniers, M Van Zanten (2013) High temperature acclimation through PIF4 signaling. *Trends Plant Sci.* 18 (2):59–64.

- [110] D Xu (2018) Multifaceted Roles of PIF4 in Plants. *Trends Plant Sci.* 23 (9):749–751.
- [111] I Paik, PK Kathare, J Il Kim, E Huq (2017) Expanding Roles of PIFs in Signal Integration from Multiple Processes. *Mol. Plant* 10 (8):1035–1046.
- [112] VN Pham, PK Kathare, E Huq (2018) Phytochromes and phytochrome interacting factors. *Plant Physiol.* 176 (2):1025–1038.
- [113] MA Koini, L Alvey, T Allen, CA Tilley, NP Harberd, GC Whitelam, KA Franklin (2009) High Temperature-Mediated Adaptations in Plant Architecture Require the bHLH Transcription Factor PIF4. *Curr. Biol.* 19 (5):408–413.
- [114] SV Kumar, D Lucyshyn, KE Jaeger, E Alós, E Alvey, NP Harberd, PA Wigge (2012) Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature* 484 (7393):242–245.
- [115] SN Gangappa, SV Kumar (2017) DET1 and HY5 Control PIF4-Mediated Thermosensory Elongation Growth through Distinct Mechanisms. *Cell Rep.* 18 (2):344–351.
- [116] B Zhang, M Holmlund, S Lorrain, M Norberg, LS Bakó, C Fankhauser, O Nilsson (2017) BLADE-ON-PETIOLE proteins act in an E3 ubiquitin ligase complex to regulate PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 abundance. *Elife* 6 (pii):e26759.
- [117] MS Box, BE Huang, M Domijan, KE Jaeger, AK Khattak, SJ Yoo, EL Sedivy, DM Jones, TJ Hearn, AAR Webb, A Grant, JCW Locke, PA Wigge (2015) ELF3 controls thermoresponsive growth in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 25 (2):194–199.
- [118] C Nieto, V López-Salmerón, JM Davière, S Prat (2015) ELF3-PIF4 interaction regulates plant growth independently of the evening complex. *Curr. Biol.* 25 (2):187–193.
- [119] DA Nusinow, A Helfer, EE Hamilton, JJ King, T Imaizumi, TF Schultz, EM Farré, SA Kay (2011) The ELF4-ELF3-"LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* 475 (7356):398–404.
- [120] D Ezer, JH Jung, H Lan, S Biswas, L Gregoire, MS Box, V Charoensawan, S Cortijo, X Lai, D Stöckle, C Zubieta, KE Jaeger, PA Wigge (2017) The evening complex coordinates environmental and endogenous signals in Arabidopsis. *Nat. Plants* 3 :17087.
- [121] A Raschke, C Ibañez, KK Ullrich, MU Anwer, S Becker, A Glöckner, J Trenner, K Denk, B Saal, X Sun, M Ni, SJ Davis, C Delker, M Quint (2015) Natural variants of ELF3 affect thermomorphogenesis by transcriptionally modulating PIF4-dependent auxin response

- genes. *BMC Plant Biol.* 15 (1):197.
- [122] C Delker, L Sonntag, GV James, P Janitza, C Ibañez, H Ziermann, T Peterson, K Denk, S Mull, J Ziegler, SJ Davis, K Schneeberger, M Quint (2014) The DET1-COP1-HY5 Pathway Constitutes a Multipurpose Signaling Module Regulating Plant Photomorphogenesis and Thermomorphogenesis. *Cell Rep.* 9 (6):1983–1989.
- [123] J Lee, K He, V Stolc, H Lee, P Figueroa, Y Gao, W Tongprasit, H Zhao, I Lee, WD Xing (2007) Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *Plant Cell* 19 (3):731–749.
- [124] G Toledo-Ortiz, H Johansson, KP Lee, J Bou-Torrent, K Stewart, G Steel, M Rodríguez-Concepción, KJ Halliday (2014) The HY5-PIF Regulatory Module Coordinates Light and Temperature Control of Photosynthetic Gene Transcription. *PLoS Genet.* 10 (6):e1004416.
- [125] R Catalá, J Medina, J Salinas (2011) Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (39):16475–16480.
- [126] HJ Lee, JH Jung, L Cortés Llorca, SG Kim, S Lee, IT Baldwin, CM Park (2014) FCA mediates thermal adaptation of stem growth by attenuating auxin action in Arabidopsis. *Nat. Commun.* 5 :5473.
- [127] KA Franklin, SH Lee, D Patel, SV Kumar, AK Spartz, C Gu, S Ye, P Yu, G Breen, JD Cohen, PA Wigge, WM Gray (2011) Phytochrome-Interacting Factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (50):20231–20235.
- [128] J Sun, L Qi, Y Li, J Chu, C Li (2012) Pif4-mediated activation of yucca8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating arabidopsis hypocotyl growth. *PLoS Genet.* 8 (3):1002594.
- [129] R Wang, Y Zhang, M Kieffer, H Yu, S Kepinski, M Estelle (2016) HSP90 regulates temperature-dependent seedling growth in Arabidopsis by stabilizing the auxin co-receptor F-box protein TIR1. *Nat. Commun.* 7 :10269.
- [130] Y Nomoto, S Kubozono, M Miyachi, T Yamashino, N Nakamichi, T Mizuno (2012) A circadian clock-and PIF4-mediated double coincidence mechanism is implicated in the thermosensitive photoperiodic control of plant architectures in arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 53 (11):1965–1973.

- [131] J Sun, L Qi, Y Li, Q Zhai, C Li (2013) PIF4 and PIF5 Transcription Factors Link Blue Light and Auxin to Regulate the Phototropic Response in Arabidopsis. *Plant Cell* 25 (6):2102–2114.
- [132] J Huai, X Zhang, J Li, T Ma, P Zha, Y Jing, R Lin (2018) SEUSS and PIF4 Coordinately Regulate Light and Temperature Signaling Pathways to Control Plant Growth. *Mol. Plant* 11 (7):928–942.
- [133] BA McClure, T Guilfoyle (1987) Characterization of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs. *Plant Mol. Biol.* 9 (6):611–623.
- [134] H Ren, WM Gray (2015) SAUR Proteins as Effectors of Hormonal and Environmental Signals in Plant Growth. *Mol. Plant* 8 (8):1153–1164.
- [135] AK Spartz, H Ren, MY Park, KN Grandt, SH Lee, AS Murphy, MR Sussman, PJ Overvoorde, WM Gray (2014) SAUR inhibition of PP2C-D phosphatases activates plasma membrane H⁺-ATPases to promote cell expansion in Arabidopsis. *Plant Cell* 26 (5):2129–2142.
- [136] N Sun, J Wang, Z Gao, J Dong, H He, W Terzaghi, N Wei, XW Deng, H Chen (2016) Arabidopsis SAURs are critical for differential light regulation of the development of various organs . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (21):6071–6076.
- [137] H Ren, MY Park, AK Spartz, JH Wong, WM Gray (2018) A subset of plasma membrane-localized PP2C.D phosphatases negatively regulate SAUR-mediated cell expansion in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 14 (6):e1007455.
- [138] D Xiao, Y Cui, F Xu, X Xu, G Gao, Y Wang, Z Guo, D Wang, NN Wang (2015) SENESCENCE-SUPPRESSED PROTEIN PHOSPHATASE directly interacts with the cytoplasmic domain of SENESCENCE-ASSOCIATED RECEPTOR-LIKE KINASE and negatively regulates leaf senescence in arabidopsis. *Plant Physiol.* 169 (2):1275–1291.
- [139] M Bemer, H Van Mourik, JM Muiño, C Ferrándiz, K Kaufmann, GC Angenent (2017) FRUITFULL controls SAUR10 expression and regulates Arabidopsis growth and architecture. *J. Exp. Bot.* 68 (13):3391–3403.
- [140] K Hou, W Wu, S-SS Gan (2013) SAUR36, a small auxin up RNA gene, is involved in the promotion of leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 161 (2):1002–1009.
- [141] R Narsai, SR Law, C Carrie, L Xu, J Whelan (2011) In-depth temporal transcriptome profiling reveals a crucial developmental switch with roles for RNA processing and

- organelle metabolism that are essential for germination in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 157 (3):1342–1362.
- [142] JE Park, YS Kim, HK Yoon, CM Park (2007) Functional characterization of a small auxin-up RNA gene in apical hook development in Arabidopsis. *Plant Sci.* 172 (1):150–157.
- [143] H van Mourik, ADJ van Dijk, N Stortenbeker, GC Angenent, M Bemer (2017) Divergent regulation of Arabidopsis SAUR genes: A focus on the SAUR10-clade. *BMC Plant Biol.* 17 (1):1–14.
- [144] K Chae, CG Isaacs, PH Reeves, GS Maloney, GK Muday, P Nagpal, JW Reed (2012) Arabidopsis SMALL AUXIN UP RNA63 promotes hypocotyl and stamen filament elongation. *Plant J.* 71 (4):684–697.
- [145] AK Spartz, SH Lee, JP Wenger, N Gonzalez, H Itoh, D Inzé, WA Peer, AS Murphy, PJ Overvoorde, WM Gray (2012) The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion. *Plant J.* 70 (6):978–990.
- [146] JA Stavang, J Gallego-Bartolomé, MD Gómez, S Yoshida, T Asami, JE Olsen, JL García-Martínez, D Alabadí, MA Blázquez (2009) Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *Plant J.* 60 (4):589–601.
- [147] E Oh, JY Zhu, ZY Wang (2012) Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat. Cell Biol.* 14 (8):802–809.
- [148] C Martínez, A Espinosa-Ruíz, M de Lucas, S Bernardo-García, JM Franco-Zorrilla, S Prat (2018) PIF4-induced BR synthesis is critical to diurnal and thermomorphogenic growth. *EMBO J.* 37 (23):99552.
- [149] S Bernardo-García, M de Lucas, C Martínez, A Espinosa-Ruiz, JM Davière, S Prat (2014) BR-dependent phosphorylation modulates PIF4 transcriptional activity and shapes diurnal hypocotyl growth. *Genes Dev.* 28 (15):1681–1694.
- [150] JX He, JM Gendron, Y Yang, J Li, ZY Wang (2002) The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (15):10185–10190.
- [151] A Grossjohann, R Lippmann, H Sun, M Klecker, C Martinez, P Janitza, K Schneeberger, GV James, C Delker, C Ibañez, S Prat, M Quint, W Ludwig, K Bürstenbinder (2018) Brassinosteroids Dominate Hormonal Regulation of Plant Thermomorphogenesis via BZR1. *Curr. Biol.* 28 (2):303–310.

