

Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Laboratorio de Biología Celular y Molecular
Instituto de Agrobiotecnología del Litoral – UNL – CONICET

***“Estudios funcionales de factores de transcripción
vegetales de la familia TCP. Análisis de su
participación en el desarrollo vegetal”***

Tesis para acceder al título de Dr. en Ciencias Biológicas

Lic. Nora Uberti Manassero

Director de Tesis: Dr. Daniel H. Gonzalez

Año 2013

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, al Dr. Daniel González, por darme la posibilidad y el lugar para realizar esta tesis. Por permitirme crecer y desarrollarme en el ámbito científico, por su gran paciencia ante mi falta de paciencia.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, institución que ha sido mi segundo hogar desde hace 10 años, donde recibí mi formación de grado y conocí gran cantidad de gente valiosa. Por darme la posibilidad de esta etapa de formación de postgrado. A CONICET, por otorgarme las becas con las cuales he podido realizar este trabajo.

A Elina, por ser mi guía entre las mesadas desde el primer día. Porque ella fue el origen de esta tesis, y ha sabido acompañarme y aconsejarme durante todos estos años. Por haberme contagiado su pasión por este trabajo, y por su amistad sincera. A Luli y a Fran, por su trabajo codo a codo, por sus discusiones interminables y por sus infaltables “chistes ñoños”. Porque su presencia y energías hicieron del laboratorio un lugar cálido y entrañable. A Edu, por permitirme ser su compañera de mesada, por las horas compartidas, las charlas, las risas y los consejos. Por sus mates con café y su cariño. A Caro, por su ternura y su pasión. Por enseñarme una manera dulce de hacer las cosas. A Ivi, por las charlas de horas y su siempre buena predisposición frente a todos mis pedidos de auxilio. A Rodri, por ser un excelente compañero de viajes y la solución a todos mis problemas informáticos. A Ale, por su alegría contagiosa y sus riquísimos postres, que nos endulzaron los días. A Nata, por ser un excelente compañero y un gran compinche. Por mostrarme otra forma de querer este trabajo. Y a Eze, mi querido “hijo laboratoril”, que ha sabido tenerme paciencia en el camino de ir aprendiendo juntos. Porque nuestras discusiones dieron muchos frutos, y nos ayudaron a vislumbrar los caminos que queremos recorrer.

A Grace y a Rosa...por los almuerzos inolvidables y las enseñanzas de vida que siempre voy a llevar conmigo. Por rolar su papel de madres, por cuidarnos y querernos a todos los que pasamos por el laboratorio, por hacernos sentir una gran

familia. A Marta, porque de su mano aprendí a ejercer la docencia. Por su espíritu incansable y sus canciones de todos los días.

A los “chicos del 4to”, por el apoyo cotidiano, por la ayuda mutua y la enorme cantidad de buenos momentos compartidos. A Juli, una gran inspiración en el mundo laboral, una gran amiga en el mundo personal.

A Leandro, Abelardo, Alicia, Andre, Vane y toda la gente del IAL de Esperanza, por su apoyo, ayuda y excelente predisposición. Muchas gracias por su buen humor y por hacerme sentir parte.

A Luci y Vale, mis niñas queridas, que a pesar de no entender una palabra de lo que digo, me escuchan y me aguantan todos los miércoles. Gracias chiquis!!

A mis queridos amigos de Rotaract...por ser la balanza que equilibra mis días y mis energías. Muy especialmente a Cristian, por su infatigable predisposición a ayudarme siempre, por su cariño y su amistad. Por ser mi Pepe Grillo.

A la persona que ha vivido esta tesis día a día, palmo a palmo conmigo. Por su paciencia infinita, por su apoyo incondicional. Por demostrarme que su cariño alcanza hasta para aprender a hacer una PCR...por ser el sostén de mi mundo, gracias eternas, Ger.

Y por último, a mi hermosa familia. Por su confianza plena, por el soporte en los momentos malos y la alegría compartida en los buenos. Por enseñarme todos los días a ser una mejor persona. A mi abuela querida, porque con su gran cariño ha sabido adaptarse y entenderme siempre, a pesar de todas mis locuras. A mi tío, porque su amor no necesita de palabras. A mi tía, en su honor, todas mis horas de estudio están dedicadas a compensar las que ella no pudo tener. A mi hermano, con quien vamos a recibirnos juntos! Porque siempre vamos a estar para el otro, por ser el ying de mi yang. A mis padres. Esa excelente combinación de racionalidad e idealismo que me inspira a seguir, a buscar nuevas metas, a trazar nuevos planes. Porque definitivamente, quiero ser como ellos cuando sea grande...

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Postgrado de la Cátedra de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional del Litoral - Instituto de Agrobiotecnología del Litoral. La gran mayoría de los resultados presentados en este trabajo manuscrito han dado lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a Congresos:

Publicaciones en Revistas Internacionales con Referato Estricto:

Viola, I.; **Uberti Manassero, N.**; Ripoll, R. y Gonzalez, D. (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: 143–155.

Uberti-Manassero, N.; Lucero, L.; Viola, I.; Vegetti, A. y Gonzalez, D. (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: 809–823.

Viola, I.; Reinheimer, R.; Ripoll, R.; **Uberti-Manassero, N.**; Gonzalez, D. (2012) *Determinants of the DNA binding specificity of class I and class II TCP transcription factors*. J. Biol. Chem. 287: 347–356.

Uberti-Manassero, N.; Viola, I.; Welchen, E. y Gonzalez, D. (2013) *TCP transcription factors: architectures of plant form*. Biomol. Concepts. En prensa.

Publicaciones en Congresos Nacionales:

Uberti-Manassero, N. y Gonzalez, D. *Class I TCP proteins regulate organ growth and development in Arabidopsis thaliana*. XLV Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). San Miguel de Tucumán, Tucumán. 10 al 13 de noviembre de 2009.

Uberti-Manassero, N. y Gonzalez, D. *Role of AtTCP15, a TCP transcription factor, in the regulation of organ development in arabidopsis*. XLVI Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Puerto Madryn, Chubut. 30 de noviembre al 3 de diciembre de 2010.

Uberti-Manassero, N. y Gonzalez, D. *The Arabidopsis TCP transcription factor AtTCP16 regulates the expression of meristem-specific genes*. XLVII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Potrero de los Funes, San Luis. 30 de octubre al 2 de noviembre de 2011.

Uberti-Manassero, N. y Gonzalez, D. *Role of AtTCP15 in the regulation of carpel development and cytokinin responses in Arabidopsis thaliana*. XLVIII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mendoza, Mendoza. 30 de octubre al 2 de noviembre de 2012.

MIEMBROS DEL JURADO

Dra. Carla Schommer

Instituto de Biología Celular y Molecular de Rosario (IBR) – CONICET -
Universidad Nacional de Rosario.

Dra. Claudia Casalongue

Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB), Unidad Ejecutora, CONICET -
FCEyN - Universidad Nacional de Mar del Plata.

Dr. Sebastián Asurmendi

Instituto de Biotecnología, CICVyA - INTA Castelar – CONICET.

ÍNDICE

1 ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

2. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	2
----------------------------------	---

RESUMEN

3. RESUMEN	6
------------------	---

INTRODUCCIÓN

4. INTRODUCCIÓN	14
4.1 Desarrollo y mantenimiento del meristema apical del tallo	14
4.2 Formación de primordios y establecimiento de las regiones que limitan el meristema y los órganos secundarios	17
4.3 Desarrollo de los órganos laterales formación de las hojas	20
4.4 Desarrollo de los órganos laterales formación de las flores	24
4.5 Un órgano complejo dentro de la flor desarrollo del gineceo	27
4.6 Las proteínas TCP	33
4.7 Propiedades de unión al ADN	34
4.8 Genes blanco	37
4.9 Interacciones proteína-proteína	38
4.10 Los sitios II como elementos regulatorios en cis reconocidos por las TCPs	42
4.11 Funciones de las proteínas TCP	43
4.11.1 Ramificaciones laterales (o secundarias)	44
4.11.2 Desarrollo de gametofitos	46
4.11.3 Desarrollo de flores	46
4.11.4 Desarrollo de hojas	50
4.11.5 Interacción con vías hormonales	54
4.11.6 Biogénesis de mitocondrias	55
4.11.7 Regulación del ritmo circadiano	56

OBJETIVOS

5. OBJETIVOS	60
5.1 Objetivo general.....	60
5.2 Objetivos específicos	60

MATERIALES Y MÉTODOS

6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
6.1 MATERIALES	62
6.1.1 Material vegetal.....	62
6.1.2 Plantas mutantes y líneas reporteras utilizadas	62
6.1.3 Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas	64
6.1.4 Cepa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> utilizada.....	64
6.1.5 Vectores utilizados	64
6.1.6 Análisis de secuencias	65
6.2 MÉTODOS	65
6.2.1 Amplificación de fragmentos de ADN por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	65
6.2.2 Purificación de fragmentos de ADN	66
6.2.3 Digestión con endonucleasas de restricción.....	66
6.2.4 Preparación de oligonucleótidos sintéticos doble hebra	66
6.2.5 Ligación de moléculas de ADN	66
6.2.6 Clonado de la región promotora de <i>AtTCP11</i>	67
6.2.7 Clonado de la región promotora de <i>AtTCP15</i>	67
6.2.8 Clonado de la región promotora de <i>AtTCP16</i>	68
6.2.9 Clonado de la región codificante de <i>AtTCP11</i>	68
6.2.10 Clonado de la fusión <i>AtTCP11-EAR</i>	69
6.2.11 Clonado de la fusión <i>AtTCP11-EAR</i> bajo el control del promotor de <i>AtTCP11</i>	69
6.2.12 Clonado de la región codificante de <i>AtTCP15</i>	70
6.2.13 Clonado de la fusión <i>AtTCP15-EAR</i>	70
6.2.14 Clonado de la fusión <i>AtTCP15-EAR</i> bajo el control del promotor de <i>AtTCP15</i>	71
6.2.15 Clonado de la región codificante de <i>AtTCP16</i>	71
6.2.16 Clonado de la fusión <i>AtTCP16-EAR</i>	71
6.2.17 Transformación de <i>Escherichia coli</i> con ADN plasmídico por electroporación	72
6.2.18 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con ADN plasmídico por electroporación	72
6.2.19 Mini-preparación de ADN plasmídico	73
6.2.20 Mini-preparación de ADN genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	74

6.2.21 Extracción y purificación de ARN de <i>Arabidopsis thaliana</i>	74
6.2.22 Cuantificación de ácidos nucleicos	74
6.2.23 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	74
6.2.24 Electroforesis de ARN en geles de agarosa desnaturalizantes	75
6.2.25 Técnica de <i>Northern blot</i>	75
6.2.26 Marcado radiactivo de los fragmentos de ADN	75
6.2.27 Hibridización de membranas de nylon	76
6.2.28 Transcripción reversa	76
6.2.29 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	77
6.2.30 Marcación radioactiva de fragmentos de ADN para ensayos de retardo en gel	77
6.2.31 Ensayos de retardo en gel.....	78
6.2.32 Condiciones generales de crecimiento en cámara de cultivo	79
6.2.33 Condiciones de crecimiento en tierra	79
6.2.34 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
6.2.35 Selección de plantas transformantes	80
6.2.36 Cruzamiento de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	81
6.2.37 Análisis de plantas transformadas	81
6.2.38 Tinción de Alexander para granos de polen.....	81
6.2.39 Tratamientos con hormonas	82
6.2.40 Tratamientos con auxinas.....	82
6.2.41 Tratamientos con citoquininas	82
6.2.42 Cuantificación de IAA libre	83
6.2.43 Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa.....	83
6.2.44 Microscopía de interferencia diferencial de Nomarski	83
6.2.45 Microscopía electrónica de barrido	84
6.2.46 Cortes histológicos de órganos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	84
6.3 ANEXO I	85
6.4 ANEXO II.....	88

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.CAPITULO I - ESTUDIOS FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS AtTCP11 Y AtTCP16	92
7.1 Estructura del gen AtTCP11	92
7.2 Estudio del patrón de expresión conferido por la región promotora de AtTCP11	93
7.3 Estudio de mutantes insercionales	93
7.4 La expresión ectópica de la forma represora dominante de AtTCP11 genera una gran variedad de alteraciones morfológicas en <i>Arabidopsis thaliana</i>	94
7.5 Estructura del gen AtTCP16	98
7.6 Patrón de expresión de AtTCP16.....	98
7.7 Estudio de mutantes insercionales	99

7.8 La expresión ectópica de la forma represora dominante de AtTCP16 provoca un gran número de alteraciones morfológicas.....	101
7.9 Los cotiledones de plantas AtTCP16-EAR desarrollan meristemas ectópicos ..	104
8.CAPITULO II - ESTUDIOS FUNCIONALES DE LA PROTEÍNA AtTCP1.....	110
8.1 Estructura del gen AtTCP15	110
8.2 Estudio de la mutante tcp15.....	110
8.3 La expresión constitutiva de una variante represora de AtTCP15 es letal para Arabidopsis thaliana.....	111
8.4 Patrón de expresión de AtTCP15.....	113
8.5 La expresión de p15 AtTCP15-EAR genera una gran variedad de alteraciones morfológicas	114
8.6 AtTCP15-EAR afecta la expresión de genes que regulan el establecimiento de los límites entre meristemas y órganos laterales.....	118
8.7 AtTCP15-EAR regula genes blanco de proteínas TCP de clase II.....	123
8.8 AtTCP15 es un factor activador de la transcripción.....	125
8.9 Las plantas que sobre-expresan AtTCP15 tienen un fenotipo complementario al de las plantas p15 AtTCP15-EAR.....	126
8.10 AtTCP15 participa en diversos procesos regulados por hormonas vegetales...	126
8.11 Las citoquininas inducen la expresión de AtTCP15	128
8.12 Las plantas AtTCP15-OE tienen menores niveles de auxinas que las plantas salvajes	128
8.13 AtTCP15 y su relación con las vías de regulación de auxinas y citoquininas en hojas	131
8.14 AtTCP15 y su relación con las vías de regulación de auxinas y citoquininas en flores.....	137

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES.....	148
----------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA.....	154
-----------------------	-----

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

2 ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa A	ribonucleasa A
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ABS	albúmina sérica bovina
BAP	6-bencilaminopurina
CaMV	virus del mosaico de la coliflor
Ci	curie
CK	citoquininas
cm	centímetros
col.	colaboradores
dATP	desoxiadenosinatrifosfato
dNTP	desoxinucleótidostrifosfato (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
g	gravedad
GA	giberelinas
GUS	β -glucuronidasa
h	hora

HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
IAA	ácido indolacético
LB	Luria-Bertani
M	molar
mA	miliamper/s
min	minuto
ME	meristemas ectópicos
ml	mililitro/s
mM	milimolar
mm	milímetros
mmol	milimoles
MS	medio de cultivo Murashige-Skoog
NAA	ácido naftalenacético
ng	nanogramos
nm	nanómetros
p/v	peso en volumen
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PM	peso molecular
rpm	revoluciones por minuto
RT-qPCR	retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa en tiempo real
s	segundo
SAM	meristema apical del tallo
SDS	dodecil sulfato de sodio
T-DNA	ADN de transferencia
U	unidad/es

UV	ultravioleta
UTR	regiones no traducidas de un gen
v/v	volumen en volumen
vol	volumen/es
W	watt/s
X-gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-glucurónido
μE	microeinstein
μg	microgramos
μl	microlitros
μm	micrometros
μM	micromolar
°C	grados centígrados

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

Proteínas: se escriben en mayúscula. Ej.: AtTCP11

Genes: se escriben en mayúscula e itálica. Ej.: *AtTCP11*.

RESUMEN

3 RESUMEN

Las proteínas de la familia TCP son factores de transcripción específicos de plantas. Su nombre se debe a que contienen el llamado dominio TCP, identificado a partir de homologías de secuencia en los primeros miembros estudiados de la familia: teosinte branched 1, cycloidea y PCF. El dominio TCP está involucrado en el reconocimiento de secuencias específicas de ADN y tiene cierta homología con el dominio bHLH presente en factores de transcripción de eucariotas, incluidas las plantas. En base a la homología de secuencia existente dentro del dominio TCP, estas proteínas han sido divididas en 2 clases, denominadas I y II. Las proteínas de la clase II son las más estudiadas, a partir de la existencia de mutantes con fenotipos reconocibles. De este modo, se ha determinado que las mismas participan en procesos de morfogénesis en hojas y flores y en la inhibición del desarrollo de ramificaciones laterales, así como en la regulación de ciertas vías hormonales. 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. Mucho menos es lo conocido sobre la función de las proteínas de clase I, aunque existen evidencias que también vinculan a algunas de ellas con la regulación de la proliferación y el crecimiento celular. Una de las hipótesis más aceptadas propone que el crecimiento de los órganos estaría regulado por actividades antagónicas de proteínas TCP sobre la proliferación y el crecimiento celular en los bordes de los meristemas correspondientes. De este modo, las proteínas de la clase I estimularían la proliferación celular en determinadas regiones del meristema o primordio y, subsecuentemente, las proteínas de la clase II reprimirían estos procesos a medida que las células van saliendo de la zona de proliferación.

Dado el escaso conocimiento existente sobre las proteínas TCP de clase I, el objetivo general de esta tesis fue realizar un estudio funcional de ciertos miembros de esta subfamilia de factores de transcripción, a fin de revelar su participación en la regulación del desarrollo vegetal. Para ello, los objetivos específicos fueron los siguientes: 1) Estudiar los cambios morfológicos y de desarrollo ocasionados al expresar en plantas de *A. thaliana* las proteínas AtTCP11, AtTCP15 y AtTCP16 en su

forma nativa o fusionadas a un dominio represor; 2) Identificar genes cuya expresión esté regulada directa o indirectamente por las proteínas en estudio; 3) Identificar posibles genes blanco de estas proteínas; 4) Estudiar los patrones de expresión conferidos por las regiones promotoras de los genes que codifican las proteínas bajo estudio.

En base a los objetivos planteados, los resultados obtenidos han permitido echar luz sobre la función de las proteínas TCP de clase I:

AtTCP11 se expresa de manera ubicua en los diferentes estadios de la planta, desde meristemas y primordios de hojas en plántulas, hasta hojas y granos de polen en plantas maduras. A pesar de que la sobreexpresión de la forma nativa no genera un cambio fenotípico apreciable, la expresión de la forma represora dominante AtTCP11-EAR provoca alteraciones en la morfología de las hojas, en la elongación de tallos, pedúnculos y pecíolos y en el desarrollo de los granos de polen. El hecho de que las anomalías morfológicas ocurran en los mismos órganos donde se detecta la expresión del gen es un indicio de que su función está asociada a estos órganos, posiblemente relacionada con la regulación de la proliferación o la expansión celular.

La expresión de AtTCP16 se detecta especialmente en cotiledones, hojas y flores. La expresión de la forma represora de AtTCP16 genera plantas con cotiledones lobulados, hojas redondeadas y flores en las que los verticilos externos no se elongan correctamente. Además, estas plantas desarrollan meristemas ectópicos sobre la cara adaxial de los cotiledones. Estas estructuras expresan genes involucrados en el desarrollo de meristemas, tales como *STM*, *KNATI*, *CUC1* y *CLV3*, y retienen todas las características propias de un meristema apical, ya que son capaces de desarrollar hojas, flores, vainas y semillas. El grado de desarrollo de estos meristemas ectópicos disminuye cuando AtTCP16-EAR se expresa en plantas en las que la función de la proteína *STM* está alterada, lo cual indica que esta proteína es necesaria, al menos parcialmente, para la formación de los meristemas ectópicos. Del mismo modo, la aparición de los meristemas ectópicos demuestra la participación de AtTCP16 en la regulación de la expresión de ciertos genes exclusivos de meristema.

AtTCP15 se expresa en hojas jóvenes, y su expresión se restringe a la base y los márgenes de las mismas a medida que éstas maduran, desapareciendo cuando las hojas están completamente desarrolladas. Asimismo, se expresa en el gineceo y los filamentos de anteras, y posteriormente en el septum y los funículos de las vainas. La expresión de la forma nativa y de la forma represora de AtTCP15 genera fenotipos opuestos y complementarios, sugiriendo que esta TCP es una proteína activadora de la transcripción. El estudio de los fenotipos observados nos llevó a determinar que AtTCP15 es capaz de regular indirectamente la expresión de genes que separan a los meristemas de los órganos secundarios, específicamente de *LOB*, *BOP1*, *CUC1* y *CUC2*. Dado que la expresión de estos genes es también regulada por una AtTCP3 de clase II, decidimos estudiar los genes blanco reportados para esta proteína. Los ensayos realizados nos permiten dilucidar que *IAA3/SHY2* y *SAUR65*, pero no *ASI*, son regulados por AtTCP15, la cual es capaz de reconocer los elementos en *cis* presentes en los promotores de ambos genes. Este resultado evidencia un nuevo punto de solapamiento entre las vías de regulación de proteínas TCP de clase I y II. Por otro lado, los dos genes propuestos como blancos directos de AtTCP15 son ampliamente reconocidos como genes de respuesta a auxinas, lo cual nos llevó a preguntarnos sobre la relación entre estas hormonas vegetales y AtTCP15, y su efecto sobre el desarrollo de *A. thaliana*. AtTCP15 afecta los niveles de la auxina ácido indolacético y la expresión del promotor de respuesta a auxinas DR5, quizás en parte debido a que provoca cambios en la expresión de los genes *YUC1* y *YUC4*, los cuales codifican enzimas involucradas en la síntesis de esta hormona. A través de estos cambios, AtTCP15 participaría en el desarrollo del gineceo, ya que *YUC1* y *YUC4* son fundamentales para generar el máximo de auxinas que provoca la fusión de la región distal de los carpelos y el desarrollo del estilo y las papilas estigmáticas, procesos alterados por AtTCP15. De la misma manera, AtTCP15 parece estar involucrada en la elongación de los filamentos de anteras y en el correcto desarrollo de la lámina de las hojas, probablemente a través de la regulación directa de genes *SAUR*, entre ellos *SAUR65* y *SAUR19*. También observamos que la expresión de *AtTCP15* es inducida por citoquininas. A su vez, AtTCP15 parece mediar la respuesta a esta hormona en los procesos de desarrollo del gineceo, la formación de tricomas en los sépalos y el desarrollo de aserramientos en los márgenes de las hojas, en tanto que reforzaría la retroalimentación negativa clásica de la respuesta a citoquininas a través de la regulación, quizás en forma directa, de la

expresión de *ARR7* y *ARR15*. En función de estos resultados, podemos decir que AtTCP15 actúa de manera ubicua en *A. thaliana*, promoviendo el correcto desarrollo de diversos órganos y tejidos, especialmente a través de su participación a distintos niveles en las vías de regulación de auxinas y citoquininas.

En conclusión, los factores de transcripción TCP de clase I estudiados en el presente trabajo están involucrados en un gran número de procesos, especialmente relacionados con el desarrollo de órganos secundarios. Este trabajo de tesis aporta información relevante sobre las funciones de tres proteínas TCP de clase I de *A. thaliana*, ampliando el conocimiento sobre esta subfamilia y generando nuevas bases para estudios posteriores.

SUMMARY

TCP domain proteins constitute a family of transcription factors found only in plants. These proteins contain a highly conserved domain, the TCP domain, defined by the first identified members of the family: teosinte branched1, cycloidea and PCF. The TCP domain is involved in DNA binding and dimerization, and is similar to the bHLH domain present in eukaryotic transcription factors, including plants. Based on features present both within and outside the TCP domain, TCPs are divided in two classes, named I and II. Class II proteins are more studied, due to the existence of mutants with clear phenotypes. It has been demonstrated that Class II TCPs participate in flower and leaf morphogenesis, shoot branching and hormone pathways. In all cases, the action of these proteins seems to be related, in a positive or negative way, with cell growth and proliferation. Relatively less is known about Class I TCPs, although there is some evidence that relates them with cell growth and proliferation. An accepted hypothesis postulates that organ growth is regulated by the antagonistic activity of TCP proteins on cell growth and proliferation in the margins of meristems. In this way, Class I TCPs would stimulate proliferation in defined regions of meristems or primordia, while subsequently Class II TCPs would repress this process when cells leave the proliferative zone.

Due to the small amount of information available about the role of class I TCP transcription factors, the general objective of this thesis was to carry out a functional study of some members of this sub-family, in order to analyze their participation in plant development. The specific objectives were: 1) To study the morphological and developmental changes caused by the expression of AtTCP11, AtTCP15 and AtTCP16, either in native or modified forms, in *A. thaliana*. 2) To identify genes directly or indirectly regulated by these proteins. 3) To identify possible target genes. 4) To study the expression patterns conferred by the promoter regions of the corresponding genes.

Based on these objectives, the results obtained shed light on the function of Class I TCP proteins:

AtTCP11 is ubiquitously expressed in different plant stages, from meristems and leaf primordia in seedlings, to leaves and pollen grains in mature plants. Although the over-expression of the native form did not generate phenotypic changes, the expression of the dominant repressive form AtTCP11-EAR caused alterations in leaf morphogenesis, shoot, petiole and pedicel elongation, and pollen grain development. Morphological anomalies are coincident with AtTCP11 expression pattern, suggesting that its function is associated with these organs, possibly related with regulation of cell proliferation or expansion.

AtTCP16 expression is detected in cotyledons, leaves and flowers. The repressive form of AtTCP16 expressed in *A. thaliana* generated lobed cotyledons, rounded leaves and flowers with shortened external whorls. In addition, these plants developed ectopic meristems over the adaxial side of cotyledons. These ectopic meristems expressed typical meristematic genes like *STM*, *KNAT1*, *CUC1* and *CLV3*, and retained all the characteristics associated with the shoot apical meristem, since they were able to develop leaves, flowers, siliques and seeds. AtTCP16-EAR expressed in a *STM* mutant developed significantly less ectopic meristems, suggesting that *STM* is at least partially necessary for the development of these structures. The results indicate that AtTCP16 participates indirectly in the regulation of meristematic genes.

AtTCP15 is expressed in young leaves, and its expression is subsequently restricted to the basal margins during maturation, until it finally disappears in mature leaves. This gene is also expressed in gynoecium and anther filaments, as well as in the septum and the funiculus of mature siliques. The expression of the native and repressive forms of AtTCP15 generated opposite phenotypes, suggesting that this TCP acts as a transcriptional activator. The study of the phenotypes led us to find that AtTCP15 is able to indirectly regulate the expression of boundary genes, specifically *LOB*, *BOP1*, *CUC1* and *CUC2*. Since the expression of these genes is also regulated by a Class II TCP, AtTCP3, we decided to study other target genes reported for this protein. We found that *IAA3/SHY2* and *SAUR65*, but not *ASI*, are also regulated by AtTCP15, which is able to interact with *cis* elements that contain a TCP target site in the promoter regions of both genes. This result reveals a new overlapping point between the pathways affected by Class I and Class II TCPs. On the other hand, the fact that *IAA3/SHY2* and *SAUR65* are well known auxin responsive genes led us to analyze the

relationship between AtTCP15, hormones, and plant development. AtTCP15 affects auxin levels and the expression of the DR5 reporter, probably through the regulation of *YUC1* and *YUC4*, genes that encode key enzymes in the auxin biosynthesis pathway. It is probably through this pathway that AtTCP15 regulates gynoecium development, since *YUC1* and *YUC4* are responsible for the auxin maxima necessary for the development of gynoecium apical tissues, like style and stigma, processes altered in plants expressing AtTCP15. In the same way, AtTCP15 seems to be involved in anther filament elongation and leaf expansion, possibly through direct regulation of *SAUR* genes, like *SAUR65* and *SAUR19*. We also observed that AtTCP15 expression is induced by cytokinins. In addition, AtTCP15 seems to mediate cytokinin responses in processes related with gynoecium development, sepal trichome formation and leaf margin serration, while at the same time may potentiate the negative feedback loop typical of cytokinin responses by regulating *ARR7* and *ARR15* expression. Based on these results, we can say that AtTCP15 acts ubiquitously in *A. thaliana*, promoting the correct development of several organs and tissues, especially by participating in the regulation of auxin and cytokinin pathways.

In conclusion, the Class I TCP transcription factors studied during the present work are involved in many processes in *A. thaliana*, especially related to secondary organ growth and development. This thesis brings information about the functions of three Class I TCPs, providing new clues to understand the role of these proteins in plant development and establishing a basis for future studies.

INTRODUCCIÓN

4 INTRODUCCIÓN

La forma y arquitectura de las plantas está dictada por los 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 (Ingram y Waites, 2006). Por lo tanto, mantener una delicada regulación de estos procesos es esencial para producir la correcta estructura de las plantas. En general, los principales reguladores de los procesos de división, crecimiento y diferenciación celular son factores de transcripción, los cuales inician procesos de expresión de genes que eventualmente determinan las características de las células y los tejidos en los que se expresan. Asimismo, la acción de las hormonas está usualmente relacionada a los procesos de 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.

La mayor parte de los órganos de las plantas se desarrollan a partir de los grupos de células indiferenciadas y totipotentes que constituyen los meristemas. Mientras que las células en el centro de los meristemas mantienen su estado indiferenciado, las células de la periferia desarrollan progresivamente ciertos programas que finalizan eventualmente con la formación de los órganos secundarios (Barton, 2010). Por lo tanto, el balance entre ambos tipos celulares es esencial para asegurar la producción de órganos con las características estructurales que permitan el correcto desarrollo de las plantas.

4.1 Desarrollo y mantenimiento del meristema apical del tallo

El meristema apical del tallo (SAM por sus siglas en inglés: Shoot Apical Meristem) se origina durante la embriogénesis y genera prácticamente todos los órganos aéreos de las plantas. El SAM se puede dividir en diferentes regiones, entre las cuales encontramos la zona central (ZC), la zona periférica (ZP) y la zona “medular” (ZM)

(Fletcher y Meyerowitz, 2000). La zona central, como su nombre lo indica, está ubicada en la región central del domo del meristema, y es la encargada de proveer las células tanto para la zona periférica como para la zona “medular”, aunque su velocidad de división es baja. La región que la circunda, la zona periférica, tiene una velocidad de división mayor y es la que da origen a los órganos laterales. La zona “medular” está por debajo de la zona central, y es a partir de la cual se generan los tejidos del tallo (Fig. 4.1 A). Los primordios de hojas se originan a partir de un pequeño grupo de células de la zona periférica del SAM, las cuales luego se regeneran mediante división celular de las zonas central y periférica. En el SAM ocurre una activa división y proliferación celular, y ambos procesos deben estar balanceados para controlar el tamaño y la estructura del meristema (Reddy, 2008). El tamaño del SAM en *A. thaliana* se mantiene mediante la retroalimentación negativa entre WUSCHEL (WUS) y CLAVATA3 (CLV3). Las células del centro organizador, o zona medular, expresan WUS y son las responsables de mantener a las células de la zona central en estado indiferenciado (Schoof y col., 2000). SHOOTMERISTEMLESS (STM) también es requerido para el mantenimiento de las células madre, y su expresión en todo el meristema previene la diferenciación de éstas a células específicas de tejido (Endrizzi y col., 1996). Las citoquininas (CK) también juegan un rol importante en la regulación de la función de los meristemas. Los estudios clásicos de regulación química del crecimiento y la formación de órganos *in vitro* indican que el exceso de CK sobre auxinas promueve la formación de tallos y hojas a partir de cúmulos de células indiferenciadas o callos (Skoog y Miller, 1957). Además, estudios recientes han demostrado que plantas con bajos niveles de CK desarrollan meristemas apicales de menor tamaño y actividad reducida, lo cual sugiere una acción positiva de las CK sobre la actividad del SAM. La regulación mutua entre las CK y los genes exclusivos de meristemas puede explicar la producción de CK y su señalización en el SAM: STM, un factor de transcripción miembro de la familia KNOX de clase I, induce la producción de CK a través de la activación de *AtIPT7*, gen que codifica una enzima clave en la vía de biosíntesis de esta hormona. A su vez, las CK promueven un rápido aumento de los niveles de transcritos de los genes *KNOX I*, indicando la existencia de una retroalimentación positiva entre STM y la vía de señalización de las CK. Por otro lado, los factores de transcripción KNOX reprimen la biosíntesis de giberelinas (GA), reguladoras del crecimiento, para mantener el normal funcionamiento del meristema. Las CK también estimulan la expresión de genes

relacionados con el catabolismo de las GA, reforzando el establecimiento de bajos niveles de GA dentro del SAM. Por lo tanto, las proteínas KNOX son esenciales para el desarrollo de los meristemas, ya que simultáneamente activan la biosíntesis de CK y reprimen la biosíntesis de GA (Su y col., 2011). Sumado a esto, diversos estudios han demostrado que *ARR7* y *ARR15*, los principales genes de respuesta a CK, son requeridos para la correcta expresión de *CLV3*. Dado que *CLV3* limita la expresión de *WUS*, quien, a su vez, reprime la expresión de *ARR5*, *ARR7* y *ARR15*, se establece en el meristema una retroalimentación negativa entre *WUS* y los *ARR* de tipo A mencionados (Fig. 4.1 A) Estudios recientes sugieren que las CK regulan parcialmente la expresión de *WUS*, tanto de manera dependiente, como independiente de *CLV3* (Gordon y col., 2009). Las auxinas también juegan un rol clave en el mantenimiento del SAM. Las auxinas producidas por las proteínas YUCCA (YUC) se acumulan en la zona central del meristema en un nivel óptimo (bajo) capaz de generar una cascada de señales mediada por la vía Aux/IAA-ARF. Es interesante destacar que en el SAM de las mutantes *yucca*, *pin1*, *pinoid* o de plantas tratadas con el inhibidor del transporte de auxinas NPA, se observa un marcado aumento de la expresión de *ARR7* y *ARR15*, indicando que su activación debe estar directamente inducida por la pérdida de la acumulación local de auxinas (Zhao y col., 2010). Dado que las auxinas suprimen la expresión de *STM*, que a su vez promueve la biosíntesis de CK en el SAM (Heisler y col., 2005; Jasinski y col., 2005, Yanai y col., 2005), las auxinas deben reprimir la expresión de *ARR7* y *ARR15* a través de una vía mediada por *STM*. En las mutantes del gen *MONOPTEROS/ARF5* (*MP/ARF5*), *ARR7* y *ARR15* se expresan ectópicamente en la zona central y periférica del SAM (Zhao y col., 2010), sugiriendo que *MP/ARF5* inhibe la expresión de ambos genes en estas zonas. Por lo tanto, *ARR7* y *ARR15* no actúan sólo como supresores de la respuesta a CK en la zona central del SAM, sino también como blancos de la vía de señalización de auxinas mediada por *MP* (Su y col., 2011). Estos resultados también sugieren que las vías de señalización de auxinas y CK convergen en *ARR7* y *ARR15* en la zona central del meristema durante el desarrollo del SAM (Fig. 4.1.A). En contraposición con las CK, las auxinas se acumulan en niveles relativamente altos en regiones puntuales de la zona periférica del SAM, dando lugar a la iniciación de los órganos laterales. Se ha demostrado que las auxinas regulan negativamente la biosíntesis de CK (Nordström y col., 2004), y que su acumulación en los primordios de órganos suprime la expresión de *STM*. En conjunto, estos reportes

permiten establecer un modelo para el mantenimiento del SAM y la formación de los órganos secundarios: elevadas relaciones CK/auxinas son necesarias para mantener el *pool* de células indiferenciadas en el SAM, mientras que un máximo de auxinas (baja relación CK/auxinas) es necesario para promover la diferenciación celular, dando lugar al desarrollo de los primordios de órganos sobre la zona periférica del SAM. La regulación mutua sobre los genes de biosíntesis y de respuesta de ambas hormonas genera la distribución y los niveles óptimos para cada uno de los casos (Su y col., 2011).

4.2 Formación de primordios y establecimiento de las regiones que limitan el meristema y los órganos secundarios

No sólo los niveles de auxinas y CK varían drásticamente entre el SAM y los primordios de órganos laterales, sino también todo el programa de expresión génica. Mientras que el mantenimiento del meristema depende de la expresión de los genes *KNOX I*, su expresión en los primordios es negativamente regulada por los factores de transcripción de tipo MYB pertenecientes a la familia ARP (por las iniciales de sus miembros Asymmetric Leaves 1/ Rough Sheath 2/ Phantastica). Se ha demostrado que AS1 actúa en conjunto con LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB) y ASYMMETRIC LEAVES 2 (AS2), dos proteínas con dominio LBD, y con el factor remodelador de la cromatina HIRA, para formar un módulo represor que inhibe la expresión de los genes *KNOX* de clase I, *KNAT1/BP*, *KNAT2* y *KNAT6*, en la región donde se forma el primordio del órgano secundario (Guo y col., 2008) (Fig. 4.1 B). En los meristemas, AS1 es negativamente regulado por STM, lo cual permite la expresión de los genes *KNOX*. La regulación negativa de los genes *KNOX* y la iniciación de la expresión de los genes regulados por auxinas están interconectadas en los primordios. La acumulación de auxinas parece actuar en paralelo con la represión de los genes *KNOX* mediada por el complejo AS1/AS2 en los primordios, al tiempo que la disminución de la expresión de estos genes reduce la acumulación local de auxinas. Análisis genéticos muestran que la incapacidad para formar los órganos laterales en las inflorescencias de las mutantes *pin1* se debe, al menos en parte, a una extensión de los dominios de expresión de BP (Hay y col., 2006). Más aún, los patrones de expresión de STM y PIN1 son estrictamente complementarios en la región de iniciación de los

órganos secundarios, lo que reafirma el concepto de funciones antagónicas (Heisler y col., 2005).

JAGGED LATERAL ORGANS (JLO), miembro de la familia de proteínas con dominio LBD, se expresa en la región fronteriza entre el SAM y los órganos laterales. El aumento de los niveles de expresión de JLO en las hojas genera márgenes lobulados, debido principalmente al aumento de la expresión de los genes *KNOX* en estas regiones. Los blancos primarios de JLO son probablemente los genes *PIN*, ya que la expresión de *PIN1* y los demás miembros de la familia se reprime rápidamente luego de la inducción de JLO, precediendo la activación de la expresión de *STM* y *BP* (Borghgi y col., 2007). *LOB*, el miembro fundador de la familia de genes con dominio LBD (Husbands y col., 2007), se expresa en la base de todos los órganos laterales, incluidas las raíces. Si bien la función de *LOB* aún no se comprende completamente, diversos genes de la familia LBD están involucrados en la mediación de la respuesta a auxinas. La expresión de *LOB* es inducida por el complejo *AS1/AS2*, y por *BP* (Lin y col., 2003). Además de la familia LBD, un importante número de reguladores transcripcionales actúan en las fronteras entre el SAM y los órganos laterales para reprimir la división celular y el crecimiento. Los genes *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC1, 2 y 3)* de *A. thaliana*, que codifican factores de transcripción de la familia NAC, son los más estudiados de este grupo de genes, y fueron descubiertos debido al fenotipo de la doble mutante *cuc1-cuc2* (Aida y col., 1997). Los embriones de la mutante tienen los cotiledones fusionados, debido a la pérdida de la línea divisoria entre estos órganos. Durante la embriogénesis, los genes *CUC* son requeridos para la activación de la expresión de *STM*, y durante el desarrollo post-embriionario son los responsables de promover la formación de las regiones limítrofes entre el SAM y los órganos laterales, y de los órganos laterales entre sí. *CUC1* y *CUC2*, son post-transcripcionalmente regulados por el miR164, el cual actúa restringiendo y amortiguando la expresión de estos genes (Laufs y col., 2004; Sieber y col., 2007). Existe una interdependencia intrincada entre la iniciación de los órganos secundarios dependiente de auxinas y la expresión de los genes *CUC*. Las mutantes con transporte de auxinas reducido, como *pin1* y *pinoid*, presentan una expansión de los dominios de expresión de *CUC2* y *STM* a la periferia, donde éstos suprimen el crecimiento de los cotiledones y los demás órganos, sugiriendo que la expresión de *CUC* sería negativamente regulada por auxinas. Además, en las

plantas mutantes en el miR164, donde la expresión de CUC1 y CUC2 está aumentada, el patrón de filotaxis está alterado. Si bien la filotaxia está determinada por el establecimiento de los máximos de auxinas, la disminución de la expresión de CUC2 parece actuar *a posteriori* e interferir con el mantenimiento de los ángulos filotácticamente correctos entre los órganos (Furutani y col., 2004; Peaucelle y col., 2007; Rust y Simon, 2008).

PETALLOSS (PTL) codifica un factor de transcripción que separa los sépalos entre sí, suprimiendo el crecimiento en las regiones de los límites (Brewer y col., 2004). En las mutantes *ptl*, y en las dobles mutantes con *cuc1* y *cuc2*, las regiones que limitan los órganos no se establecen, indicando que PTL y CUC actúan reprimiendo el crecimiento a través de vías paralelas. El desarrollo normal de los órganos sólo es posible si se reprime la expresión de CUC y PTL en los primordios, y entre los diversos factores que comparten esta tarea se encuentran AS1 y AS2. Esto aparece claramente reflejado en las mutantes *as1-jag* o *as2-jag*, donde la expresión de PTL, CUC1 y CUC2 en los primordios provoca una severa reducción del tamaño de los órganos (Xu y col., 2008). Además, diversos factores de transcripción de la familia TCP parecen regular la expresión de los genes *CUC*, promoviendo la expresión del miR164 en los órganos laterales (Koyama y col., 2007). *BLADE ON PETIOLE (BOP) 1* y *2*, dos genes que codifican proteínas que contienen el dominio BTB/POZ, se expresan en la base de los órganos, desde donde regulan la diferenciación y la polaridad de las células (Norberg y col., 2005). En las mutantes *bop1-bop2*, la lámina de las hojas se extiende y crece sobre los márgenes de los pecíolos. BOP1 y BOP2 son funcionalmente redundantes, y actúan reprimiendo la expresión de los genes *KNOX* a través de la activación de AS1 y AS2. Aunque los genes *BOP* se expresan en las células adyacentes a los órganos laterales, son requeridos para la expresión de los genes de frontera *LOB* y *LBD36* (Ha y col., 2007). Además, se demostró que las proteínas BOP interaccionan con PERIANTHIA, un factor de transcripción del tipo TGA que controla el número de órganos y la proliferación celular en el meristema. Diversos genes controlan la formación de los límites en flores, regulando al mismo tiempo la expresión de genes de identidad floral. La proteína con dedos de zinc SUPERMAN (SUP) restringe la proliferación en las fronteras entre los estambres y los carpelos, mientras que la proteína tipo superman RABBIT EARS (RBE) actúa por debajo de PTL para separar los órganos del primer verticilo y reprimir la

expresión ectópica del gen homeótico *AGAMOUS* (*AG*) (Rust y Simon, 2008). De todos los miembros de la familia *KNOX*, sólo *KNAT6* se expresa en las fronteras entre los órganos. En una jerarquía funcional, *KNAT6* actúa por debajo de los genes *CUC*, y de manera antagónica a *BP* (Belles-Boix y col., 2006; Ragni y col., 2008).

4.3 Desarrollo de los órganos laterales: formación de las hojas

Las hojas son órganos derivados de la población de células pluripotentes del SAM. Durante el desarrollo vegetativo, las hojas se forman secuencialmente sobre los costados del SAM, a través de la especificación de las células fundadoras. Una división celular activa acompaña el crecimiento del primordio de la hoja, y la diferenciación celular comienza pronto, dando lugar a células especializadas que consolidan las funciones de la hoja. Un evento clave durante la diferenciación celular es la especificación de la identidad adaxial-abaxial, lo que permite el desarrollo de una lámina plana con regiones superiores e inferiores bien definidas. Una vez que la forma básica de la hoja se establece, la división celular cesa y las hojas crecen predominantemente por expansión celular, hasta alcanzar su tamaño final. Las fases de proliferación celular, diferenciación y expansión no están delimitadas de manera rígida en el tiempo, sino que se extienden y superponen, y su coordinación en el tiempo y el espacio es fundamental para producir la forma final de las hojas (Barkoulas y col., 2007).

En el apartado anterior describimos el establecimiento de un primordio, la delimitación de las regiones que median el meristema y el órgano secundario, y los patrones de expresión necesarios para que esto suceda. Sin embargo, el paso clave en la determinación de un primordio de hoja es el establecimiento de su polaridad, lo cual se basa en las interacciones antagónicas mutuas entre los determinantes adaxiales y abaxiales. Los genes de la familia *ARP* no sólo toman parte en el establecimiento de los primordios, sino también en la determinación de la identidad axial. Debido a que se expresan uniformemente en los primordios jóvenes, se ha propuesto que su función como determinantes de identidad adaxial está dada por la interacción con otras proteínas. *AS2* se compleja con *AS1* para ejercer su función en el dominio adaxial, donde una de las funciones de las proteínas *ARP* es la de regular negativamente a los

genes *KNOX I* (Guo y col., 2008; Yang y col., 2008). En las plantas de hojas simples, los genes *KNOX I* son reprimidos en el primordio a lo largo de su desarrollo, pero en plantas con hojas compuestas estos genes se expresan nuevamente en estadios posteriores a fin de permitir la formación de los diferentes lóbulos (Jackson y col., 1994; Lincoln y col., 1994; Bharathan y col., 2002). De igual manera, los genes de la familia HD-ZIP III (por sus siglas en inglés, class III HOMEODOMAIN–LEUCINE ZIPPER) son importantes en la determinación de la identidad adaxial. En *A. thaliana*, esta familia está compuesta por 5 genes: *PHABULOSA (PHB)*, *PHAVOLUTA (PHV)*, *REVOLUTA (REV)*, *ATHB8* y *ATHB15*, regulados por los miR165 y 166. Por el contrario, los genes de la familia *KANADI (KAN)* promueven identidad abaxial, están representados por 4 miembros (*KANI-KAN4*), y se expresan en un patrón complementario al de los HD-ZIP III. Los genes de respuesta a auxinas (ARF por sus siglas en inglés, Auxin Response Factors) *ARF3/ETTIN (ETT)* y *ARF4* también son responsables de la identidad abaxial. *ARF3* y *ARF4* se expresan en el dominio abaxial junto con los genes *KAN*, y parecen ser regulados por éstos a nivel post-traducciona. Además, son negativamente regulados por los ta-siRNA derivados del precursor TAS3, así como por los miR165 y 166, al igual que los HD-ZIP III (Yamaguchi y col., 2012).

Los determinantes adaxiales HD-ZIP III son mutuamente antagónicos con los determinantes abaxiales *KAN* y ambos se regulan negativamente, limitando su expresión a los dominios adaxiales y abaxiales respectivamente. Un antagonismo similar ocurre entre *AS2* y *KAN*, demostrando que estas relaciones entre los determinantes adaxiales y abaxiales juegan un rol fundamental en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad de las hojas, evitando que las células exhiban durante el desarrollo identidad adaxial y abaxial simultáneamente (Yamaguchi y col., 2012) (Fig. 4.1 C).

Si bien los mecanismos precisos que determinan la expansión de la lámina de las hojas aún no se conocen, los genes de la familia *YABBY (YAB)* parecen jugar un rol fundamental en este proceso. En el genoma de *A. thaliana* hay 6 genes *YAB*: *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)*, *YAB2*, *YAB3*, *YAB5*, *CRABS CLAW (CRC)* e *INNER NO OUTER (INO)*, de los cuales los 4 primeros se expresan en estadios vegetativos en

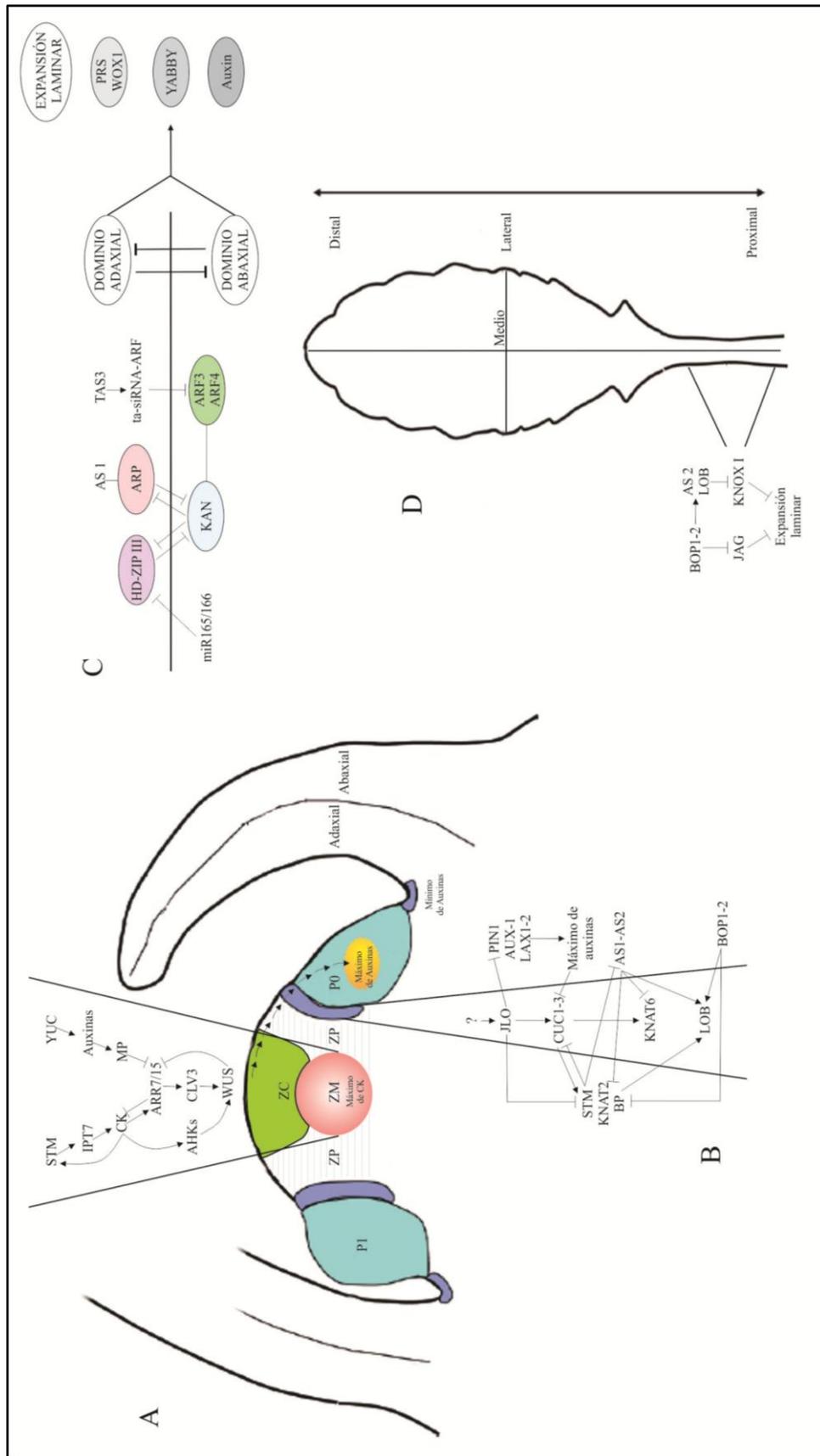


Figura 4.1 - Desarrollo del SAM y órganos laterales vegetativos. (A) Regiones del meristema apical del tallo, ZM: zona medular, ZC: zona central, ZP: zona periférica, P0 y P1: primordios de hojas. En el centro, una ampliación de las interacciones que ocurren en el SAM. (B) Interacciones genéticas que forman las regiones intermedias entre el SAM y los primordios. (C) Factores determinantes de la polaridad adaxial-abaxial y de la extensión de la lámina. (D) Ejes de la hoja e interacciones entre factores que determinan la formación del peciolo. Adaptado de Ferrandiz y col., 2010.

los primordios de hojas. Estos genes se expresan en el dominio abaxial de las hojas, y por ello en una primera instancia se los relacionó con la determinación de la identidad abaxial (Sawa y col., 1999, Siegfried y col., 1999). Sin embargo, estudios posteriores determinaron que su expresión es clave para la extensión de la lámina de las hojas, y que si bien no son requeridos para establecer la polaridad en los estadios iniciales del desarrollo, son indispensables para su posterior mantenimiento (Sarojam y col., 2010). Además, los genes *YAB* son requeridos para la iniciación de los programas de maduración de las hojas, dado que reprimen a los genes *KNOX I* (Kumaran y col., 2002) y promueven la expresión de las proteínas TCP de tipo CIN (Sarojam y col., 2010). Por lo tanto, los genes *YAB* están relacionados con la regulación de la determinación, la identidad dorso-ventral y la extensión de la lámina, características que permiten distinguir a las hojas de los tallos (Fig. 4.1 C).

Sumados a los genes *YAB*, dos genes *WOX* (WUS-related homeobox), *PRESSED FLOWER (PRS)/WOX3* y *WOX1*, parecen ser promotores de la extensión de la lámina, regulando el balance entre los dominios adaxial y abaxial en los márgenes de las hojas, de manera dependiente de *YAB* y *KAN* (Yamaguchi y col., 2012). Por último, las auxinas son también responsables de la expansión de la lámina. Durante el desarrollo de las hojas se establece un máximo de auxinas en el extremo distal de los primordios jóvenes, lo cual se cree que promueve el crecimiento distal (Bowman y Floyd, 2008; Vanneste y Friml, 2009). Posteriormente, las auxinas derivadas de los márgenes de la hoja se distribuyen simétricamente a ambos lados de la lámina, donde se cree que facilitan la expansión. Diversas evidencias sugieren que los niveles de auxinas y la expansión de la lámina están modulados a su vez por los factores de identidad adaxial-abaxial, los cuales parecen regular la expresión de los genes *YUC* (Yamaguchi y col., 2012).

En el pecíolo, *BOP1* y *BOP2* reprimen la proliferación celular y la expansión de la lámina. Estos factores se expresan en la base de la hoja en desarrollo, desde donde activan la transcripción de *AS2*, estableciendo las condiciones para la represión de los genes *KNOX I*. Además, *BOP1* y *BOP2* afectan negativamente la proliferación celular en el extremo proximal de la hoja a través de la represión de la expresión de *JAG* (Jun y col., 2010) (Fig. 4.1 D).

4.4 Desarrollo de los órganos laterales: formación de las flores

Las flores son las estructuras más complejas de las plantas, y son las responsables de distinguir el linaje de plantas recientemente divergente de las angiospermas de las demás plantas terrestres. Las flores han sido objeto de estudio desde hace muchos años, y al día de hoy se cuenta con una gran cantidad de información sobre su evolución y desarrollo, tanto a nivel morfológico como genético. Por lo tanto, en esta introducción realizaremos sólo una recopilación general de la información disponible sobre el desarrollo de las flores de *A. thaliana*, haciendo mayor hincapié en aquellos procesos sobre los que hablaremos *a posteriori* en la sección de resultados y discusión.

El primer paso para la formación de las flores es la transición entre el meristema vegetativo y el meristema apical de la inflorescencia, a partir del cual se formarán los meristemas florales. Este proceso está muy estudiado, y un resumen de los factores ambientales y genéticos que regulan la formación de los meristemas de inflorescencia (MI) y florales (MF) se muestra en la Figura 4.2 A (Liu y col., 2009).

Una vez que los primordios florales se establecen, de manera muy similar a como ocurre con los primordios de hojas, a través de un cúmulo de auxinas, comienzan a expresarse los genes que confieren identidad a los diversos órganos de las flores. En *A. thaliana*, el modelo ABCDE explica la formación de los 4 verticilos florales: sépalos, pétalos, anteras y carpelos, y de los óvulos. Los genes de tipo A están representados por *APETALA1* (*AP1*) y *APETALA2* (*AP2*). Los de tipo B por *AP3* y *PISTILLATA* (*PI*), los de tipo C por *AGAMOUS* (*AG*), los de tipo D por *SHATTERPROOF1* (*SHP1*), *SHP2* y *SEEDSTICK* (*STK*), y los de tipo E por los genes *SEPALLATA* (*SEP1*, *SEP2*, *SEP3* y *SEP4*). Un esquema del patrón de expresión de estos genes y de los órganos que determinan se presenta en la Figura 4.2 B (van Mourik y col., 2010).

El establecimiento de los patrones de expresión de los genes del modelo ABCDE permite la formación de los diversos órganos florales. Dado que el desarrollo de las flores de *A. thaliana* es un proceso complejo, se ha diseccionado para su estudio en 20 estadios, y cada uno de ellos está representado en la Figura 4.3 (Alvarez-Buylla y col., 2010).

De los órganos florales que forman los 4 verticilos, los sépalos y los pétalos (verticilos 1 y 2) forman el perianto, u órganos externos de protección. Ambos órganos tienen una estructura laminar simple, la cual está formada por una epidermis, células de mesófilo y un delicado patrón de venas. Los 4 primordios de sépalos son los primeros en formarse, alrededor del estadio 3 del desarrollo. La epidermis de la cara abaxial (expuesta) de los sépalos presenta células de diferentes tamaños, algunas pequeñas y otras grandes y alargadas, y desarrolla estomas y tricomas. Los 4 pétalos aparecen alrededor del estadio 5 del desarrollo de la flor. Las células de la epidermis adaxial son cónicas, mientras que las de la epidermis abaxial son aplanadas.

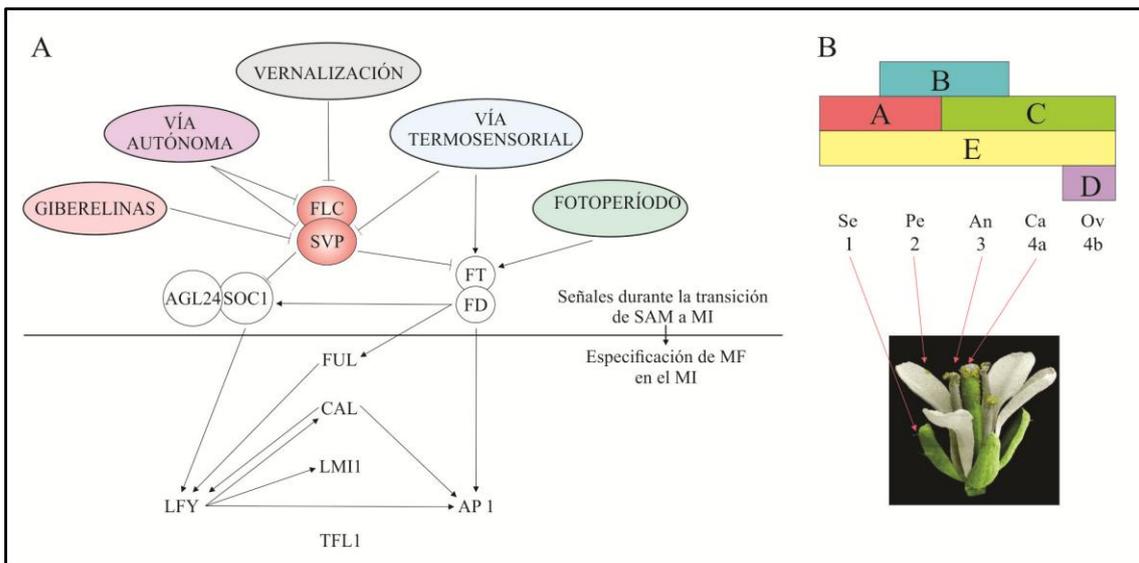


Figura 4.2: Establecimiento de los meristemas de inflorescencia (MI) y floral (MF) y determinación de órganos en flores de *A. thaliana*. (A) La identidad del meristema floral está regulada por de la integración de diferentes señales de floración, las cuales son mediadas por *SOC1* y *FT*, quienes perciben las señales provenientes del ambiente o de los estadios de desarrollo. Durante la transición floral, el complejo *FLC-SVP* reprime la expresión de *SOC1* en las hojas y el SAM, y la expresión de *FT* en las hojas, mientras que el complejo *FT-FD* promueve la expresión de *SOC1*, *AP1* y *FUL* en el SAM. *SOC1* y *AGL24* regulan mutuamente su expresión y forman un complejo que se localiza en el SAM. En el MI, la actividad aumentada de *SOC1* y *FT* promueve la expresión de diversos genes de identidad de meristemas, incluyendo a *LFY*, *AP1*, *CAL* y *FUL*, quienes a su vez especifican la identidad del MF en la periferia del MI. *AGL24*, *AGAMOUS-LIKE 24*; *AP1*, *APETALA1*; *CAL*, *CAULIFLOWER*; *FLC*, *FLOWERING LOCUS C*; *FUL*, *FRUITFULL*; *LFY*, *LEAFY*; *SOC1*, *SUPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*; *SVP*, *SHORT VEGETATIVE PHASE*. Adaptado de Liu y col., 2009. (B) Diagrama del modelo ABCDE para la determinación de los órganos en las flores de *A. thaliana*. Verticilo 1, sépalos (Se); verticilo 2, pétalos (Pe); verticilo 3, anteras (An); verticilo 4a, carpelos (Ca); verticilo 4b, óvulos (Ov). Adaptado de Liu y col. (2009).

Los estambres son los órganos reproductivos masculinos, y sus primordios comienzan a desarrollarse a partir del estadio 5. Los estambres están formados por dos partes, el filamento y la antera. La antera es una estructura bi-locular con dehiscencia longitudinal. A medida que los granos de polen se forman en las anteras (un proceso complejo dividido en 14 etapas en *A. thaliana*), el filamento se elonga hasta alcanzar la altura del gineceo en el estadio 13, momento en el cual se produce la dehiscencia de las anteras, la polinización y la antesis de la flor. (Alvarez-Buylla y col., 2010).

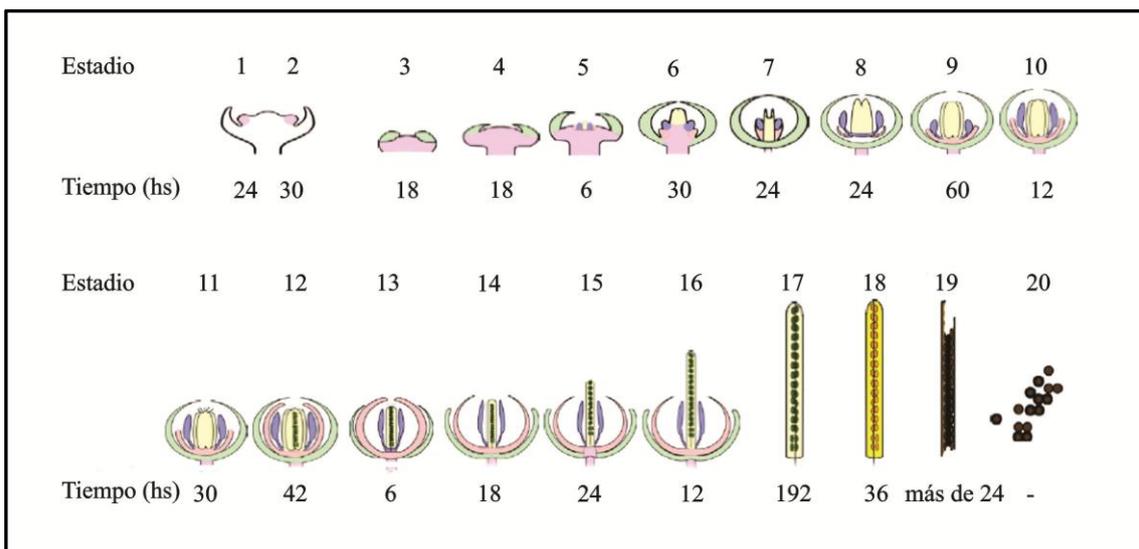


Figura 4.3: Desarrollo de la flor de *A. thaliana*, adaptado de Alvarez-Buylla y col., 2010. Se muestran los 20 estadios en los que se dividió el desarrollo de la flor para simplificar su estudio, desde la formación de los primordios hasta la maduración de las semillas.

El gineceo de *A. thaliana* es una estructura sincárpica compleja, compuesta por dos carpelos fusionados. El gineceo está conectado a la base de la flor a través de un internodo corto llamado ginóforo. Por arriba del ginóforo se encuentra el ovario, el cual contiene entre 50 y 80 óvulos, y constituye la mayor parte de la longitud del gineceo (Fig. 4.4 B). El ovario está dividido en dos longitudinalmente por un septum, el cual se forma post-genitalmente (Fig. 4.4 B). Las paredes de los dos ovarios se llaman valvas, y la parte externa del septum se denomina replum. En el extremo apical del ovario se ubican el estilo y el estigma. El estigma consiste de una sola capa de células epidérmicas alargadas y especializadas, llamadas papilas estigmáticas (Fig. 4.4 A). Esta superficie es la que recibe los granos de polen y permite su germinación. Una vez que

esto ocurre, los tubos polínicos son guiados a través del tracto de transmisión hacia los óvulos. Luego de la fertilización, los óvulos se desarrollan en semillas, y el gineceo se transforma en un fruto con dos cámaras llamado vaina o silicua. Esta estructura se abre al madurar para liberar las semillas, a lo largo de 4 zonas de dehiscencia, constituidas por los finos márgenes de las valvas a cada lado del replum. La lignificación de las células de estas zonas específicas contribuye al proceso de dehiscencia, generando una tensión mecánica que estimula el desprendimiento de las valvas (Ferrandiz y col., 2010).

4.5 Un órgano complejo dentro de la flor: desarrollo del gineceo

El primordio del gineceo se origina en el centro del meristema floral como un anillo de células encerrando una pequeña depresión, y se desarrolla como un tubo abierto durante los estadios 6 a 8. Dos crestas meristemáticas opuestas se forman en las regiones mediales internas del cilindro, y se fusionan para formar el septum. Los tejidos placentarios, que luego dan lugar a los óvulos, se desarrollan en las zonas donde se encuentran el septum y las valvas. En el estadio 9 comienza la diferenciación de las valvas, placenta, septum, estilo y papilas estigmáticas. En los estadios 11 y 12 se cierra la parte apical del gineceo, las papilas estigmáticas completan su desarrollo y el estilo se diferencia del ovario. El gineceo está completamente maduro en el estadio 13, al momento de la antesis, cuando ocurre también la fertilización. Todos los tejidos necesarios para la maduración del fruto y la dehiscencia ya están presentes en este estadio, y completarán su desarrollo luego de la fertilización de los óvulos (Alvarez-Buylla y col., 2010).

Como mencionamos anteriormente al presentar el modelo ABCDE, la expresión de AG es la responsable de especificar la identidad de los carpelos (van Mourik y col., 2010), pero no es el único factor que promueve características carpeloidales. Los dos genes MADS-box *SHP1* y *SHP2* han sido principalmente relacionados con la especificación de la identidad de los márgenes de las valvas (Liljegren y col., 2000), pero estudios posteriores demostraron que las proteínas AG y SHP son muy similares a nivel funcional, aunque juegan roles distintos durante el desarrollo del carpelo debido mayormente a sus diferentes patrones de expresión

(Pinyopich y col., 2001). Los otros dos factores de transcripción requeridos para el desarrollo de los carpelos son SPATULA (SPT) y CRC, los cuales parecen actuar por debajo de AG y SHP (Alvarez y Smyth, 1999).

AG y SEP se expresan en el primordio de los carpelos, incluso antes de que puedan observarse las diferencias morfológicas que indiquen su presencia (Hempel y col., 1997; Savidge y col., 1995; Yanofsky y col., 1990). Cuando el primordio del gineceo comienza a tomar forma y desarrollarse como un cilindro, la expresión de AG es uniforme a través de toda la estructura. Sin embargo, en estadios posteriores AG se expresa sólo en algunos tipos celulares específicos dentro del gineceo, que incluyen a las papilas estigmáticas y los óvulos (Bowman y col., 1991). En los primeros estadios de desarrollo del meristema floral, la expresión de AG es activada por la acción conjunta del regulador de identidad floral LFY y el factor de mantenimiento del meristema WUS. Una vez presente, AG reprime la expresión de WUS, provocando la pérdida de la actividad del meristema floral (Lenhard y col., 2001; Lohmann y col., 2001). A su vez, SHP1 y SHP2 se expresan en todo el gineceo en los primeros estadios y parecen actuar *a posteriori* de AG (Flanagan y col., 1996; Dinneny y col., 2005). Por lo tanto, AG y SHP se ubican en la cima de la vía que otorga identidad de carpelos, y a partir de esta posición pueden activar, directa o indirectamente, la expresión de SPT y CRC (Gomez-Mena y col., 2005).

Una vez que la identidad del órgano se ha especificado, el primordio del gineceo se divide en dos dominios diferentes. En los primeros estadios del desarrollo se especifican los patrones adaxial-abaxial y medio-laterales (Fig. 4.4 B, C), y en estadios posteriores, cuando el primordio toma forma cilíndrica, se define la polaridad apical-basal (Fig. 4.4 D). La polaridad adaxial-abaxial refiere a la diferenciación entre los dominios externos (abaxiales) e internos (adaxiales) del carpelo. Estos dominios son equivalentes a los lados inferiores y superiores de las hojas, respectivamente, y su establecimiento involucra mecanismos genéticos muy similares. Los genes HD-ZIP III se expresan en el dominio adaxial del carpelo, otorgando identidad adaxial en conjunto con *NUBBIN* (*NUB*) y *JAGGED* (*JAG*). En los dominios abaxiales, los genes *KAN*, los factores de respuesta a auxinas ARF3/ETT y ARF4 y los genes *YAB* se expresan desde los primeros estadios del desarrollo (Fig. 4.4 C) (Ferrandiz y col., 2010).