- [152] E Oh, JY Zhu, MY Bai, RA Arenhart, Y Sun, ZY Wang (2014) Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the Arabidopsis hypocotyl. *Elife* 3 :e03031.
- [153] MY Bai, JX Shang, E Oh, M Fan, Y Bai, R Zentella, TP Sun, ZY Wang (2012) Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in Arabidopsis. *Nat. Cell Biol.* 14 (8):810–817.
- [154] M-Y Bai, M Fan, E Oh, Z-Y Wang (2012) A Triple Helix-Loop-Helix/Basic Helix-Loop-Helix Cascade Controls Cell Elongation Downstream of Multiple Hormonal and Environmental Signaling Pathways in Arabidopsis. *Plant Cell* 24 (12):4917–4929.
- [155] N Bouré, SV Kumar, N Arnaud (2019) The BAP Module: A Multisignal Integrator Orchestrating Growth. *Trends Plant Sci.* 24 (7):602–610.
- [156] QF Li, C Wang, L Jiang, S Li, SSM Sun, JX He (2012) An interaction between BZR1 and DELLAs mediates direct signaling crosstalk between brassinosteroids and gibberellins in Arabidopsis. *Sci. Signal.* 5 (244):ra72.
- [157] J Fukazawa, H Teramura, S Murakoshi, K Nasuno, N Nishida, T Ito, M Yoshida, Y Kamiya, S Yamaguchi, Y Takahashi (2014) DELLAs Function as Coactivators of GAI-ASSOCIATED FACTOR1 in Regulation of Gibberellin Homeostasis and Signaling in Arabidopsis . *Plant Cell* 26 (7):2920–2938.
- [158] NG Uberti Manassero, IL Viola, E Welchen, DH Gonzalez (2013) TCP transcription factors: Architectures of plant form. *Biomol. Concepts* 4 (2):111–127.
- [159] S Li (2015) The Arabidopsis thaliana TCP transcription factors: A broadening horizon beyond development. *Plant Signal. Behav.* 10 (7):37–41.
- [160] P Cubas, N Lauter, J Doebley, E Coen (1999) The TCP domain: A motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J.* 18 (2):215–222.
- [161] P Aggarwal, M Das Gupta, AP Joseph, N Chatterjee, N Sinivasan, U Nath (2010) Identification of specific DNA binding residues in the TCP family of transcription factors in arabidopsis. *Plant Cell* 22 (4):1174–1189.
- [162] S Kosugi, Y Ohashi (1997) PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *Plant Cell* 9 (9):1607–1619.
- [163] E González-Gradío, P Cubas (2015) Chapter 9 - TCP Transcription Factors: Evolution,

- Structure, and Biochemical Function, En: *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects*, Elsevier. p. :139–152.
- [164] O Navaud, P Dabos, E Carnus, D Tremousaygue, C Hervé (2007) TCP transcription factors predate the emergence of land plants. *J. Mol. Evol.* 65 (1):23–33.
- [165] DG Howarth, MJ Donoghue (2006) Phylogenetic analysis of the “ECE” (CYC/TB1) clade reveals duplications predating the core eudicots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (24):9101–9106.
- [166] M Martín-Trillo, P Cubas (2010) TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends Plant Sci.* 15 (1):31–39.
- [167] DG Howarth, MJ Donoghue (2005) Duplications in CYC-like genes from dipsacales correlate with floral form. *Int. J. Plant Sci.* 166 (3):357–370.
- [168] JF Palatnik, E Allen, X Wu, C Schommer, R Schwab, JC Carrington, D Weigel (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425 (6955):257–263.
- [169] S Danisman, ADJ Van Dijk, A Bimbo, F Van Der Wal, L Hennig, S De Folter, GC Angenent, RGH Immink (2013) Analysis of functional redundancies within the Arabidopsis TCP transcription factor family. *J. Exp. Bot.* 64 (18):5673–5685.
- [170] S Kosugi, Y Ohashi (2002) DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family. *Plant J.* 30 (3):337–348.
- [171] IL Viola, NG Uberti Manassero, R Ripoll, DH Gonzalez (2011) The Arabidopsis class I TCP transcription factor AtTCP11 is a developmental regulator with distinct DNA-binding properties due to the presence of a threonine residue at position 15 of the TCP domain. *Biochem. J.* 435 (1):143–155.
- [172] C Schommer, JF Palatnik, P Aggarwal, A Chételat, P Cubas, EE Farmer, U Nath, D Weigel (2008) Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biol.* 6 (9):1991–2001.
- [173] IL Viola, R Reinheimers, R Ripoll, NG Uberti Manassero, DH Gonzalez (2012) Determinants of the DNA binding specificity of class I and class II TCP transcription factors. *J. Biol. Chem.* 287 (1):347–356.
- [174] C Li, T Potuschak, A Colón-Carmona, RA Gutiérrez, P Doerner (2005) Arabidopsis TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*

- A. 102 (36):12978–12983.
- [175] S Danisman, F van der Wal, S Dhondt, R Waites, S de Folter, A Bimbo, AJ van Dijk, JM Muino, L Cutri, MC Dornelas, GC Angenent, RGH Immink (2012) Arabidopsis class I and class II TCP transcription factors regulate jasmonic acid metabolism and leaf development antagonistically. *Plant Physiol.* 159 (4):1511–1523.
- [176] LE Lucero, PA Manavella, DE Gras, FD Ariel, DH Gonzalez (2017) Class I and Class II TCP Transcription Factors Modulate SOC1-Dependent Flowering at Multiple Levels. *Mol. Plant* 10 (12):1571–1574.
- [177] T Koyama, N Mitsuda, M Seki, K Shinozaki, M Ohme-Takagi (2010) TCP transcription factors regulate the activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in Arabidopsis. *Plant Cell* 22 (11):3574–3588.
- [178] NG Uberti-Manassero, LE Lucero, IL Viola, AC Vegetti, DH Gonzalez (2012) The class I protein AtTCP15 modulates plant development through a pathway that overlaps with the one affected by CIN-like TCP proteins. *J. Exp. Bot.* 63 (2):809–823.
- [179] M Das Gupta, P Aggarwal, U Nath (2014) CINCINNATA in *Antirrhinum majus* directly modulates genes involved in cytokinin and auxin signaling. *New Phytol.* 204 (4):901–912.
- [180] LE Lucero, NG Uberti-Manassero, AL Arce, F Colombatti, SG Alemano, DH Gonzalez (2015) TCP15 modulates cytokinin and auxin responses during gynoecium development in Arabidopsis. *Plant J.* 84 (2):267–282.
- [181] X Adenot, T Elmayan, D Laressergues, S Boutet, N Bouché, V Gascioli, H Vaucheret (2006) DRB4-Dependent TAS3 trans-Acting siRNAs Control Leaf Morphology through AGO7. *Curr. Biol.* 16 (9):927–932.
- [182] N Fahlgren, TA Montgomery, MD Howell, E Allen, SK Dvorak, AL Alexander, JC Carrington (2006) Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA Affects Developmental Timing and Patterning in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 16 (9):939–944.
- [183] I Efroni, SK Han, HJ Kim, MF Wu, E Steiner, KD Birnbaum, JC Hong, Y Eshed, D Wagner (2013) Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses. *Dev. Cell* 24 (4):438–445.
- [184] X Yang, HB Pang, BL Liu, ZJ Qiu, Q Gao, L Wei, Y Dong, YZ Wang (2012) Evolution of

- double positive autoregulatory feedback loops in CYCLOIDEA2 clade genes is associated with the origin of floral zygomorphy. *Plant Cell* 24 (5):1834–1847.
- [185] SH Kim, GH Son, S Bhattacharjee, HJ Kim, JC Nam, PDT Nguyen, JC Hong, W Gassmann (2014) The Arabidopsis immune adaptor SRFR1 interacts with TCP transcription factors that redundantly contribute to effector-triggered immunity. *Plant J.* 78 (6):978–989.
- [186] Y Pan, G Bradley, K Pyke, G Ball, C Lu, R Fray, A Marshall, S Jayasuta, C Baxter, R van Wijk, L Boyden, R Cade, NH Chapman, PD Fraser, C Hodgman, GB Seymour (2013) Network inference analysis identifies an APRR2-like gene linked to pigment accumulation in tomato and pepper fruits. *Plant Physiol.* 161 (3):1476–1485.
- [187] C Cheval, M Perez, LJ Leba, B Ranty, A Perochon, M Reichelt, A Mithöfer, E Robe, C Mazars, JP Galaud, D Aldon (2017) PRR2, a pseudo-response regulator, promotes salicylic acid and camalexin accumulation during plant immunity. *Sci. Rep.* 7 (1):6979.
- [188] E Giraud, S Ng, C Carrie, O Duncan, J Low, CP Lee, O van Aken, A Harvey Millar, M Murcha, J Whelan (2010) TCP transcription factors link the regulation of genes encoding mitochondrial proteins with the circadian clock in Arabidopsis Thaliana. *Plant Cell* 22 (12):3921–3934.
- [189] Y Peng, L Chen, Y Lu, Y Wu, J Dumenil, Z Zhu, MW Bevan, Y Lia (2015) The Ubiquitin receptors DA1, DAR1, and DAR2 redundantly regulate endoreduplication by modulating the stability of TCP14/15 in arabidopsis. *Plant Cell* 27 (3):649–662.
- [190] K Tatematsu, K Nakabayashi, Y Kamiya, E Nambara (2008) Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 53 (1):42–52.
- [191] P Rueda-Romero, C Barrero-Sicilia, A Gómez-Cadenas, P Carbonero, L Oñate-Sánchez (2012) Arabidopsis thaliana DOF6 negatively affects germination in non-after-ripened seeds and interacts with TCP14. *J. Exp. Bot.* 63 (5):1937–1949.
- [192] W Zhang, F Cochet, M Ponnaiah, S Lebreton, L Matheron, C Pionneau, M Boudsocq, F Resentini, S Huguet, MÁ Blázquez, C Bailly, J Puyaubert, E Baudouin (2019) The MPK 8-TCP 14 pathway promotes seed germination in Arabidopsis. *Plant J.* 100 (4):677–692.
- [193] E Steiner, I Efroni, M Gopalraj, K Saathoff, T-S Tseng, M Kieffer, Y Eshed, N Olszewski, D Weiss (2012) The Arabidopsis O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase SPINDLY Interacts with Class I TCPs to Facilitate Cytokinin Responses in Leaves and Flowers.

- Plant Cell* 24 (1):96–108.
- [194] MJ Mazur, BJ Spears, A Djajasaputra, M van der Gragt, G Vlachakis, B Beerens, W Gassmann, HA van den Burg (2017) Arabidopsis TCP Transcription Factors Interact with the SUMO Conjugating Machinery in Nuclear Foci. *Front. Plant Sci.* 8 :1–18.
- [195] JM Davière, M Wild, T Regnault, N Baumberger, H Eisler, P Genschik, P Achard (2014) Class I TCP-DELLA interactions in inflorescence shoot apex determine plant height. *Curr. Biol.* 24 (16):1923–1928.
- [196] F Resentini, A Felipo-Benavent, L Colombo, MA Blázquez, D Alabadí, S Masiero (2015) TCP14 and TCP15 Mediate the Promotion of Seed Germination by Gibberellins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 8 (3):482–485.
- [197] M Nicolas, P Cubas (2016) TCP factors: New kids on the signaling block. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33 :33–41.
- [198] Z Guo, S Fujioka, EB Blancaflor, S Miao, X Gou, J Li (2010) TCP1 modulates brassinosteroid biosynthesis by regulating the expression of the key biosynthetic gene DWARF4 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22 (4):1161–1173.
- [199] KR Challa, P Aggarwal, U Nath (2016) Activation of YUCCA5 by the Transcription Factor TCP4 Integrates Developmental and Environmental Signals to Promote Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 28 (9):2117–2130.
- [200] Y Zhou, D Zhang, J An, H Yin, S Fang, J Chu, Y Zhao, J Li (2018) TCP Transcription Factors Regulate Shade Avoidance via Directly Mediating the Expression of Both PHYTOCHROME INTERACTING FACTORs and Auxin Biosynthetic Genes. *Plant Physiol.* 176 (2):1850–1861.
- [201] J Dong, N Sun, J Yang, Z Deng, J Lan, G Qin, H He, XW Deng, VF Irish, H Chen, N Wei (2019) The Transcription Factors TCP4 and PIF3 Antagonistically Regulate Organ-Specific Light Induction of SAUR Genes to Modulate Cotyledon Opening during De-Etiolation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 31 (5):1155–1170.
- [202] D Trémouyague, L Garnier, C Bardet, P Dabos, C Hervé, B Lescure (2003) Internal telomeric repeats and “TCP domain” protein-binding sites co-operate to regulate gene expression in *Arabidopsis thaliana* cycling cells. *Plant J.* 33 (6):957–966.
- [203] ZY Li, B Li, AW Dong (2012) The *Arabidopsis* transcription factor AtTCP15 regulates endoreduplication by modulating expression of key cell-cycle genes. *Mol. Plant* 5