La polaridad medio-lateral también se especifica en los estadios tempranos del desarrollo del gineceo. Los dominios laterales del gineceo dan lugar a las valvas, mientras que los dominios mediales corresponden a los márgenes donde se fusionan los carpelos y dan lugar a los tejidos internos como la placenta y el septum, a los tejidos apicales como el estilo y el estigma y al tejido externo del replum. A lo largo del eje medio-lateral se desarrollan dos tipos de tejidos: en la zona media se forma un nuevo meristema, mientras que los dominios laterales se desarrollan como tejidos diferenciados. De acuerdo con esto, diversos genes relacionados con el mantenimiento del SAM, como los genes *KNOX I* y los genes de frontera *CUC1* y *CUC2*, se expresan específicamente en la región media, donde parecen ser requeridos para la formación del tejido de los márgenes entre las valvas y el replum (Ishida y col., 2000). Por el contrario, los genes que reprimen el estado de indiferenciación celular se expresan en los dominios laterales, entre ellos los genes *YAB*, *JAG/NUB* y *ASI/AS2* (Alonso-Cantabrana y col., 2007; Bowman y Smyth, 1999; Dinneny y col., 2006; Sigfried y col., 1999) (Fig. 4.4 D). Una vez más, las redes genéticas que mantienen separados al SAM y a los primordios laterales parecen funcionar de manera similar en el establecimiento del patrón medio-lateral del gineceo. Por lo tanto, se ha propuesto un modelo en el cual se forman dos gradientes con acciones opuestas: en los dominios laterales se encuentra un máximo de expresión de *FIL/YAB3/JAG* y *AS*, lo cual da lugar a la especificación de las valvas, mientras que en el dominio medial se encuentra un máximo de expresión de los genes *KNOX I* y *REPLUMLESS (RPL)*, dando lugar a la formación del replum. Su acción conjunta y la superposición de estos gradientes permiten la formación de las regiones denominadas márgenes de valva (Alonso-Cantabrana y col., 2007). Además, las auxinas son otro factor importante en la especificación de la polaridad medio-lateral, dado que recientemente se ha demostrado que hay un máximo de esta hormona en la región media, mientras que se encuentran muy bajos niveles de la misma en la región de las valvas (Sorefan y col., 2009) (Fig. 4.4D).

Como mencionamos anteriormente, el desarrollo de los dominios laterales da lugar a la formación de las paredes del ovario (valvas) y a los márgenes de las valvas o bordes del replum. Al contrario de AG, que ha sido propuesto como el responsable de la identidad de valva (Bowman y col., 1991), los genes SHP promueven la formación de los márgenes (Liljegren y col., 2000). La expresión de SHP está restringida a los

márgenes de las valvas por la acción de FRUITFULL (FUL) en las valvas, y por la acción de RPL en el replum (Ferrandiz y col., 2000; Gu y col., 1998; Roeder y col., 2003). En esta fina capa de tejido, compuesta por 3 o 4 capas celulares, SHP activa la expresión de *INDEHISCENT* (IND) y *ALCATRAZ* (ALC), dos genes que codifican proteínas bHLH requeridas para la formación de la zona de dehiscencia (Liljegren y col., 2000; Rajani y Sundaresan, 2001). Por lo tanto, se ha propuesto un modelo en el cual la acción cooperativa de FIL, YAB3 y JAG en las valvas activaría la transcripción de *FUL* y *SHP* en las valvas y los márgenes, respectivamente. Además, la expresión en el replum de la proteína con homeodominio RPL reprime la actividad del complejo FIL/YAB3/JAG, previniendo la activación de *SHP* (Dinneny y col., 2005). Las auxinas también están relacionadas con el desarrollo de los dominios laterales de los carpelos, ya que recientemente se ha demostrado que se requiere un mínimo de auxinas para la

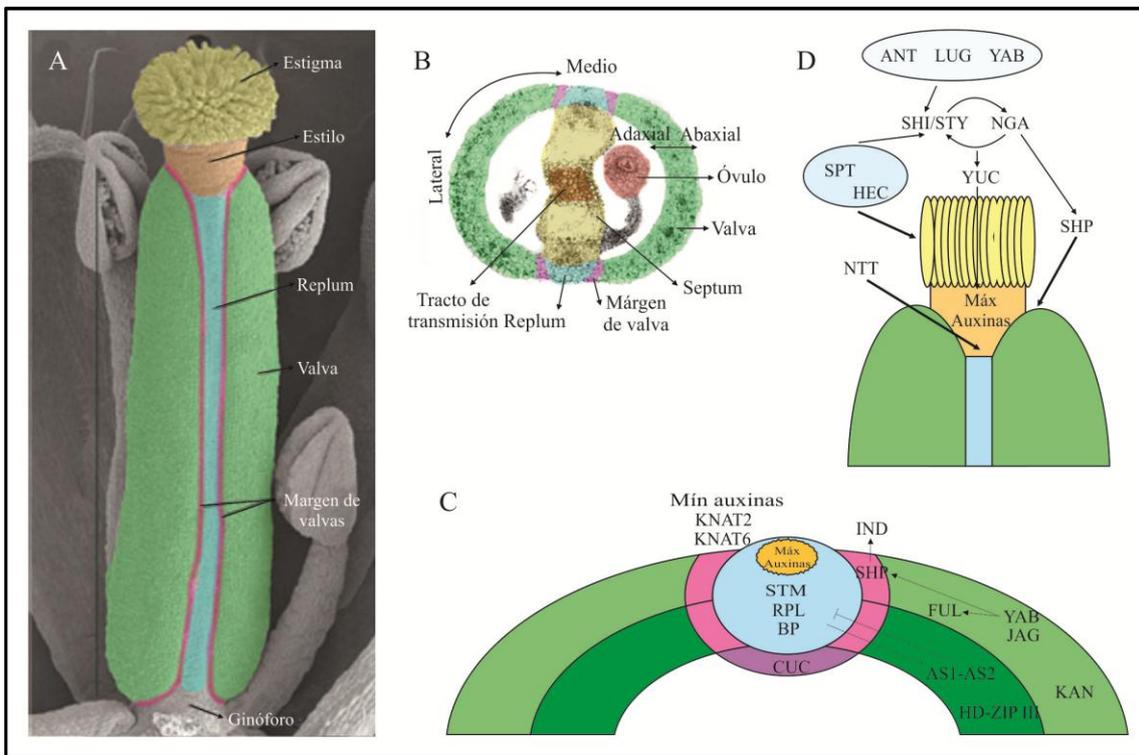


Figura 4.4: Formación del gineceo en *A. thaliana*. (A) Zonas y tejidos que conforman el gineceo. (B) Corte transversal donde se observan los tejidos internos. (C) Interacciones que promueven la formación de los ejes medio-lateral y adaxial-abaxial del gineceo. (D) Interacciones que promueven la formación de los tejidos marginales apicales del carpelo. Adaptado de Ferrandiz y col., 2010.

diferenciación de las zonas de dehiscencia en los frutos de *A. thaliana*. La creación del mínimo de auxinas es responsabilidad de IND, quien controla la dirección del transporte de auxinas a través de una relocalización de los transportadores PIN (Sorefan y col., 2009) (Fig. 4.4 D). SPT también se expresa en las zonas de dehiscencia, donde es regulada por IND (Groszmann y col., 2008), pero su función en este mecanismo aún no se comprende completamente.

De acuerdo con lo discutido anteriormente, los tejidos marginales del carpelo son derivados de la región media del primordio del gineceo y se localizan en la región fronteriza que se forma entre los dos carpelos fusionados. Estos tejidos son la placenta, el septum, el tracto de transmisión, el estilo y el estigma (Bowman y col., 1999) (Fig. 4.4 A). Muchos factores toman parte en el desarrollo de estos tejidos y, en general, muestran un elevado grado de redundancia funcional. Entre ellos, AINTEGUMENTA (ANT), LEUNIG (LUG), SEUSS (SEU) y FIL forman un complejo multimérico necesario para el desarrollo de los tejidos marginales apicales del carpelo (Ferrandiz y col., 2010) (Fig. 4.4 D). SPT es otro de los factores de mayor importancia, y se lo ha propuesto incluso como un mediador de la respuesta a auxinas en los tejidos marginales (Heisler y col., 2001). Otros factores específicamente relacionados con el desarrollo del tracto de transmisión son las proteínas bHLH HECATE (HEC1-3) (Gremski y col., 2007). Las proteínas HEC son capaces de interactuar con SPT y se ha propuesto su acción conjunta en la especificación del tejido mencionado, sumada a la función de NO TRANSMITTING TRACT (NTT) (Crawford y col., 2007) (Fig. 4.4 D).

Otros factores importantes que promueven el desarrollo de los tejidos marginales de los carpelos son los miembros de la familia SHI/STY, factores activadores de la transcripción del tipo dedos de zinc (Kuusk y col., 2002). STYLISH1 (STY1) parece actuar por debajo de LUG para promover la formación de los tejidos marginales apicales, y ha sido ligado a las auxinas ya que es capaz de activar directamente la expresión de uno de los genes de la vía de biosíntesis de esta hormona, *YUC4* (Eklund y col., 2010; Kuusk y col., 2006; Sohlberg y col., 2006). Recientemente, se ha propuesto que los genes *NGATHA* (*NGA*) actúan cooperativamente con *STY* en el desarrollo del estilo, promoviendo la biosíntesis de auxinas en el extremo distal de los carpelos, a través de la activación de los genes *YUC* (Alvarez y col., 2009; Trigueros y col., 2009). Aunque la regulación jerárquica entre *NGA* y *STY* no ha sido elucidada, se

postula una posible retroalimentación positiva entre ambos factores (Fig. 4.4 D). Los genes *SHP* han sido mencionados anteriormente en relación a su importancia para la identidad de los carpelos y la diferenciación de los márgenes de las valvas, y recientemente se los ha vinculado también con el desarrollo del estilo y el estigma, de manera dependiente de *NGA* (Colombo y col., 2010), aunque este mecanismo parece ser muy complejo y no ha sido aun completamente dilucidado.

Las auxinas son, claramente, las mayores responsables del desarrollo del patrón apical-basal del gineceo. El modelo propuesto por Nemhauser y colaboradores (2000) propone que un máximo de auxinas en el extremo distal del gineceo induce la diferenciación y proliferación del estigma y el estilo, y que niveles intermedios y bajos de esta hormona especifican la formación del ovario y el ginóforo. De acuerdo con este modelo, los reguladores de la biosíntesis de auxinas, *SHI/STY* y *NGA*, y sus blancos *YUC1* y *YUC4*, se expresan en el extremo apical de los gineceos jóvenes, generando el máximo de auxinas propuesto (Fig. 4.4 D). Además, la inhibición del transporte polar de auxinas, o la sobreexpresión de *STY1*, son capaces de restaurar la proliferación del estilo y estigma ausentes en las mutantes *lug*, *seu*, *ant*, *styl1*, *spt*, *crc* y *jag*, demostrando que las auxinas actúan por debajo, o en paralelo a los genes promotores de estilo y estigma (Ferrandiz y col., 2010).

El programa apical debe ser reprimido en la zona con niveles intermedios de auxinas, a fin de permitir la especificación del ovario. Se ha propuesto que esto sucede por la respuesta de *ETT/ARF3* a los niveles de auxinas intermedios encontrados en esta región. Debido a que *ETT/ARF3* reprime la actividad de los genes *SPT* y *HEC*, promotores de estilo, estigma y tracto de transmisión, su actividad en la zona media debe reprimir localmente el programa de desarrollo apical (Alvarez y Smyth, 1999; Gremski y col., 2007; Heisler y col., 2001; Sessions y col., 1997). El desarrollo del ginóforo debe ser restringido a la región basal del gineceo mediante la acción de las proteínas dedos de zinc *KNUCKLES* (*KNU*), a través del establecimiento o mantenimiento de un tejido limitante en esta posición (Payne t col., 2004).

A pesar de que el modelo del gradiente de auxinas se utiliza para explicar el establecimiento del eje apical-basal, su existencia no se ha comprobado aún, más allá de la presencia del máximo de auxinas en el extremo distal del gineceo. Los niveles de

auxinas a lo largo del cilindro del gineceo no han sido medidos, y por lo tanto la hipótesis de los niveles intermedios y bajos de auxinas en el ovario y el ginóforo aún debe ser demostrada. Además, recientemente se ha sugerido que el extremo distal del gineceo se distingue del ovario a través de un gradiente opuesto de CK (Ostergaard, 2009).

A pesar de la gran cantidad de factores responsables de la especificación de los distintos tipos de tejidos dentro del gineceo, aún restan por determinar proteínas, efectores o mecanismos que permitan establecer claramente las pautas de desarrollo y formación de este órgano tan complejo.

4.6 Las proteínas TCP

Las proteínas TCP (TCPs) son factores de transcripción involucrados en diversos procesos relacionados con el crecimiento, como el desarrollo de hojas, la formación de ramificaciones laterales, la morfogénesis floral, el desarrollo de polen, la germinación, la senescencia, el ritmo circadiano, la regulación del ciclo celular y la señalización hormonal (Martín-Trillo y Cubas, 2010). Estas proteínas contienen un dominio de 59 aminoácidos altamente conservado, el dominio TCP, definido a partir de los tres primeros miembros identificados: TB1 (teosinte branched1), CYC (cycloidea) y PCF1 y 2 (Cubas y col., 1999). El dominio TCP es responsable de la unión al ADN y la dimerización, y su estructura secundaria sugiere que 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 y bHLH (Fig. 4.5 A) muestran que los residuos hidrofóbicos implicados en la dimerización y la formación de la interfase entre las hélices en las proteínas bHLH se encuentran conservados en el dominio TCP (Aggarwal y col., 2010). 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 (Kosugi y Ohashi, 1997; Cubas y col., 1999).

Estudios evolutivos indican que la familia TCP surgió a partir de un ancestro aún desconocido luego de la aparición de las algas verdes y antes de la emergencia de las plantas terrestres (Navaud y col., 2007).

En base a las características presentes tanto dentro como fuera del dominio TCP, la familia se divide en dos sub-familias o clases: clase I (también llamada PCF o TCP-P) y clase II (CYC/TB1 o TCP-C) (Cubas y col., 1999; Navaud y col., 2007). 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; y 3) la longitud de la hélice II. A su vez, la clase II está dividida en dos linajes denominados CIN y CYC/TB1 (o ECE) (Fig. 4.5 B). El linaje CYC/TB1 es específico de angiospermas y sufrió dos grandes eventos de duplicación antes de la diversificación de las eudicotiledóneas, lo que dio lugar a la aparición de los clados CYC1, CYC2 y CYC3 (Howarth y Donoghue, 2006). Por fuera del dominio TCP, diversos miembros de la clase II presentan un dominio R de función aún desconocida, cuya estructura de tipo “*coiled-coil*” podría ser capaz de mediar interacciones proteína-proteína (Lupas y col., 1991). Por su parte, los miembros de la clase I comparten secuencias cortas que flanquean el dominio TCP.

4.7 Propiedades de unión al ADN

Las primeras evidencias de 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 (Kosugi y Ohashi, 1997). 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 TCPs de arroz (PCF2 y PCF5) (Kosugi y Ohashi, 2002) y de *A. thaliana* (AtTCP4, AtTCP15 y AtTCP20) (Schommer y col., 2008; Viola y col., 2011) sugieren que la secuencia consenso de unión de las TCPs de clase I puede definirse como GTGGGNCC, mientras que las proteínas de clase II muestran preferencia por la secuencia GTGGNCCC. Recientemente, se ha establecido que el mayor determinante de las diferencias en las preferencias de unión de las dos clases es el residuo de la posición 11 del dominio TCP de clase I, o su equivalente, el residuo 15 del dominio TCP de clase II (Viola y col., 2012). Mientras que todas las proteínas de clase II contienen un residuo de ácido aspártico (Asp) en dicha posición, la mayoría de las proteínas de clase I presentan una glicina (Gly), y las mutaciones recíprocas de estos residuos conllevan un cambio de especificidad. En concordancia con estos resultados, AtTCP16, una proteína de clase I con Asp11, muestra preferencia por la secuencia de unión de las proteínas de clase II (Viola y col., 2012).

Se ha propuesto, entonces, que la preferencia entre las 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. 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*. El dominio HLH también tiene influencia sobre la selectividad de la región básica, ya que determina el requerimiento de una región básica extendida en proteínas con Asp15 y genera una mayor o menor eficiencia en la discriminación entre secuencias relacionadas (Viola y col., 2012).

Hasta el presente, no se han realizado estudios estructurales sobre el dominio TCP, o el complejo que éste forma con el ADN, y lo que se sabe acerca de sus propiedades bioquímicas y de unión al ADN está basado en estudios de mutagénesis y modelado molecular utilizando el dominio bHLH de la proteína MyoD como molde (Aggarwal y col., 2010; Viola y col., 2011; Viola y col., 2012). Tal como fue predicho por Cubas y colaboradores en 1999, la región básica del dominio TCP es mayormente desestructurada y la formación de una hélice es inducida por la unión al ADN (Aggarwal y col., 2010). Sumado a esto, se ha demostrado que AtTCP4 es capaz de

formar dímeros tanto en presencia como en ausencia de ADN y que una versión mutada de esta proteína en los residuos que formarían parte de la interfase del dímero no puede unir ADN, sugiriendo que la dimerización es necesaria para la unión a las secuencias de ADN blanco (Agarwal y col., 2010). Viola y colaboradores (2011) desarrollaron estudios bioquímicos de las propiedades de unión al ADN de cuatro TCPs de clase I de *A. thaliana*, utilizando secuencias palindrómicas de 10 pares de bases (pb) conformadas por dos hemi-secuencias de tipo GTGGG. Mediante estos estudios, los autores determinaron que, con excepción de AtTCP11, la especificidad de unión recae mayormente en la interacción simultánea de los dos monómeros con los pares de bases G:C ubicados en las posiciones 3 y 4 de cada hemi-secuencia. Por otra parte, y de acuerdo con la secuencia consenso encontrada para PCF2 (Kosugi y Ohashi, 2002), AtTCP15 y AtTCP20 (Viola y col., 2011), modificaciones en las posiciones 1 y 2 de la hemi-secuencia no tienen efecto sobre la unión, siempre y cuando se den sólo sobre una de éstas, por lo que se formaría un complejo asimétrico sobre el ADN.

4.8 Genes blanco

Dado que las secuencias consenso de las TCPs de clase I y II son distintas pero se superponen, se ha planteado la hipótesis de que proteínas de ambas clases podrían compartir genes blanco, regulando la expresión de los mismos en forma antagónica (Kosugi y Ohashi, 2002; Li y col., 2005). Sin embargo, estudios utilizando mutantes o plantas que sobreexpresan formas nativas o modificadas de las TCPs sugieren que una redundancia parcial en las funciones de las diversas TCPs se superpone con funciones específicas para cada una de ellas. Hasta el momento, la existencia de funciones solapadas entre las TCPs de clase I y II ha sido demostrada en pocos trabajos. Recientemente, se ha demostrado que *LIPOXYGENASE2* (*LOX2*), un gen relacionado con la biosíntesis de ácido jasmónico (JA por sus siglas en inglés), es blanco tanto de AtTCP20 (de clase I) como de AtTCP4 (de clase II), aunque la primera inhibe la expresión de *LOX2* en tanto que la segunda la induce (Schommer y col., 2008; Danisman y col., 2012). Aunque la hipótesis de la existencia de funciones antagónicas entre las TCPs de las clases I y II se basa en la unión a los mismos sitios blanco, AtTCP20 y AtTCP4 unen regiones diferentes del promotor de *LOX2*, lo cual sugiere la existencia de mecanismos alternativos para la acción antagónica de las TCPs de ambas

clases (Danisman y col., 2012). En la Tabla 4.1 se presentan una lista de genes blanco identificados y/o propuestos para las TCP.

Una pregunta que surge del análisis de lo anteriormente expuesto es si las secuencias consenso definidas para las TCPs de clase I y II son válidas para todos los miembros de cada una de las clases, o si hay variaciones en las especificidades de unión al ADN. Según lo reportado, AtTCP16 prefiere una secuencia de unión de clase II a pesar de ser una TCP de clase I, lo cual está relacionado a la presencia de Asp en la posición 11 del dominio TCP (Viola y col., 2012). Los ensayos de preferencia de unión al ADN sugieren que los cambios en la especificidad pueden darse en miembros de las dos clases. Por ejemplo, la proteína de clase II AtTCP4 selecciona la secuencia GTGGTCCC, lo cual denota una mayor preferencia por una T en la posición 5 que la observada para PCF5 (Schommer y col., 2008). Asimismo, la secuencia consenso determinada para CYC, una TCP de clase II de *A. majus*, es GNGGGNCC, la cual es más parecida a una secuencia de clase I (Costa y col., 2005). Las bases moleculares para explicar este comportamiento aún se desconocen. De acuerdo a ensayos de SELEX (por sus siglas en inglés: systematic evolution of ligands by exponential enrichment) realizados con dos TCPs de clase I, AtTCP15 y AtTCP20 de *A. thaliana*, las preferencias de unión para ambas son similares, aunque no idénticas (Viola y col., 2011). AtTCP11, otra TCP de clase I, muestra un comportamiento diferente, ya que prefiere la secuencia GTGGGCCN. De acuerdo a estudios de mutagénesis, las diferentes propiedades de unión de AtTCP11 pueden atribuirse a la presencia de una treonina (Thr) en la posición 15 del dominio TCP, la cual está normalmente ocupada por una Arg en las demás TCPs de *A. thaliana*. Además, la naturaleza del residuo de la posición 15 también afecta la eficiencia de unión al ADN de las proteínas de clase I. En resumen, los reportes citados sugieren que los cambios en las preferencias de unión al ADN podrían ser un mecanismo a través del cual las TCPs podrían adquirir su especificidad funcional.

4.9 Interacciones proteína-proteína

Tal como fue reportando para las proteínas bHLH, los factores de transcripción TCP pueden unir ADN en forma de homo o heterodímeros. Diversos estudios realizados

TCP		BLANCO		DESCRIPCIÓN		REFERENCIAS	
PCF1 PCF2	(+) PCNA			PCF1 y PCF2 de arroz unen específicamente dos elementos en <i>cis</i> (sitios IIa y IIb) de la región promotora del gen de arroz PCNA, esenciales para su expresión en meristemas.			Kosugi y Ohashi (1997)
AfTCP15	(+) CYCA2;3 (+) RBR			AfTCP15 regula directamente la expresión de reguladores negativos de la endoreduplicación.			Li y col. (2012)
AfTCP20	(+) CYCB1;1 (+) PCNA2 (+) RPL24B (+) RPS15aD (+) RPS27aB			AfTCP20 estimula el crecimiento y la división celular a través de la regulación transcripcional de CYCB1;1, PCNA2, y de los genes ribosomales RPL24B, RPS15aD y RPS27aB. Los elementos GCCCR presentes en los promotores de estos genes son requeridos para mantener elevados niveles de expresión.			Li y col. (2005)
AfTCP20	(-) LOX2 (+) AfTCP9			AfTCP20 inhibe la biosíntesis de JA a través de la represión transcripcional de LOX2, tanto directa como indirectamente (a través de la activación de AfTCP9). Además, AfTCP20 controla el crecimiento y la división celular indirectamente a través de la vía de señalización de JA.			Danisman y col. (2012)
AfTCP21/CHE	(-) CCA1			AfTCP21 se une al promotor de CCA1 y a su vez la expresión de AfTCP21 es regulada por CCA1. Dado que AfTCP21 y TOC1 interactúan, se establece una conexión a nivel molecular entre TOC1 y CCA1.			Pruneda-Paz y col. (2009)
AfTCP3	(+) miR164, AS1, IAA3/SHY2, SAURs			AfTCP3 controla la diferenciación de las células de las hojas a través de la regulación negativa de los genes CUC.			Koyama y col. (2010)
AfTCP4	(+) LOX2			AfTCP4 estimula la biosíntesis de JA a través de la activación directa de LOX2.			Schommer y col. (2008)
AfTCP13/PTF1	(+) psbD			AfTCP13 ha sido localizado en cloroplastos. Es capaz de unir la secuencia GTGGACC del promotor de psbD.			Baba y col (2001).
AfTCP24	(-) AtCDT1a (-) AtCDT1b			El heterodímero ABAP1-AfTCP24 une la secuencia consenso de las TCP de clase II en los promotores de AtCDT1a y AtCDT1b, regulando negativamente su expresión.			Masuda y col. (2008)
CYC	(+) RAD			CYC es capaz de unirse al promotor de RAD <i>in vivo</i> , induciendo su expresión.			Costa y col. (2005)
AfTCP1	(+) DWF4			AfTCP1 induce la biosíntesis de brassinosteroides a través de la activación de DWF4.			Guo y col. (2010)
CYC1C CYC1D	(+) CYC1C (+) CYC1D			CYC1C y CYC1D se regulan a sí mismos o mutuamente a través de la formación de homo y heterodímeros, a fin de mantener su expresión asimétrica en las flores en desarrollo de <i>P.heterotrichia</i> .			Yang y col. (2012)
TCPs de clase I							
TCPs de clase II							

Tabla 4.1: Genes blanco de los factores de transcripción TCP. En la tabla se resumen las interacciones entre las proteínas TCP y sus genes blanco.

en arroz, *A. thaliana* y *P. heterotrichia* proveen evidencia de que las TCPs pueden formar heterodímeros con miembros de su misma clase (Kosugi y Ohashi, 2002; Viola y col., 2011; Danisman y col., 2012; Yang y col., 2012). Un dato interesante es que el heterodímero formado por AtTCP11 y AtTCP15 es capaz de unir ADN de manera más eficiente y a través de una secuencia diferente a la preferida por cada uno de los homodímeros (Viola et al., 2011; Ripoll et al, resultados no publicados). Esto sugiere que la formación del heterodímero sería capaz de aumentar la diversidad funcional de las TCPs y proveer las bases para la especificidad. De manera similar, Danisman y colaboradores (2012) reportaron que los heterodímeros de AtTCP20 con AtTCP8 o AtTCP22, pero no los homodímeros, son capaces de interactuar con el promotor de *LOX2* en ensayos de simple híbrido en levaduras.

Diversos reportes indican además que las TCPs son capaces de interactuar con una amplia variedad de otras proteínas (Tabla 4.2). AtTCP20 interactúa en ensayos de doble híbrido en levaduras con el factor de transcripción AtPuralpha, relacionado con la regulación de genes expresados en células en proliferación (Trémousaygue y col., 2003). TIC, una TCP de clase I de *A. majus*, interactúa con un factor de transcripción de la familia NAC llamado CUP, relacionado con la separación de órganos laterales (Weir y col., 2004). El heterodímero ABAP1-AtTCP24 une secuencias de clase II presentes en las regiones promotoras de los genes *AtCDT1a* y *AtCDT1b*, y regula negativamente su expresión (Masuda y col., 2008). Diversas TCPs de *A. thaliana* de ambas clases interactúan con diferentes componentes del núcleo del reloj circadiano en ensayos de doble híbrido en levaduras y de interacción proteína-proteína *in vitro*, indicando que los factores de transcripción de la familia TCP están fuertemente relacionados con la expresión de genes regulados por el ritmo circadiano (Pruneda-Paz y col., 2009; Giraud y col., 2010). Esta interacción muestra incluso cierto grado de especificidad, ya que AtTCP21 y AtTCP3 sólo interactúan con PRR1/TOC1, AtTCP2 y AtTCP11 interactúan con una variedad de componentes y AtTCP15 sólo lo hace con PRR5 (Giraud y col., 2010). Por otro lado, las TCP de tipo CIN (AtTCP2, AtTCP3, AtTCP4, AtTCP10 y AtTCP24) interactúan con ASYMMETRIC LEAVES 2 (AS2) y este complejo es capaz de reprimir la expresión de BP y KNAT2, factores de transcripción específicos de meristema pertenecientes a la familia KNOX de clase I (Li y col., 2012). Sugio y colaboradores encontraron que una

TCP		INTERACCIÓN CON	DESCRIPCIÓN	REFERENCIAS
AtTCP7	SAP11		SAP11 interactúa con AtTCP7, pero no logra desestabilizarla.	Sugio y col. (2011)
AtTCP8	PNM1		PNM1 interactúa con AtTCP8 y la proteína NAP1 en el núcleo de las células vegetales, coordinando la expresión de genes nucleares y mitocondriales.	Hammani y col. (2011)
AtTCP11	LHY-CCA1-PRR1- PRR3-PRR5		Las TCP funcionan como proteínas de unión al ADN asociadas a proteínas del ritmo circadiano.	Pruneda-Paz y col. (2009)
AtTCP15	PRR1-PRR5			
AtTCP13/PTF1	AHP1-AHP2-AHP3		AtTCP13 es un posible blanco de las proteínas AHP1 -AHP3.	Suzuki y col. (2001)
AtTCP14	DOF6		AtTCP14 estimula la germinación, mientras que DOF6 la reprime a través una vía de regulación negativa de la biosíntesis de ABA.	Tatematsu y col. (2008); Rueda-Romero y col. (2012)
AtTCP14 AtTCP15	SPINDLY		SPY regula la respuesta a CK a través de la regulación de la actividad de AtTCP14 y AtTCP15.	Steiner y col. (2012)
AtTCP20	AtPur- α		AtTCP20 y AtPur- α regulan ciertos genes expresados durante la proliferación celular.	Trémousaygue y col. (2003)
AtTCP21	PRR1/TOC1		El complejo AtTCP21-PRR1 reprime la expresión de CCA1.	Giraud y col. (2010)
TIC (<i>A. majus</i>)	CUP		TIC y CUP reducen la división celular en meristemas y primordios, favoreciendo la formación de órganos discretos.	Weir y col. (2004)
AtTCP2	CCA1		Las TCP funcionan como proteínas de unión al ADN asociadas a proteínas del ritmo circadiano.	Pruneda-Paz y col. (2009)
AtTCP3	TOC1/PRR1			
AtTCP2, AtTCP4, AtTCP13	SAP11		El péptido SAP11 del phytoplasma <i>M. quadrilineatus</i> desestabiliza las TCPs de tipo CIN.	Sugio y col. (2011)
CIN AtTCPs	AS2		Los complejos participan en la represión de los genes específicos de meristema, KNAT1/BP y KNAT2.	Li y col. (2012)
AtTCP24	ABAP1		El heterodímero ABAP1-AtTCP24 regula negativamente la expresión de los genes AtCDT1a y b. ABAP1 conecta a AtTCP24 con el complejo de pre-replicación AIORC1a	Masuda y col. (2008)

Tabla 4.1: Genes blanco de los factores de transcripción TCP. Se resumen en la tabla las interacciones entre las proteínas TCP y sus genes blanco.

molécula efectora de un fitoplasma, SAP11, es capaz de interactuar con un grupo de TCPs de tipo CIN y mediar su desestabilización, causando de este modo una disminución en la síntesis de JA. AtTCP14 y AtTCP15 interactúan con la N-acetilglucosamina transferasa SPYNDLY (SPY) y se ha propuesto que éstas y otras TCPs pueden ser modificadas covalentemente y activadas como consecuencia de dicha interacción (Steiner y col., 2012). Estos hallazgos sugieren que las proteínas TCP pueden ser dirigidas a diferentes genes blanco a través de la interacción con una variedad de factores de transcripción no TCP. Estas interacciones pueden proporcionar así una especificidad adicional a la acción de las proteínas TCP.

4.10 Los sitios II como elementos regulatorios en cis reconocidos por las proteínas TCPs

Luego de la identificación de los sitios IIa (GTGGGCCCGT) y IIb (GTGGGACCAT) en la región promotora del gen *PCNA* de arroz (Kosugi y Ohashi, 1997), Trémousaygue y colaboradores (2003) encontraron elementos similares (TGGGCC) en el gen *PCNA2* de *A. thaliana*, los cuales eran esenciales para la expresión de este gen en tejidos en proliferación. Los autores incluso encontraron que tales elementos, consecuentemente denominados “sitio II”, eran frecuentes en los promotores de genes de proteínas ribosomales, preferentemente expresados durante la proliferación celular, y definieron su secuencia consenso como TGGGCY (Y = C o T). Además, reportaron que AtTCP20 era capaz de unir dichas secuencias *in vitro*. Tiempo después, los elementos sitio II fueron encontrados en las regiones promotoras de genes relacionados con la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular (Li y col., 2005), en genes expresados durante la iniciación del desarrollo de meristemas axilares (Tatematsu y col., 2005), y en genes que codifican componentes de la cadena respiratoria mitocondrial (Welchen y Gonzalez, 2005; 2006). Por lo tanto, los elementos sitio II fueron propuestos como coordinadores de la expresión de genes en procesos vinculados con el desarrollo y la proliferación celular, tales como la biogénesis de mitocondrias y ribosomas (Li y col., 2005; Welchen y Gonzalez, 2006, Gonzalez y col., 2007).

Los elementos sitio II se encuentran normalmente presentes en varias copias, ubicadas entre 50 y 300 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (Welchen y Gonzalez, 2006) y están frecuentemente asociados a otros elementos regulatorios en *cis*. Trémousayge y colaboradores (1999, 2003) reportaron que uno de los motivos normalmente asociados a los sitios II son los telo boxes (internal telomeric repeat; AAACCCTAA). Los telo boxes se encuentran generalmente corriente abajo de los elementos sitio II (Trémousaygue y col., 1999, 2003) y operan como activadores transcripcionales de la actividad basal de estos últimos (Trémousaygue y col., 1999, 2003; Manevski y col., 2000; Welchen y Gonzalez 2005). Esta asociación se identificó también en las regiones promotoras de un importante número de genes expresados preferentemente en tejidos en activa proliferación celular o en respuesta a señales que promueven el crecimiento de yemas axilares en *A. thaliana* (Tatematsu y col., 2005). Adicionalmente, los sitios II se relacionaron a otros elementos regulatorios en *cis*, tales como el tef box (ARGGRYANNNNGT) en el promotor del gen que codifica el factor de elongación de la traducción eEF1A, el trap40 box (GGGGGTAGAATAG) en el promotor del gen que codifica la proteína ribosomal AP40, el elemento MSA, que confiere expresión durante la mitosis al gen de ciclina *CYCBI;1* (Li y col., 2005) y el elemento G-box (CACGTG) presente en la región promotora del gen *COX5b-2* (Comelli y Gonzalez, 2009a,b). De modo general, puede decirse que la combinación de los elementos sitio II con otros motivos regulatorios en *cis* es capaz de conferir una respuesta transcripcional específica a diversos grupos de genes. Además, recientemente se ha reportado que, de acuerdo al número y la arquitectura de los elementos sitio II en un promotor, su orientación relativa, la presencia de otros elementos regulatorios y el momento del ciclo diurno en el que los genes que los contienen se expresan, los sitios II podrían actuar como elementos activadores o represores de la expresión génica (Giraud y col., 2010).

4.11 Funciones de las proteínas TCP

A partir de las primeras evidencias que relacionaron a las TCPs con los procesos de crecimiento y proliferación celular, una gran cantidad de estudios han ayudado a echar luz sobre los roles específicos de los diferentes miembros de cada una de las subfamilias. De modo general, los resultados reportados confirman el rol

inicialmente propuesto para las TCPs, pero además muestran de manera evidente que estos factores de transcripción participan en una multiplicidad de procesos a través de diferentes mecanismos. En la próxima sección, resumiremos los conocimientos con los que se cuenta hasta el momento sobre la función y los mecanismos de acción de las diferentes TCPs.

4.11.1 Ramificaciones laterales (o secundarias)

El primer miembro caracterizado de la familia TCP fue TB1, estudiado en maíz por Doebley y su equipo (1995, 1997) incluso antes de ser nombrada la familia por Cubas y colaboradores en 1999. TB1 afecta el desarrollo de los meristemas axilares de la planta de maíz: previene el desarrollo en los nodos inferiores y promueve el crecimiento y la formación de inflorescencias femeninas (espigas) en los nodos superiores. En la mutante *tb1*, los meristemas axilares inferiores se desarrollan para dar lugar a ramificaciones basales (macollos), mientras que los superiores generan ramificaciones terminadas en inflorescencias masculinas (panojas), generando un fenotipo que recuerda al antecesor del maíz, teosinte (Doebley y col., 1997). Posteriormente, Hubbard y col. (2002) demostraron que el aumento de las ramificaciones en la mutante *tb1* se debía no sólo a la elongación de los meristemas inferiores, sino también al desarrollo de los meristemas axilares de éstos. En conjunto, estos resultados soportan el modelo propuesto para la evolución del maíz a partir de teosinte, el cual predice que la expresión de TB1 debe ser mayor en maíz que en teosinte, resultando en una reducción del desarrollo de las ramificaciones axilares (Doebley y col., 1995).

El desarrollo de las ramificaciones laterales es uno de los procesos más importantes para determinar la arquitectura de las plantas. Aparentemente, este proceso involucra dos pasos fundamentales: la formación de los meristemas y su posterior desarrollo y elongación. Desde la caracterización de TB1 a esta parte, una gran cantidad de estudios han relacionado a las TCPs con el desarrollo de las ramificaciones secundarias en diferentes especies. En arroz, el número total de macollos se reduce significativamente en plantas que sobreexpresan *OsTB1*, pero aumentan en *fc1*, una mutante de pérdida de función de este gen, sugiriendo que *OsTB1* actúa como un regulador negativo del crecimiento de las ramificaciones en arroz, al igual que TB1 en

maíz (Takeda y col., 2003). Kebrom y colaboradores (2006) demostraron que *SbTB1* (homólogo de *TB1* en sorgo) aumenta sus niveles de expresión en plantas crecidas en condiciones de sombra, inhibiendo el desarrollo de las yemas axilares y promoviendo un fenotipo de dominancia apical típico de plantas crecidas en estas condiciones. Los autores propusieron un nexo entre las vías reguladas por luz y el desarrollo de ramificaciones secundarias mediado por *OsTB1*, debido a que *OsTB1* es negativamente regulado por el fitocromo *phyB1* en condiciones favorables de iluminación. *BRC1* (*AtTCP18*) y *BRC2* (*AtTCP12*) son los homólogos más cercanos a *TB1* en *A. thaliana*, identificados por Aguilar-Martinez y colaboradores en 2007. Como las mutantes de *tb1*, las mutantes *brc1* tienen aumentado el número de ramificaciones, lo cual sugiere la existencia de un mecanismo ancestral de regulación del desarrollo de ramificaciones. Al igual que *SbTB1*, los niveles de expresión de *BRC1* aumentan cuando las plantas son cultivadas en condiciones de alta densidad de siembra o de baja intensidad lumínica. Además, *BRC1* está relacionado con dos vías hormonales que regulan el desarrollo de las yemas axilares, las vías de auxinas y estrigolactonas (SL). Aunque las auxinas no parecen ejercer un control directo sobre la expresión de *BRC1*, la actividad de esta proteína es necesaria para generar el fenotipo típico de dominancia apical inducido por auxinas. Por otro lado, los niveles de expresión de *BRC1* están fuertemente disminuidos en las mutantes de pérdida de función de los genes *MAX*. Los productos de estos genes promueven la síntesis y actividad de las estrigolactonas, las cuales reducen la capacidad de transporte de las auxinas en el tallo, evitando su exportación desde las yemas y por lo tanto inhibiendo el desarrollo de las mismas (Bennett y col., 2006; Gómez-Roldán, 2008; Umehara y col., 2008). Recientemente, Braun y col. (2012) demostraron que el gen *PsBRC1* de arveja se expresa mayormente en meristemas axilares y que sus niveles de transcripción aumentan luego de la aplicación directa de SL y disminuyen ante un tratamiento con CK. En los últimos meses se ha demostrado que una TCP de clase II denominada *BAD1* (por sus siglas en inglés, Branch Angle Defective 1) regula el ángulo en el cual las ramificaciones laterales de maíz emergen a partir del tallo principal de la inflorescencia (Bai y col., 2012). *BAD1*, que tiene una secuencia relacionada con *TB1*, promueve la proliferación celular en el pulvino, una estructura ubicada entre el tallo y las ramificaciones laterales, influenciando así el ángulo de emergencia y la arquitectura de la planta a través de este mecanismo.

Estos hallazgos sitúan a las TCPs de tipo TB1 en un papel crucial en la determinación del destino de los meristemas axilares y la regulación del desarrollo de las ramificaciones en angiospermas. Su acción es a su vez regulada por el balance entre las condiciones externas (medioambientales) e internas (hormonales) que determinan la arquitectura final de las plantas.

4.11.2 Desarrollo de gametofitos

Aunque las TCPs de clase I y II están involucradas en la regulación de una gran cantidad de vías diferentes, sólo unos pocos trabajos hacen mención a su función en el desarrollo de gametofitos. Pagnussat y col. (2004) fueron los primeros en mencionar que una disrupción en *AtTCP4* afecta los primeros estadios del desarrollo del embrión en *A. thaliana*. Recientemente se ha observado que los granos de polen de las plantas que expresan *AtTCP4-VP16* no son capaces de producir semillas viables, aun cuando se utilicen para fertilizar óvulos de plantas normales (Sarvepalli y Nath, 2011). Extrañamente, diversos procesos como la maduración del polen, la elongación del tubo polínico y la interacción con las papilas estigmáticas no se encuentran afectados en estos gametos. Sumado a esto, los carpelos de las plantas *AtTCP4-VP16* fecundados con polen de plantas normales tampoco son capaces de generar semillas viables, lo cual sugiere que una alteración de la expresión de *AtTCP4* produce una disfunción reproductiva general.

Plantas que expresan un RNA de interferencia para *AtTCP16* muestran un 60% de granos de polen abortados en los primeros estadios de desarrollo (Takeda y col., 2006). Según estos autores, el patrón de expresión de *AtTCP16* se restringe a las microsporas en estadio uni y bicelular, lo cual sugiere que *AtTCP16* está involucrada en la gametogénesis masculina. Si bien estos resultados sugieren cierta vinculación de las TCPs con la gametogénesis, aún restan estudios para comprender completamente el rol de estos factores de transcripción en la regulación de la reproducción de las plantas con flores.

4.11.3 Desarrollo de flores

En *A. majus* se han encontrado varios genes que controlan la asimetría floral. Las flores de *A. majus* son asimétricas a lo largo de su eje dorso-ventral y presentan

distintos tipos de órganos con identidad dorsal, lateral y ventral. Esta asimetría es más evidente en los verticilos de pétalos y estambres, y depende de la acción de los genes duplicados *CYCLOIDEA* (*CYC*) y *DICHOTOMA* (*DICH*), que codifican proteínas TCP de clase II. *CYC* y *DICH* se expresan en el dominio dorsal del meristema floral y continúan expresándose en los dominios dorsales de la flor en estadios tardíos, aunque *CYC* se expresa en una región más extensa que *DICH* (Almeida y col., 1997; Luo y col., 1999; Luo y col., 1996). Las mutantes dobles *cyc-dich* tienen flores ventralizadas, con simetría radial, lo que demuestra que estas proteínas son necesarias para la generación de la asimetría. El análisis del desarrollo de mutantes simples y dobles muestra que *CYC* y *DICH* son capaces de promover o reprimir el crecimiento de los órganos, dependiendo del tipo y estadio de los mismos, y que *CYC* siempre genera fenotipos más fuertes que *DICH* (Almeida et al., 1997; Luo et al., 1999; Luo et al., 1996). Gaudin y su equipo (2000) reportaron elevados niveles de expresión de CYCLIN D3b e HISTONE H4 en los 4 estambres de las flores de *A. majus*, no así en el estaminoide dorsal que no completa su desarrollo, donde se expresan *CYC* y *DICH*. Estos resultados sugieren que las funciones de *CYC/DICH* son necesarias, directa o indirectamente, para suprimir la expresión de genes del ciclo celular.

Además de *CYC* y *DICH*, se han encontrado otros dos genes capaces de regular la asimetría floral de *A. majus*: *RADIALIS* (*RAD*) y *DIVARICATA* (*DIV*) (Almeida y col., 1997; Galego y Almeida, 2002; Coen, 2005; Costa y col., 2005). Corley y col. (2005) demostraron que *RAD* es positivamente regulado por *CYC* y *DICH*. De hecho, *CYC* es capaz de unirse a los sitios TCP de clase I presentes en el promotor y las regiones intrónicas de *RAD* (Costa y col., 2005). Al igual que *RAD*, *DIV* es una proteína de la familia MYB, y ha sido propuesta como determinante de la identidad ventral (Costa y col., 2005; Galego y Almeida, 2002). Al contrario de *RAD*, *DIV* es regulada negativamente por las proteínas TCP, ya que en la doble mutante *cyc-dich* la expresión de *DIV* se expande a todas las regiones de la flor (Galego y Almeida, 2002). Esta información permite plantear un modelo de interacciones entre las TCPs de clase II y las proteínas MYB para el establecimiento de la asimetría floral: *CYC* y *DICH* están presentes en los dominios dorsales y activan directamente la expresión de *RAD*, quien a su vez antagoniza la función de *DIV*. Dada la similitud de secuencia entre *RAD* y *DIV*, este antagonismo podría reflejar una competencia molecular. Aunque *RAD* no funciona

como activador transcripcional, podría inhibir a DIV uniéndose competitivamente a sus genes blanco o a proteínas que interaccionen con ésta. La expresión de RAD en los pétalos dorsales podría de este modo inhibir la acción de DIV en dichas regiones. Este mecanismo explicaría por qué los efectos de DIV se ven restringidos a los pétalos ventrales y laterales, a pesar de que su expresión se encuentra en todos los pétalos (Corley y col., 2005; Costa y col., 2005, Galego y Almeida, 2002). Sin embargo, RAD no sería capaz de mediar todas las funciones de CYC y DICH, dado que a pesar de que las mutantes *rad* y *cyc-dich* son similares, difieren en diversos aspectos fenotípicos (Corley y col., 2005).

El homólogo más cercano a *CYC* en *A. thaliana* es *AtTCP1*, el cual se expresa de manera transitoria en las regiones dorsales del meristema floral en estadios tempranos del desarrollo (Cubas y col., 2001), aunque su expresión no es suficiente para generar flores asimétricas. Como *A. thaliana*, *Iberis amara* pertenece a la familia de las *Brassicaceae*, pero a diferencia de ésta, presenta una corola monosimétrica. Los pétalos adaxiales son más pequeños que los abaxiales y este hecho se correlaciona con la expresión de *IaTCP1*, la cual es mayor en los dos pétalos más pequeños. La sobreexpresión de *IaTCP1* en *A. thaliana* genera pétalos pequeños y finos, aunque no asimétricos (Busch y Zachago, 2007). Dado que los tamaños de las células de los pétalos de las plantas transgénicas son similares a los de las plantas salvajes, la expresión de *IaTCP1* estaría relacionada con la inhibición de la proliferación celular, tal como está propuesto para *CYC* en *A. majus*. Sin embargo, la sobreexpresión de *CYC* en *A. thaliana* conduce a un aumento del tamaño de los pétalos debido a un aumento del área celular (Costa y col., 2005), demostrando que *CYC* altera la expansión celular pero no la proliferación en este sistema heterólogo. Un homólogo de *CYC* en arroz, *REP1* (RETARDED PALEA 1), está involucrado en la determinación de la simetría floral en esta especie (Yuan y col., 2009), sugiriendo la existencia de un mecanismo común de regulación de la simetría floral entre plantas mono y dicotiledóneas.

En *Gerbera hybrida*, *GhCYC2* regula la simetría de una manera diferente a los genes *CYC* clásicos. En lugar de regular la asimetría dorso-ventral de las flores individuales, *GhCYC2* participa en el control de la identidad de los tipos florales de la inflorescencia compuesta de *Gerbera*. La sobreexpresión de *GhCYC2* en *Gerbera* resulta en flores internas (tubulosas) con morfología semejante a la de las flores

externas (liguladas). Pero aún más importante, el efecto de GhCYC2 sobre el crecimiento de los pétalos varía de acuerdo al tipo de flor en el que se exprese. En las flores externas los pétalos son más cortos (con lo cual la inflorescencia parece más pequeña), mientras que en las flores internas los pétalos son más largos que en las plantas salvajes. La regulación diferencial de la expansión y la proliferación celular se ha reportado para otras TCPs de tipo CYC, pero nunca para un mismo tipo de órgano como se ve en este caso (Broholm y col., 2008). De manera similar, la inserción de un transposón que inactiva el gen *HaCYC2* de girasol genera flores externas hermafroditas y polisimétricas, características que son típicas de las flores internas tubulosas (Fambrini y col., 2011).

Además de CYC, se ha encontrado a otra TCP de *A. majus*, denominada CIN, vinculada con el control de la proliferación y diferenciación celular en pétalos (Crawford y col., 2004). Las mutantes *cin* tienen células aplanadas en los labios de los pétalos, en lugar de células cónicas como las de las plantas salvajes. Al contrario de CYC, CIN parece promover la división celular en pétalos, ya que las mutantes tienen labios más pequeños y menores niveles de expresión de CYCLIN D3b e HISTONE H4. Cabe destacar que en hojas se observó la función opuesta, ya que CIN parece reprimir la división celular en estos órganos, especialmente en los márgenes. Las TCPs de tipo CIN de *A. thaliana* constituyen un pequeño clado y algunos de sus miembros son regulados negativamente por el miR319 (Palatnik y col., 2003). La mutante de pérdida de función *tcp2-3-4-10-24*, las plantas *jaw-D* (que sobre-expresan el miR319; Palatnik y col., 2003) o las plantas que expresan la fusión de cualquiera de estas TCPs al dominio represor dominante SRDX (EAR) muestran fenotipos similares en flores, con pétalos de márgenes ondulados debido principalmente a una proliferación celular excesiva en tales regiones (Koyama y col., 2007, 2011). De acuerdo con estos resultados, la pérdida de función del miR319 genera flores muy pequeñas, con sépalos fusionados y desarrollo de pétalos y estambres altamente reprimido, debido a la expresión ectópica de AtTCP4 (Nag y col., 2009). Por lo tanto, las TCPs de tipo CIN parecen ser responsables de la represión de la proliferación celular en las regiones marginales de los órganos florales.

Las TCPs de clase I también han sido recientemente relacionadas con la regulación del desarrollo de los órganos florales (Steiner y col., 2012; Kieffer y col., 2011). AtTCP14 y AtTCP15 parecen regular el tamaño, la forma y la proliferación

celular en los cuatro verticilos. La expresión de las formas represoras dominantes de estas proteínas produce una disminución de la elongación de los órganos de los tres verticilos externos y el desarrollo de estructuras culminadas en papilas estigmáticas a partir de las regiones mediales del gineceo. Se ha postulado también que AtTCP14 y AtTCP15 promueven la respuesta a CK en flores a través de la N-acetilglucosamina transferasa SPINDLY (SPY), la cual sería capaz de modificar post-traduccionamente a las TCPs (Steiner y col., 2012).

4.11.4 Desarrollo de hojas

Los mayores esfuerzos realizados para develar las vías regulatorias de las que participan las TCPs se han llevado a cabo con las TCPs de tipo CIN, de clase II. Como se mencionó anteriormente, CIN se identificó en *A. majus* debido a que su mutación producía hojas con una curvatura alterada de la superficie debido a un exceso de proliferación celular en los márgenes (Nath y col., 2003). En base a esto, se propuso que la actividad de CIN tornaría a las células más sensibles a las señales de detención de la proliferación que viajan desde la punta de la hoja hacia la base. En *A. thaliana*, la subfamilia CIN está formada por ocho miembros (AtTCP2, 3, 4, 5, 10, 13, 17 y 24), cinco de los cuales (AtTCP2, 3, 4, 10 y 24) son negativamente regulados post-transcripcionalmente por el miR319 (Palatnik y col., 2003). El alto grado de redundancia funcional entre los miembros de la subfamilia está ampliamente demostrado, así como su rol en la regulación de la proliferación celular en los márgenes de las hojas. La pérdida de función de las TCPs reguladas por miR319, o la baja de los niveles de expresión de todos los miembros de la subfamilia, genera hojas altamente onduladas y aserradas, confirmando su función como reguladores negativos de la proliferación (Nath y col., 2003; Palatnik y col., 2003; Crawford y col., 2004; Palatnik y col., 2007; Efroni y col., 2008; Koyama y col., 2010) (Fig. 4.6). Resultados similares se obtuvieron en plantas que expresan la forma represora de las TCPs de tipo CIN (Koyama y col., 2007). De acuerdo con estos resultados, la expresión de las formas resistentes al microRNA de las TCPs de tipo CIN resulta en cotiledones fusionados, ausencia de meristema apical del tallo y hojas más pequeñas que las de las plantas salvajes (Costa y col., 2005; Schommer y col., 2008; Rodriguez y col., 2010; Sarvepalli y Nath, 2011). Sumado a esto, Ori y colaboradores (2007) encontraron que la mutante de ganancia de función del gen TCP de tipo CIN, *LANCEOLATE (LA)*, produce en

tomate la formación de hojas pequeñas y simples en lugar de hojas compuestas. Masuda y su equipo (2008) mostraron que AtTCP24 es capaz de interactuar *in vivo* con AtABAP1 y AtORC1 (una proteína del Complejo de Pre-Replicación), y que este triple complejo actúa como un represor de AtCDT1a y AtCDT1b, inhibiendo la replicación mitótica durante el desarrollo de las hojas. También se ha propuesto un rol importante para las TCPs de tipo CIN como reguladores heterocrónicos, ya que los patrones de expresión espacio-temporales de estas proteínas parecen ser de gran importancia para el control de la diferenciación celular y, en última instancia, del tamaño y la forma de las hojas. De acuerdo con el rol de las proteínas CIN como promotoras de la diferenciación y maduración celular, algunos autores han encontrado que las plantas que expresan formas de ganancia de función dominantes de AtTCP4 sufren senescencia prematura

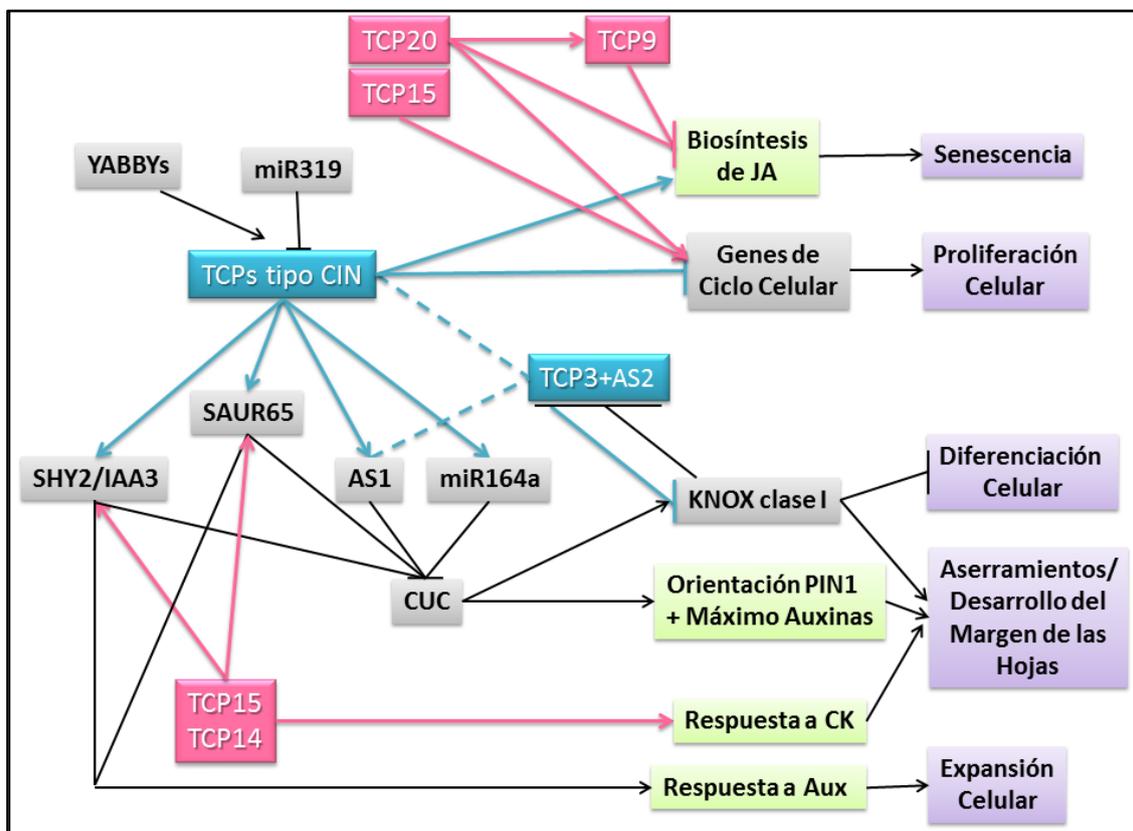


Figura 4.6: Red de interacciones moleculares de proteínas TCP en hojas. Acción de las TCPs de clase II, tipo CIN, en el desarrollo de las hojas, y puntos de contacto con las TCPs de clase I.

debido, en parte, a la expresión aumentada de enzimas de la biosíntesis de ácido jasmónico (JA) (Schommer y col., 2008; Sarvepalli y col., 2011).

En los últimos años, los esfuerzos se han concentrado en encontrar los posibles genes blanco de los factores de transcripción TCP de clase II. A este respecto, Koyama y col. (2010) demostraron que la mayor contribución al fenotipo de las plantas AtTCP3-EAR está dada por el aumento de la expresión de genes específicos de meristemas y aquellos que regulan el establecimiento de los bordes entre meristemas y órganos laterales, como son *CUC* y *LOB*. Los genes *CUC* son negativamente regulados por los blancos directos de AtTCP3: AS1, SAUR65, SHY2/IAA3 y miR164, y se postula que el aumento de los niveles de expresión de genes *CUC* en las plantas que expresan AtTCP3-EAR podría ser el motivo de la expresión ectópica de los genes KNOX de clase I en las mismas (Koyama y col., 2007). Sumado a esto, Li y colaboradores (2012) propusieron una regulación directa de los genes KNOX de clase I por parte de las TCPs reguladas por el miR319. Los autores demostraron que estas TCPs son capaces de interaccionar físicamente con AS2, un conocido represor de los genes *KNOX* de clase I, y de unirse a los promotores de los genes *BP/KNAT1* y *KNAT2*. De esta manera, las TCPs reguladas por el miR319 son capaces de regular a los genes KNOX de clase I a través de ambas vías, directa e indirecta, demostrando una vez más su función como represores de la proliferación y promotores de la diferenciación celular.

A pesar de la bien conocida regulación post-transcripcional de las TCPs de tipo CIN por parte del miR319, muy poco se sabe acerca de los factores de transcripción que podrían regularlas. Sarojam y sus colaboradores (2010) observaron que las mutantes *yabby* no son capaces de activar la expresión de las TCPs de tipo CIN y, como consecuencia, los programas de desarrollo de la lámina no prosiguen y las hojas no se forman. Sin embargo, esto es sólo el inicio de los estudios que permitirán establecer la naturaleza de la interacción entre los genes *YABBY* y las TCPs de tipo CIN.

En comparación con las TCPs de clase II, mucho menos es lo que se conoce acerca de las vías de regulación en las que participan las TCPs de clase I. En 2005, Li y colaboradores demostraron que AtTCP20 es capaz de interaccionar con la región promotora de varios genes que codifican proteínas ribosomales y del gen de ciclina *CYCB1;1*. Los autores propusieron un modelo en el cual las TCPs de tipo I serían las

responsables de la estimulación del crecimiento y división celular requerida en los primordios jóvenes, mientras que las TCPs de clase II suprimirían el crecimiento y la división celular al tiempo que las células salen de la zona de multiplicación. De acuerdo con esta hipótesis, el crecimiento de los órganos secundarios debería estar regulado por el balance de las actividades antagónicas de las TCPs de clase I y II. Sin embargo, aún resta determinar la función específica de AtTCP20 en la regulación del desarrollo y el tamaño de los órganos, ya que formas activadoras y represoras de esta proteína generan fenotipos pleiotrópicos, pero no opuestos, en hipocotilos, hojas y raíces (Hervé y col., 2009). Basados en resultados de transcriptómica y en estudios previos (Tremousaygue y col., 2003; Li y col., 2005; Tatematsu y col., 2005) los autores sugirieron que AtTCP20 podría jugar un rol importante en la regulación del crecimiento, división y expansión celular. Recientemente, Danisman y su equipo (2012) reportaron que las mutantes simples y doble de AtTCP20 y AtTCP9 tienen hojas de tamaño similar al de las plantas salvajes, pero con células de mayor tamaño. Esto se explicaría si AtTCP20 y AtTCP9 actuaran como promotores de la proliferación celular, y el aumento de la expansión celular fuese un mecanismo compensatorio ocurrido en estas mutantes. Los autores demuestran, además, que los heterodímeros de AtTCP20-AtTCP8 y AtTCP20-AtTCP22 son capaces de interactuar con el promotor de *LOX2*, también reportado como blanco de AtTCP4. De acuerdo a estos resultados, *LOX2* parece estar bajo el control directo y antagónico de TCPs de clase I y II.

En los últimos tiempos se han reportado nuevos estudios sobre las TCPs de clase I. La mutante doble en los genes *AtTCP14* y *AtTCP15* presenta alteraciones en el desarrollo de las hojas: 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 (Kieffer y col., 2011). El mismo fenotipo se ve considerablemente aumentado cuando AtTCP14 o AtTCP15 se expresan fusionadas al dominio represor EAR (Kieffer y col., 2011). Las plantas que expresan AtTCP14- o AtTCP15-EAR tienen también tricomas ramificados (Kieffer y col., 2011; Li y col., 2012), un defecto normalmente asociado a un aumento en la ploidía de las células debido a un número excesivo de ciclos de endo-reduplicación. Li y colaboradores (2012) demostraron que AtTCP15-EAR induce endo-reduplicación en tricomas y cotiledones y que, contrariamente, la expresión ectópica de AtTCP15 causa una disminución drástica en

las ramificaciones de los tricomas y en el contenido de ADN de los núcleos celulares. Consistentemente con estos resultados, los niveles de transcripto de CYCA2;3 y RBR, reguladores negativos de la endo-reduplicación, están significativamente disminuidos en plántulas de AtTCP15-EAR, mientras que ciertos genes que regulan positivamente este proceso presentan niveles de expresión aumentados (Li y col., 2012). Recientemente, Steiner y colaboradores propusieron que tanto AtTCP14 como AtTCP15 promueven la respuesta a CK, ya que las hojas de la doble mutante tienen márgenes lisos (en lugar de aserrados) y son menos sensibles a esta hormona que las hojas de las plantas salvajes.

4.11.5 Interacción con vías hormonales

Una gran cantidad de información relaciona la función de las proteínas TCP con diversas vías hormonales. Aguilar-Martinez y col. (2007) mostraron que AtBRC1/TCP18 interacciona con las vías de auxinas y SL para modular el desarrollo de las ramificaciones. LA reprime el desarrollo de hojas compuestas en tomate, regulando la biosíntesis y degradación de GA (Yanai y col., 2011). Schommer y col. (2008) demostraron que LOX2, una enzima clave en la biosíntesis de JA, es directa y positivamente regulada por AtTCP4. De hecho, plantas que expresan AtTCP4-VP16 muestran una respuesta aumentada a GA y JA y disminuida a auxinas (Sarvepalli y Nath, 2011; Nath y Sarvepalli, 2011). Danisman y col. (2012) reportaron que AtTCP20 también es capaz de controlar la expresión de LOX2, antagonizando la regulación de AtTCP4. Además, se ha encontrado que AtTCP3 regula los genes de respuesta a auxinas *SHY2/IAA3* y *SAUR65* (Koyama y col., 2010). AtTCP14 y AtTCP15 parecen ser activados por CK y promover la respuesta a esta hormona (Steiner y col., 2012). Finalmente, AtTCP1 es capaz de regular directa y positivamente la expresión de DWARF4, una enzima clave en la biosíntesis de brasinosteroides (Guo y col., 2010, An y col., 2011). Claramente, las diversas vías hormonales y las proteínas TCPs están intrínsecamente relacionadas, y los esfuerzos futuros deberán concentrarse en dilucidar las bases moleculares de estas conexiones y cómo éstas operan para modular el desarrollo celular en particular y de la planta en general.

4.11.6 Biogénesis de mitocondrias

La actividad de la cadena respiratoria mitocondrial es llevada a cabo por una serie de complejos multi-enzimáticos compuestos por subunidades codificadas tanto en el núcleo como en la misma organela. La biogénesis de los complejos respiratorios es un proceso finamente regulado que requiere el control de la expresión de múltiples genes (Giegé y col. 2005; Gonzalez y col., 2007). Esta coordinación ocurre a nivel transcripcional en los genes nucleares, más precisamente a través de la interacción de determinados factores de transcripción con elementos comunes presentes en los respectivos promotores (Welchen y Gonzalez 2006; Gonzalez y col., 2007). Más aún, la expresión de los genes nucleares de la cadena respiratoria es regulada por múltiples factores, de acuerdo al tipo de tejido y el estadio de desarrollo (Huang y col., 1994), la disponibilidad de nutrientes (Welchen y col, 2002; 2004; Giegé y col. 2005), las señales hormonales (Comelli y col., 2009), las condiciones de luz/oscuridad (Popov y col., 2010) y el ciclo diurno (Lee y col., 2010, Giraud y col., 2010).

Se ha demostrado que la expresión de las proteínas mitocondriales codificadas por genes nucleares es controlada por elementos sitio II, los cuales son responsables de su expresión génica basal (Welchen y Gonzalez, 2005; Attallah y col., 2007) así como de modificar la magnitud de la respuesta en diferentes condiciones de desarrollo (Welchen y col., 2009; Comelli y Gonzalez, 2009; Mufarrege y col, 2009). Más del 80% de los genes que codifican las proteínas que constituyen los complejos I, III, IV y V de la maquinaria respiratoria mitocondrial en *A. thaliana* y arroz contienen elementos sitio II en sus regiones promotoras (Welchen y Gonzalez, 2006). Los elementos sitio II actúan como coordinadores de la respuesta de estos genes a diversas condiciones, tales como la disponibilidad de carbohidratos, la actividad del aparato fotosintético o la germinación de la semilla (Gonzalez y col., 2007). Particularmente, los niveles de carbohidratos parecen operar para balancear la biogénesis del aparato fotosintético y la cadena respiratoria, que a su vez están relacionados con su síntesis y utilización, respectivamente.

Lee y col. (2010) demostraron, además, que la mayoría de los genes que exhiben una fuerte respuesta a cambios en las condiciones de luz/oscuridad tienen elementos sitio II en sus regiones promotoras. En este contexto, los factores de

transcripción TCP podrían actuar, a través del reconocimiento de los sitios II, como un nexo vinculando la expresión génica con las demandas celulares para el crecimiento (Gonzalez, y col., 2007; Giraud y col., 2010).

4.11.7 Regulación del ritmo circadiano

El reloj circadiano regula diversos aspectos del desarrollo y crecimiento de las plantas (Hamer y col., 2009). Las redes circadianas pueden delinearse como un oscilador central que genera señales específicas compuestas por factores positivos y negativos organizados en ciclos auto-regulatorios (Pruneda-Paz y Kay, 2010). El núcleo del reloj circadiano está compuesto por la retroalimentación negativa entre TOC1/PRR1 (por sus siglas en inglés, Timing of CAB Expression 1/Pseudo-Response Regulator 1) y dos factores de transcripción de tipo MYB, CCA1 (Circadian Clock Associated 1) y LHY (Late Elongated Hypocotyl). Además, el oscilador circadiano puede ser regulado por factores medioambientales claves como la luz y la temperatura (Harmer y col., 2009; Pruneda-Paz y Kay, 2010). CCA1 y LHY son proteínas de unión a ADN que reprimen la expresión de TOC1 a través de la unión específica a su promotor.

En estudios recientes, Pruneda-Paz y colaboradores (2009) demostraron que el factor de transcripción AtTCP21 o CHE (CCA1 Hiking Expedition) interacciona específicamente con el fragmento del promotor de *CCA1* que comprende los nucleótidos -363 a -192 y presenta la secuencia consenso de unión de las TCPs de clase I, GTGGGACC. Además, AtTCP21/CHE es capaz de interactuar con TOC1/PRR1. Estos resultados le permitieron a los autores proponer un mecanismo a través del cual TOC1/PRR1 sería capaz de regular la expresión de CCA1 mediante su interacción con AtTCP12/CHE, convirtiendo a AtTCP21 en un componente importante del oscilador circadiano (Pruneda-Paz y col., 2009). Además, CCA1 y LHY reprimen la expresión de *AtTCP21* a través de la unión directa a su promotor, con lo cual se establece un nuevo módulo de retroalimentación transcripcional mutua entre CCA1 y AtTCP21 dentro del núcleo del reloj circadiano de *A. thaliana* (Pruneda-Paz y Kay, 2010).

En paralelo, se encontró una disminución en los niveles de expresión de CCA1 en plantas que expresan la fusión AtTCP20-EAR (Hervé y col., 2009), lo cual indicaría que otras TCPs, además de AtTCP21, podrían tener funciones redundantes sobre la

regulación de CCA1. Dado que TOC1 interacciona con el dominio de unión a ADN de AtTCP21, el cual presenta una secuencia altamente conservada entre los diferentes miembros de la familia TCP, es posible que AtTCP20 y otras TCPs puedan también participar de la regulación de la expresión de CCA1 (Pruneda-Paz y col., 2009).