- (1):270–280.
- [204] M Kieffer, V Master, R Waites, B Davies (2011) TCP14 and TCP15 affect internode length and leaf shape in *Arabidopsis*. *Plant J.* 68 (1):147–158.
- [205] J Six, ET Elliott, K Paustian, JW Doran (1998) Aggregation and soil organic matter accumulation in cultivated and native grassland soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62 (5):1367–1377.
- [206] G Ooms, PJJ Hooykaas, RJM Van Veen, P Van Beelen, TJG Regensburg-Tuïnk, RA Schilperoort (1982) Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid* 7 (1):15–29.
- [207] M Vidal, RK Brachmann, A Fattaey, E Harlow, JD Boeke (1996) Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (19):10315–10320.
- [208] M De Lucas, JM Davière, M Rodríguez-Falcón, M Pontin, JM Iglesias-Pedraz, S Lorrain, C Fankhauser, MA Blázquez, E Titarenko, S Prat (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451 (7177):480–484.
- [209] T Ulmasov, J Murfett, G Hagen, TJ Guilfoyle (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9 (11):1963–1971.
- [210] K Hiratsu, K Matsui, T Koyama, M Ohme-Takagi (2003) Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant J.* 34 (5):733–739.
- [211] RA Jefferson, TA Kavanagh, MW Bevan (1987) GUS fusions: β -glucuronidase. *EMBO J.* 6 (13):3901–3907.
- [212] O Louvet, F Doignon, M Crouzet (1997) Stable DNA-binding yeast vector allowing high-bait expression for use in the two-hybrid system. *Biotechniques* 23 (5):816–820.
- [213] SF Altschul, W Gish, W Miller, EW Myers, DJ Lipman (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (3):403–410.
- [214] E Wood (1983) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, En: *Biochemical Education*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. :82.
- [215] RP Hellens, E Anne Edwards, NR Leyland, S Bean, PM Mullineaux (2000) pGreen: A

- versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42 (6):819–832.
- [216] TL Shimada, T Shimada, I Hara-Nishimura (2010) A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*: TECHNICAL ADVANCE. *Plant J.* 61 (3):519–528.
- [217] SJ Clough, AF Bent (1998) Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16 (6):735–743.
- [218] D Gietz, A St, J Robin, RH Schiestl (1992) Improved efficiency. 20 (6):1992–1992.
- [219] FM Ausubel, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Seidman, JA Smith, K Struhl, CJ Wiley, FM Ausubel, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JA Smith, RD Allison, M Bittner, S Blackshaw (2003) Current protocols in molecular biology - Volumes 1 and 2, En: *Molecular Reproduction and Development*, Wiley.
- [220] HC Bimboim, J Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 (6):1513–1523.
- [221] B Charrier, A Champion, Y Henry, M Kreis (2002) Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiol* 130 (2):577–590.
- [222] F Ariel, T Jegu, D Latrasse, N Romero-Barrios, A Christ, M Benhamed, M Crespi (2014) Noncoding transcription by alternative rna polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. *Mol. Cell* 55 (3):383–396.
- [223] RA Jefferson, TA Kavanagh, MW Bevan (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6 (13):3901–3907.
- [224] JJ Sedmak, SE Grossberg (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* 79 (1–2):544–552.
- [225] IL Viola, DH Gonzalez (2009) Binding properties of the complex formed by the *Arabidopsis* TALE homeodomain proteins STM and BLH3 to DNA containing single and double target sites. *Biochimie* 91 (8):974–981.
- [226] JH Miller (1972) Assay of β Galactosidase, En: *Experiments in molecular genetics.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [227] Waadt Rainer, Schlücking Kathrin, Schroeder Julian I., K Jörg (2014) Protein fragment

- bimolecular fluorescence complementation analyses for the in vivo study of protein-protein interactions and cellular protein complex localizations Rainer. *Methods Mol Biol.* 1062 :629–658.
- [228] J Schindelin, I Arganda-Carreras, E Frise, V Kaynig, M Longair, T Pietzsch, S Preibisch, C Rueden, S Saalfeld, B Schmid, JY Tinevez, DJ White, V Hartenstein, K Eliceiri, P Tomancak, A Cardona (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9 (7):676–682.
- [229] WM Gray, A Ostin, G Sandberg, CP Romano, M Estelle (2002) High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (12):7197–7202.
- [230] IL Viola, LN Guttlein, DH Gonzalez (2013) Redox Modulation of Plant Developmental Regulators from the Class I TCP Transcription Factor Family. *Plant Physiol.* 162 (3):1434–1447.
- [231] IL Viola, A Camoirano, DH Gonzalez (2016) Redox-Dependent Modulation of Anthocyanin Biosynthesis by the TCP Transcription Factor TCP15 during Exposure to High Light Intensity Conditions in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 170 (1):74–85.
- [232] T Koyama, M Furutani, M Tasaka, M Ohme-Takagi (2007) TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 19 (2):473–484.
- [233] T Koyama, M Ohme-Takagi, F Sato (2011) Generation of serrated and wavy petals by inhibition of the activity of TCP transcription factors in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal. Behav.* 6 (5):697–699.
- [234] C Hervé, P Dabos, C Bardet, A Jauneau, MC Auriac, A Ramboer, F Lacout, D Tremousaygue (2009) In vivo interference with attcp20 function induces severe plant growth alterations and deregulates the expression of many genes important for development. *Plant Physiol.* 149 (3):1462–1477.
- [235] M Fan, M-Y Bai, J-G Kim, T Wang, E Oh, L Chen, CH Park, S-H Son, S-K Kim, MB Mudgett, Z-Y Wang (2014) The bHLH Transcription Factor HBI1 Mediates the Trade-Off between Growth and Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in Arabidopsis. *Plant Cell* 26 (2):828–841.
- [236] M Ikeda, S Fujiwara, N Mitsuda, M Ohme-Takagi (2012) A triantagonistic basic helix-

- loop-helix system regulates cell elongation in arabidopsisw oa. *Plant Cell* 24 (11):4483–4497.
- [237] KS Heyndrickx, J V. de Velde, C Wang, D Weigel, K Vandepoele (2014) A Functional and Evolutionary Perspective on Transcription Factor Binding in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 26 (10):3894–3910.
- [238] P Machanick, TL Bailey (2011) MEME-ChIP: Motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics* 27 (12):1696–1697.
- [239] J Kudla, R Bock (2016) Lighting the way to protein-protein interactions: Recommendations on best practices for bimolecular fluorescence complementation analyses. *Plant Cell* 28 (5):1002–1008.
- [240] J V. Cabello, JI Giacomelli, C V. Piattoni, AA Iglesias, RL Chan (2016) The sunflower transcription factor HaHB11 improves yield, biomass and tolerance to flooding in transgenic Arabidopsis plants. *J. Biotechnol.* 222 :73–83.
- [241] A Traven, B Jelacic, M Sopta (2006) Yeast Gal4: A transcriptional paradigm revisited. *EMBO Rep.* 7 (5):496–499.
- [242] X Han, H Yu, R Yuan, Y Yang, F An, G Qin (2019) Arabidopsis Transcription Factor TCP5 Controls Plant Thermomorphogenesis by Positively Regulating PIF4 Activity. *iScience* 15 :1–12.
- [243] Y Zhou, Q Xun, D Zhang, M Lv, Y Ou, J Li (2019) TCP Transcription Factors Associate with PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 and CRYPTOCHROME 1 to Regulate Thermomorphogenesis in Arabidopsis thaliana. *iScience* 15 :600–610.
- [244] U V. Pedmale, SSC Huang, M Zander, BJ Cole, J Hetzel, K Ljung, PAB Reis, P Sridevi, K Nito, JR Nery, JR Ecker, J Chory (2016) Cryptochromes Interact Directly with PIFs to Control Plant Growth in Limiting Blue Light. *Cell* 164 (1–2):233–245.
- [245] O Pucciariello, M Legris, C Costigliolo Rojas, MJ Iglesias, CE Hernando, C Dezar, M Vazquez, MJ Yanovsky, SA Finlayson, S Prat, JJ Casal (2018) Rewiring of auxin signaling under persistent shade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115 (21):5612–5617.
- [246] R Richter, C Behringer, IK Müller, C Schwechheimer (2010) The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and phytochrome-interacting factors. *Genes Dev.* 24 (18):2093–2104.

- [247] K Nozue, SL Harmer, JN Maloof (2011) Genomic analysis of circadian clock-, light-, and growth-correlated genes reveals PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR5 as a modulator of auxin signaling in arabidopsis. *Plant Physiol.* 156 (1):357–372.
- [248] JW Reed, MF Wu, PH Reeves, C Hodgens, V Yadav, S Hayes, R Pierik (2018) Three Auxin Response Factors Promote Hypocotyl Elongation. *Plant Physiol.* 178 (2):864–875.

ANEXOS

10. ANEXOS

10.1. ANEXO I: Lista de oligonucleótidos usados

10.1.1. Oligonucleótidos usados para clonado

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	USO
TCP15 F	ggc <u>GGTACCT</u> CATCATCATCATGGATC	Clonado de <i>TCP15</i> en el vector pENTR 3C
TCP15 R	ggc <u>CTCGAG</u> GGAATGATGACTGGTGCTTC	Clonado de <i>TCP15</i> en el vector pENTR 3C
pTCP15 F	ccg <u>GTCGACG</u> AAAGATGAATTTGCCTAAAC	Clonado del promotor de <i>TCP15</i> en el vector pENTR 3C
pTCP15 R	cgc <u>GGTACCT</u> CGAAGCTTTGGTGGTGGG	Clonado del promotor de <i>TCP15</i> en el vector pENTR 3C
PIF4 F	gcg <u>GAATTC</u> ATGGAACATCAAGGTTGGAG	Clonado de <i>PIF4</i> en los vectores pENTR 3C, pGADT7 y pGBKT7
PIF4 R	ccg <u>CTCGAG</u> CTAGTGGTCCAAACGAGAAC	Clonado de <i>PIF4</i> en los vectores pENTR 3C, pGADT7 y pGBKT7
PIF4 R2	ccg <u>CTCGAG</u> GTTGGTCCAAACGAGAACCGT	Clonado de <i>PIF4</i> sin el codón de parada en el vector pENTR 3C

Las letras minúsculas indican secuencias adaptadoras. Las secuencias subrayadas indican los sitios de restricción.

10.1.2. Oligonucleótidos usados para RT-qPCR y ChIP-qPCR

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')
Actin F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG
Actin R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
dTV	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV
TCP15 qPCR F	CAGAGTCCTGCAACGGCACC
TCP15 qPCR R	CGCCGCCACTACCACCACTG
TCP14 qPCR F	GCAAGTTTCCGGCGACTCT
TCP14 qPCR R	CGGCAGAAAATCCCACCGTT
SAUR19 qPCR F	CGATCATCCAATGGGTGGCT
SAUR19 qPCR R	TGTTGGCTCATCATCGTTGGA
SAUR20 qPCR F	CGATCATCCAATGGGTGGCT
SAUR20 qPCR R	TGTTGGCTCATCATCGTTGGA
SAUR21 qPCR F	CGCTCTCATACTTGAGCCAACC
SAUR21 qPCR R	AGCCGAGAAGTCACATTGATGAAG
SAUR63 qPCR F	AACGGAAGGACCAATCACATTACC

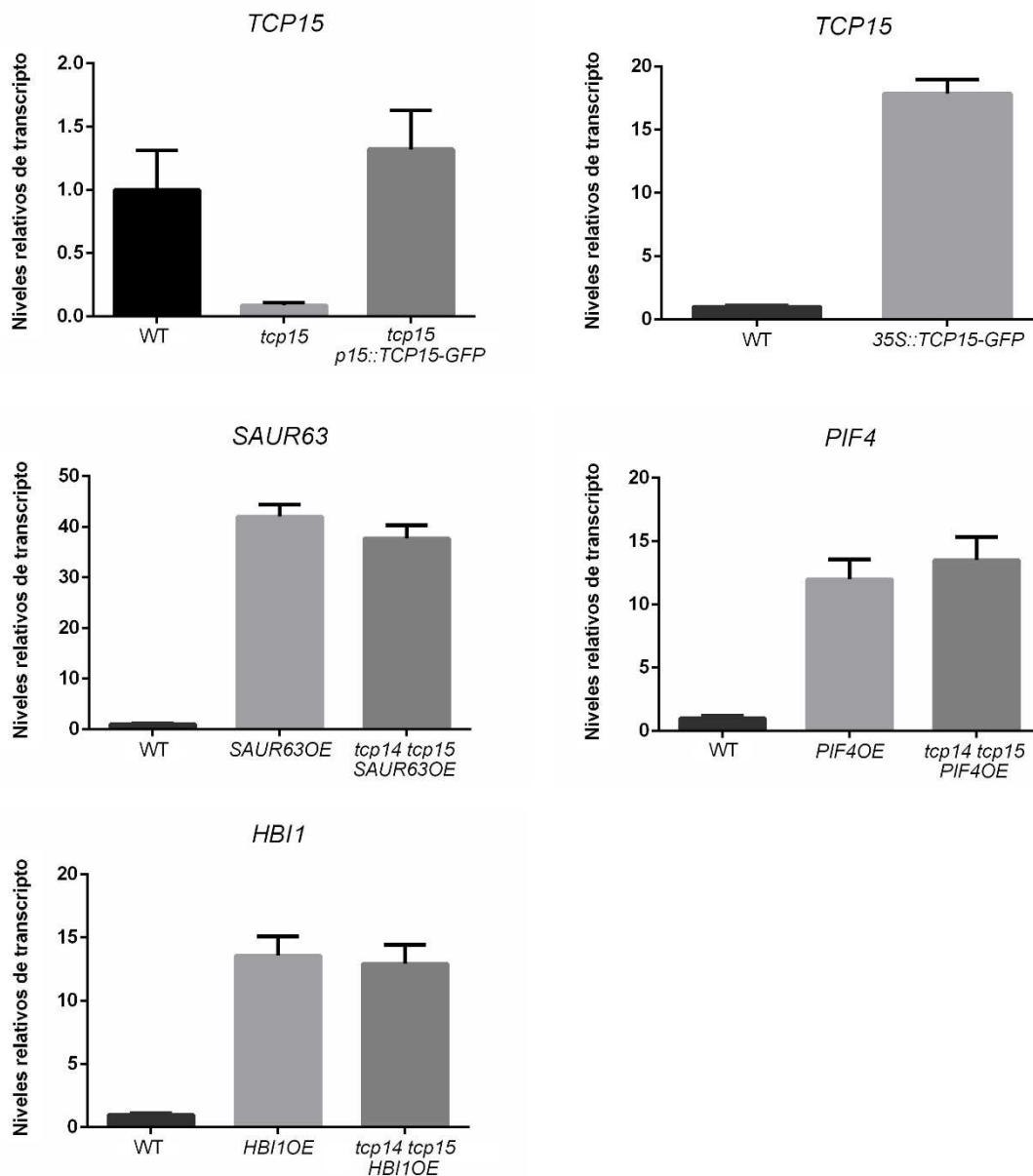
SAUR63 qPCR R	TCGTCTTTGGATCAGTTTGACGAG
SAUR65 qPCR F	CCTCAGGGCGGGTGGACCAA
SAUR65 qPCR R	ACCACTCTGTTGTTCTTGTGGTTGC
IAA19 qPCR F	AAAGATCGGATGCTACCGGG
IAA19 qPCR R	ACCAGCTCCTTGCTTCTTGTT
IAA29 qPCR F	GGGAAAGAGGGTGACTIONGGC
IAA29 qPCR R	TCCGATGAACAGATTCCGCA
HBI1 qPCR F	CTTGCCGTGGAAGATGTATCCG
HBI1 qPCR R	AGATCCTTGCTGGTCTAACGGAA
PRE1 qPCR F	TTCCATAGTCAAAAAGTCTCCGACAT
PRE1 qPCR R	AATAATGCACCTGCTAAGGCAATG
PRE6 qPCR F	GGACGACAACAGCGCCGAA
PRE6 qPCR R	TTGGTGGCCGAAACGGATG
EXP8 qPCR F	GGCAGTTCGGACAAACCTACCAA
EXP8 qPCR R	TATGCAGCCACGTCAGCACC
YUC8 qPCR F	GAAAGGGCTCTCAGGTGCGT
YUC8 qPCR R	CCCTTGAGCGTTTCGTGGGTT
PIF4 qPCR F	AGCAAAGTCAACAACCGTCC
PIF4 qPCR R	GGCTCACCAACCTAGTGGTC
GA20ox1 qPCR F	CCCAAGGCCTTTGTGGTCAA
GA20ox1 qPCR R	ATTCCTCTCGCTCTCGCTG
GA3ox1 qPCR F	GTGACCTCTCCACATCCTATCCA
GA3ox1 qPCR R	CCAGCTTCGGTACAGGTGATATCT
CHIP-HBI1-P1 F	TGGTTGGTGGTATACTGTTCTTTGT
CHIP-HBI1-P1 R	TGCAAAAGATCTTGTATCTTGGGT
CHIP-HBI1-P2 F	TTTCCGCAATTTGTTCTTGAGCC
CHIP-HBI1-P2 R	CGGGTCCATCGTTTAGAGACAC
CHIP-HBI1-P3 F	AGGGGACCTTATGTGTGTGGG
CHIP-HBI1-P3 R	ATTGTTTTTGGGTGGTTGCTTAAAA
CHIP-HBI1-P4 F	TGGGTTTTTGGTCTCCACATGA
CHIP-HBI1-P4 R	TCAAGGCAACGGCTCTGGTT
CHIP-GA20ox1-P1 F	CCTCTAGTGGTCCAATGGTTAAAGA
CHIP-GA20ox1-P1 R	TCTGGTGACTAACATGGAAACACA
CHIP-GA20ox1-P2 F	AAACCCATGTCTAATGGTTGTCCT
CHIP-GA20ox1-P2 R	TAAAGAAGGTGGGGGCCGA
CHIP-GA20ox1-P3 F	CATTCCACCACTGTTTTAGCG
CHIP-GA20ox1-P3 R	GGAGTTATCAATACTTTTGCCACGA
CHIP-PP2A F	TAACGTGGCCAAAATGATGC

CHIP-PP2A R	CTTCACTTAGCTCCACCAAGCA
CHIP-PRE1-F	CGACTGTTACATACTTGTCGGATCT
CHIP-PRE1-R	TTACATGCTGCCCTCGGGTC
CHIP-PRE6-P1 F	CGTGGGGATGCAATGGTGGT
CHIP-PRE6-P1 R	AGAAGAGGGATCAAGTGGGGT
CHIP-PRE6-P2 F	AGCTCTGTAGCTTTGTGGACTGA
CHIP-PRE6-P2 R	GTCACTCGGTTTCGATTTTGGCT
CHIP-PRE6-P3 F	ACACCATGTGAATAGCTCGAAAGAA
CHIP-PRE6-P3 R	TGTGTAATAACTCACCCACGTCAA

10.1.3. Oligonucleótidos usados para analizar plantas *tcp15-3 DR5::GUS*

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	USO
LbB1.3	ATTTTGCCGATTCGGAAC	Oligo Fw para validar inserción de T-ADN
T15EN Rv	GGCCTCGAGCTAGGAATGATGACTGGT	Oligo Rv para validar inserción de T-ADN
T15EAR Fw	GGCTCTAGATCATCATCATCATGGATC	Oligo Fw para amplificar <i>TCP15</i> salvaje
TCPD15 Rv	GGCAAGCTTCTAAGTCCCTGTAGCGGCTAT	Oligo Rv para amplificar <i>TCP15</i> salvaje

10.2. ANEXO II: Niveles de expresión de las plantas transgénicas obtenidas y utilizadas durante el trabajo de Tesis



Niveles relativos de transcritos de los genes *TCP15*, *SAUR63*, *HBI1* y *PIF4*, medidos por RT-qPCR utilizando los oligonucleótidos del ANEXO I (sección 9.1.2), en las líneas de plantas transgénicas utilizadas durante este trabajo de Tesis.

10.3. ANEXO III: Genes SAUR regulados negativamente en plantas p15::TCP15-EAR

Nombre de la sonda	AGI	Gen	logFC	adj.P.Val
A_84_P21449	AT4G34770	SAUR1	-2,296	0,012679
A_84_P23341	AT4G34790	SAUR3	-1,708	0,015423
A_84_P765839	AT4G38825	SAUR13	-1,663	0,009477
A_84_P15788	AT4G38840	SAUR14	-1,556	0,010152
A_84_P16734	AT4G38850	SAUR15	-2,049	0,008542
A_84_P554482	AT3G03850	SAUR26	-2,293	0,007271
A_84_P20189	AT3G03830	SAUR28	-1,226	0,045777
A_84_P21135	AT3G03820	SAUR29	-2,419	0,011084
A_84_P20503	AT4G34760	SAUR50	-1,987	0,008959
A_84_P19956	AT1G76190	SAUR56	-1,476	0,011187
A_84_P537376	AT1G29420	SAUR61	-1,192	0,039462
A_84_P10257	AT1G29430	SAUR62	-1,73	0,01359
A_84_P279980	AT1G29440	SAUR63	-1,973	0,007597
A_84_P19713	AT1G29450	SAUR64	-2,293	0,007729
A_84_P15930	AT1G29460	SAUR65	-1,905	0,008542
A_84_P11207	AT1G29500	SAUR66	-2,063	0,008542
A_84_P22555	AT1G29510	SAUR67	-2,077	0,007597
A_84_P563710	AT5G27780	SAUR75	-1,396	0,048812

10.4. ANEXO IV: Genes SAUR con sitios TCP en sus promotores

Genes SAUR	AGI	Sitios de unión TCP
3	AT4G34790	GGCCCC / TGGACCCAC
13	AT4G38825	GGGCCCTC / GGTCCCAC
14	AT4G38840	GGGCCC
15	AT4G38850	GGGCCC
19	AT5G18010	GGTCCC
20	AT5G18020	GGTCCC
21	AT5G18030	GGTCCCA
24	AT5G18080	GGTCCC
26	AT3G03850	TGGTCCCA
50	AT4G34760	GGGGCCAC
61	AT1G29420	GGGACCCC
62	AT1G29430	TGGGACCA
63	AT1G29440	TGGGACCC
64	AT1G29450	TGGACCC / TGGGACCC
65	AT1G29460	GAGGACCCGC / TGGGACCTC
66	AT1G29500	TGGGACCC / GGACCC
67	AT1G29510	TGGGACCC
75	AT5G27780	GGTCCCAC