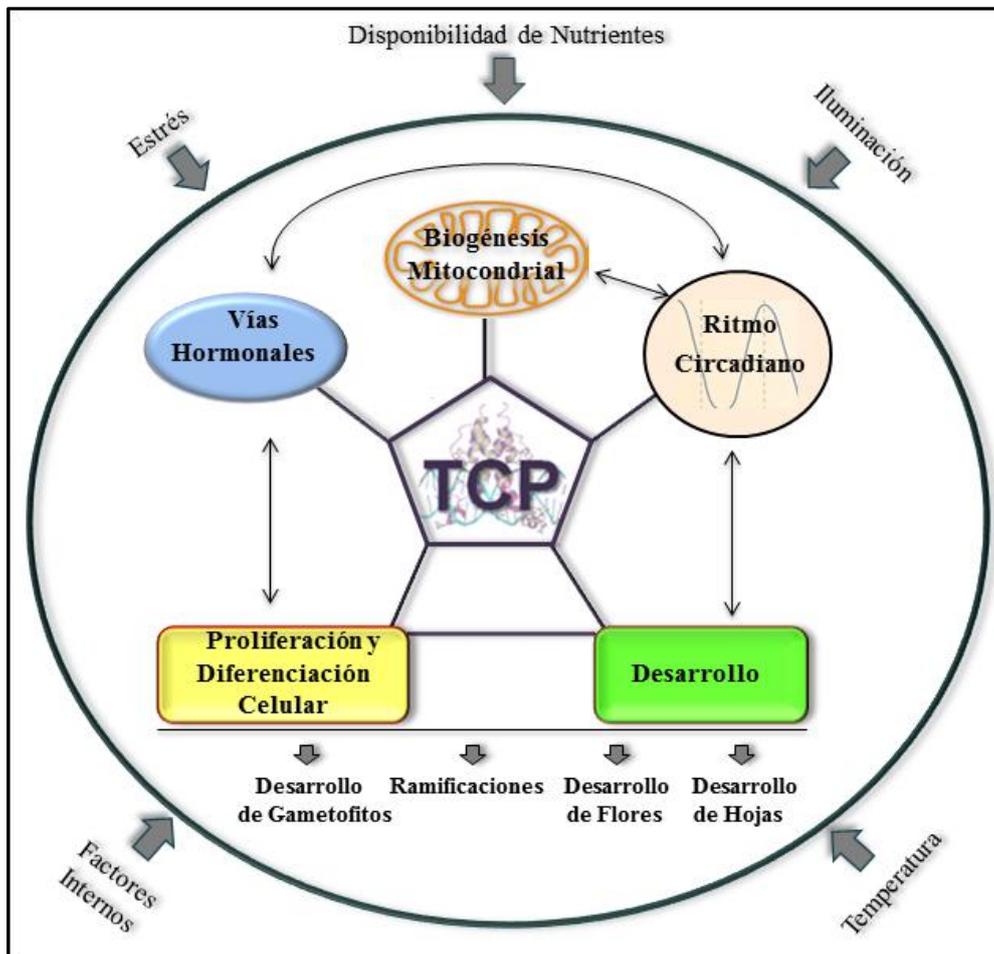


Figura 4.7: Visión integral de la función de las proteínas TCP. Las TCPs regulan el desarrollo de las plantas a través de su actuación en procesos relacionados con la proliferación, el crecimiento y la diferenciación celular, así como influenciando las vías relacionadas con hormonas. Estas proteínas participan además en la regulación de otros procesos tales como la biogénesis mitocondrial y la regulación del ritmo circadiano, lo cual permitiría a las plantas ajustar su desarrollo en respuesta a factores tanto internos como externos.

En los últimos tiempos se ha demostrado que otros miembros de la familia TCP (AtTCP2, AtTCP3, AtTCP11, AtTCP15) son capaces de interactuar con diferentes proteínas regulatorias del reloj circadiano como LHY, PRR1, PRR5 y CCA1

(Giraud y col., 2010) y de regular diversos genes de acuerdo a las demandas energéticas impuestas por los cambios del ciclo circadiano. Una vez más, la actividad de los factores de transcripción TCP podría estar relacionada con el control del desarrollo y el crecimiento, proveyendo un mecanismo que conectaría las señales hormonales, medioambientales (luz, temperatura, condiciones de estrés) y nutricionales con el ritmo circadiano (Pruneda-Paz y Kay, 2010) (Fig. 4.7).

De acuerdo a estos hallazgos, se puede postular que las TCPs tienen funciones adicionales que no están estrictamente relacionadas con la regulación del desarrollo y la arquitectura de la planta. Sumada a la regulación del ritmo circadiano (Pruneda-Paz y col., 2009; Pruneda-Paz y Kay, 2010), estas proteínas podrían regular la biogénesis de ribosomas y de los complejos respiratorios mitocondriales (Tremousaygue y col., 2003; Li y col., 2005; Welchen y Gonzalez, 2006; Gonzalez y col., 2007), ajustando el metabolismo celular a las demandas de crecimiento y a las señales recibidas del medioambiente (Martin-Trillo y Cubas, 2010; Giraud y col., 2010, Miller y col., 2011).

OBJETIVOS

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de tesis es estudiar la función de los factores de transcripción vegetales de la familia TCP clase I, o PCF, analizando su participación en la regulación del desarrollo vegetal. El fin último es obtener información sobre los mecanismos moleculares involucrados en la acción de este grupo de proteínas.

5.2 Objetivos específicos

Estudiar los cambios morfológicos y de desarrollo ocasionados al expresar en plantas de *Arabidopsis thaliana* las proteínas AtTCP11, AtTCP15 y AtTCP16 en su forma nativa, o fusionadas a un dominio represor.

Identificar los genes cuya expresión esté regulada directa o indirectamente por las proteínas en estudio.

Identificarlos posibles genes blanco de estas proteínas.

Estudiar los patrones de expresión conferidos por las regiones promotoras de los genes que codifican las proteínas bajo estudio.



MATERIALES Y MÉTODOS

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1 Material vegetal

Los ensayos realizados durante la etapa experimental de este trabajo se llevaron a cabo utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana* Heyhn. ecotipo Columbia (Col-0), cuyas semillas fueron provistas por Lehle Seeds (Tucson, AZ, USA). Las mutantes con inserciones de T-DNA de líneas SALK (Alonso y col., 2003) y las plantas que contienen construcciones reporteras fueron suministradas por el Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio State University), mientras que las líneas GABI-Kat (Rosso y col., 2003) fueron proporcionadas por el Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC).

6.1.2 Plantas mutantes y líneas reporteras utilizadas

Todas las líneas mutantes en genes TCP se confirmaron mediante PCR sobre ADN genómico (ver punto 6.2.1), a través de dos reacciones en paralelo, utilizando oligonucleótidos específicos para el gen de interés, así como la combinación de uno de éstos con un cebador específico para la inserción. Los niveles de expresión de cada uno de los genes se midieron por RT-PCR semi-cuantitativa (ver punto 6.2.1) en el caso de *AtTCP11*, y por RT-qPCR (ver punto 6.2.28) en el caso de *AtTCP15* y *AtTCP16*.

Las líneas mutantes estudiadas con inserciones de T-DNA en la región del gen *AtTCP11* se detallan a continuación.

SALK_003395: Inserción de T-DNA en la región 5'UTR. Verificada con cebadores p11 F – p11 R y p11 F - LBb1 (específico para la inserción).

SALK_020124: Inserción de T-DNA en la región 3'UTR. Verificada con cebadores TCP11-EAR F – TCP11-EAR R y TCP11-EAR F - LBb1.

SALK_056047: Inserción de T-DNA en la región 3'UTR. Verificada con cebadores TCP11-EAR F – TCP11-EAR R y TCP11-EAR F - LBb1.

SALK_082324: Inserción de T-DNA en la región 5'UTR. Verificada con cebadores p11 F – p11 R y p11 R - LBb1.

La línea mutante con inserción de T-DNA en la región del gen *AtTCP15* se detalla a continuación.

SALK_011491: Inserción de T-DNA en la región codificante. Verificada con cebadores TCP15-EAR F – TCP15-EAR R y TCP15-EAR F – LBb1.

La línea mutante con inserción de T-DNA en la región del gen *AtTCP16* se detalla a continuación.

GK-655C10: Inserción de T-DNA en la región codificante, a 173 pb del sitio de inicio de la traducción. Verificada con cebadores TCP16-EAR F – TCP16-EAR R y T-DNA GK – TCP16-EAR R.

La línea mutante en *STM* utilizada se describe a continuación:

CS3781: *bum1-3*, alelo de fenotipo débil, presenta un cambio de G a A en el nucleótido 906 de la secuencia codificante de *STM*, generando un codón de stop prematuro luego de 302 aminoácidos. La mutación se encuentra ubicada dentro del homeodominio.

Las diferentes líneas reporteras utilizadas se describen a continuación.

CS9610: CLV3::GUS, ecotipo Col-0, resistencia a BASTA.

CS16707: DR5::GUS, ecotipo Col-0.

CS6141: KNAT1::GUS, ecotipo Col-0, resistencia a kanamicina.

pCUC1::CUC1-GUS y STM::GUS, ambas en ecotipo Col-0 y resistentes a kanamicina, fueron gentilmente facilitadas por el Dr. Javier Palatnik, IBR, Rosario (Spinelli y col., 2011).

6.1.3 Cepas de *Escherichia coli* utilizadas

DH5 α : (supE44 Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 (NaI^r) thi-1 relA1) (Hanahan, 1983)

SCS 110: rpsL (Str^r) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZ Δ M15].

6.1.4 Cepa de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada

LB4404 presenta resistencia cromosómica al antibiótico rifampicina (100 mg/l). Esta cepa utiliza el sistema binario de transformación de *Agrobacterium* y posee el plásmido pTi/pRi desarmado pAL4404 (cuyo agente selectivo es la estreptomocina (300 mg/l)) en la cepa Ach5. Esta cepa además posee el plásmido pTi/pRi pTiAch5 (Ooms y col., 1982).

6.1.5 Vectores utilizados

pBluescript SK⁻: es un fagémido derivado del pUC19. Posee el gen *lacZ α* , y un gen de resistencia al antibiótico ampicilina (Stratagene Cloning Systems).

pBII101.3: es un derivado del vector binario pBIN19 y contiene el gen que codifica la enzima β -glucuronidasa de *E. coli* (*gus*) con la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (*nos*) clonados tras una secuencia múltiple de clonado en la misma disposición que en el vector pUC119. Dentro de la región de movilización del ADN, necesaria para la transformación de plantas, se encuentra el gen *nptII* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina. Incluye además el gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano RK2 (Jefferson y col., 1987).

pBII121: es un derivado del vector pBII101 que contiene un fragmento de 800 pb del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV) frente al gen *gus* (Jefferson y col., 1987).

Para el clonado, secuenciación y obtención de las sondas de ADN utilizadas en los ensayos de Northern blot se utilizó el plásmido pCR2.1 TOPO (Invitrogen).

6.1.6 Análisis de secuencias

Todas las secuencias nucleotídicas analizadas en este trabajo se obtuvieron de la base de datos proporcionada por el Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio State University). Los estudios de alineamientos de secuencias nucleotídicas se realizaron utilizando el programa BLAST (blastn o blastp, respectivamente, Altschul y col., 1990), así como el programa ClustalW (Thompson y col., 1994). El diseño de los cebadores utilizados en los ensayos de RT-qPCR se realizó con el programa Primer-BLAST (Ye y col., 2012).

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Amplificación de fragmentos de ADN por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

En las reacciones de amplificación por PCR se usaron volúmenes de reacción de 50 µl, empleándose 1,5 U de la enzima *Taq* ADN polimerasa (Promega) por reacción. Se utilizó la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima, a la cual se agregó: MgCl₂ 2 mM; dNTP 0,2 mM c/u y 500 ng de cada oligonucleótido específico. A esta mezcla de reacción se le incorporó el ADN molde y la enzima. Finalmente se añadió una gota de aceite mineral (Promega) y se procedió a la reacción de amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo en los termocicladores PT-100™ (MJ Research, Inc.) y PxE 0,2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation) utilizando los programas apropiados para cada caso y en donde la temperatura de hibridización se estableció de acuerdo a la secuencia de los oligonucleótidos utilizados [$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$].

Para realizar las reacciones de PCR de colonia se usaron como moldes pequeñas cantidades de bacterias extraídas directamente de la placa de transformación. Todas las reacciones de amplificación utilizadas en estos casos se realizaron en volúmenes de reacción de 16 µl, manteniendo las proporciones descritas. Los productos de las reacciones de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa según el punto 6.2.23.

Las reacciones de PCR semi-cuantitativas se realizaron utilizando como molde ADN copia generado por transcripción reversa (ver punto 6.2.28). Se tomaron diferentes alícuotas de la reacción de PCR a determinados ciclos, luego de lo cual se sembraron las alícuotas en un gel de agarosa al porcentaje correspondiente según los tamaños de los fragmentos a analizar.

6.2.2 Purificación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN se purificaron a partir de geles de agarosa, empleándose el equipo comercial GFX™ PCR DNA y Gel Band Purification (Amersham Pharmacia Biotech Inc.).

6.2.3 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 50 μl , dependiendo de la cantidad de ADN. Para la digestión de los vectores provenientes de las mini-preparaciones de ADN, se adicionó a la reacción de corte la enzima ARNasa A (Promega) en una concentración final de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

6.2.4 Preparación de oligonucleótidos sintéticos doble hebra

El oligonucleótido doble hebra codificando el dominio represor EAR se obtuvo mezclando 600 ng de cada oligonucleótido simple hebra en un volumen final de 20 μl . La mezcla de oligonucleótidos se calentó a 80°C durante 5 min y se dejó llegar a temperatura ambiente lentamente para favorecer la hibridación. Los oligonucleótidos simple hebra no son completamente complementarios sino que dejan a cada uno de los lados del fragmento doble hebra extremos cohesivos compatibles con las enzimas *SalI* y *SacI*. Se utilizaron 2 μl de esta preparación para posteriores ligaciones.

6.2.5 Ligación de moléculas de ADN

La ligación de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 U de T4 ADN ligasa (Promega) en un volumen de reacción de 10 μl y empleando la solución

amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima. Se utilizaron cantidades de inserto y vector tales que la relación molar entre ambos fuera de 5 a 1 respectivamente. La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C. En el caso de las ligaciones realizadas para generar las fusiones, la relación entre los productos a ligar fue equimolecular.

6.2.6 Clonado de la región promotora de *AtTCP11*

Para el aislamiento del fragmento de promotor de *AtTCP11* se utilizaron los cebadores p11 F y p11 R (Anexo I), los cuales amplifican la región comprendida entre los nucleótidos -1514 y -1 corriente arriba del sitio de inicio de la traducción. La PCR se realizó utilizando como molde ADN genómico, extraído de acuerdo al protocolo mencionado en el punto 6.2.20. El fragmento de ADN amplificado se digirió con las enzimas de restricción *HindIII-BamHI* y se clonó en el vector pBI101.3.

Los clones positivos se determinaron mediante PCR de colonias, utilizando el cebador GUS-NH₂ específico para el gen *gus* y un oligonucleótido específico del promotor. Asimismo, se realizaron digestiones de mini-preparaciones de ADN con enzimas de restricción seguidas de electroforesis en gel de agarosa (ver punto 6.2.23). Las digestiones se llevaron a cabo con las enzimas utilizadas para el clonado y con enzimas que tienen secuencias blanco dentro del promotor, en este caso *EcoRI*. En todos los casos, los clonados se confirmaron fehacientemente a través de secuenciación.

6.2.7 Clonado de la región promotora de *AtTCP15*

El aislamiento del fragmento de promotor de *AtTCP15* se realizó con los cebadores p15 F y p15 R (Anexo I), los cuales amplifican la región comprendida entre los nucleótidos -978 y -1 corriente arriba del sitio de inicio de la traducción. El procedimiento de amplificación es igual al descrito para el promotor de *AtTCP11*. El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción *SalI-BamHI* y se clonó en el vector pBI101.3.

Los clones positivos se determinaron de igual manera que en el caso de *AtTCP11*. Para la segunda digestión con enzimas de restricción se utilizó *HindIII*, la

cual posee una secuencia de reconocimiento en el sitio de múltiple clonado del vector, así como en la secuencia del promotor de *AtTCP15*.

6.2.8 Clonado de la región promotora de *AtTCP16*

El aislamiento del fragmento de promotor de *AtTCP16* se realizó con los cebadores p16 F y p16 R (Anexo I), los cuales amplifican la región comprendida entre los nucleótidos -1826 y -1 corriente arriba del sitio de inicio de la traducción. El procedimiento de amplificación es igual al descrito para el promotor de *AtTCP11*. El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción *HindIII-XhoI* y se clonó en el vector pBI101.3 digerido con *HindIII-SalI*. Para el segundo intento de clonado del promotor, se amplificó una secuencia de 1365 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción, con los cebadores p16 F2 y p16 R2 (Anexo I). El producto de PCR obtenido se digirió con las enzimas *HindIII-NheI*, y se clonó en el vector digerido con las enzimas *HindIII-XbaI*.

Los clones positivos se determinaron de igual manera que en el caso de *AtTCP11*. La digestión con enzimas de restricción se realizó con *HindIII-BamHI*, las cuales se encuentran en el sitio de múltiple clonado del vector y flanquean la secuencia del promotor.

6.2.9 Clonado de la región codificante de *AtTCP11*

Para el aislamiento y amplificación de la región codificante de *AtTCP11* se utilizaron los oligonucleótidos TCP11-EAR F y TCP11 R (Anexo I), los cuales amplifican la secuencia de 566 pb. Como molde se utilizó ADN genómico, debido a la carencia de intrones en la secuencia del gen. El producto de PCR fue digerido con las enzimas *XbaI-SalI*, y clonado en un vector derivado del pBI121 generado en el laboratorio, el cual contiene el sitio *SalI*.

Los clones positivos se determinaron de igual manera que en el caso del clonado de los promotores, con la diferencia de que los oligonucleótidos usados en las PCR de colonia son específicos para la inserción. Las digestiones de las mini-preparaciones de ADN se realizaron con las enzimas de clonado, así como con *EcoRI*,

la cual tiene un sitio de reconocimiento dentro de la secuencia de *AtTCP11* y otra en el extremo 3' del terminador *nos* del vector.

6.2.10 Clonado de la fusión *AtTCP11*-EAR

Para el aislamiento y amplificación de la región codificante de *AtTCP11* se utilizaron los oligonucleótidos TCP11-EAR F y TCP11-EAR R (Anexo I). Como molde se utilizó ADN genómico, debido a la carencia de intrones en la secuencia del gen. El producto de PCR fue digerido en su extremo 3' con la enzima *SalI* y ligado a la secuencia que codifica el dominio represor EAR, la cual presenta extremos cohesivos compatibles con *SalI* en su extremo 5' y con *SacI* en su extremo 3'. Esta ligación se usó posteriormente como molde para la amplificación del fragmento completo *AtTCP11*-EAR, realizada con los oligonucleótidos TCP11-EAR F y EAR XK (Anexo I). El producto de la fusión se digirió con las enzimas *XbaI*-*KpnI* y se clonó en el vector pBI121 derivado del clonado de *AtTCP15*-EAR, el cual contiene el sitio *KpnI*. Esta estrategia fue necesaria debido a la presencia de un sitio *SacI* dentro de la secuencia codificante de *AtTCP11*.

Los clones positivos se determinaron de igual manera que en el caso del clonado de la región codificante de *AtTCP11*. Las digestiones de las mini-preparaciones de ADN se realizaron con las enzimas *XbaI*-*SalI* y *XbaI*-*KpnI*, las cuales flanquean la secuencia codificante de *AtTCP11* y la fusión completa, respectivamente.

6.2.11 Clonado de la fusión *AtTCP11*-EAR bajo el control del promotor de *AtTCP11*

Para generar esta construcción, se amplificó la secuencia del promotor de *AtTCP11* anteriormente descrita, con los oligonucleótidos p11 F y p11 *XbaI* (Anexo I), utilizando como molde el vector obtenido del clonado previo. El producto de PCR se digirió con las enzimas *HindIII*-*XbaI* y se clonó en el vector pBI121 que contenía la fusión *AtTCP11*-EAR.

Los clones positivos se determinaron de igual manera que en el caso del clonado de la región codificante de *AtTCP11*. Las digestiones de las mini-preparaciones de ADN se realizaron con las enzimas de clonado y con *XhoI*, ya que tanto el promotor

como la región codificante de *AtTCP11* presentan un sitio de reconocimiento para esta enzima, permitiendo corroborar la fusión.

6.2.12 Clonado de la región codificante de *AtTCP15*

Para el aislamiento y amplificación de la región codificante de *AtTCP15* se utilizaron los oligonucleótidos TCP15-EAR F y TCP15 R (Anexo I), los cuales amplifican la secuencia de 978 pb. Como molde se utilizó ADN genómico, debido a la carencia de intrones de la secuencia del gen. El producto de PCR fue digerido con las enzimas *XbaI-XhoI*, y clonado en un vector derivado del pBI121 generado en el laboratorio, el cual contiene el sitio *SalI*, compatible con *XhoI*.

Los clones positivos se determinaron de igual manera que en el caso del clonado de la región codificante de *AtTCP11*. Las digestiones de las mini-preparaciones de ADN se realizaron con las enzimas *HindIII-BamHI*, la primera presente en el extremo 3' de la secuencia del promotor 35SCaMV y la segunda dentro de la secuencia de *AtTCP15*.

6.2.13 Clonado de la fusión *AtTCP15-EAR*

Para el aislamiento y amplificación de la región codificante de *AtTCP15* se utilizaron los oligonucleótidos TCP15-EAR F y TCP15-EAR R (Anexo I). Como molde se utilizó ADN genómico, debido a la carencia de intrones en la secuencia del gen. El producto de PCR fue digerido en su extremo 3' con la enzima *SalI* y ligado a la secuencia que codifica el dominio represor EAR, la cual presenta extremos cohesivos compatibles con *SalI* en su extremo 5' y con *SacI* en su extremo 3'. Esta ligación se usó posteriormente como molde para la amplificación del fragmento completo *AtTCP15-EAR*, realizada con los oligonucleótidos TCP15-EAR F y EAR XK (Anexo I). El producto de la fusión se digirió con las enzimas *XbaI-XhoI* y se clonó en el vector pBI121 generado en el laboratorio, el cual contiene el sitio *SalI*, compatible con *XhoI*. Esta estrategia fue necesaria para permitir los clonados posteriores de las fusiones de *AtTCP11* y *AtTCP16* en el sitio *KpnI* introducido por el cebador EAR XK (Anexo I).

Los clones positivos se determinaron de igual manera que en el caso del clonado de la región codificante de *AtTCP11*. Las digestiones de las mini-preparaciones

de ADN se realizaron con las enzimas utilizadas para el clonado y con *HindIII-BamHI*, la primera presente en el extremo 3' de la secuencia del promotor 35SCaMV y la segunda dentro de la secuencia de *AtTCP15*.

6.2.14 Clonado de la fusión AtTCP15-EAR bajo el control del promotor de *AtTCP15*

Para generar esta construcción, se digirió el vector que contenía la secuencia de *AtTCP15-EAR* con las enzimas *XbaI-EcoRI*, lo cual liberó un fragmento formado por la fusión y la secuencia terminadora *nos* presente en el pBI121. Dicho fragmento se ligó luego en el vector pBI101.3 que contenía la secuencia del promotor de *AtTCP15*.

Los clones positivos se determinaron de igual manera que en el caso del clonado de la región codificante de *AtTCP11*. Las digestiones de las mini-preparaciones de ADN se realizaron con las enzimas *HindIII-EcoRI* y *BamHI-EcoRI*.

6.2.15 Clonado de la región codificante de *AtTCP16*

Para el aislamiento y amplificación de la región codificante de *AtTCP16* se utilizaron los oligonucleótidos TCP16-EAR F y TCP16 R (Anexo I), los cuales amplifican la secuencia de 498 pb. Como molde se utilizó ADN genómico, debido a la carencia de intrones en la secuencia del gen. El producto de PCR fue digerido con las enzimas *XbaI-XhoI*, y clonado en un vector derivado del pBI121 generado en el laboratorio, el cual contiene el sitio *SalI*, compatible con *XhoI*.

Los clones positivos se determinaron de igual manera que en el caso del clonado de la región codificante de *AtTCP11*. Las digestiones de las mini-preparaciones de ADN se realizaron con las enzimas *BamHI-EcoRI*, la primera presente dentro de la secuencia de *AtTCP16*, y la segunda en el extremo 3' del terminador *nos* del vector.

6.2.16 Clonado de la fusión AtTCP16-EAR

Para el aislamiento y amplificación de la región codificante de *AtTCP16* se utilizaron los oligonucleótidos TCP16-EAR F y TCP16-EAR R (Anexo I). Como molde se utilizó ADN genómico, debido a la carencia de intrones en la secuencia del gen. El producto de PCR fue digerido en su extremo 3' con la enzima *SalI* y ligado a la

secuencia que codifica el dominio represor EAR, la cual presenta extremos cohesivos compatibles con *SalI* en su extremo 5' y con *SacI* en su extremo 3'. Esta ligación se usó posteriormente como molde para la amplificación del fragmento completo AtTCP16-EAR, realizada con los oligonucleótidos TCP16-EAR F y EAR XK (Anexo I). El producto de la fusión se digirió con las enzimas *XbaI-KpnI* y se clonó en el vector pBI121 derivado del clonado de AtTCP15-EAR, el cual contiene el sitio *KpnI*.

Los clones positivos se determinaron de igual manera que en el caso del clonado de la región codificante de *AtTCP11*. Las digestiones de las mini-preparaciones de ADN se realizaron con las enzimas utilizadas para el clonado, así como con *BamHI-KpnI*.

6.2.17 Transformación de *Escherichia coli* con ADN plasmídico por electroporación

La preparación de las células competentes y las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo (Micro Pulser™, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,1 cm de separación entre los electrodos (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB (Anexo II) a la suspensión de células y se las incubó durante 1 h a 37°C. Después de centrifugar a 4000 x g durante 5 min, el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de medio LB y se sembró en placas de Petri con medio LB-agar suplementado con el antibiótico adecuado. Luego de crecidas las colonias, se realizaron mini-preparaciones de plásmidos como se detalla en el punto 6.2.19 y los plásmidos obtenidos se analizaron por digestión con enzimas de restricción y/o PCR. Los clones positivos se guardaron en medio líquido con el agregado de los antibióticos a -80°C en glicerol 50%.

6.2.18 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con ADN plasmídico por electroporación

La preparación de las células competentes y las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo (Micro Pulser™, Bio-Rad). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,25 cm (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB a la suspensión de

células y la mezcla se incubó durante 2 horas a 28°C. Después de centrifugar a 4000 x g durante 5 minutos, el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de medio LB y se sembró en placas de Petri que contenían medio LB suplementado con los antibióticos adecuados. Las placas fueron incubadas a 28°C hasta la aparición de colonias (aproximadamente 48 horas). Luego, se realizaron mini-preparaciones de plásmidos como se detalla en el punto siguiente, y los plásmidos obtenidos se analizaron por digestión con enzimas de restricción y/o PCR. Los clones positivos se guardaron en medio líquido con el agregado de los antibióticos a -80°C en glicerol 50%.

6.2.19 Mini-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 Birnboim y Dolly (1979). Se centrifugaron 1,5 ml de un cultivo saturado de células cultivadas en medio LB con el antibiótico adecuado, a 5000 g durante 5 min. El sedimento celular fue resuspendido en 100 µl de solución de miniprep I (Anexo II). Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente se agregaron 200 µl de solución de miniprep II (Anexo II). Se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. 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. 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 por 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 20 µl de agua destilada estéril.

Cuando se necesitó preparar ADN plasmídico de alta calidad se utilizó el kit comercial Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System de Promega siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.2.20 Mini-preparación de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*

El ADN de hojas de *A. thaliana* se preparó siguiendo la técnica de Li y Chory (1998). Una ó 2 hojas de la planta se disgregaron con un pilón plástico en tubo Eppendorf a temperatura ambiente durante 15 segundos. Se agregaron 700 µl de solución amortiguadora de extracción (Anexo II) y se mezcló en vórtex durante 5 segundos. Se centrifugó durante 10 min a 15000 x g y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron 600 µl de isopropanol frío y se centrifugó a 15000 x g durante 10 min. El precipitado de ADN se secó y se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril.

6.2.21 Extracción y purificación de ARN de *Arabidopsis thaliana*

Las extracciones de ARN se realizaron con Trizol comercial (Molecular Probes TRIzol, número de catálogo 15596026), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

6.2.22 Cuantificación de ácidos nucleicos

La calidad y cantidad del ADN purificado se analizó por lectura espectrofotométrica a 260/280 nm, considerando que $DO_{260} = 1$ equivale a 50 µg/ml de ADN, y por electroforesis en geles de agarosa al 0,7% en presencia de bromuro de etidio 0,3 µg/ml. La concentración de ARN en solución se estimó a partir de la absorbancia a 260/280 nm, considerando que $DO_{260} = 1$ corresponde a 40 µg/ml de ARN y se evaluó su calidad por corrida en geles de agarosa 1,5% en condiciones desnaturalizantes y tinción con bromuro de etidio 0,1 µg/µl de muestra sembrada.

6.2.23 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se utilizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa de tipo submarino de acuerdo a lo descrito por Sambrook y col. (1989). La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,7 y 2% (p/v) de acuerdo con el tamaño de los fragmentos analizados. Los geles fueron preparados en solución TAE 1X (Anexo II). El ADN se sembró con 1/10 vol de solución de siembra (Anexo II) y fue visualizado por tinción con bromuro de etidio 0,3 µg/ml. Las corridas electroforéticas se realizaron en solución TAE 1X a una intensidad de corriente constante de 70 mA y se utilizó como marcador de tamaño de los fragmentos ADN del bacteriófago λ (Promega) digerido con la enzima

de restricción *Hind*III (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb). Para la visualización de los geles se utilizó un transiluminador de luz UV ($\lambda=310$ nm).

6.2.24 Electroforesis de ARN en geles de agarosa desnaturalizantes

Para realizar la corrida electroforética de ARN en condiciones desnaturalizantes se sembraron 20 μ g de ARN por calle (cuantificado por lectura de la absorbancia a 260 nm y 280 nm). Antes de sembrar, las muestras fueron desnaturalizadas mezclando 1 volumen de ARN en solución acuosa y 3 vol de solución de desnaturalización (formamida 66% (v/v); HEPES 1,3X y formaldehído 8% (p/v)) e incubando esta mezcla a 65°C durante 5 min.

Los geles en condiciones desnaturalizantes se prepararon con agarosa 1,5% (p/v) en solución amortiguadora HEPES 1X (pH 7,8) y formaldehído 6% (p/v) según Ausubel y col. (1987). A cada muestra a sembrar se le agregaron 1/10 vol de solución de siembra (Anexo II) y 1/20 vol de solución de bromuro de etidio 0,3 mg/ml. La electroforesis se realizó en solución de HEPES 1X en forma submarina y a intensidad de corriente constante de 40 mA. Para la visualización de los geles se utilizó un transiluminador de luz UV ($\lambda=310$ nm).

6.2.25 Técnica de *Northern blot*

Los geles de separación de ARN por electroforesis descritos en el punto anterior se transfirieron por capilaridad en medio SSC 6X (Anexo II) a membranas de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences). Las membranas fueron secadas y fijadas por exposición a radiación ultravioleta ($\lambda=310$ nm) durante 3-5 min. Luego fueron hibridizadas con las sondas apropiadas, lavadas y expuestas a películas Kodak X-AR o Kodak Biomax MS. Para analizar los niveles de ARN transferido, los filtros fueron hibridizados con una sonda de ARNr 25S de *Vicia faba* en condiciones similares a las descritas en el punto 6.2.27, pero a 68°C.

6.2.26 Marcado radiactivo de los fragmentos de ADN

La marcación de ADN doble hebra se realizó utilizando el método de cebado al azar (Feinberg y Vogelstein, 1983). Para la desnaturalización del ADN doble hebra, se

incubaron aproximadamente 100 ng en un volumen de 35 μ l de agua a 100°C durante 3-5 min. Luego de transferir la mezcla inmediatamente a hielo, se agregaron 10 μ l de solución OLB (ver Anexo II), 2 μ l de ASB 10 mg/ml; 2 μ l de [α -³²P]dATP (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l, NEN) y 2-3 U del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (5 U/ μ l, Promega, Madison, WI, USA). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente entre 3 y 15 h, se diluyó en 200 μ l finales de agua y se filtró a través de una columna de Sephadex G-50 según el método descrito por Ausubel y col. (1987), para eliminar el exceso de [α -³²P]dATP no incorporado. La sonda purificada (actividad específica de aproximadamente 10⁸ cpm/ μ g) fue desnaturalizada a 100°C durante 3 min y diluida en una cantidad adecuada de solución de hibridización.

6.2.27 Hibridización de membranas de nylon

Las membranas de nylon a las cuales se fijaron los ARN mediante la técnica de *Northern blot* fueron pre-hibridizadas a 65°C en horno de hibridización durante por lo menos 2 h en solución SSC 5X, Denhardt 5X (Anexo II) y SDS 0,2% (p/v). La hibridización se realizó en las mismas condiciones pero con el agregado de la sonda marcada correspondiente y durante toda la noche. Luego de la hibridización, los filtros a los que se habían transferido los ARN se lavaron 3 veces a 65°C durante 15 min con SSC 2X. Las membranas que contenían fragmentos de ADN se lavaron con SSC 2X, SDS 0,1% a 65°C (2 veces), con SSC 1X, SDS 0,1% a 65°C (2 veces), con SSC 0,5X, SDS 0,1% a 65°C (2 veces) y con SSC 0,5X a 65°C (1 vez). Luego de los lavados se secaron y expusieron a películas Kodak X-AR o Kodak Biomax MS según cada caso.

6.2.28 Transcripción reversa

Para esta reacción se utilizó como molde ARN total de *A. thaliana*. En un primer paso se agregó 0,1 μ M del oligonucleótido dT_v (Anexo I) junto con 1 μ g de ARN total, y se incubó a 65°C durante 5 min a fin de desarmar las estructuras secundarias del ARN. Inmediatamente después de pasados los 5 minutos, la mezcla fue colocada en hielo. A continuación se agregaron dNTPs (5 mM de c/u), la solución amortiguadora de la enzima y 200 U de Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega), hasta un volumen final de 30 μ l. La reacción se dejó transcurrir durante 1,5 horas a 42°C y luego se inactivó la enzima durante 5 min a 80°C más 30 segundos a 94°C.