10.5. ANEXO V: Lista de genes blancos de PIF4 con expresión reducida en plantas *P15::TCP15-EAR*

AGI	Gen
At1g01430	<i>TBL25</i>
At1g02230	<i>ANAC004</i>
At1g02335	<i>GL22</i>
At1g03870	<i>FLA9</i>
At1g04240	<i>IAA3/SHY2</i>
At1g07880	<i>ATMPK13</i>
At1g09390	<i>GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein</i>
At1g11545	<i>XTH8</i>
At1g12110	<i>ATNRT1</i>
At1g12500	<i>Nucleotide-sugar transporter family protein</i>
At1g12570	<i>Glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase family protein</i>
At1g13950	<i>ATELF5A-1</i>
At1g14190	<i>Glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase family protein</i>
At1g14280	<i>PKS2</i>
At1g14730	<i>Cytochrome b561/ferric reductase transmembrane protein family</i>
At1g15550	<i>ATGA3ox1</i>
At1g15580	<i>ATAUX2-27</i>
At1g20190	<i>ATEXP11</i>
At1g22330	<i>RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein</i>
At1g22360	<i>AtUGT85A2</i>
At1g22530	<i>PATL2</i>
At1g23030	<i>ARM repeat superfamily protein</i>
At1g23080	<i>ATPIN7</i>
At1g23480	<i>ATCSLA03</i>
At1g26290	<i>unknown protein</i>
At1g26945	<i>KDR</i>
At1g29420	<i>SAUR61</i>
At1g29430	<i>SAUR62</i>
At1g29440	<i>SAUR63</i>
At1g29450	<i>SAUR64</i>
At1g29460	<i>SAUR65</i>
At1g29500	<i>SAUR66</i>

At1g29510	<i>SAUR68</i>
At1g32100	<i>ATPRR1</i>
At1g33170	<i>S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein</i>
At1g33770	<i>Protein kinase superfamily protein</i>
At1g49220	<i>RING/U-box superfamily protein</i>
At1g52700	<i>alpha/beta-Hydrolases superfamily protein</i>
At1g52830	<i>IAA6</i>
At1g55330	<i>AGP21</i>
At1g61260	<i>Protein of unknown function (DUF761)</i>
At1g64640	<i>AtENODL8</i>
At1g66190	<i>unknown protein</i>
At1g66940	<i>protein kinase-related</i>
At1g67050	<i>unknown protein</i>
At1g67790	<i>unknown protein</i>
At1g69160	<i>unknown protein</i>
At1g72150	<i>PATL1</i>
At1g72430	<i>SAUR78</i>
At1g73370	<i>ATSUS6</i>
At1g73830	<i>BEE3</i>
At1g75500	<i>WAT1</i>
At1g76160	<i>sks5</i>
At1g76240	<i>Arabidopsis protein of unknown function (DUF241)</i>
At1g78850	<i>D-mannose binding lectin protein with Apple-like carbohydrate-binding domain</i>
At1g80280	<i>alpha/beta-Hydrolases superfamily protein</i>
At2g10940	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
At2g16850	<i>PIP2;8</i>
At2g18300	<i>HBI1 basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein</i>
At2g19460	<i>Protein of unknown function (DUF3511)</i>
At2g20750	<i>ATEXPB1</i>
At2g21650	<i>ATRL2</i>
At2g22170	<i>Lipase/lipoxygenase</i>
At2g22980	<i>SCPL13</i>
At2g23130	<i>AGP17</i>
At2g28140	<i>Protein of unknown function (DUF1635)</i>
At2g29730	<i>UGT71D1</i>
At2g33570	<i>Domain of unknown function (DUF23)</i>
At2g33810	<i>SPL3</i>

At2g34655	<i>unknown protein</i>
At2g35860	<i>FLA16</i>
At2g36870	<i>XTH32</i>
At2g37090	<i>IRX9</i>
At2g37925	<i>COPT4</i>
At2g38120	<i>AUX1</i>
At2g38320	<i>TBL34</i>
At2g39180	<i>ATCRR2</i>
At2g39250	<i>SNZ</i>
At2g40610	<i>ATEXP8</i>
At2g41820	<i>Leucine-rich repeat protein kinase family protein</i>
At2g42870	<i>HLH1</i>
At2g42900	<i>Plant basic secretory protein (BSP) family protein</i>
At2g47930	<i>AGP26</i>
At3g01490	<i>Protein kinase superfamily protein</i>
At3g01550	<i>ATPPT2</i>
At3g01680	<i>unknown protein</i>
At3g01860	<i>unknown protein</i>
At3g03820	<i>SAUR29</i>
At3g03830	<i>SAUR28</i>
At3g03850	<i>SAUR26</i>
At3g06070	<i>unknown protein</i>
At3g07010	<i>Pectin lyase-like superfamily protein</i>
At3g11700	<i>FLA18</i>
At3g12610	<i>DRT100</i>
At3g13403	<i>Defensin-like (DEFL) family protein</i>
At3g13980	<i>unknown protein</i>
At3g14760	<i>unknown protein</i>
At3g15540	<i>IAA19</i>
At3g16240	<i>AQP1</i>
At3g16690	<i>Nodulin MtN3 family protein</i>
At3g17120	<i>unknown protein</i>
At3g18710	<i>ATPUB29</i>
At3g21550	<i>AtDMP2</i>
At3g22415	<i>unknown protein</i>
At3g23050	<i>AXR2</i>
At3g23090	<i>TPX2 (targeting protein for Xklp2) protein family</i>

At3g24110	<i>Calcium-binding EF-hand family protein</i>
At3g25717	<i>DVL6</i>
At3g27690	<i>LHCB2</i>
At3g28200	<i>Peroxidase superfamily protein</i>
At3g29370	<i>unknown protein</i>
At3g50240	<i>KICP-02</i>
At3g52290	<i>IQD3</i>
At3g52840	<i>BGAL2</i>
At3g56810	<i>unknown protein</i>
At3g58120	<i>ATBZIP61</i>
At3g58850	<i>HLH2</i>
At3g61840	<i>Protein of unknown function (DUF688)</i>
At3g62110	<i>Pectin lyase-like superfamily protein</i>
At3g62630	<i>Protein of unknown function (DUF1645)</i>
At4g01460	<i>basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein</i>
At4g01950	<i>ATGPAT3</i>
At4g02130	<i>GATL6</i>
At4g03330	<i>ATSYP123</i>
At4g12730	<i>FLA2</i>
At4g14480	<i>Protein kinase superfamily protein</i>
At4g16515	<i>RGF6</i>
At4g16980	<i>arabinogalactan-protein family</i>
At4g17460	<i>HAT1</i>
At4g18610	<i>LSH9</i>
At4g23820	<i>Pectin lyase-like superfamily protein</i>
At4g25020	<i>D111/G-patch domain-containing protein</i>
At4g25260	<i>Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein</i>
At4g27720	<i>Major facilitator superfamily protein</i>
At4g28160	<i>hydroxyproline-rich glycoprotein family protein</i>
At4g28250	<i>ATEXPB3</i>
At4g29310	<i>Protein of unknown function (DUF1005)</i>
At4g30180	<i>sequence-specific DNA binding transcription factors; transcription regulators</i>
At4g30410	<i>IBL1; sequence-specific DNA binding transcription factors</i>
At4g32880	<i>ATHB-8</i>
At4g33560	<i>Wound-responsive family protein</i>
At4g34610	<i>BLH6</i>
At4g34650	<i>SQS2</i>

At4g34760	SAUR50
At4g34770	SAUR1
At4g34790	SAUR3
At4g34810	SAUR5
At4g36030	ARO3
At4g36540	BEE2
At4g38400	ATEXLA2
At4g38690	<i>PLC-like phosphodiesterases superfamily protein</i>
At4g38700	<i>Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein</i>
At4g38825	SAUR13
At4g38840	SAUR14
At4g38850	ATSAUR15
At4g39350	ATCESA2
At4g39770	<i>Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein</i>
At5g01240	LAX1
At5g01790	<i>unknown protein</i>
At5g03120	<i>unknown protein</i>
At5g03760	ATCSLA09
At5g07110	PRA1.B6
At5g07580	<i>Integrase-type DNA-binding superfamily protein</i>
At5g10430	AGP4
At5g14090	LAZY 1
At5g19190	<i>unknown protein</i>
At5g20630	ATGER3
At5g23350	<i>GRAM domain-containing protein / ABA-responsive protein-related</i>
At5g25460	<i>Protein of unknown function</i>
At5g39860	BHLH136
At5g43700	ATAUX2-11
At5g43750	NDH18
At5g44020	<i>HAD superfamily</i>
At5g44030	CESA4
At5g44570	<i>unknown protein</i>
At5g45820	CIPK20
At5g46240	KAT1
At5g48900	<i>Pectin lyase-like superfamily protein</i>
At5g49170	<i>unknown protein</i>
At5g51460	ATTPPA

At5g51550	<i>EXL3</i>
At5g51790	<i>basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein</i>
At5g53500	<i>Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein</i>
At5g53980	<i>ATHB52</i>
At5g54530	<i>Protein of unknown function</i>
At5g54585	<i>unknown protein</i>
At5g57780	<i>Protein of unknown function</i>
At5g60020	<i>ATLAC17</i>
At5g60860	<i>AtRABA1f</i>
At5g61660	<i>glycine-rich protein</i>
At5g65890	<i>ACR1</i>
At5g66590	<i>CAP (Cysteine-rich secretory proteins</i>
At5g66800	<i>unknown protein</i>
At5g66920	<i>sks17</i>

10.6. ANEXO VI: Lista de secuencias consenso enriquecidas en los promotores de los genes blancos de PIF4 con expresión reducida en plantas p15::TCP15-EAR

Las secuencias de 6 pb enriquecidas se analizaron utilizando la herramienta oligo-analysis de RSAT (<http://rsat.eead.csic.es/plants/>). Se utilizaron las secuencias ubicadas hasta 3 kpb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, evitando el solapamiento con genes vecinos. Se marcan las secuencias para PIF4 (cacatg) y para proteínas TCP (ggaccc).

Encabezado de las columnas

Seq	Secuencia del oligómero
Id	Identificación del oligómero
Exp Freq	Frecuencia relativa esperada
Occ	Ocurrencias observadas
Exp Occ	Ocurrencias esperadas
Occ P	Probabilidad de la ocurrencia (binomial)
Occ E	E-value para la ocurrencia (binomial)
Occ Sig	Significancia de la ocurrencia (binomial)
Rank	Rango
Ovl Occ	Número de ocurrencias superpuestas (descartado de la cuenta)
Forbocc	Posiciones prohibidas (para evitar la superposición)