6.2.29 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

A fin de obtener una medida cuantitativa de los niveles de los ARN de interés, se utilizó la técnica de RT-qPCR. La misma fue llevada a cabo en un termociclador StepOne™ Real Time PCR System (Life Technologies™). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µl, conteniendo buffer de reacción de la enzima (5X; 4 µl), SYBR green (10X; 1 µl), dNTPs 62,5 µM, 20 pmoles de cada oligonucleótido específico, 10 µl de una dilución del producto de la transcripción reversa previamente descrita y 0,15 U de la enzima Phire ADN polimerasa (Thermo Scientific). Se utilizaron los oligonucleótidos Actina F y Actina R (Anexo I), que amplifican fragmentos de ACTINA2 y ACTINA8 (Charrier y col., 2002) o PP2A F y PP2A R, que amplifican una región del gen *PP2AA3* (Czechowski et al., 2005) (Anexo I), como controles de la concentración de ADN copia en cada una de las muestras. La fluorescencia se midió a 82°C durante 40 ciclos y los niveles relativos de expresión se determinaron utilizando el método de Ct comparativo. Los resultados presentados corresponden a triplicados biológicos y técnicos de una línea independiente. Resultados similares se obtuvieron con al menos dos líneas adicionales en cada caso. Los niveles de miR164 fueron determinados en el laboratorio del Dr. Javier Palatnik (IBR, Rosario) de acuerdo al protocolo de Chen y col. (2005). Los conjuntos de datos fueron analizados con la prueba *t* de Student, y las diferencias significativas se marcaron con un asterisco sobre las barras de los gráficos.

6.2.30 Marcación radioactiva de fragmentos de ADN para ensayos de retardo en gel

Para la marcación radiactiva de los fragmentos de ADN, éstos se clonaron previamente en el vector pBluescript SK⁻. Los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos pAS1 F-R, pIAA3 F-R, o pSAUR65 F-R (Anexo I) se purificaron de geles de agarosa al 2% (P/V) empleando el sistema comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Luego, se realizaron digestiones con la enzima *Bam*HI, en las soluciones amortiguadoras y condiciones sugeridas por el fabricante. A continuación, con el agregado de 5 µCi de [α -³²P]dATP (3000Ci/mmol), dCTP, dGTP y dTTP 0,2 mM cada uno, y 2 U de Klenow, se realizó la reacción de marcación a temperatura ambiente entre 3 y 16 h. Los productos obtenidos

se sembraron en geles verticales de poliacrilamida [acrilamida 5% (P/V), bis-acrilamida 0,08% (P/V), TBE 0,5 X, glicerol 2,5% (V/V)] usando la solución de siembra para ADN descripta. La corrida se realizó en solución amortiguadora TBE 0,5X a 30 mA durante 1,5 h. Los geles se desarmaron y se expusieron 5 min a placas radiográficas. Las señales en las placas autorradiográficas permitieron reconocer en el gel la posición de la banda de interés, la que fue escindida y sumergida en 1 ml de solución de elución de oligonucleótidos [Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM, NaCl 500 mM, EDTA (pH 8,0) 20 mM] durante toda la noche a 4°C. Se centrifugó 1 min a 12000 x g para provocar que la acrilamida se depositara en el fondo del tubo, se tomó el sobrenadante que contenía el fragmento de ADN marcado y se lo precipitó en etanol 70% (V/V) con acetato de sodio 0,3 M (pH 5,2) y 1 µg de ARNt (Sigma), durante 30 minutos a -80°C. El oligonucleótido purificado fue resuspendido en agua destilada estéril, libre de nucleasas, y conservado a -20°C hasta su uso en los ensayos de unión. La mutagénesis de la secuencia de unión putativa de AtTCP15 del fragmento de promotor de *IAA3/SHY2* se realizó según el protocolo descrito por Silver y col. (1995).

6.2.31 Ensayos de retardo en gel

Los ensayos de retardo en gel fueron llevados a cabo según el protocolo descrito por Sessa y col. (1993). Las reacciones de unión se realizaron en un volumen de 18 µl con 3-1000 ng de proteína de fusión purificada y la cantidad de oligonucleótido marcado correspondiente a aproximadamente 30000 cpm, en la solución de unión [HEPES (pH 7,5) 20 mM, glicerol 10% (V/V), Tritón X-100 0,5% (V/V), EDTA (pH 8,0) 0,5 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, ASB 22 ng/µl, DTT 1 mM]. Una vez agregados todos los componentes, las mezclas se incubaron 20 min a 25°C, se les adicionó Ficoll al 2,5% (P/V) y se las sembró en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes [acrilamida 5% (P/V), bis-acrilamida 0,08% (P/V), TBE 0,5X y glicerol 2,5% (V/V)] previamente precorridos a un voltaje constante de 100 V durante 90 min, sin cortar la corriente. La electroforesis se dejó transcurrir durante 90 minutos a corriente constante en solución amortiguadora TBE 0,5X, al cabo de los cuales se secó el gel y se expuso a placa radiográfica (Kodak MXG/Plus) con pantalla intensificadora a -80°C durante toda la noche.

6.2.32 Condiciones generales de crecimiento en cámara de cultivo

Las plantas fueron crecidas en cámara de cultivo simulando fotoperíodo de “día largo”, el cual consiste en 16 horas de luz a una temperatura aproximada de entre 24 y 26°C y 8 horas de oscuridad a una temperatura de entre 20 y 22°C aproximadamente. La humedad se mantuvo en un rango variable entre 40-70%. Las condiciones de iluminación fueron logradas con una combinación de lámparas fluorescentes blancas frías y de tipo GroLux (Silvania, Vinhedo, SP, Brasil), con una densidad de flujo de fotones fotosintética de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

6.2.33 Condiciones de crecimiento en tierra

Las plantas de *A. thaliana* fueron crecidas sobre un sustrato conformado por una mezcla de turba, vermiculita y perlita en proporción 2:2:1 respectivamente, cubierto por un colchón de tierra fértil especialmente formulada para plantas de interior (Terrafertil, Plantas de Interior) a fin de favorecer la germinación o el enraizamiento de las plántulas provenientes de placas. Las macetas fueron subirrigadas con agua para mantener la humedad del sustrato, y suplementadas una vez por semana con fertilizante Hakaphos rojo en concentración de 5 g/l.

6.2.34 Transformación de *Arabidopsis thaliana*

El método utilizado para transformar plantas de *A. thaliana* fue el de inmersión floral (*floral dip*), descrito por Clough y Bent (1998). Se prepararon aproximadamente 8 macetas con tierra para cada una de las construcciones a introducir en las plantas. Se sembraron alrededor de 20 semillas por pote, lo que permitió luego seleccionar las que mostraban un aspecto más saludable y reducir el número de plantas por maceta a 12. 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 el punto 6.2.18. Se realizó un pre-inóculo

de 30 ml de medio LB suplementado con rifampicina 50 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml y estreptomicina 300 µg/ml. Este pre-inóculo se creció hasta saturación durante 24 h a 28°C y una agitación de 160 rpm. Con este cultivo se inocularon 3 erlenmeyers con 200 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, a 28°C, con agitación). Las células fueron cosechadas por centrifugación a 5500 x g durante 20 min. Los sedimentos se resuspendieron cuidadosamente en 1 l de solución de infiltración (sacarosa 5%), a la que se le adicionaron 300 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 30 segundos tratando de evitar que el líquido entre en contacto con la tierra. Luego, los pots se ubicaron en forma horizontal en una bandeja, se taparon con nylon para conservar un ambiente húmedo y se llevaron a cámara de cultivo. A las 24-48 h se colocaron en posición vertical y se les agregó abundante agua permitiendo que las plantas se desarrollaran hasta la formación y maduración de semillas (4-5 semanas aproximadamente para nuestras condiciones de cultivo).

Finalmente se recolectaron las semillas de cada pote por separado, se limpiaron de los restos de vainas y tierra y se guardaron a 4°C hasta su posterior análisis.

6.2.35 Selección de plantas transformantes

La esterilización de las semillas para su posterior siembra en placa consiste en realizar un primer lavado con etanol 70% (v/v) (1 min) y luego con una solución de lavandina 5% y SDS 1% (15 min). Luego de este paso de desinfección, las semillas se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y finalmente se resuspendieron en agar 0,1%. Una vez resuspendidas se sembraron en placas de Petri de 150 mm con medio MS 0,5X, 0,8% agar y kanamicina 40 µg/ml o higromicina 25 µg/ml, como agente selectivo. Las placas fueron mantenidas en la heladera durante tres días y luego fueron pasadas a cámara de cultivo, manteniéndose de esta forma durante 12-15 días. En ese período sólo las plantas transformadas generaron hojas verdaderas muy verdes y raíces suficientemente largas. Las plantas se dejaron crecer hasta la aparición de hojas y se

transplantaron a potes con tierra. Cuando las semillas estuvieron maduras, éstas se recolectaron, rotularon y guardaron a 4°C.

6.2.36 Cruzamiento de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Para realizar los cruzamientos entre los diversos genotipos utilizados, se procedió de la siguiente manera: se emascularon las flores (quitando sépalos, pétalos y anteras) a utilizar como receptoras (gametos femeninos). Los pimpollos elegidos para la emasculación fueron aquellos que estuvieran en estadio 11 – 12 de desarrollo, momento previo a la antesis de la flor, en el cual las anteras aun no alcanzan la elongación ni el grado de madurez suficiente como para fertilizar al gineceo. Sobre estas flores emasculadas se pincelaron las anteras maduras de flores abiertas (gametos masculinos). Una vez desarrollada la vaina y recolectadas las semillas, estas se sembraron en placas que contuvieran los antibióticos correspondientes a cada construcción cruzada, y se analizaron como se explica a continuación.

6.2.37 Análisis de plantas transformadas

Con el objetivo de confirmar que las plantas resistentes al antibiótico usado para la selección de transformantes contengan las inserciones de interés, se procedió al análisis de la presencia del transgén por PCR. Para ello se realizó una mini-preparación de ADN genómico a partir de una o dos hojas de cada planta siguiendo el protocolo que se describe en el punto 6.2.20. El ADN obtenido fue utilizado como molde en una reacción de PCR. 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 hasta la obtención de líneas homocigotas. Tales líneas fueron luego utilizadas para los ensayos descriptos.

6.2.38 Tinción de Alexander para granos de polen

La tinción de Alexander (1969) es útil para determinar la viabilidad de los granos de polen, de acuerdo a la coloración que adopte cada uno: púrpura fuerte aquellos viables, y azul turquesa pálido aquellos inviables. Aunque nuestra coloración

no permitió observar estos cambios de color, nos permitió discernir la morfología de los granos de polen. Para realizar la tinción de Alexander, simplemente se hizo una dilución 1:50 en agua de la solución madre (Anexo II) en la cual se esparcieron los granos. Luego de 5 minutos, se observaron y fotografiaron.

6.2.39 Tratamientos con hormonas

Todos los tratamientos con auxinas y/o CK se realizaron en plantas cultivadas en tierra, mediante atomización con las soluciones de trabajo correspondientes. De acuerdo al fin del experimento, los tratamientos se realizaron de dos maneras diferentes. Para las medidas de niveles de expresión relativos de genes mediante RT-qPCR, se rociaron las plantas con la hormona de interés y se recolectaron las muestras luego de dos horas de realizado el tratamiento. Para la observación de fenotipos se realizaron atomizaciones sucesivas, desde la aparición del segundo par de hojas hasta la formación de las vainas. Los tratamientos con auxinas se realizaron 3 días por semana, mientras que los tratamientos con CK se realizaron 5 días por semana. En todos los casos, las plantas control fueron tratadas en paralelo con la solución utilizada para disolver las hormonas.

6.2.40 Tratamientos con auxinas

Los tratamientos con auxinas se realizaron utilizando un análogo sintético de IAA, ácido naftalenacético (NAA Sigma). La disolución de la misma se hizo en agua desionizada, con el agregado de ácido acético glacial hasta alcanzar completa disolución. La solución madre de NAA 50 mM se guardó a -20°C, y la solución de uso, NAA 25 µM, se consiguió haciendo una dilución en agua de la solución madre.

6.2.41 Tratamientos con citoquininas

Los tratamientos con CK se realizaron utilizando 6-bencilamiopurina (BAP), (Sigma). La disolución de la hormona se hizo en agua desionizada, con el agregado de NaOH 10 N hasta alcanzar completa disolución. La solución madre de BAP 100 mM se guardó a -20°C, y la solución de uso, BAP 100 µM, se consiguió haciendo una dilución en agua de la solución madre.

6.2.42 Cuantificación de IAA libre

Las determinaciones se realizaron en plántulas de 15 días crecidas en placa de petri. El método de cuantificación utilizado se basa en el protocolo reportado por Durgbanshi y col. (2005). Las mediciones se realizaron gracias a la valiosa colaboración del Dr. Sergio G. Alemán, Laboratorio de Fisiología Vegetal, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto.

6.2.43 Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa

Para analizar la actividad β -glucuronidasa en forma histoquímica en las plantas transformadas, plántulas o plantas adultas fueron lavadas con solución fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0) durante algunos minutos para eliminar restos de tierra o medio de cultivo y luego transferidas a una solución de fosfato 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 (Anexo II). A continuación, se sometieron a vacío durante 5 min y se incubaron a 37°C en oscuridad durante 2-16 h (Jefferson, y col., 1987). Luego de la incubación se agregó etanol 70% para decolorar los tejidos y se guardaron en solución etanólica a 4°C hasta ser fotografiadas. Las imágenes digitalizadas se tomaron con una cámara LUMIX DMC-FZ35 (Panasonic) sobre microscopio óptico y se procesaron con el software Corel PHOTO-PAINT X6.

El análisis histoquímico se realizó en plántulas de 0 a 15 días, crecidas en placas de Petri con medio MS 0,5X, 0,8% agar, y en plantas adultas crecidas en macetas con tierra según se describe anteriormente.

6.2.44 Microscopía de interferencia diferencial de Nomarski

Para poder observar las células de parénquima en empalizada mediante microscopía de Nomarski, las hojas de roseta de plantas adultas se trataron previamente con una solución 5g/ml de hidrato de cloral, realizando pasajes sucesivos hasta lograr la completa decoloración de las mismas. Posteriormente, se montaron y observaron en un microscopio OLYMPUS BH-2, y se tomaron las fotografías correspondientes con una cámara SIGHT DS-Fi1, Software de Captura de Imágenes NIS-Elements v2.3.

6.2.45 Microscopía electrónica de barrido

Las plántulas, hojas, flores e inflorescencias de *A. thaliana* se fijaron en solución FAA (Anexo II) y se transfirieron luego de 24 hs a etanol 70%. Luego de una serie de deshidrataciones sucesivas con etanol 80%, 96% y 100%, se transfirieron a acetona pura para su disecación por método de punto crítico con CO₂, para lo cual se utilizó un desecador Emitech K850. Finalmente, las muestras se cubrieron con una mezcla de oro-paladio utilizando el equipo Edwards S150B, y se fotografiaron con un microscopio electrónico de barrido Leitz AMR 1000 (Cambridge, England), perteneciente al Centro Científico Tecnológico CONICET de Rosario.

6.2.46 Cortes histológicos de órganos de *Arabidopsis thaliana*

Las muestras utilizadas para los análisis histológicos se colectaron en acetona fría para fijarlas, y a los 20 minutos se transfirieron a una solución de etanol 70%. A continuación, se realizaron los siguientes pasos sucesivos a fin de preparar las muestras para el entacado: etanol 80%, 90%, 95%, 15 minutos en cada solución; 2 pasajes sucesivos por etanol 100%, de 30 minutos cada uno; solución etanol 100% - xilol 3:1, etanol 100% - xilol 1:1 y etanol 100% - xilol 1:3, 30 minutos cada una, 3 pasajes por xilol puro, los dos primeros de 15 minutos y el tercero de 2 horas; mezcla xilol – parafina 3:1, xilol – parafina 1:1, xilol – parafina 1:3, de 30 minutos cada una; 3 pasajes sucesivos por parafina pura, de al menos 1 hora cada uno. Luego del último paso por parafina pura se procedió al entacado de las muestras. Las mismas se cortaron en láminas de 10 µm de ancho, se montaron en portaobjetos previamente tratados con polilisina y se secaron durante una noche a 28°C. Para proceder a la tinción de los cortes, se realizaron los siguientes pasos: 2 pasajes por xilol, de 5 minutos cada uno; etanol 100%, etanol 96%, etanol 90%, etanol 80%, etanol 70%, etanol 50%, agua desionizada, solución de azul de toluidina 0,1% en agua, durante 1 minuto cada uno; 3 lavados en agua desionizada de al menos 1 minuto cada uno. Luego de la tinción, se secaron las muestras a 28°C durante una noche y se montaron con Bálsamo de Canadá sintético.

6.3 ANEXO I

Oligonucleótidos utilizados en reacciones de amplificación de PCR, RT-qPCR y ensayos de retardo en geles. La secuencia subrayada corresponde a los sitios de restricción, detallados en la columna contigua a la de la secuencia de cada cebador. El uso de los mismos se detalla en la cuarta columna.

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	SITIO	USO
p11 F	GGCAAGCTTGCTACATCATTGAGAAACTC	HindIII	Construcción de p11::GUS en el vector pBI101.3 y p11::AtTCP11-EAR en el vector pBI121
p11 R	GGCGGATCCCTCCGAATTCGTCGATTTTGT	BamHI	Construcción de p11::GUS en el vector pBI101.3
p11 XbaI	GGCTCTAGACTCCGAATTCGTCGATTTTGT	XbaI	Construcción p11::AtTCP11-EAR en el vector pBI121
TCP11-EAR F	GGCTCTAGAATGATTTTTCAGAATGTGTG	XbaI	Construcción 35S::AtTCP11, 35S::AtTCP11-EAR y p11::AtTCP11-EAR en el vector pBI121
TCP11-EAR R	CGGGTCGACAATGGTGACGGCGTCTAC	SalI	Construcción 35S::AtTCP11-EAR y p11::AtTCP11-EAR en el vector pBI121
TCP11 R	CGGGTCGACTCGAGCTAATGGTGACGGCGTCT	SalI	Construcción 35S::AtTCP11 en el vector pBI121
p15 F	CCGGTCGACGAAAGATGAATTTGCCTAAAC	SalI	Construcción de p15::GUS en el vector pBI101.3 y p15::AtTCP15-EAR en el vector pBI121
p15 R	CCGTCTAGATGATCGAAGCTTTGGTGG	XbaI	Construcción de p15::GUS en el vector pBI101.3
TCP15-EAR F	GGCTCTAGATCATCATCATGGATC	XbaI	Construcción 35S::AtTCP15, 35S::AtTCP15-EAR y p15::AtTCP15-EAR en el vector pBI121
TCP15-EAR R	GGCCTCGAGAGGAATGATGACTGGTGC	XhoI	Construcción 35S::AtTCP15-EAR y p15::AtTCP15-EAR en el vector pBI121
TCP15 R	GGCCTCGAGCTAGGAATGATGACTGGT	XhoI	Construcción 35S::AtTCP15 en el vector pBI121
p16 F	GGCAAGCTTGAAAATCCCAAAAACCTC	HindIII	Construcción de p16::GUS en el vector pBI101.3
p16 R	GGGCTCGAGCTAGGAGGTGGTGGTGACAC	XhoI	Construcción de p16::GUS en el vector pBI101.3

*Estudios funcionales de factores de transcripción vegetales de la familia TCP
Análisis de su participación en el desarrollo vegetal*

p16 F2	GGCAAGCTTGTGTAAGAGTCGGGTAAT	HindIII	Construcción de p16::GUS (2) en el vector pBI101.3
p16 R2	GGCGCTAGCAATCCATTTTCTCTGTTTT	NheI	Construcción de p16::GUS (2) en el vector pBI101.3
TCP16-EAR F	GGCTCTAGAATGGATTGCAAAAAATGGAA	XbaI	Construcción 35S::AtTCP16 y 35S::AtTCP16-EAR en el vector pBI121
TCP16-EAR R	GGCCTCGAGAAACTGTGGTTGTGGCTG	XhoI	Construcción 35S::AtTCP16-EAR en el vector pBI121
TCP16 R	GCGCTCGAGAAACTGTGGTTGTGGCTG	XhoI	Construcción 35S::AtTCP16 y 35S::AtTCP16-EAR en el vector pBI121
EAR F	TCGACTTGATTGGATCTTGAGTTGAGACTTGG ATTGCTTGAGCT		Dominio EAR
EAR R	CAAGCGAATGGAAGTCTCAACTCAAGATCCAA ATCAAG		Dominio EAR
EAR R-XK	GGCCTCGAGGTACCTCAAGCGAATCCAAGTCT C	XhoI KpnI	Clonado de fusiones en pBI121
GUS-NH ₂	TTGGGGTTTCTACAGGAC		Chequeo de fusiones a GUS
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT		Inserción de T-DNA de líneas mutantes SALK
T-DNA GK	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC		
dTV	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV (V=A, C, G)		Retro-transcripción de ARNm
ACTINA F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG		RT-q-PCR
ACTINA R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC		RT-q-PCR
ARR7 F	TGACGGATTACTCAATGCCAGGACT		RT-q-PCR
ARR7 R	CTGCTAGCTTCACCGGTTTCAACA		RT-q-PCR
ARR15 F	TGAGAGGTGGTGAAGCTGAAGAAGG		RT-q-PCR
ARR15 R	TGGAGTGTGTCATCAAGGGAGGA		RT-q-PCR
AS1 F	AGGCGAGACGCAGAGGCCAA		RT-q-PCR
AS1 R	AGACGGTTCAGGGGCGGTCT		RT-q-PCR
AS2 F	CATGCGCCTCCGTGACCCTG		RT-q-PCR
AS2 R	CACGGCGGTGGCTGTTCCAT		RT-q-PCR
BOPI F	ACTATCCCGCGGTCCCACA		RT-q-PCR
BOPI R	CCAATGCCCGGACTGGACC		RT-q-PCR
CUC1 F	CCCCACGTCAGCCACGTAC		RT-q-PCR
CUC1 R	GCTGCTGCTGCTGCATCGAA		RT-q-PCR
CUC2 F	ACCGTCACAGCCAGCGCAAT		RT-q-PCR
CUC2 R	GGCGGTGGAAGACGGCTGAA		RT-q-PCR
CUC3 F	AGGGCTCCACGTGGCCTCAA		RT-q-PCR
CUC3 R	CACGTGTGGCGGTGTGAATGG		RT-q-PCR
IAA3/SHY2 F	GGGTTGTGCGGTTTCTCGGGC		RT-q-PCR
IAA3/SHY2 R	GGACAACCTTTTGCCTGTTTCTGA		RT-q-PCR
KNAT1 F	TCTCACGTGGTGGGAGTTGCA		RT-q-PCR
KNAT1 R	GGTTTCCAGTGACGCTTCTTTGGT		RT-q-PCR
LOB F	GAAGAAAAACAAATGGCGTCGTCATCA		RT-q-PCR
LOB R	CCGACGAGCCATAGACGGG		RT-q-PCR
miR164 F	GGCGGTGGAAGCAGGGCA		RT-q-PCR
miR164 R	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT		RT-q-PCR
PP2A F	CCTGCGGTAATAACTGCATCT		RT-q-PCR
PP2A R	CTTCACTTAGCTCCACCAAGCA		RT-q-PCR

SAUR19 F	TCGGCGGCACCAAAAGGGTT		RT-q-PCR
SAUR19 R	TGGCTCATCATCGTTGGAACCG		RT-q-PCR
SAUR65 F	CCTCAGGGCGGGTGGACCAA		RT-q-PCR
SAUR65 R	ACCACTCTGTTGTTCTTGTGGTTGC		RT-q-PCR
TCP15 F	CAGAGTCTTGCAACGGCACC		RT-q-PCR
TCP15 R	CGCCGCCACTACCACCACTG		RT-q-PCR
TCP16 F	CGCATTTCGGATCCCGCCGAG		RT-q-PCR
TCP16 R	GCAGGCTCGGCATTCTGGAGG		RT-q-PCR
YUC1 F	TGGGATGCCGAAAACGCCGT		RT-q-PCR
YUC1 R	CGTCAGACGCCGTTCCAAGGA		RT-q-PCR
YUC4 F	GGAACGGGGCAAAGTTTCTG		RT-q-PCR
YUC4 R	CGGCGTTTTTGGCATTTCCTT		RT-q-PCR
pAS1 F	GGCGGATCCGTATTTTTGGTAGGGTTATGG	BamHI	Ensayos de movilidad electroforética
pAS1 R	GGCAGATCTATGAGTAATTGGGGATGAGG	HindIII	Ensayos de movilidad electroforética
pIAA3 F	GGCGGATCCCTTGCGCGGTTTAGCTTTTCG	BamHI	Ensayos de movilidad electroforética
pIAA3 R	GTAGAAGATCTCAAGCCACCG	HindIII	Ensayos de movilidad electroforética
pIAA3-mut F	GCGTCTAGACCTGCATCTTCTGTCATT	XbaI	Mutagénesis del sitio TCP
pIAA3-mut R	CGCTCTAGAATCTGATCACAGAATCGCTG	XbaI	Mutagénesis del sitio TCP
pSAUR65 F	GGCGGATCCATCCACAAATTGATTTAGCAG	BamHI	Ensayos de movilidad electroforética
pSAUR65 R	GGGAGATCTCAACCAAAGAAGACAGAAAC	HindIII	Ensayos de movilidad electroforética

6.4 ANEXO II

Composición de las soluciones y medios de cultivo utilizados.

Denhardt 100X: Polivinilpirrolidona 2% (p/v); albumina sérica bovina 2% (p/v); Ficoll 2% (p/v).

FAA: (etanol absoluto, ácido acético glacial, formaldehído, agua desionizada, en proporción 50:5:10:35).

Medio de cultivo 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 agrega agar al 1,5% (p/v).

Medio Murashige y Skoog: KNO₃ 1,9 g/l; NH₄NO₃ 1,65 g/l; CaCl₂·2H₂O 0,44 g/l; MgSO₄·7H₂O 0,37 g/l; KH₂PO₄ 0,17 g/l; Na₂EDTA 37,3 mg/l; FeSO₄·7H₂O 27,8 mg/l; MnSO₄·4H₂O 22,3 mg/l; H₃BO₃ 6,2 mg/l; ZnSO₄·4H₂O 8,6 mg/l; KI 0,83 mg/l; Na₂MoO₄·2H₂O 0,25 mg/l; CuSO₄·5H₂O 0,025 mg/l; CoCl₂·6H₂O 0,025 mg/l. Se ajusta el pH a 5,8 con NaOH 1 M. Para medios sólidos se añaden 8 g/l de agar.

Solución amortiguadora de extracción de ADN de *Arabidopsis thaliana* por mini-preparación: Tris-HCl 200 mM (pH 8,0); NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5%.

Solución de desnaturalización para membranas de nylon: NaOH 0,2 N; NaCl 1,5 M.

Solución de Miniprep I: Tris-HCl 25 mM (pH 8,0); glucosa 50 mM y EDTA 10 mM.

Solución de Miniprep II: NaOH 0,2 N y SDS 0,1% (p/v).

Solución de neutralización para membranas de nylon: Tris-HCl 0,4 M (pH 7,6); SSC 2X.

Solución de siembra de ADN y ARN en geles de agarosa: Azul de bromofenol 0,25% (p/v); xilencianol FF 0,25% (p/v); glicerol 30% (v/v).

Solución madre de X-gluc: X-Gluc 50 mM en N-N-dimetilformamida.

Solución madre para tinción de Alexander: 10 ml de etanol 96%, 5 ml de verde malaquita 1%; 5 g de fenol; 5 ml de fucsina ácida 1% en agua; 0,5 ml de naranja G 1% en agua; 2 ml de ácido acético glacial; 25 ml de glicerol y 50 ml de agua. La solución debe guardarse en frasco color caramelo o protegida de la luz.

SSC 1X: NaCl 0,15 M; citrato de sodio 0,015 M.

TAE 1X: Tris-acetato 40 mM (pH 8,0); EDTA 1 mM.

TBE 1X: Tris-HCl 89 mM (pH 8,0); ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM (pH 8,0).

TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7,5).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I: ESTUDIOS FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS AtTCP11 Y AtTCP16

7.1 Estructura del gen *AtTCP11*

El gen que codifica *AtTCP11* está ubicado en el cromosoma 2 de *A. thaliana* y está formado por una secuencia codificante carente de intrones de 566 pares de bases (pb), flanqueada por extremos 5' y 3' no codificantes de 91 y 292 pb respectivamente.

Debido a que la región promotora de *AtTCP11* no ha sido anteriormente estudiada, decidimos tomar para tal fin una secuencia de 1068 pb ubicada corriente arriba del sitio de inicio de la traducción. La misma contiene una región intergénica de 282 pb, así como el extremo 5' de la secuencia del gen *At2g36990*, ubicado en orientación antisentido respecto de *AtTCP11*. El modelo del gen y su región promotora se observan en la Figura 7.1 A.

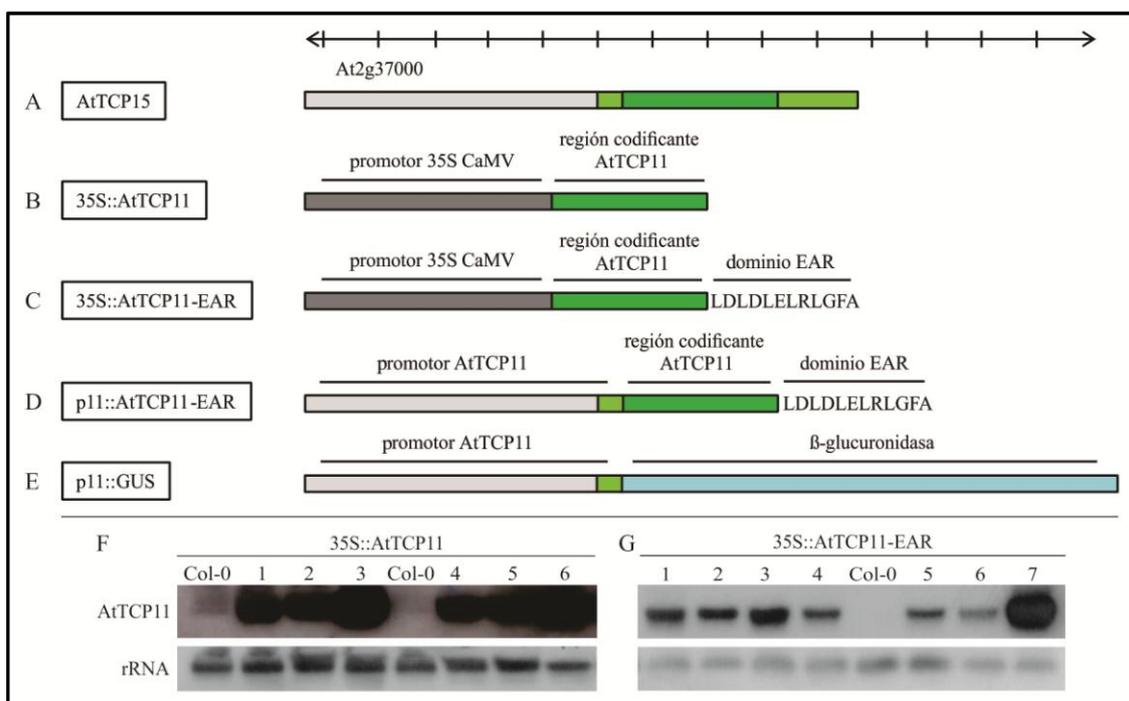


Figura 7.1: Esquema de *AtTCP11* y construcciones realizadas. (A) Esquema de *AtTCP11*, incluyendo la región promotora utilizada (caja gris claro), la región codificante (caja verde oscuro), y los extremos 5' y 3' no codificantes (cajas verde claro). (B-E) Construcciones realizadas en los vectores binarios *pBI121* (B-D) o *pBI101.3* (E). El dominio EAR se muestra en forma de sus residuos aminoacídicos para mayor claridad. Las divisiones de la regla en la región superior de la imagen corresponden a 200 pb, y las cajas mantienen las proporciones de acuerdo al tamaño de cada uno de los fragmentos. (F, G) Ensayos de Northern blot a partir de los cuales se determinaron los niveles de expresión de *AtTCP11* en plantas salvajes (Col-0) y *35S::AtTCP11* (F) o *35S::AtTCP11-EAR* (G).

7.2 Estudio del patrón de expresión conferido por la región promotora de *AtTCP11*

Para el estudio del patrón de expresión conferido por la región promotora de *AtTCP11*, se clonó en el vector binario pBI101.3 el fragmento de promotor anteriormente mencionado, frente a la región codificante del gen de la β -glucuronidasa (*gus*). Las plantas transformadas con la construcción reportera, denominada p11::GUS (Fig. 7.1 E), se seleccionaron con el antibiótico kanamicina y la presencia del transgén se determinó por PCR sobre ADN genómico (Ver Materiales y Métodos). Se analizaron mediante ensayos de tinción histoquímica 15 líneas independientes y finalmente se seleccionaron 3 líneas representativas para estudios posteriores.

Como se observa en la Figura 7.2, los ensayos histoquímicos revelaron la expresión del gen reportero en el sistema vascular de los cotiledones (Fig. 7.2. A), hojas de roseta y caulinares (Fig. 7.2. C, D). También se observó tinción en el meristema apical y primordios de hojas (Fig. 7.2. B), así como en yemas axilares (Fig. 7.2. D). En flores, la expresión se restringió al sistema vascular de los sépalos (Fig. 7.2. E) y a óvulos y granos de polen maduros (Fig. 7.2. F). También se observó expresión en raíces, tanto en plántulas de 15 días como en plantas adultas (Fig. 7.2. G, H).

7.3 Estudio de mutantes insercionales

A fin de comenzar el estudio de la función de *AtTCP11*, decidimos analizar las mutantes insercionales disponibles. Existen cuatro líneas SALK con inserciones en la región de *AtTCP11*: SALK_082324 y SALK_003395, en las cuales el T-DNA está insertado en la región 5' no codificante de *AtTCP11*, y SALK_056047 y SALK_020124, donde el T-DNA se encuentra en la región 3' no codificante. Las cuatro líneas fueron analizadas por PCR a fin de comprobar la presencia de la inserción, con un oligonucleótido específico de *AtTCP11* y LBb1 (Anexo I, Materiales y Métodos), específico para el T-DNA. En todos los casos se obtuvieron líneas homocigotas, pero las medidas de transcripto por RT-PCR semi-cuantitativa demostraron que las cuatro mutantes expresaban ARN que contenía la región codificante completa de *AtTCP11* en niveles similares a los de plantas salvajes. El análisis fenotípico de estas plantas no reveló diferencias apreciables con respecto a las plantas salvajes en ninguno de los

estadios del desarrollo. Este resultado no es extraño, ya que las mismas no presentan alteraciones significativas en los niveles de expresión del gen en estudio.