Seq	Id	Exp Freq	Occ	Exp Occ	Occ P	Occ E	Occ Sig	Rank	Ovl Occ	Forbocc
cacatg	cacatg catgtg	0.0005200044196	350	186.98	1.4e-26	2.9e-23	22.54	1	9	1750
ggaccc	ggaccc gggtcc	0.0001097834324	103	39.48	3.1e-17	6.4e-14	13.20	2	0	515
ccccac	ccccac gtgggg	0.0001386188737	106	49.84	3.2e-12	6.7e-09	8.17	3	0	530
gaccca	gaccca tgggtc	0.0002472253537	150	88.90	2.2e-09	4.6e-06	5.34	4	0	750
acatgc	acatgc gcatgt	0.0004002952423	219	143.94	3.7e-09	7.6e-06	5.12	5	3	1095
acatgg	acatgg ccatgt	0.0003775899632	207	135.77	8.2e-09	1.7e-05	4.77	6	0	1035
ggtcca	ggtcca tggtacc	0.0002517506237	148	90.52	1.9e-08	3.9e-05	4.41	7	0	740
ataatg	ataatg cattat	0.0011004492259	508	395.69	3.4e-08	7.2e-05	4.15	8	2	2540
atgtga	atgtga tcacat	0.0008102794421	382	291.36	2.2e-07	4.6e-04	3.34	9	3	1910
tataca	tataca tgtata	0.0012035306668	540	432.76	3.7e-07	7.7e-04	3.11	10	20	2700
gggaca	gggaca tgtccc	0.0001698484987	103	61.07	6.3e-07	1.3e-03	2.88	11	0	515
atacat	atacat atgtat	0.0012479677658	555	448.74	7,00E-07	1.5e-03	2.84	12	19	2775
aggacc	aggacc ggtcct	0.0001375138659	87	49.45	8.7e-07	1.8e-03	2.74	13	0	435
ggacca	ggacca tggtcc	0.0002437261623	136	87.64	1,00E-06	2.2e-03	2.67	14	0	680
agacag	agacag ctgtct	0.0002736403018	147	98.39	2.9e-06	6.0e-03	2.22	15	1	735

gggcca	gggcca tggccc	0.0001570093605	94	56.46	3.1e-06	6.4e-03	2.19	16	0	470
acacat	acacat atgtgt	0.0008642932754	391	310.78	6.6e-06	1.4e-02	1.87	17	1	1955
acaaaa	acaaaa ttttgt	0.0033379058328	1352	1200.23	8.9e-06	1.8e-02	1.73	18	18	6760
gtccca	gtccca tgggac	0.0001899754263	107	68.31	9.1e-06	1.9e-02	1.72	19	0	535
gtcaca	gtcaca tgtgac	0.0003671713184	184	132.03	1.1e-05	2.3e-02	1.64	20	0	920
catgca	catgca tgcacg	0.0004738834991	229	170.40	1.1e-05	2.3e-02	1.64	21	42	1145
gggacc	gggacc ggtccc	0.0001033112438	66	37.15	1.2e-05	2.6e-02	1.59	22	0	330
gtccac	gtccac tgggac	0.0002164429938	117	77.83	2.1e-05	4.3e-02	1.36	23	0	585
ctgtcc	ctgtcc ggacag	0.0001189392112	72	42.77	2.8e-05	5.9e-02	1.23	24	0	360
cccacc	cccacc ggtggg	0.0001602454548	91	57.62	3,00E-05	6.2e-02	1.21	25	0	455
gacagc	gacagc gctgtc	0.0001219648278	73	43.86	3.5e-05	7.4e-02	1.13	26	0	365
atgtgc	atgtgc gacacat	0.0002569599461	133	92.40	4.2e-05	8.8e-02	1.06	27	1	665
cacaca	cacaca tgtgtg	0.0005627576972	261	202.35	4.3e-05	9.0e-02	1.04	28	47	1305
atgttc	atgttc gaacat	0.0005805693704	265	208.76	0.00010	2.1e-01	0.68	29	0	1325
ccctac	ccctac tagagg	0.0001264111687	73	45.45	0.00010	2.1e-01	0.67	30	0	365
tacaca	tacaca tgtgta	0.0007173272393	320	257.93	0.00011	2.2e-01	0.66	31	0	1600
acacac	acacac gtgtgt	0.0004954048413	230	178.14	0.00011	2.3e-01	0.64	32	46	1150
aagtgg	aagtgg ccactt	0.0004384969402	206	157.67	0.00013	2.7e-01	0.57	33	0	1030
catggc	catggc gccatg	0.0001655600161	90	59.53	0.00014	2.9e-01	0.53	34	1	450
acagct	acagct agctgt	0.0002352807457	120	84.60	0.00017	3.5e-01	0.46	35	2	600
atgcta	atgcta tagcat	0.0004407332655	206	158.48	0.00017	3.5e-01	0.45	36	1	1030
tacata	tacata tatgta	0.0011849033927	502	426.06	0.00018	3.8e-01	0.42	37	17	2510
acgtat	acgtat atacgt	0.0003648034445	174	131.17	0.00020	4.3e-01	0.37	38	12	870
cccaca	cccaca tgtggg	0.0002530134897	127	90.98	0.00021	4.3e-01	0.37	39	0	635
atggtc	atggtc gaccat	0.0003552793298	170	127.75	0.00021	4.3e-01	0.37	40	0	850
acatgt	acatgt acatgt	0.0004587554164	212	164.96	0.00025	5.1e-01	0.29	41	0	1060
cacgtg	cacgtg cacgtg	0.0001954215360	101	70.27	0.00033	6.9e-01	0.16	42	0	505
acgtgg	acgtgg ccacgt	0.0002586437675	128	93.00	0.00034	7.0e-01	0.16	43	9	640
aacatg	aacatg catggt	0.0008037809439	349	289.02	0.00034	7.0e-01	0.15	44	25	1745
catttc	catttc gaaatg	0.0008088850275	351	290.85	0.00034	7.1e-01	0.15	45	2	1755
ggtcac	ggtcac gtgacc	0.0001684540841	89	60.57	0.00037	7.7e-01	0.12	46	0	445
catata	catata tatatg	0.0014463692836	599	520.08	0.00038	7.9e-01	0.10	47	28	2995
gtatca	gtatca tgatac	0.0004778825750	218	171.83	0.00039	8.2e-01	0.09	48	0	1090
aataat	aataat attatt	0.0027944787875	1113	1004.82	0.00041	8.4e-01	0.07	49	71	5565
agtggg	agtggg cccact	0.0002229941114	112	80.18	0.00045	9.4e-01	0.03	50	0	560

10.7. ANEXO VII: Ubicación de los sitios de unión para PIF4 y proteínas TCP en los promotores de los genes blancos de PIF4 con expresión reducida en plantas *p15::TCP15-EAR*

10.7.1. Genes con motivos de unión para proteínas TCP y PIF4 en sus promotores

AGI	Gen	Posición del sitio TCP	Secuencia	Posición del sitio PIF4	Secuencia
AT1G02230	<i>NAC004</i>	-66	GGGTCC	-124	CACATG
AT1G03870	<i>FLA9</i>	-924	GGGCCC	-140 -620 -1236 -1247 -1789	CACATG CACATG CACGTG CACGTG CACATG
AT1G04240	<i>SHY2</i>	-1878	GGGACC	-16 -18 -1782 -1851	CACATG CACATG CACATG CACGTG
AT1G12110	<i>NPF6.3</i>	-1855	GGGCCC	-112 -114 -708 -1871 -1891	CACATG CACATG CACATG CACGTG CACGTG
AT1G12500	<i>AT1G12500</i>	-1775	GGGCCC	-1717 -1617	CACATG CACATG
AT1G12570	<i>AT1G12570</i>	-1230	GGGACC	-549	CACATG
AT1G15550	<i>GA3ox1</i>	-2083 -2497	GGGTCC GGGTCC	-70 -1473	CACATG CACGTG
AT1G15580	<i>IAA5</i>	-101	GGGGCC	-427 -565 -567 -605 -745	CACGTG CACATG CACATG CACATG CACATG
AT1G26945	<i>PRE6</i>	-577	GGGACC	-77 -1418 -1984 -2713	CACATG CACATG CACATG CACATG
AT1G29420	<i>SAUR61</i>	-45 -44	GGGACC GGGTCC	-81 -177	CACATG CACATG
AT1G29430	<i>SAUR62</i>	-34	GGGACC	-10 -109	CACATG CACATG
AT1G29440	<i>SAUR63</i>	-119 -118	GGGACC GGGTCC	-92 -193	CACATG CACATG
AT1G29450	<i>SAUR64</i>	-14 -15 -474	GGGTCC GGGACC GGGTCC	-95 -297 -614	CACATG CACATG CACATG
AT1G29460	<i>SAUR65</i>	-23 -161	GGGACC GGGTCC	-104	CACATG
AT1G29500	<i>SAUR66</i>	-211 -210	GGGACC GGGTCC	-36	CACATG
AT1G49220	<i>ATL10</i>	-2622	GGGTCC	-2681	CACATG
AT1G52830	<i>IAA6</i>	-191	GGGTCC	-73 -172	CACATG CACATG

				-311	CACATG
				-949	CACATG
				-1164	CACGTG
AT1G55330	AGP21	-1065	GGGTCC	-198	CACATG
				-2741	CACATG
AT1G66190	AT1G66190	-113	GGGACC	-685	CACATG
		-496	GGGACC		
AT1G66940	AT1G66940	-702	GGGCCC	-1364	CACATG
		-1072	GGGCCC	-1900	CACATG
				-2163	CACGTG
				-2290	CACATG
				-2470	CACATG
AT1G67050	AT1G67050	-2288	GGGTCC	-1925	CACATG
		-2054	GGGTCC	-910	CACATG
				-116	CACATG
AT1G69160	AT1G69160	-559	GGGGCC	-2148	CACGTG
AT1G72150	PATL1	-1696	GGGTCC	-994	CACATG
		-1695	GGGACC	-810	CACATG
AT1G76160	SKS5	-1721	GGGTCC	-2385	CACATG
		-2205	GGGTCC	-1362	CACATG
		-1720	GGGACC	-2367	CACATG
				-1360	CACATG
AT1G76240	AT1G76240	-1494	GGGGCC	-80	CACGTG
				-560	CACGTG
				-726	CACATG
				-1534	CACATG
				-1646	CACATG
				-2417	CACGTG
AT1G78850	MBL1	-441	GGGTCC	-902	CACATG
				-778	CACATG
AT1G80280	AT1G80280	-459	GGGACC	-567	CACATG
		-892	GGGTCC	-706	CACATG
		-893	GGGACC	-883	CACGTG
		-940	GGGACC	-935	CACATG
AT2G16850	PIP2-8	-1178	GGGACC	-201	CACATG
				-1684	CACATG
				-1721	CACATG
AT2G18300	HBI1	-291	GGGTCC	-476	CACATG
AT2G20750	EXPB1	-2647	GGGTCC	-1986	CACATG
				-2214	CACATG
				-2807	CACATG
				-2977	CACATG
AT2G23130	AGP17	-51	GGGACC	-779	CACATG
				-1117	CACGTG
AT2G28140	AT2G28140	-678	GGGACC	-787	CACATG
		-679	GGGTCC	-2071	CACGTG
		-2794	GGGACC	-2551	CACGTG
AT2G29730	UGT71D1	-1010	GGGTCC	-492	CACATG
AT2G33810	SPL3	-609	GGGGCC	-132	CACATG
AT2G34655	AT2G34655	-1680	GGGGCC	-60	CACATG
		-2346	GGGTCC	-79	CACATG
		-2375	GGGTCC	-627	CACATG
		-2681	GGGTCC	-634	CACATG
				-1010	CACATG