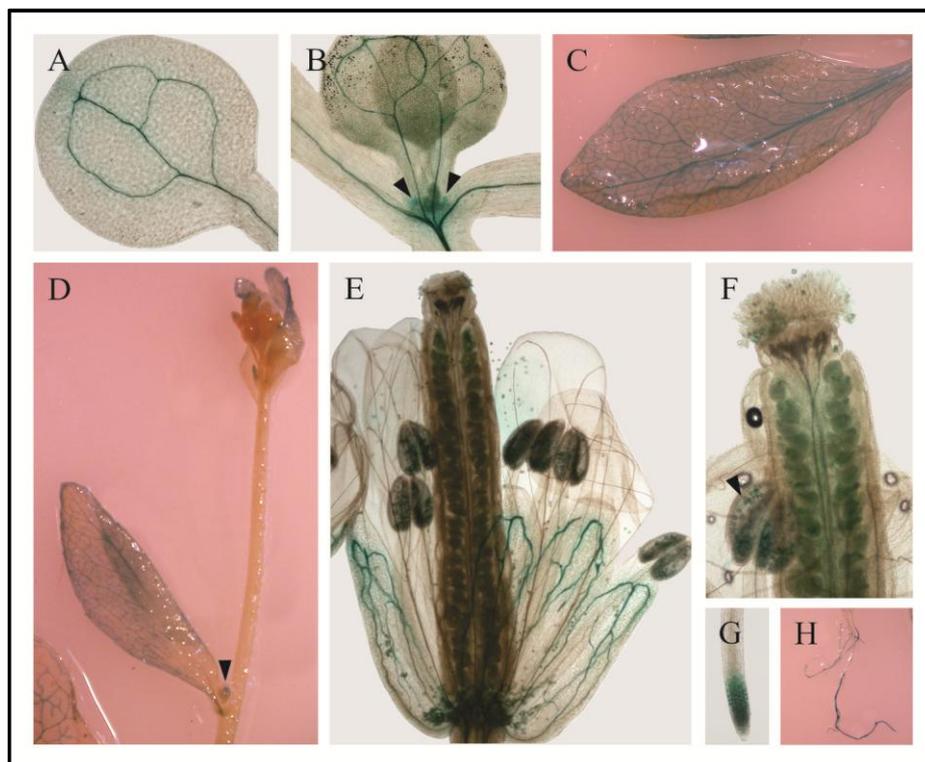


Figura 7.2: Patrón de expresión conferido por la región promotora de AtTCP11. (A, B) Plántula de 15 días, donde se observa expresión en las haces vasculares de los cotiledones (A) y el primer par de hojas (B), así como en el meristema apical y los primordios de hojas (B). (C, D) Planta adulta de 40 días. Nótese la expresión del gen reportero en las haces vasculares de las hojas, tanto de roseta (C) como caulinares (D), así como en la yema axilar (punta de flecha). (E, F) Flor madura mostrando tinción en las haces vasculares de los sépalos (E), y en óvulos y granos de polen maduros (F). (G, H) Expresión del gen reportero en raíces de plantas de 15 días (G) y de 45 días (H).

Dado que no podríamos obtener mayor información sobre la función de AtTCP11 en base al estudio de las líneas mutantes, decidimos utilizar diferentes estrategias basadas en la expresión de diversas formas de AtTCP11 en *A. thaliana*.

7.4 La expresión ectópica de la forma represora dominante de AtTCP11 genera una gran variedad de alteraciones morfológicas en *Arabidopsis thaliana*

Debido a que la familia de factores de transcripción TCP posee un gran número de miembros con elevada redundancia funcional (Galego y Almeida, 2002; Palatnik y col., 2003; Koyama y col., 2007; Schommer y col., 2008; Kieffer y col., 2011; Steiner y

col., 2012), decidimos utilizar una estrategia que nos permitiera expresar una forma dominante de AtTCP11. Para ello, utilizamos el dominio represor dominante EAR (Hiratsu y col., 2003), cuya función ha sido ampliamente comprobada, incluso en factores de transcripción TCP (Koyama y col., 2007, 2010, 2011; Hervé y col., 2009; Kieffer y col., 2011; Li y col., 2012). Para generar la construcción, se amplificó la región codificante de *AtTCP11* con los oligonucleótidos TCP11 F y R (Anexo I, Materiales y Métodos), y se fusionó el dominio EAR al extremo carboxilo terminal mediante ligación seguida de amplificación. El fragmento fusionado se clonó en el vector binario pBI121, bajo el control del promotor 35SCaMV. En la Figura 7.1 C se muestra un esquema de la construcción, de ahora en más llamada AtTCP11-EAR.

Una vez seleccionadas las plantas transformantes y obtenidas las líneas homocigotas, se procedió a su estudio. Los niveles de expresión de las distintas líneas se determinaron mediante ensayos de *Northern blot*, y se seleccionaron dos líneas de alta expresión (Fig. 7.1 G) para estudios posteriores.

El análisis fenotípico de las plantas AtTCP11-EAR muestra una gran variedad de alteraciones morfológicas en diversos estadios de desarrollo. Las hojas de roseta tienen los márgenes levemente ondulados y curvados hacia arriba, mayormente en la región distal de la lámina (Fig. 7.3 B). Contrariamente a lo que sucede con las hojas silvestres, que pueden aplanarse realizando pequeños cortes en los bordes, las láminas de las hojas de plantas TCP11-EAR no pueden aplanarse y continúan presentando pliegues y ondulaciones (Fig. 7.3 C, D, E). Esto podría deberse a un crecimiento alterado en la zona central de la hoja respecto de los bordes, especialmente en la región distal, lo que sugiere que AtTCP11 podría regular la expansión de la lámina en hojas. En las líneas con fenotipos más severos, las hojas son más pequeñas que las salvajes, lo que sugiere que la proteína de fusión actuaría reprimiendo la expansión, preferentemente en los bordes de la lámina foliar. En estadio reproductivo también se observan diversas alteraciones. Las hojas caulinares son considerablemente más pequeñas que las salvajes, tienen pecíolos acortados y sus márgenes se pliegan hacia arriba originando hojas completamente arrolladas sobre sí mismas (Fig. 7.3 E, F). Las plantas AtTCP11-EAR presentan una marcada pérdida de dominancia apical, dada por el acortamiento del tallo principal de la inflorescencia y el mayor desarrollo relativo de

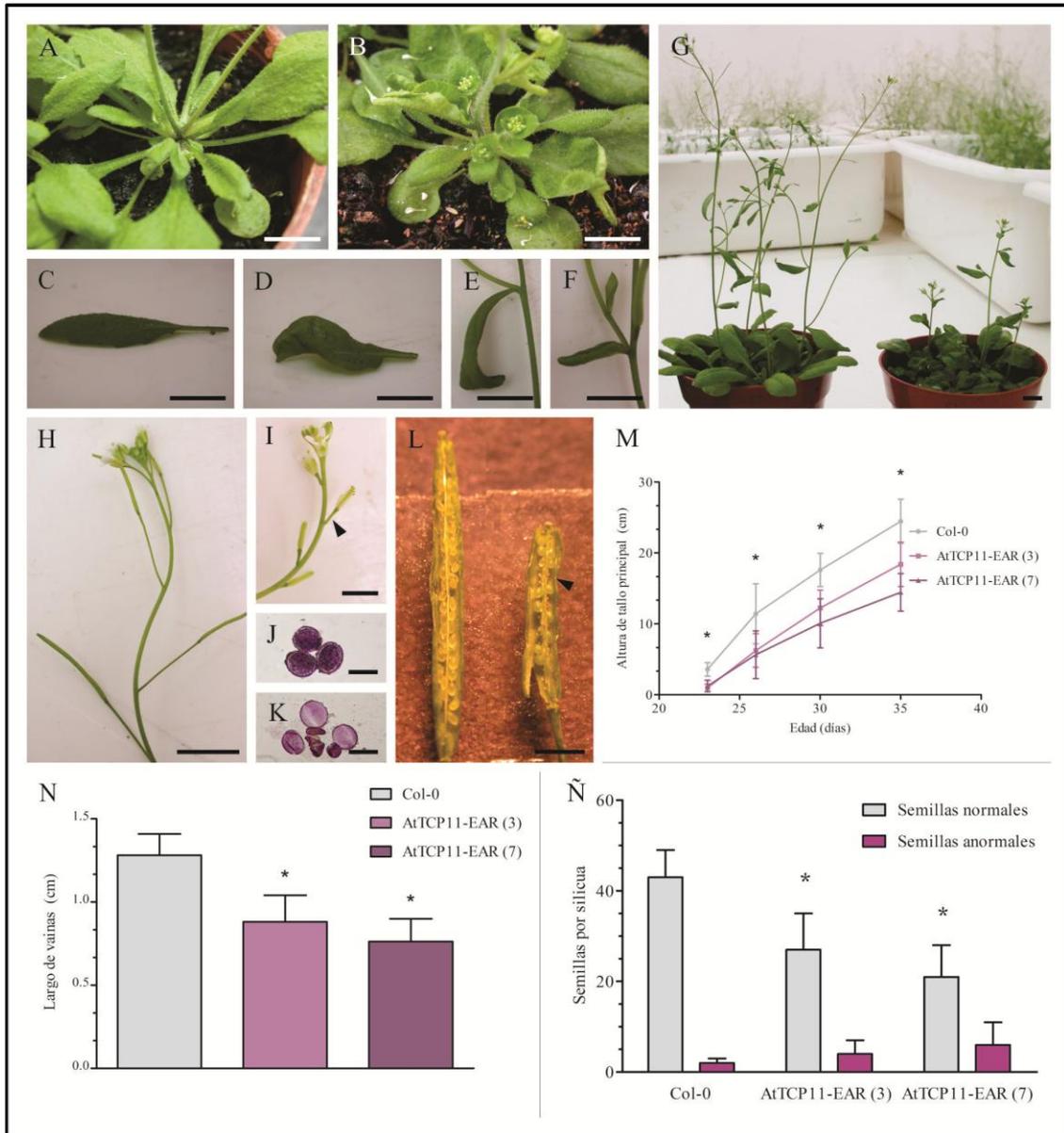


Figura 7.3: Fenotipo de plantas AtTCP11-EAR. (A-D) Fenotipo de hojas de roseta de plantas salvajes (A, C) y AtTCP11-EAR (B, D). Nótese el ondulamiento en los márgenes de las hojas de plantas AtTCP11-EAR, especialmente en la región distal de la lámina. Obsérvese el desarrollo de inflorescencias axilares en (B), ausentes en (A). (E, F) Hojas caulinares salvajes y AtTCP11-EAR, respectivamente. (G) Elongación del tallo principal en plantas salvajes (izq.) y AtTCP11-EAR (der.). (H, I) Inflorescencias de plantas adultas, salvajes y AtTCP11-EAR respectivamente. Nótese el acortamiento de los internodos y de los pedúnculos que sostienen las flores en (I), marcados con una punta de flecha. (J, K) Granos de polen tratados con Tinción de Alexander (ver Materiales y Métodos), extraídos de plantas salvajes (J) y AtTCP11-EAR (K), donde se observa la presencia de granos de polen con morfología anormal en (K). (L) Vainas maduras de plantas salvajes (izq.) y AtTCP11-EAR (der.). La punta de flecha indica los espacios vacíos donde se encuentran óvulos no fecundados o semillas abortadas. (M-Ñ) Cuantificación de la longitud del tallo principal (M), la longitud de las vainas (N) y el número de semillas normales y anormales (Ñ) de plantas salvajes (Col-0) y de dos líneas independientes de plantas AtTCP11-EAR. Barras de tamaño: (A-I) 1 cm, (J-K) 25 μ m, (L) 2,5 mm.

los tallos secundarios (Fig. 7.3 B, G). Los pedúnculos florales también se observan acortados (Fig. 7.3 H, I), lo cual le da a la inflorescencia una apariencia más compacta. La morfología de las flores no se ve alterada, pero las silicuas son considerablemente más cortas que las de las plantas salvajes. Este acortamiento podría ser consecuencia de la presencia de óvulos no fecundados y/o semillas abortadas (Fig. 7.3 L, N), ubicados al azar a lo largo del septum. En concordancia con esto, el número de semillas producidas es significativamente menor (Fig. 7.3 Ñ). En un intento por determinar el origen de esta anomalía, estudiamos los granos de polen de las plantas AtTCP11-EAR. Las anteras presentan un menor número de granos de polen y una alta proporción de granos con morfología anormal (Fig. 7.3 J, K). Es posible entonces que la deficiencia en la fecundación se deba al menor número de granos de polen o a la fecundación con granos anormales, incapaces de generar semillas viables.

En resumen, la expresión ectópica de la forma represora de AtTCP11 afecta principalmente el desarrollo de tallos secundarios, hojas, pecíolos y pedúnculos, sugiriendo que AtTCP11 participa en la regulación del desarrollo de órganos secundarios. Además, AtTCP11 parece tener un rol importante en el desarrollo de los granos de polen.

Dado que las alteraciones morfológicas son coherentes con el patrón de expresión observado en las plantas reporteras p11::GUS, decidimos expresar AtTCP11-EAR bajo el control de su propio promotor (p11::AtTCP11-EAR, Fig. 7.1 D). Las plantas que expresan dicha construcción muestran una versión más leve de los fenotipos anteriormente descritos para las plantas 35S::AtTCP11-EAR, confirmando la función de AtTCP11 en los órganos mencionados.

Por otro lado, la expresión ectópica de la forma nativa de AtTCP11 (35S::AtTCP11, Fig. 7.1 B) no genera diferencias morfológicas observables respecto de las plantas salvajes, sugiriendo que la funcionalidad de AtTCP11 podría requerir la actuación de un factor o factores adicionales, que podrían ser limitantes. Esto no sería extraño, ya que se ha demostrado que AtTCP11 es capaz de unirse al ADN en forma de homo o heterodímeros con otras proteínas TCP de clase I, siendo la eficiencia de dichas uniones mayor en el caso de los heterodímeros (Viola y col., 2011). Los factores que

interaccionan con AtTCP11 *in vivo*, así como los genes blancos de este factor de transcripción, aún deben ser determinados.

7.5 Estructura del gen AtTCP16

El gen que codifica AtTCP16 está ubicado en el cromosoma 3 de *A. thaliana* y está formado por una secuencia codificante carente de intrones de 498 pb, cuyos extremos 5' y 3' no codificantes no se encuentran aún determinados (Fig. 7.4 A).

Así como los extremos no codificantes, la región promotora de *AtTCP16* no está delimitada. Sin embargo, la región intergénica ubicada corriente arriba del sitio de inicio de la traducción consta de 1826 pb, y tal fragmento fue considerado como región promotora en estudios posteriores (Fig. 7.4 A).

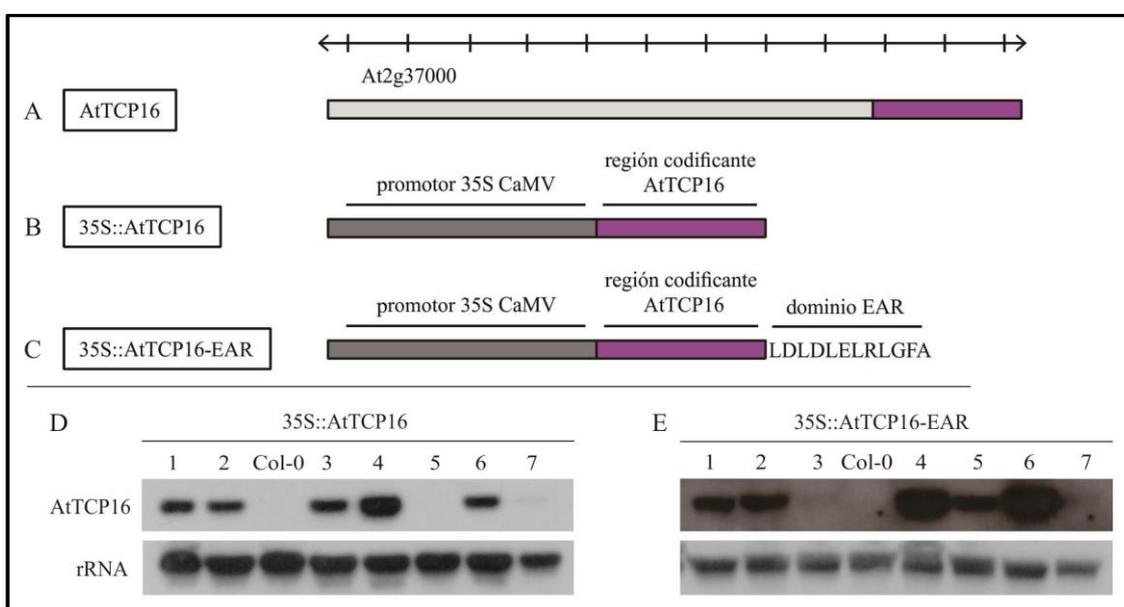


Figura 7.4: Esquema de AtTCP16 y construcciones realizadas. (A) Esquema de AtTCP16, incluyendo la región promotora (caja gris claro) y la región codificante (caja violeta oscuro). (B, C) Construcciones realizadas en el vector binario pBII21. El dominio EAR se muestra en forma de sus residuos aminoacídicos para mayor claridad. Las divisiones de la regla en la región superior de la imagen corresponden a 200 pb y las cajas mantienen las proporciones de acuerdo al tamaño de cada uno de los fragmentos. (D, E) Ensayos de Northern blot a partir de los cuales se determinaron los niveles de expresión de AtTCP16 en plantas salvajes (Col-0) y 35S::AtTCP16 (D) o 35S::AtTCP16-EAR (E).

7.6 Patrón de expresión de AtTCP16

En un intento por determinar el patrón de expresión conferido por la región promotora de *AtTCP16*, se amplificó con los oligonucleótidos p16 F y R (Anexo I,

Materiales y Métodos) la región intergénica antes mencionada y se clonó en el vector pBI101.3. Las plantas transformadas con esta construcción se analizaron mediante PCR sobre ADN genómico para confirmar la presencia de la inserción deseada. A pesar de obtener plantas que contenían la construcción, no pudimos encontrar ninguna que expresara el gen *gus* en ningún tejido, órgano o estadio de crecimiento ensayado. Un segundo intento fue realizado amplificando una región más pequeña del promotor, con los oligonucleótidos p16 F2 y R2 (Anexo I, Materiales y Métodos), y siguiendo el mismo procedimiento de clonado, transformación y análisis de las plantas. Sin embargo, este segundo intento también fue infructuoso.

En 2006, Takeda y colaboradores publicaron un trabajo en el que observaban expresión de *AtTCP16* en granos de polen en estadios tempranos del desarrollo, específicamente desde la formación de las tétradas hasta el estadio unicelular. Posiblemente, las diferencias entre sus resultados y los nuestros se deban a que los autores clonaron un fragmento de promotor levemente mayor, el cual incluye una pequeña porción del extremo 3' no codificante del gen que se encuentra corriente arriba de *AtTCP16*.

Dado que no existen predicciones del patrón de expresión de *AtTCP16* en las bases de datos disponibles, y a fin de evaluar si el gen se expresa y en qué órganos lo hace, medimos los niveles de transcripto por PCR en tiempo real (RT-qPCR). Como se observa en la Figura 7.5 A, *AtTCP16* se expresa mayormente en flores y cotiledones, y en menor medida en hojas jóvenes y adultas. Las medidas están relativizadas al órgano con menor expresión, en este caso hojas de plántulas de 15 días.

7.7 Estudio de mutantes insercionales

Las mutantes estudiadas pertenecen a la línea GK-655C10, de ahora en más denominada *tcp16*. En estas mutantes, el T-DNA se encuentra dentro de la región codificante del gen *AtTCP16*, a 230pb del sitio de inicio de la traducción. Mediante PCR sobre ADN genómico se buscaron plantas homocigotas para la inserción, y a través de ensayos de RT-qPCR determinamos que los niveles relativos de transcripto de *AtTCP16* en estas mutantes son del 20% respecto de los encontrados en las plantas salvajes. Debido a que la inserción interrumpe el marco de lectura del gen, es probable

que los niveles de expresión detectados se deban a transcripciones parciales o a fragmentos truncos del ARN mensajero, incapaces de generar una proteína funcional. Para corroborar esta hipótesis, realizamos RT-PCR semi-cuantitativa con los oligonucleótidos que permiten la amplificación de la región codificante completa de *AtTCP16*. En las muestras correspondientes a las plantas salvajes observamos la amplificación de un fragmento de aproximadamente 500 pb, mientras que en las mutantes no hubo amplificación, reforzando el concepto de que *tcp16* es una mutante nula o de pérdida de función.

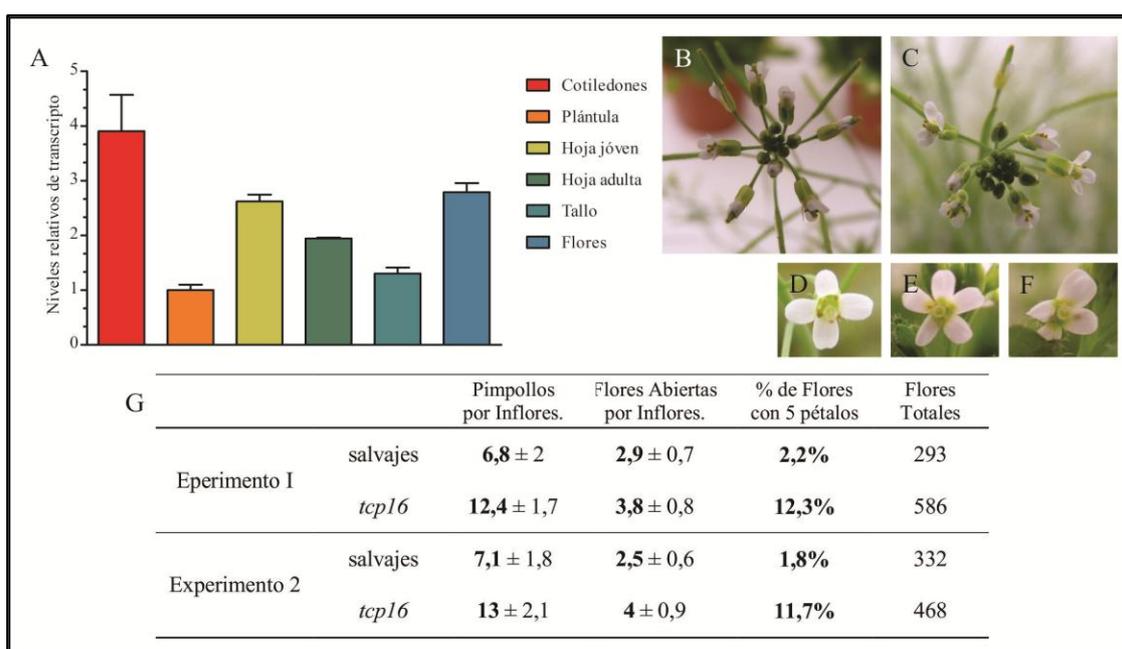


Figura 7.5: Expresión de *AtTCP16* en *A. thaliana* y estudio de la mutante *tcp16*. (A) Niveles de expresión relativos de *AtTCP16* medidos en diferentes estadios de desarrollo y órganos de *Arabidopsis*. (B, C) Inflorescencia de plantas salvajes (B) y mutantes *tcp16* (C), donde se observa el mayor número de pimpollos encontrados en las plantas mutantes. (D-F) Flores salvaje (D) y mutantes (E, F), donde se muestran las flores con 5 pétalos presentes en las plantas *tcp16*, así como la asimetría que desarrollan las mismas. (G) Cuantificación del número de pimpollos por inflorescencia (promedio y desviación estándar), número de flores abiertas por inflorescencia (promedio y desviación estándar), porcentaje de flores con 5 pétalos (respecto del total de flores abiertas) y el número total de flores analizadas para cada una de las líneas.

El análisis fenotípico de las mutantes *tcp16* no reveló diferencias morfológicas con plantas salvajes en estadio vegetativo. Sin embargo, una vez alcanzado el estadio reproductivo, observamos una leve alteración a nivel del desarrollo de pétalos (Fig.7.5

B-G). Alrededor del 12% de las flores producidas por las mutantes presentan 5 pétalos, en lugar de los 4 que forman las flores normales, mientras que en las plantas salvajes, este tipo de anomalía fue observado sólo en alrededor del 2% de las flores (Fig.7.5 G). Generalmente, el desarrollo del quinto pétalo genera una redistribución asimétrica de estos órganos, como puede verse en la Figura 7.5 C-F. Además, observamos un aumento en el número de flores, tanto en la inflorescencia principal (Fig. 7.5B-C) como en las secundarias, sobre todo a nivel de flores no abiertas o pimpollos. En las mutantes *tcp16*, el número promedio de pimpollos fue de alrededor de 13, mientras que en las plantas salvajes el promedio fue de 7 pimpollos por inflorescencia. Otra característica sutilmente afectada fue el número de ramificaciones que presenta el tallo principal: las plantas *tcp16* desarrollaron generalmente cuatro ramificaciones, mientras que las plantas salvajes desarrollaron tres ramificaciones en condiciones normales de crecimiento. Sin embargo, en contraposición con lo reportado por Takeda y col. (2006), no encontramos alteraciones morfológicas o de viabilidad en los granos de polen de las mutantes *tcp16*.

7.8 La expresión ectópica de la forma represora dominante de *AtTCP16* provoca un gran número de alteraciones morfológicas

En base a la experiencia obtenida con *AtTCP11*, decidimos continuar el estudio funcional de *AtTCP16* generando construcciones que expresaran ectópicamente las formas nativa (35S::*AtTCP16*) y represora (35S::*AtTCP16*-EAR) de *AtTCP16* (Fig. 7.4 B, C). Para la amplificación de la región codificante de *AtTCP16* se utilizaron los oligonucleótidos TCP16-EAR F y TCP16 R (versión nativa), o TCP16-EAR F y R (versión represora) (Anexo I, Materiales y Métodos). La estrategia de clonado y el proceso de transformación y selección de plantas fueron iguales a los mencionados anteriormente para *AtTCP11*. Los niveles de expresión de *AtTCP16* en las líneas obtenidas, medidos mediante *Northern blot*, se muestran en la Figura 7.4 D, E. Dos líneas independientes, con elevados niveles de expresión para cada una de las construcciones, se eligieron para posteriores estudios.

Al igual que lo ocurrido con *AtTCP11*, las plantas que expresan la forma nativa de *AtTCP16* no presentan cambios fenotípicos que las diferencien de las plantas

salvajes. Por otra parte, aquellas que expresan AtTCP16-EAR (denominadas de esta manera de ahora en adelante) muestran una gran variedad de alteraciones.

Desde los primeros estadios de desarrollo las plantas AtTCP16-EAR se diferencian claramente de las plántulas salvajes, ya que tienen cotiledones redondeados, con pecíolos más cortos. En las líneas con elevados niveles de expresión, los cotiledones desarrollan lóbulos en la región basal (Fig. 7.6 A-C) y crecimientos ectópicos en la cara adaxial. A medida que las plantas se desarrollan, los crecimientos sobre los cotiledones también lo hacen, dando lugar a la formación de hojas similares a las de la roseta, pero significativamente más pequeñas que las que se desarrollan a partir del meristema apical (Fig. 7.6 F). Sorprendentemente, pueden formarse entre 4 y 16 hojas a partir de los crecimientos en los cotiledones, y en los casos más extremos incluso se desarrollan inflorescencias con flores fértiles. Esto sugiere que estas estructuras ectópicas tienen características similares a las del meristema apical.

Las hojas de roseta y caulinares de las plantas AtTCP16-EAR son más redondeadas y poseen pecíolos acortados (Fig. 7.6 D, E, G, H). Utilizando el programa LAMINA (Bylesjöy col., 2008) realizamos medidas de superficie y circularidad de las hojas, las que indicaron que, si bien las diferencias en el área foliar no son significativas, la circularidad de las hojas de las plantas que expresan la fusión es del $89,7 \pm 2,1\%$, en tanto que la circularidad de las hojas salvajes es del $68,5 \pm 2,4\%$.

No sólo los tejidos vegetativos presentan diferencias en relación con las plantas salvajes, sino que también las inflorescencias y las flores están modificadas. Las flores están sostenidas por pedúnculos y entrenudos acortados, generando inflorescencias de apariencia más compacta que las de plantas salvajes (Fig. 7.6 I-K). En las flores, las mayores diferencias se observan en los primeros estadios de desarrollo, previos a la antesis o apertura de la flor. En tales estadios, los órganos de los verticilos externos (sépalos y pétalos) se ven acortados (Fig. 7.6 J), lo cual expone el gineceo, mientras que en las flores salvajes los carpelos se encuentran siempre cubiertos por los sépalos hasta el momento de la antesis (Fig. 7.6 I). Al momento de la antesis, esta diferencia se vuelve más sutil ya que los pétalos se elongan, aunque los sépalos siguen siendo más cortos, y las flores toman una apariencia prácticamente normal (Fig. 7.6K).

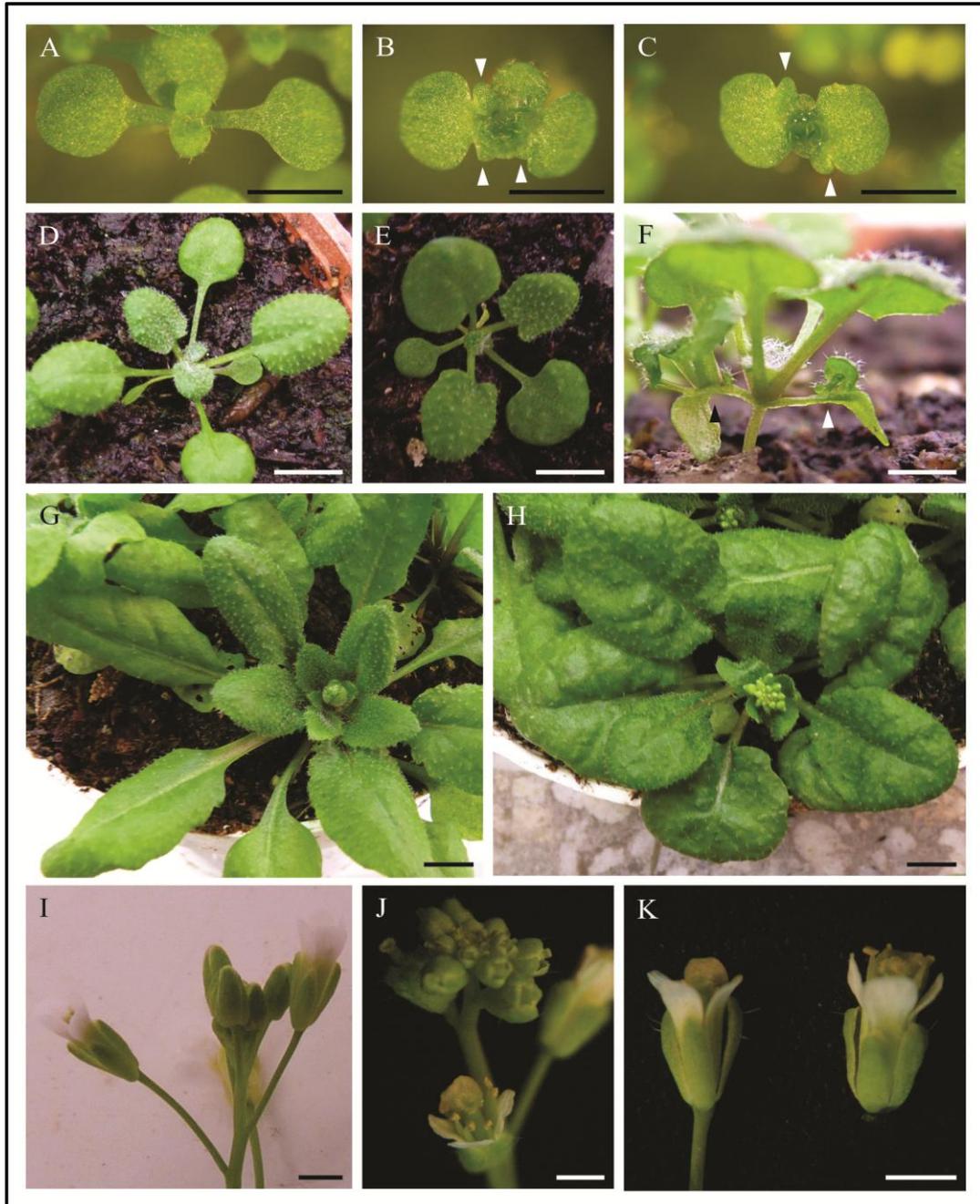


Figura 7.6: Fenotipo de plantas *AtTCP16-EAR*. (A-C) Plántulas de 15 días, salvajes (A) y *AtTCP16-EAR* (B, C). Las puntas de flecha marcan el desarrollo de lóbulos en la región basal de los cotiledones de las plantas *AtTCP16-EAR*. (D-F) Plantas de 20 días, salvaje (D) y *AtTCP16-EAR* (E, F). Nótese en (E) la redondez de las hojas, y en (F) el desarrollo de hojas en la cara adaxial de ambos cotiledones, marcadas por las puntas de flecha. (G, H) Plantas de 35 días, salvaje (G) y *AtTCP16-EAR* (H), donde se observa la marcada diferencia en la morfología de las hojas. (I, J) Extremo distal de inflorescencias salvajes (I) y *AtTCP16-EAR* (J). Obsérvense los pimpollos abiertos en la inflorescencia en (J). (K) Flor salvaje (izq.) y *AtTCP16-EAR* (der.), donde se puede ver que el acortamiento de los sépalos observado desde los primeros estadios de desarrollo (J) se mantiene en las flores *AtTCP16-EAR* luego de la antesis. Barras de tamaño: (A-H) 0,5 cm, (I-K) 0,1 cm.

7.9 Los cotiledones de plantas *AtTCP16-EAR* desarrollan meristemas ectópicos

En un intento por estudiar los procesos que dan lugar a la formación de una nueva planta sobre la región adaxial de los cotiledones, realizamos cruza de las plantas *AtTCP16-EAR* con plantas reporteras de la expresión de diversos genes específicos de meristema. Para ello, utilizamos fusiones a *gus* de dos genes de la familia KNOX, *STM* (*SHOOTMERISTEMLESS*) y *KNAT1/BP* (*BREVIPEDICELLUS*), así como de *CUC1* y *CLV3* (*CLAVATA3*). Los ensayos de tinción histoquímica muestran que la expresión de estos genes se activa en una región determinada de los cotiledones, restringida a un pequeño cúmulo de células ubicadas generalmente en un punto de bifurcación de los haces vasculares en la región basal de los mismos (Fig. 7.7). Estos resultados nos permiten inferir que la expresión de *AtTCP16-EAR* promueve la formación de meristemas ectópicos (ME) sobre la cara adaxial de los cotiledones. Dichos meristemas parecen retener todas las funciones de un SAM clásico, ya que son capaces de originar todos los órganos aéreos presentes en las plantas normales.