				-2166	CACATG
AT2G36870	<i>XTH32</i>	-2297	GGGTCC	-1056	CACATG
		-2296	GGGACC	-2951	CACATG
AT2G37090	<i>IRX9</i>	-641	GGGTCC	-1092	CACATG
		-1113	GGGACC		
AT2G39180	<i>CCR2</i>	-1342	GGGACC	-471	CACATG
				-485	CACGTG
				-2315	CACATG
AT2G40610	<i>EXPA8</i>	-1981	GGGACC	-388	CACATG
				-446	CACATG
				-1417	CACATG
				-1725	CACATG
AT2G41820	<i>PXC3</i>	-1553	GGGTCC	-1727	CACGTG
				-2705	CACATG
AT3G01550	<i>PPT2</i>	-363	GGGGCC	-12	CACATG
		-192	GGGGCC	-125	CACATG
				-378	CACATG
AT3G03850	<i>SAUR26</i>	-255	GGGACC	-77	CACATG
				-150	CACATG
				-304	CACATG
AT3G13980	<i>AT3G13980</i>	-583	GGGTCC	-69	CACGTG
				-423	CACATG
				-2540	CACATG
AT3G16240	<i>TIP2-1</i>	-22	GGGTCC	-45	CACATG
		-537	GGGTCC	-713	CACATG
		-807	GGGTCC	-1398	CACATG
		-808	GGGACC		
AT3G17120	<i>AT3G17120</i>	-84	GGGACC	-1876	CACGTG
		-654	GGGGCC	-1876	CACGTG
		-2839	GGGTCC		
		-2983	GGGTCC		
AT3G21550	<i>DMP2</i>	-818	GGGGCC	-848	CACGTG
				-1016	CACATG
				-1087	CACATG
				-2187	CACATG
AT3G22415	<i>AT3G22415</i>	-1052	GGGTCC	-183	CACATG
				-2976	CACGTG
AT3G23090	<i>WDL3</i>	-1456	GGGACC	-956	CACATG
				-2144	CACATG
AT3G28200	<i>PER31</i>	-2722	GGGTCC	-2709	CACATG
				-992	CACATG
				-1080	CACATG
AT3G29370	<i>P1R3</i>	-555	GGGGCC	-375	CACATG
				-420	CACATG
				-573	CACATG
				-1378	CACATG
				-1490	CACATG
				-1500	CACATG
				-1687	CACATG
				-1714	CACATG
				-1745	CACGTG
				-2607	CACATG
AT3G50240	<i>KIN4B</i>	-455	GGGACC	-499	CACATG
AT3G52840	<i>BGAL2</i>	-19	GGGTCC	-1092	CACATG
		-18	GGGACC	-2261	CACATG

				-2311 -2600	CACATG CACATG
AT4G01460	<i>BHLH57</i>	-660 -661 -2240 -2849	GGGTCC GGGACC GGGACC GGGACC	-1021 -1242	CACATG CACATG
AT4G01950	<i>ATGPAT3</i>	-764	GGGTCC	-1756	CACATG
AT4G02130	<i>GATL6</i>	-656 -662 -1183 -1194	GGGACC GGGTCC GGGACC GGGTCC	-237 -864 -1055	CACATG CACATG CACATG
AT4G16515	<i>RGF6</i>	-9	GGGTCC	-439	CACGTG
AT4G16980	<i>AT4G16980</i>	-318 -102	GGGACC GGGGCC	-493	CACATG
AT4G17460	<i>HAT1</i>	-1315 -1316	GGGACC GGGTCC	-905 -966 -1302	CACATG CACATG CACGTG
AT4G18610	<i>LSH9</i>	-699 -700 -1995	GGGACC GGGTCC GGGTCC	-1983	CACGTG
AT4G25020	<i>AT4G25020</i>	-2147 -2368	GGGTCC GGGTCC	-86 -2250	CACGTG CACATG
AT4G28250	<i>EXPB3</i>	-81 -137	GGGTCC GGGACC	-701 -1141	CACATG CACATG
AT4G29310	<i>AT4G29310</i>	-33 -650 -1886	GGGCCC GGGTCC GGGTCC	-2409 -1954	CACGTG CACATG
AT4G30180	<i>BHLH146</i>	-2129	GGGTCC	-237 -247 -317 -378 -455 -584 -808 -1431 -2188 -2257	CACGTG CACATG CACATG CACATG CACATG CACATG CACATG CACATG CACATG CACATG
AT4G30410	<i>IBL1</i>	-1493 -1492	GGGTCC GGGACC	-9 -1476 -1484 -2247 -2779	CACATG CACATG CACGTG CACATG CACATG
AT4G32880	<i>ATHB-8</i>	-2583 -814	GGGTCC GGGTCC	-71 -532 -789 -2418 -2494	CACATG CACATG CACATG CACATG CACATG
AT4G34610	<i>BLH6</i>	-465 -466 -706	GGGTCC GGGACC GGGTCC	-1133	CACATG
AT4G34760	<i>SAUR50</i>	-11	GGGGCC	-331 -516 -905	CACATG CACATG CACATG
AT4G34790	<i>SAUR3</i>	-45 -218	GGGCCC GGGTCC	-70 -515	CACATG CACATG

		-330	GGGGCC		
AT4G36540	<i>BEE2</i>	-801	GGGACC	-53 -164	CACATG CACATG
AT4G38825	<i>SAUR13</i>	-276 -448	GGGACC GGGCCC	-55 -112 -215	CACATG CACATG CACATG
AT4G38840	<i>SAUR14</i>	-120	GGGCCC	-85 -278 -397	CACATG CACATG CACATG
AT4G38850	<i>SAUR15</i>	-383	GGGCCC	-106 -225 -418	CACATG CACATG CACATG
AT4G39350	<i>CESA2</i>	-81 -67	GGGTCC GGGTCC	-323 -1395 -1903	CACGTG CACATG CACATG
AT4G39770	<i>TPPH</i>	-160 -181 -251 -2546	GGGTCC GGGTCC GGGACC GGGTCC	-246 -246 -821 -821 -1108 -1788 -1887 -1920	CACGTG CACGTG CACGTG CACGTG CACATG CACATG CACGTG CACATG
AT5G03120	<i>AT5G03120</i>	-1963	GGGTCC	-418	CACATG
AT5G03760	<i>CSLA9</i>	-2550	GGGGCC	-1388 -1772 -2043 -2257	CACATG CACATG CACATG CACATG
AT5G10430	<i>AGP4</i>	-1389 -1851	GGGACC GGGTCC	-592	CACATG
At5g14090	<i>LA1</i>	-1250	GGGACC	-1398	CACGTG
AT5G20630	<i>GER3</i>	-1961	GGGACC	-80 -117 -2842 -2911	CACATG CACATG CACATG CACGTG
AT5G23350	<i>AT5G23350</i>	-1143	GGGTCC	-499 -1520 -1531	CACATG CACATG CACATG
AT5G39860	<i>PRE1</i>	-1958	GGGTCC	-936 -1919 -2701 -2815	CACATG CACGTG CACATG CACATG
AT5G51460	<i>TPPA</i>	-430 -318 -572	GGGACC GGGCCC GGGACC	-600 -357 -1665 -357	CACATG CACGTG CACATG CACGTG
AT5G51550	<i>EXL3</i>	-437 -664 -2178	GGGTCC GGGACC GGGCCC	-954 -1849	CACATG CACATG
AT5G54530	<i>AT5G54530</i>	-90 -1415 -1454 -1723 -1797	GGGGCC GGGTCC GGGACC GGGTCC GGGTCC	-201 -506 -1493 -1620 -2650 -2882	CACATG CACATG CACGTG CACGTG CACATG CACATG

AT5G61660	<i>AT5G61660</i>	-2245	GGGTCC	-2237 -2341	CACGTG CACATG
AT5G66800	<i>AT5G66800</i>	-1870	GGGTCC	-270 -367 -2454 -2761	CACGTG CACATG CACGTG CACGTG
AT5G66920	<i>SKS17</i>	-1243	GGGCC	-977 -1142 -1173	CACATG CACATG CACATG
AT1G73830	<i>BEE3</i>	-2464	GGGACC	-1011 -1706 -1726 -1865	CACATG CACATG CACATG CACATG
AT1G75500	<i>WAT1</i>	-827	GGGCC	-531 -1706 -1718	CACATG CACATG CACGTG

10.7.2. Genes con motivos de unión sólo para PIF4 en sus promotores

AGI	Gen	Posición del sitio TCP	Secuencia	Posición del sitio PIF4	Secuencia
AT1G11545	<i>XTH8</i>	-	-	-614	CACGTG
AT1G14730	<i>CY561C</i>	-	-	-1985 -1899	CACGTG CACATG
AT1G20190	<i>EXPA11</i>	-	-	-65 -535 -578 -1162	CACATG CACATG CACATG CACATG
AT1G22330	<i>AT1G22330</i>	-	-	-1184 -1634 -1745	CACATG CACGTG CACATG
AT1G23030	<i>PUB11</i>	-	-	-1249	CACATG
AT1G23080	<i>PIN7</i>	-	-	-499	CACATG
AT1G23480	<i>CSLA3</i>	-	-	-336 -388 -550	CACGTG CACATG CACATG
AT1G26290	<i>AT1G26290</i>	-	-	-2404	CACATG
AT1G29510	<i>SAUR67</i>	-	-	-335 -42	CACATG CACATG
AT1G32100	<i>PRR1</i>	-	-	-2026	CACGTG
AT1G33170	<i>AT1G33170</i>	-	-	-104 -303	CACGTG CACGTG
AT1G33770	<i>AT1G33770</i>	-	-	-1307 -1271	CACATG CACATG
AT1G52700	<i>AT1G52700</i>	-	-	-373 -1098 -1114 -2575	CACATG CACATG CACATG CACATG
AT2G10940	<i>AT2G10940</i>	-	-	-65 -612 -680	CACATG CACATG CACATG
AT2G19460	<i>AT2G19460</i>	-	-	-844	CACGTG

AT2G21650	<i>RL2</i>	-	-	-363	CACGTG
AT2G33570	<i>GALS1</i>	-	-	-100	CACATG
AT2G37925	<i>COPT4</i>	-	-	-717	CACATG
AT2G38120	<i>AUX1</i>	-	-	-140	CACATG
AT3G01680	<i>SEOB</i>	-	-	-93	CACGTG
AT3G03820	<i>SAUR29</i>	-	-	-157	CACATG
AT3G03830	<i>SAU28</i>	-	-	-284	CACATG
				-19	CACATG
AT3G06070	<i>AT3G06070</i>	-	-	-503	CACATG
AT3G07010	<i>AT3G07010</i>	-	-	-602	CACATG
				-604	CACATG
				-610	CACATG
				-681	CACATG
				-895	CACATG
AT3G11700	<i>FLA18</i>	-	-	-575	CACATG
				-615	CACGTG
				-771	CACGTG
AT3G12610	<i>DRT100</i>	-	-	-387	CACATG
				-396	CACATG
				-697	CACATG
				-890	CACATG
AT3G15540	<i>IAA19</i>	-	-	-70	CACGTG
				-177	CACATG
				-344	CACATG
				-659	CACATG
				-1396	CACGTG
				-1840	CACATG
				-2204	CACATG
AT3G16690	<i>SWEET16</i>	-	-	-112	CACATG
AT3G18710	<i>PUB29</i>	-	-	-2901	CACATG
				-1947	CACATG
				-1621	CACATG
AT3G23050	<i>IAA7</i>	-	-	-2113	CACGTG
				-22	CACGTG
AT3G25717	<i>RTFL16</i>	-	-	-526	CACGTG
				-526	CACGTG
AT3G27690	<i>LHCB2.4</i>	-	-	-88	CACGTG
				-88	CACGTG
AT3G52290	<i>IQD3</i>	-	-	-809	CACATG
AT3G56810	<i>AT3G56810</i>	-	-	-76	CACATG
AT3G58850	<i>PAR2</i>	-	-	-128	CACATG
				-729	CACATG
				-731	CACATG
				-739	CACATG
				-775	CACATG
				-1002	CACATG
				-1030	CACGTG
				-2708	CACATG
				-2776	CACATG
				-2782	CACATG
AT3G62110	<i>AT3G62110</i>	-	-	-78	CACGTG
				-71	CACGTG
AT3G62630	<i>AT3G62630</i>	-	-	-753	CACGTG
AT4G28160	<i>AT4G28160</i>	-	-	-676	CACATG
				-172	CACATG

AT4G34770	<i>SAUR1</i>	-	-	-456 -71	CACATG CACATG
AT4G34810	<i>SAUR5</i>	-	-	-551 -69	CACATG CACATG
AT5G01790	<i>AT5G01790</i>	-	-	-500 -407 -156	CACATG CACATG CACATG
AT5G07580	<i>ERF106</i>	-	-	-2071	CACATG
AT5G43700	<i>IAA4</i>	-	-	-386 -250 -98 -1380 -990	CACATG CACATG CACATG CACATG CACATG
AT5G43750	<i>PNSB5</i>	-	-	-951 -40 -1606 -968	CACATG CACGTG CACATG CACATG
AT5G44020	<i>AT5G44020</i>	-	-	-2607 -2187 -1803 -301 -2605	CACATG CACATG CACATG CACATG CACATG
AT5G48900	<i>AT5G48900</i>	-	-	-2362 -2339	CACGTG CACGTG
AT5G51790	<i>AT5G51790</i>	-	-	-1444 -454 -20 -1442	CACATG CACATG CACGTG CACATG
AT5G53500	<i>AT5G53500</i>	-	-	-2714	CACATG
AT5G54585	<i>AT5G54585</i>	-	-	-876	CACATG
AT5G60860	<i>RABA1F</i>	-	-	-1197 -1007	CACGTG CACATG
AT5G65890	<i>ACR1</i>	-	-	-575 -502 -482 -28	CACGTG CACGTG CACATG CACATG
AT5G66590	<i>AT5G66590</i>	-	-	-48	CACATG

10.7.3. Genes con motivos de unión sólo para proteínas TCP en sus promotores

AGI	Gen	Posición del sitio TCP	Secuencia	Posición del sitio PIF4	Secuencia
AT1G67790	<i>SEOC</i>	-107 -106	GGGACC GGGTCC	-	-
AT2G38320	<i>TBL34</i>	-2102	GGGTCC	-	-
AT2G39250	<i>SNZ</i>	-469	GGGACC	-	-
AT5G49170	<i>AT5G49170</i>	-78	GGGTCC	-	-

10.7.4. Genes sin motivos de unión para proteínas TCP o PIF4 en sus promotores

AGI	Gen
AT1G01430	<i>TBL25</i>
AT1G02335	<i>GL22</i>
AT1G07880	<i>ATMPK13</i>
AT1G09390	<i>GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein</i>
AT1G13950	<i>ATELF5A-1</i>
AT1G14190	<i>Glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase family protein</i>
AT1G14280	<i>PKS2</i>
AT1G22360	<i>AtUGT85A2</i>
AT1G22530	<i>PATL2</i>
AT1G61260	<i>Protein of unknown function</i>
AT1G64640	<i>AtENODL8</i>
AT1G72430	<i>SAUR78</i>
AT1G73370	<i>ATSUS6</i>
AT2G22170	<i>Lipase/lipoxygenase</i>
AT2G22980	<i>SCPL13</i>
AT2G35860	<i>FLA16</i>
AT2G42870	<i>HLH1</i>
AT2G42900	<i>Plant basic secretory protein (BSP) family protein</i>
AT2G47930	<i>AGP26</i>
AT3G01490	<i>Protein kinase superfamily protein</i>
AT3G01860	<i>unknown protein</i>
AT3G13403	<i>Defensin-like (DEFL) family protein</i>
AT3G14760	<i>unknown protein</i>
AT3G24110	<i>Calcium-binding EF-hand family protein</i>
AT3G58120	<i>ATBZIP61</i>
AT3G61840	<i>Protein of unknown function</i>
AT4G03330	<i>ATSYP123</i>
AT4G12730	<i>FLA2</i>
AT4G14480	<i>Protein kinase superfamily protein</i>
AT4G23820	<i>Pectin lyase-like superfamily protein</i>
AT4G25260	<i>Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein</i>
AT4G27720	<i>Major facilitator superfamily protein</i>

AT4G33560	<i>Wound-responsive family protein</i>
AT4G34650	<i>SQS2</i>
AT4G36030	<i>ARO3</i>
AT4G38400	<i>ATEXLA2</i>
AT4G38690	<i>PLC-like phosphodiesterases superfamily protein</i>
AT4G38700	<i>Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein</i>
AT5G01240	<i>LAX1</i>
AT5G07110	<i>PRA1.B6</i>
AT5G19190	<i>unknown protein</i>
AT5G25460	<i>Protein of unknown function</i>
AT5G44030	<i>CESA4</i>
AT5G44570	<i>Protein of unknown function</i>
AT5G45820	<i>CIPK20</i>
AT5G46240	<i>KAT1</i>
AT5G53980	<i>ATHB52</i>
AT5G57780	<i>Protein of unknown function</i>
AT5G60020	<i>ATLAC17</i>

10.B. ANEXO VIII: Lista de los sitios de unión de PIF4 y proteínas TCP más cercanos en los promotores de los genes blancos de PIF4 con expresión reducida en plantas *p15::TCP15-EAR*

AGI	Gen	Posición del sitio TCP	Posición del sitio PIF4	Distancia
AT1G80280	<i>AT1G80280</i>	-940	-935	5
AT4G39770	<i>TPPH</i>	-251	-246	5
AT4G30410	<i>IBL1</i>	-1492	-1484	8
AT5G61660	<i>AT5G61660</i>	-2245	-2237	8
AT1G80280	<i>AT1G80280</i>	-893	-883	10
AT4G18610	<i>LSH9</i>	-1995	-1983	12
AT3G28200	<i>PER31</i>	-2722	-2709	13
AT4G17460	<i>HAT1</i>	-1316	-1302	14
AT3G01550	<i>PPT2</i>	-363	-378	15
AT1G12110	<i>NPF6.3</i>	-1855	-1871	16
AT3G29370	<i>P1R3</i>	-555	-573	18
AT1G52830	<i>IAA6</i>	-191	-172	19
AT2G37090	<i>IRX9</i>	-1113	-1092	21
AT3G16240	<i>TIP2-1</i>	-22	-45	23
AT1G29430	<i>SAUR62</i>	-34	-10	24
AT4G32880	<i>ATHB-8</i>	-814	-789	25
AT4G34790	<i>SAUR3</i>	-45	-70	25
AT1G29440	<i>SAUR63</i>	-118	-92	26
AT1G04240	<i>SHY2</i>	-1878	-1851	27
AT3G21550	<i>DMP2</i>	-818	-848	30
AT4G38840	<i>SAUR14</i>	-120	-85	35
AT4G38850	<i>SAUR15</i>	-383	-418	35
AT1G29420	<i>SAUR61</i>	-45	-81	36
AT5G39860	<i>PRE1</i>	-1958	-1919	39
AT5G51460	<i>TPPA</i>	-318	-357	39
AT5G54530	<i>AT5G54530</i>	-1454	-1493	39
AT1G76240	<i>AT1G76240</i>	-1494	-1534	40
AT3G50240	<i>KIN4B</i>	-455	-499	44
AT3G03850	<i>SAUR26</i>	-255	-304	49
AT1G29460	<i>SAUR65</i>	-161	-104	57
AT1G02230	<i>NAC004</i>	-66	-124	58
AT1G12500	<i>AT1G12500</i>	-1775	-1717	58
AT1G49220	<i>ATL10</i>	-2622	-2681	59
AT4G30180	<i>BHLH146</i>	-2129	-2188	59
AT4G38825	<i>SAUR13</i>	-276	-215	61
AT3G01550	<i>PPT2</i>	-192	-125	67
AT4G29310	<i>AT4G29310</i>	-1886	-1954	68
AT5G66920	<i>sks17</i>	-1243	-1173	70
AT1G29450	<i>SAUR64</i>	-14	-95	81
AT4G32880	<i>ATHB-8</i>	-2583	-2494	89
AT3G16240	<i>TIP2-1</i>	-808	-713	95
AT4G25020	<i>AT4G25020</i>	-2147	-2250	103
AT5G54530	<i>AT5G54530</i>	-1723	-1620	103
AT1G80280	<i>AT1G80280</i>	-459	-567	108
AT2G28140	<i>AT2G28140</i>	-679	-787	108
AT5G54530	<i>AT5G54530</i>	-90	-201	111
AT4G02130	<i>GATL6</i>	-1183	-1055	128

AT1G67050	<i>AT1G67050</i>	-2054	-1925	129
AT1G29450	<i>SAUR64</i>	-474	-614	140
At5g14090	<i>LA1</i>	-1250	-1398	148
AT2G20750	<i>EXPB1</i>	-2647	-2807	160
AT3G13980	<i>AT3G13980</i>	-583	-423	160
AT1G76160	<i>sks5</i>	-2205	-2367	162
AT2G41820	<i>PXC3</i>	-1553	-1727	174
AT1G29500	<i>SAUR66</i>	-211	-36	175
AT4G16980	<i>AT4G16980</i>	-318	-493	175
AT2G34655	<i>AT2G34655</i>	-2346	-2166	180
AT2G18300	<i>HBI1</i>	-291	-476	185
AT1G66190	<i>AT1G66190</i>	-496	-685	189
AT4G02130	<i>GATL6</i>	-662	-864	202
AT4G39350	<i>CESA2</i>	-81	-323	242
AT2G28140	<i>AT2G28140</i>	-2794	-2551	243
AT2G40610	<i>EXPA8</i>	-1981	-1725	256
AT5G51550	<i>EXL3</i>	-664	-954	290
AT1G66940	<i>AT1G66940</i>	-1072	-1364	292
AT5G03760	<i>CSLA9</i>	-2550	-2257	293
AT1G75500	<i>WAT1</i>	-827	-531	296
AT1G03870	<i>FLA9</i>	-924	-620	304
AT4G34760	<i>SAUR50</i>	-11	-331	320
AT1G15580	<i>IAA5</i>	-101	-427	326
AT1G78850	<i>MBL1</i>	-441	-778	337
AT1G76160	<i>sks5</i>	-1721	-1362	359
AT4G01460	<i>BHLH57</i>	-661	-1021	360
AT5G23350	<i>AT5G23350</i>	-1143	-1520	377
AT4G34610	<i>BLH6</i>	-706	-1133	427
AT4G16515	<i>RGF6</i>	-9	-439	430
AT2G33810	<i>SPL3</i>	-609	-132	477
AT1G26945	<i>PRE6</i>	-577	-77	500
AT3G23090	<i>WDL3</i>	-1456	-956	500
AT2G16850	<i>PIP2-8</i>	-1178	-1684	506
AT2G29730	<i>UGT71D1</i>	-1010	-492	518
AT4G28250	<i>EXPB3</i>	-137	-701	564
AT5G66800	<i>AT5G66800</i>	-1870	-2454	584
AT1G73830	<i>BEE3</i>	-2464	-1865	599
AT1G15550	<i>GA3ox1</i>	-2083	-1473	610
AT4G36540	<i>BEE2</i>	-801	-164	637
AT2G36870	<i>XTH32</i>	-2297	-2951	654
AT1G12570	<i>AT1G12570</i>	-1230	-549	681
AT1G72150	<i>PATL1</i>	-1696	-994	702
AT2G23130	<i>AGP17</i>	-51	-779	728
AT5G10430	<i>AGP4</i>	-1389	-592	797
AT2G39180	<i>CCR2</i>	-1342	-485	857
AT1G55330	<i>AGP21</i>	-1065	-198	867
AT3G22415	<i>AT3G22415</i>	-1052	-183	869
AT5G20630	<i>GER3</i>	-1961	-2842	881
AT3G17120	<i>AT3G17120</i>	-2839	-1876	963
AT4G01950	<i>ATGPAT3</i>	-764	-1756	992
AT3G52840	<i>BGAL2</i>	-19	-1092	1073
AT5G03120	<i>AT5G03120</i>	-1963	-418	1545
AT1G69160	<i>AT1G69160</i>	-559	-2148	1589