A fin de obtener mayores detalles sobre el desarrollo de los ME, realizamos cortes histológicos de los cotiledones. Como puede verse en la Figura 7.8 A, B, los ME se desarrollan sobre el haz vascular principal, a la altura del segundo nodo (Fig. 7.7 D-E), el cual está directamente conectado a los haces vasculares del hipocotilo. Del mismo modo, puede verse cómo los primordios de hojas surgen con una filotaxia aparentemente normal (Fig. 7.8 B). Un detalle más claro del desarrollo de las hojas a partir de los ME se observa en la Figura 7.8 D-F, donde se muestra que las mismas surgen al final de un surco generado en la cara adaxial de los cotiledones, el cual no se observa en los cotiledones salvajes (Fig. 7.8 C). Las hojas presentan morfología normal, con tricomas en la cara adaxial desde los primeros estadios de desarrollo (Fig. 7.8 D-F).

Cabe aclarar que la aparición de ME está restringida a los cotiledones y, más aún, a una región específica de los mismos. No hay estructuras ectópicas en hojas ni en flores, y tampoco se observa desdiferenciación celular en ningún otro órgano de las plantas *AtTCP16-EAR*. Casualmente, un fenotipo muy similar al observado en las plantas *AtTCP16-EAR* puede verse en el trabajo de Hibara y col. (2003), donde la expresión ectópica de *CUC1* produce cotiledones con lóbulos en los márgenes y

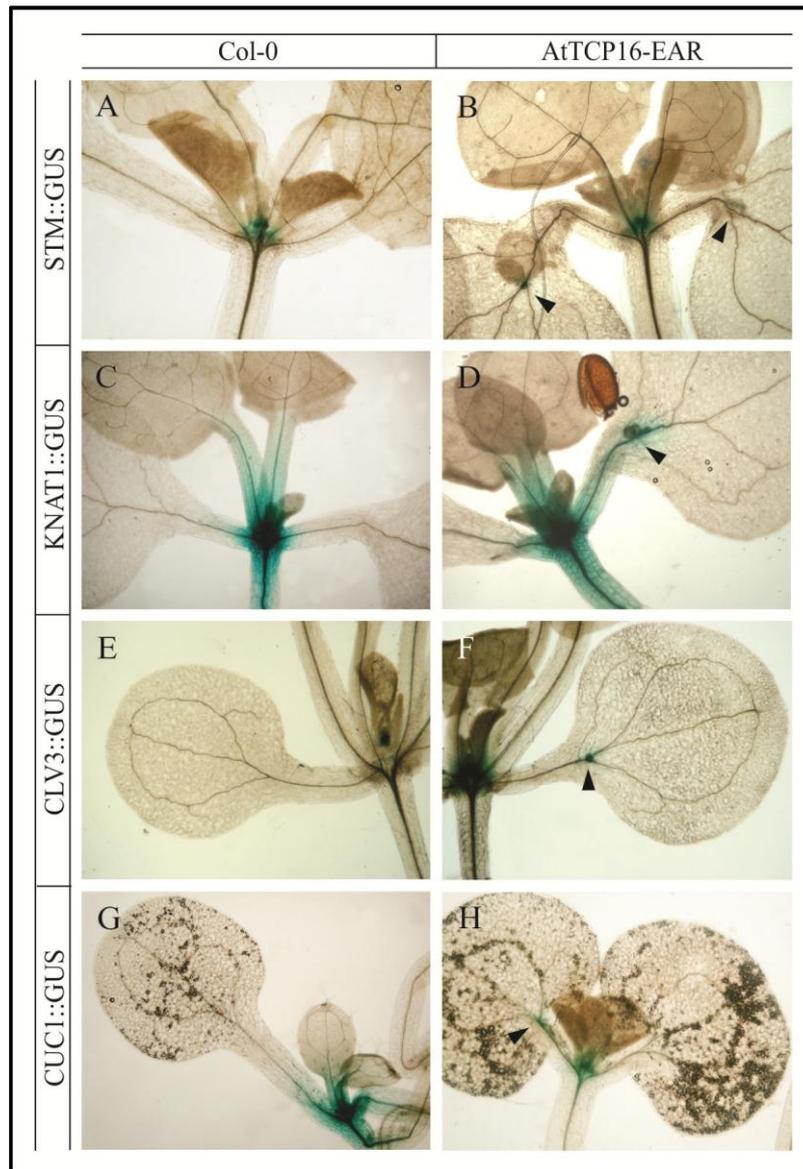


Figura 7.7: Cruzas de plantas *AtTCP16-EAR* con plantas reporteras de genes de meristema. (A, B) *STM::GUS*, (C, D) *KNAT1::GUS*, (E, F) *CLV3::GUS*, (G, H) *CUC1::GUS*. Nótese en todas las cruas la expresión puntual de los reporteros estudiados en los puntos donde se desarrollan los ME (puntas de flecha), indicando que el cúmulo de células que da lugar al desarrollo de hojas y flores en la cara adaxial de los cotiledones ha revertido su estado al de células meristemáticas.

desarrollo de ME. Estos autores demostraron que la expresión ectópica de *CUC1* promueve la expresión de los genes meristemáticos *STM*, *KNAT1* y *CLV3*, pero a diferencia de lo que ocurre en nuestras plantas, la expresión no está restringida a un punto específico del cotiledón sino que se expande desde el SAM hacia la zona distal del mismo. Sin embargo, los autores no pudieron explicar la aparición de los ME y los

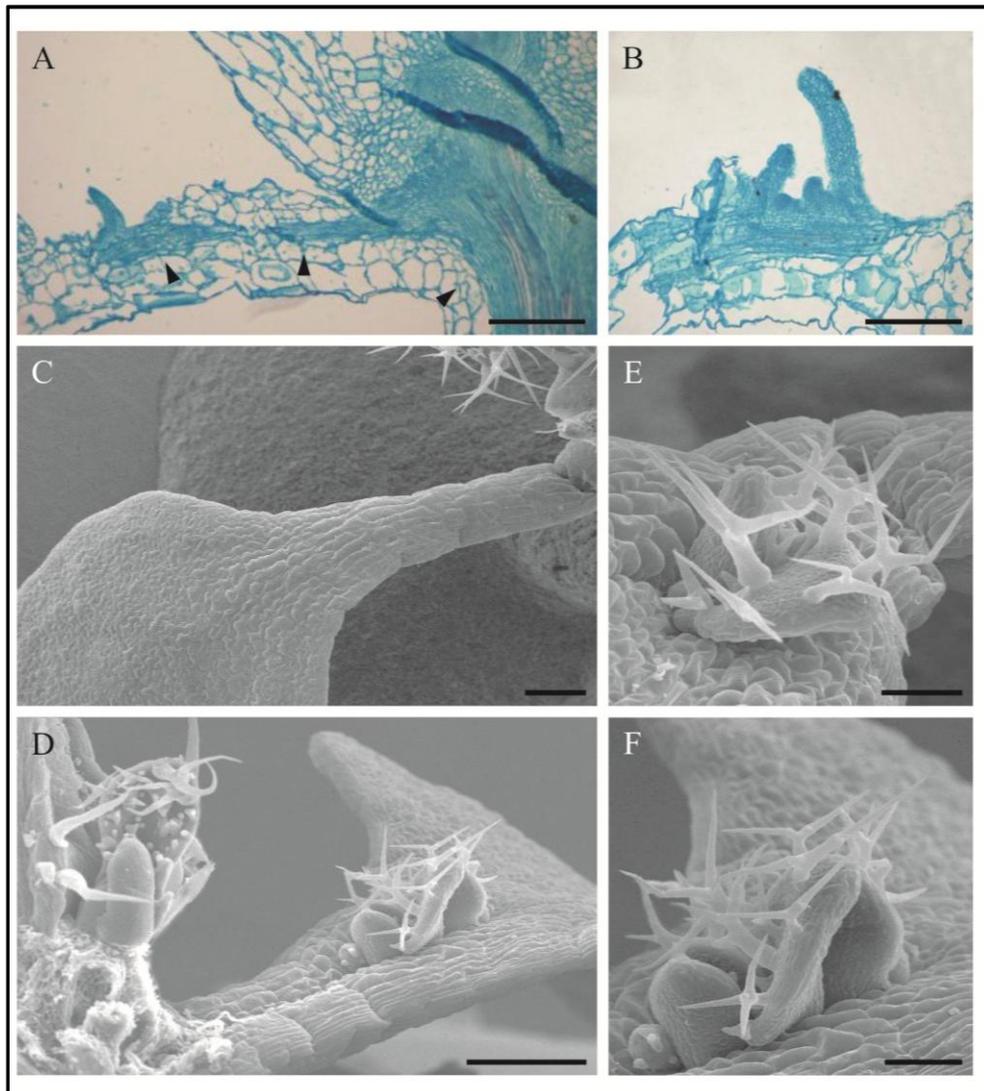


Figura 7.8: Análisis microscópico de la formación de los meristemas ectópicos. (A, B) Cortes histológicas transversales de cotiledones con ME. Nótese en (A) la ubicación del ME sobre el haz vascular, y la conexión del mismo con el haz principal del hipocotilo (punta de flecha). El orden de aparición de los primordios de hojas en (B) es similar al encontrado en el SAM de plantas salvajes. (C-F) Microfotografías electrónicas de cotiledones salvajes (C) y de plantas AtTCP16-EAR (D-F). Obsérvese en (D) la formación de un surco sobre la cara adaxial del pecíolo del cotiledón, al final del cual se desarrolla el ME. (E, F) Detalle de las hojas surgidas de los ME. Barras de tamaño: (A, B, E, F) 100 μm , (C, D) 300 μm .

lóbulo de los cotiledones únicamente en base a la expresión ectópica de los genes de meristema, dado que éstos continúan formándose en las cruces de plantas 35S::CUC1 con mutantes en *STM* o *KNAT1*.

Debido a que la formación de ME en los cotiledones de plantas AtTCP16-EAR está acompañada de la inducción de la expresión de genes de meristema, decidimos transformar con esta construcción plantas de la línea mutante *bum-1.3*, un alelo mutante débil en *STM*. La comparación de los fenotipos en la primera filial de plantas salvajes y *bum-1.3* transformadas en paralelo con AtTCP16-EAR demostró que en las mutantes el número de plantas con ME era de alrededor del 10%, significativamente menor comparado con el 30% desarrollado en las plantas salvajes. Por otra parte, las plantas mutantes pueden generar ME tanto en uno como en los dos cotiledones, mientras que en

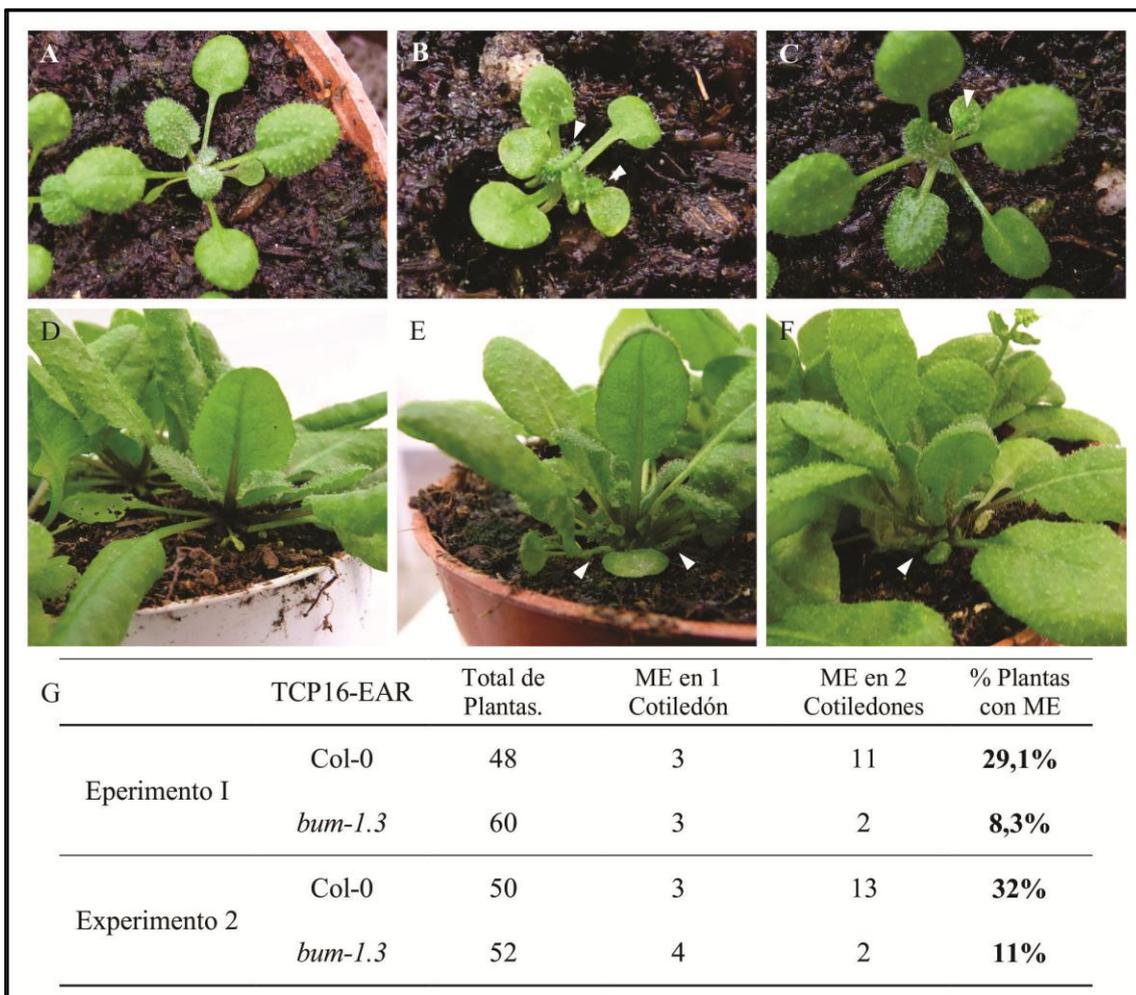


Figura7 9: Desarrollo de meristemas ectópicos en mutantes *bum-1.3*. (A-C) Plantas de 20 días, donde las puntas de flecha indican el desarrollo de ME en los dos cotiledones en las plantas AtTCP16-EAR (B), y en uno solo de ellos en las cruas con las mutantes *bum-1.3* (C). Nótese la ausencia de los mismos en los cotiledones de las plantas salvajes (A). (D-F) Plantas de 35 días, salvajes (D), AtTCP16-EAR (E) y cruas de estas últimas con *bum-1.3* (F), donde las puntas de flecha marcan el crecimiento de las hojas derivadas de los meristemas ectópicos. Obsérvese que las mismas son significativamente más pequeñas en (F) que en (E). (G) Cuantificación del número de meristemas ectópicos desarrollados en las plantas salvajes o *bum-1.3* transformadas con una construcción que expresa AtTCP16-EAR.

las plantas salvajes el desarrollo de los ME observa mayormente en los dos cotiledones (Fig. 7.9 A-C, G). Sumado a esto, el grado de desarrollo de los ME en las mutantes fue menor. Aunque el número de hojas producido fue similar, las hojas de los ME de las mutantes mostraron una menor elongación del pecíolo y la lámina (Fig. 7.9 D-F).

Estos resultados sugieren que la actividad de STM es requerida, al menos parcialmente, para la formación de los ME inducida por AtTCP16-EAR. Sin embargo, estudios más amplios serán necesarios para determinar la relación que existe entre los genes de meristema y AtTCP16. Futuros cruzamientos de las plantas AtTCP16-EAR con alelos mutantes de *KNAT1*, *CUC1/CUC2* o *CLV3* permitirán reconocer la incidencia de la actividad de estos genes en el fenotipo de las plantas AtTCP16-EAR. Asimismo, sería interesante estudiar la relación entre la formación de los ME y los niveles de expresión de las proteínas AS1 y AS2, cuya función como promotoras de diferenciación celular e inhibidoras de genes meristemáticos es ampliamente conocida (Byrne y col., 2000; Ori y col., 2000; Guo y col., 2008).

CAPITULO II: ESTUDIOS FUNCIONALES DE LA PROTEÍNA AtTCP15

8.1 Estructura del gen *AtTCP15*

El gen que codifica a *AtTCP15* está ubicado en el cromosoma 1 de *A. thaliana*, y está formado por una secuencia codificante carente de intrones de 978 pb, flanqueada por extremos 5' y 3' no codificantes de 225 y 445 pb respectivamente.

Dado que no se ha delimitado la región promotora de *AtTCP15*, decidimos utilizar para los posteriores estudios de expresión una secuencia arbitraria ubicada entre -1 y -1514 pb a partir del sitio de inicio de la traducción. El modelo del gen y la región promotora utilizada se muestran en la Figura 8.1 A.

8.2 Estudio de la mutante *tcp15*

El primer paso para el estudio de la función de *AtTCP15* fue el análisis de la mutante insercional SALK_011491 (de ahora en adelante llamada *tcp15*). En estas plantas, la inserción del T-DNA cae dentro de la región codificante de *AtTCP15* e interrumpe completamente el marco de lectura, lo cual resultaría en una mutante de pérdida de función. La presencia de la inserción se corroboró mediante PCR sobre ADN genómico, y la presencia del transcripto se determinó a través de RT-qPCR. Aunque contienen la inserción, las mutantes *tcp15* tienen niveles de transcripto de alrededor de un 10-15% con respecto a las plantas salvajes (Fig. 8.1 E). Debido a que la inserción del transposón interrumpe el marco de lectura del gen, es probable que los niveles de expresión detectados se deban a transcripciones parciales o a fragmentos truncos del ARN mensajero, incapaces de generar una proteína funcional. Para corroborar esta hipótesis, realizamos RT-PCR semi-cuantitativa con los oligonucleótidos que permiten la amplificación de la región codificante completa de *AtTCP15*. En las muestras correspondientes a las plantas salvajes observamos la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1000 pb, mientras que en las mutantes no hubo amplificación, reforzando el concepto de que *tcp15* es una mutante nula o de pérdida de función.

A pesar de ser una mutante nula, *tcp15* no presenta diferencias morfológicas respecto de las plantas salvajes en condiciones normales de crecimiento. Este resultado no es extraño ya que, debido al alto número de proteínas que componen la familia, se cree que existe una elevada redundancia funcional entre los diferentes miembros de la

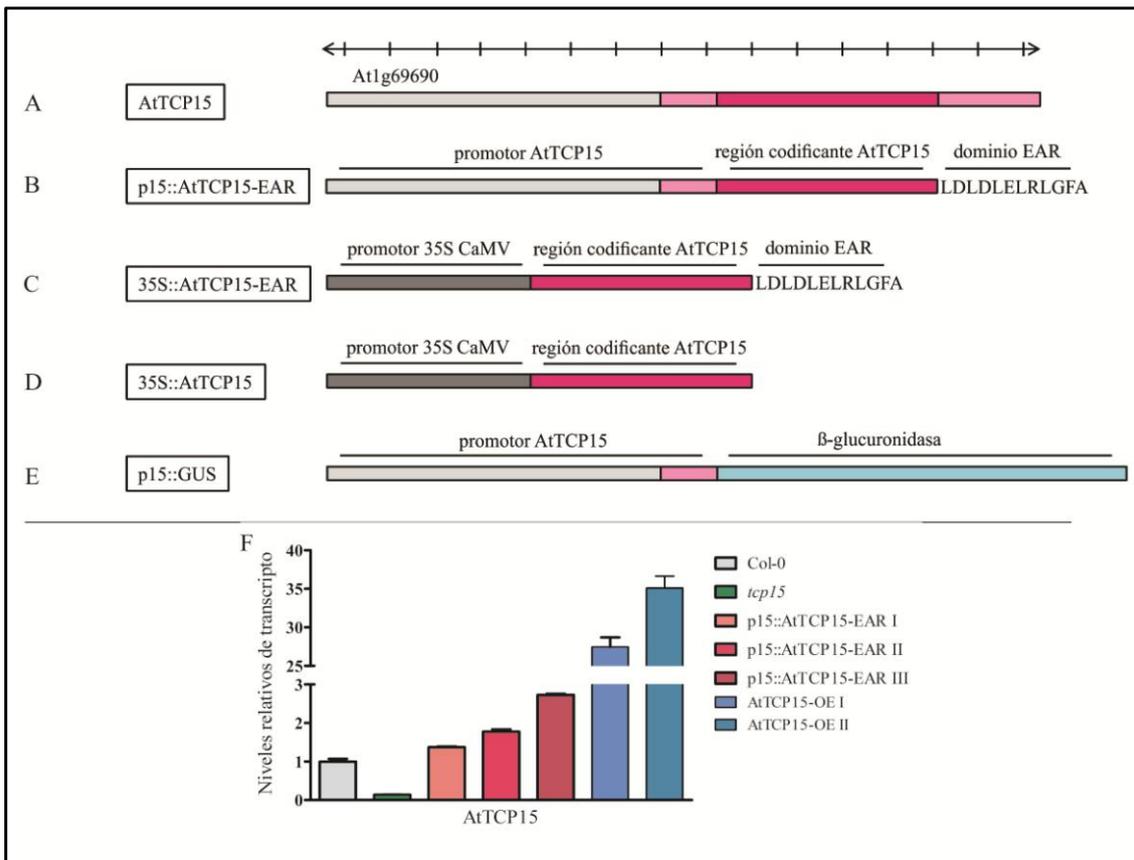


Figura 8.1: El gen *AtTCP15* y construcciones realizadas. (A) Esquema de *AtTCP15*, incluyendo la región promotora utilizada (caja gris claro), la región codificante (caja rosa oscuro) y los extremos 5' y 3' no codificantes (cajas rosa claro). (B-E) Construcciones realizadas en el vector binario pBI121. El dominio EAR se muestra en forma de sus residuos aminoacídicos para mayor claridad. Las divisiones de la regla en la regla superior de la imagen corresponden a 200 pb, y las cajas mantienen las proporciones de acuerdo al tamaño de cada uno de los fragmentos. (F) Niveles de expresión relativos de *AtTCP15* en las diferentes líneas de plantas estudiadas.

misma. El hecho de no poder obtener información sobre la función de *AtTCP15* a través del estudio de líneas mutantes, y dada la experiencia previa obtenida con *AtTCP11* y *AtTCP16*, planteamos estrategias alternativas para la expresión en plantas de formas dominantes de *AtTCP15*.

8.3 La expresión constitutiva de una variante represora de *AtTCP15* es letal para *Arabidopsis thaliana*

El dominio represor dominante EAR es ampliamente utilizado en el estudio de factores de transcripción con elevada redundancia funcional (Hiratsu y col., 2003) y su eficiencia ha sido comprobada también con proteínas TCP (Koyama y col., 2007, 2010,

2011; Hervé y col., 2009; Kieffer y col., 2011; Li y col., 2012). Por lo tanto, la primera estrategia diseñada consistió en expresar la fusión AtTCP15-EAR bajo el control del promotor 35SCaMV en plantas de *A. thaliana*. Para esto, se amplificó la región codificante de *AtTCP15* con los oligonucleótidos TCP15-EAR F y R (Anexo I, Materiales y Métodos), ésta se fusionó al dominio EAR a través de una ligación seguida de amplificación y se clonó el fragmento resultante en el vector binario pBI121 (Fig. 8.1 D). Una vez transformadas las plantas con esta construcción, procedimos a su análisis.

Durante la selección de transformantes con kanamicina, luego de 15 días de crecimiento en placa, pudimos observar dos tipos de plántulas resistentes: un grupo que se desarrollaba correctamente, con fenotipo similar al de las plantas salvajes, y un segundo grupo en el que las plántulas mostraban una detención temprana del desarrollo, con cotiledones no expandidos, e incapaces de generar hojas verdaderas. Mediante ensayos de *Northern blot*, pudimos determinar que sólo las plántulas del segundo grupo mostraban niveles aumentados del transcripto de *AtTCP15* respecto de las plantas salvajes (Fig. 8.2 A). En un intento por estudiar en mayor detalle el fenotipo de las plantas 35S::AtTCP15-EAR, realizamos micrografías electrónicas de barrido. Como se observa en la Figura 8.2, estas plántulas muestran una marcada disminución en la expansión de los cotiledones y en el desarrollo del meristema apical del vástago (Fig. 8.2 B, C, D). En los casos más extremos, los cotiledones son fuertemente hiponásticos y el SAM está completamente ausente (Fig. 8.2 C, E). En base a estos resultados podemos decir que la sobreexpresión de la forma represora de *AtTCP15* es letal para las plántulas de *A. thaliana*, debido a que la misma inhibe la formación del SAM y el desarrollo de los órganos laterales.

Dado que la estrategia desarrollada demostró la funcionalidad de la proteína AtTCP15-EAR en *A. thaliana*, decidimos generar plantas que expresaran la fusión bajo el control del propio promotor de *AtTCP15* (p15::AtTCP15-EAR, Fig. 8.1 B). De esta manera, podríamos observar el efecto de la expresión de la forma represora en las regiones en las que habitualmente se expresa *AtTCP15*. Por lo tanto, como primera medida, decidimos analizar el patrón de expresión conferido por la región promotora de *AtTCP15* utilizada.

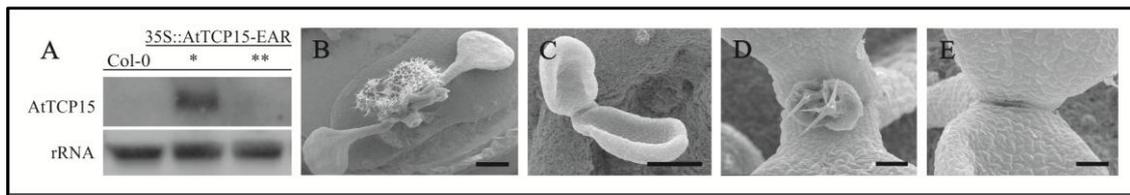


Figura 8.2: Niveles de expresión y fenotipo de plantas 35S::AtTCP15-EAR. (A) Northern blot donde se observan los niveles de expresión de AtTCP15 en plantas salvajes (Col-0) y transformadas con la construcción 35S::AtTCP15-EAR. (*) Simboliza a las muestras de ARN tomadas de plántulas con fenotipo alterado y (**) al ARN de plántulas con fenotipo salvaje. (B) Plántulas salvajes de 15 días con cotiledones expandidos y primer y segundo par de hojas en desarrollo. (C) Plántula 35S::AtTCP15-EAR de 15 días con cotiledones no expandidos y fuertemente hiponásticos. (D, E) Ampliación de la región del SAM donde se observa el desarrollo retrasado del primer par de hojas (D) o la ausencia total del meristema (E) en plántulas 35S::AtTCP15-EAR. Barras de tamaño: (B) 1000 μm , (C) 500 μm , (D-E) 100 μm .

8.4 Patrón de expresión de AtTCP15

Para analizar el patrón de expresión conferido por la región promotora de AtTCP15, se clonó el fragmento mencionado del promotor (Fig. 8.1 A) frente al gen de *gus* en el vector binario pBI101.3 (p15::GUS, Fig. 8.1 E). Una vez obtenidas las plantas transformadas, se estudiaron 20 líneas homocigotas independientes entre sí mediante análisis histoquímicos de la actividad GUS, y finalmente se eligieron dos líneas representativas para continuar con los ensayos.

Como puede verse en la Figura 8.3, encontramos expresión del gen reportero en todos los estadios de desarrollo de las plantas, desde embriones hasta flores y silicuas. En embriones, la expresión está restringida a los primordios de los cotiledones (Fig. 8.3 A), desapareciendo luego cuando la plántula emerge y los cotiledones están completamente expandidos. Además, se observa una fuerte expresión en el meristema apical del tallo y en los primordios de hojas (Fig. 8.3 B). La expresión en las hojas se va restringiendo a la región basal de la lámina y a los bordes del pecíolo a medida que éstas maduran, apagándose finalmente cuando las hojas están totalmente desarrolladas (Fig. 8.3 C, D). Una vez que las plantas pasan a estadio reproductivo, podemos observar tinción en los meristemas axilares de la inflorescencia, pedúnculos florales, filamentos de anteras y carpelos (Fig. 8.3 E, F). Tal como sucede en las hojas, la expresión es mayor en carpelos jóvenes y va disminuyendo con el desarrollo, quedando confinada en las silicuas a los extremos basal y distal (Fig. 8.3 E). En las silicuas maduras, la expresión del gen reportero se encuentra específicamente en el septum y los funículos

(Fig. 8.3 G). Cabe destacar que no observamos expresión en raíces, en ninguno de los estadios analizados.

El patrón de expresión observado es coherente con los niveles de transcripto de *AtTCP15* en distintos tejidos y estadios de desarrollo, deducidos a partir de resultados de microarreglos presentes en bases de datos públicas. Esto nos hace inferir que el fragmento de promotor utilizado contiene la mayor parte de las regiones necesarias para la correcta expresión del gen *AtTCP15*.

8.5 La expresión de p15::AtTCP15-EAR genera una gran variedad de alteraciones morfológicas

Las plantas que expresan *AtTCP15-EAR* bajo el control de su propio promotor presentan una amplia gama de alteraciones morfológicas, especialmente en los órganos donde se observa actividad del promotor en las plantas reporteras. De acuerdo con las diferencias en los niveles de expresión de *AtTCP15-EAR*, determinadas mediante RT-qPCR, pudimos observar fenotipos de diferente intensidad (Fig. 8.1 F), los cuales se separaron en tres clases para simplificar su estudio. La clase III (Fig. 8.4 A) está formada por aquellas plantas con fenotipo similar al observado para las plantas *35S::AtTCP15-EAR*, incapaces de desarrollarse más allá del estadio de plántula. En la clase II se agrupan las plantas de fenotipo intermedio, con cotiledones pequeños e hiponásticos, parcialmente expandidos (Fig. 8.4 A). A pesar de que pueden generar hojas verdaderas al mismo tiempo que las plantas salvajes, éstas son muy pequeñas y sufren una severa hiponastia. Alrededor del 60% de estas plantas no logran desarrollarse más allá de la cuarta semana de vida y generalmente no dejan descendencia.

La clase I reúne plantas con un fenotipo similar a las de clase II, aunque menos pronunciado. En las primeras semanas de vida, estas plantas expanden los cotiledones, aunque no completamente, y son más pequeñas que las plantas salvajes. Si bien el primer par de hojas presenta una morfología normal, a partir del segundo o tercer par los márgenes de las hojas comienzan a curvarse hacia arriba en la región basal (Fig. 8.4 C), y esta característica se acentúa en cada nueva hoja que emerge. A los 30 días de crecimiento, las hojas son más pequeñas que las salvajes y muestran una severa

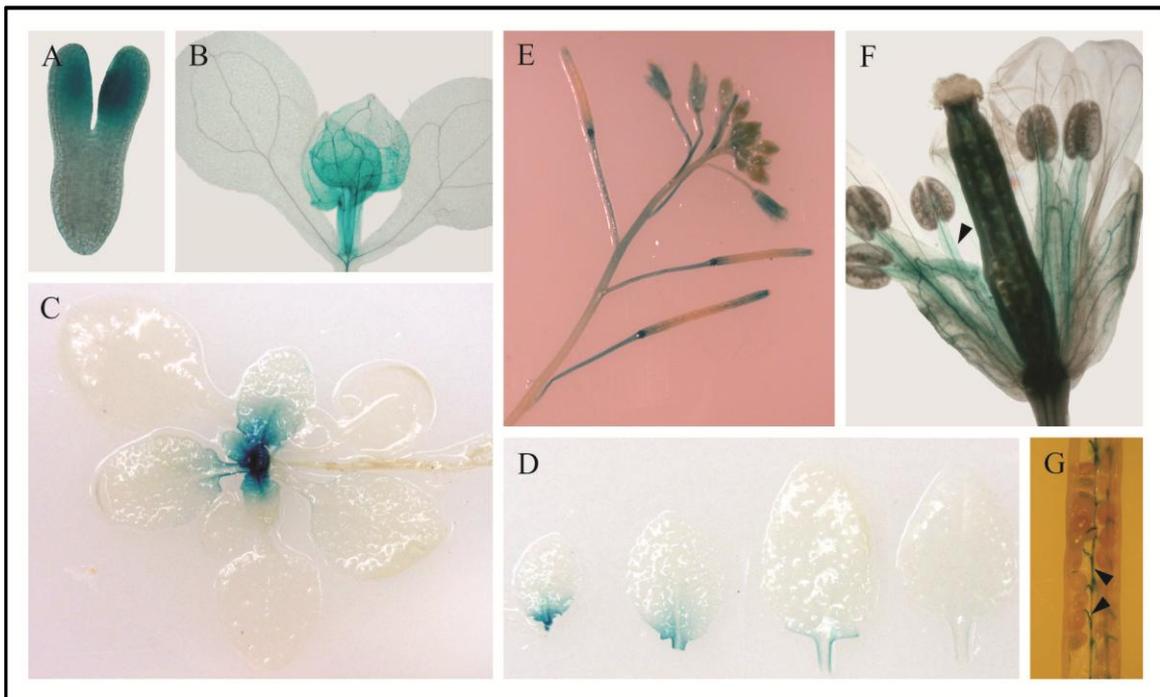


Figura 8.3: Patrón de expresión conferido por la región promotora de *AtTCP15*. (A) Embrión en estadio torpedo. (B) Plántula de 15 días. (C) Roseta de 25 días. (D) Detalle de hojas de roseta de 25 días. (E) Inflorescencia. (F) Flor madura. La punta de flecha indica la tinción en el filamento de las anteras. (G) Silicua madura. Las puntas de flechas muestran la expresión en el septum y los funículos.

hiponastia y el desarrollo de protuberancias en la cara abaxial (Fig. 8.4 D, E). Para estudiar este fenotipo en mayor detalle, realizamos cortes histológicos transversales de las láminas de las hojas (Fig. 8.4 F, G), donde observamos que todos los estratos celulares están alterados en las plantas que expresan la fusión. El espesor del parénquima en empalizada se ve severamente reducido y el parénquima esponjoso está altamente desorganizado y presenta gran cantidad de espacios vacíos (Fig. 8.4 F, G). Esto produce un incremento relativo en el área de la cara abaxial de la hoja, lo que podría ser la causa de la curvatura hacia arriba y de la formación de las protuberancias antes mencionadas. Las células de la epidermis adaxial y del parénquima en empalizada son considerablemente más pequeñas que en las plantas salvajes (Fig. 8.4 H, I, K, L, N), lo cual sugiere que *AtTCP15-EAR* es capaz de inhibir la expansión celular. Las células epidérmicas de la cara abaxial también tienen menor área que las salvajes, y en hojas con fenotipos muy severos pierden la forma característica de pieza de rompecabezas y sus bordes se vuelven más uniformes (Fig. 8.4 J, M, O), lo cual generalmente está

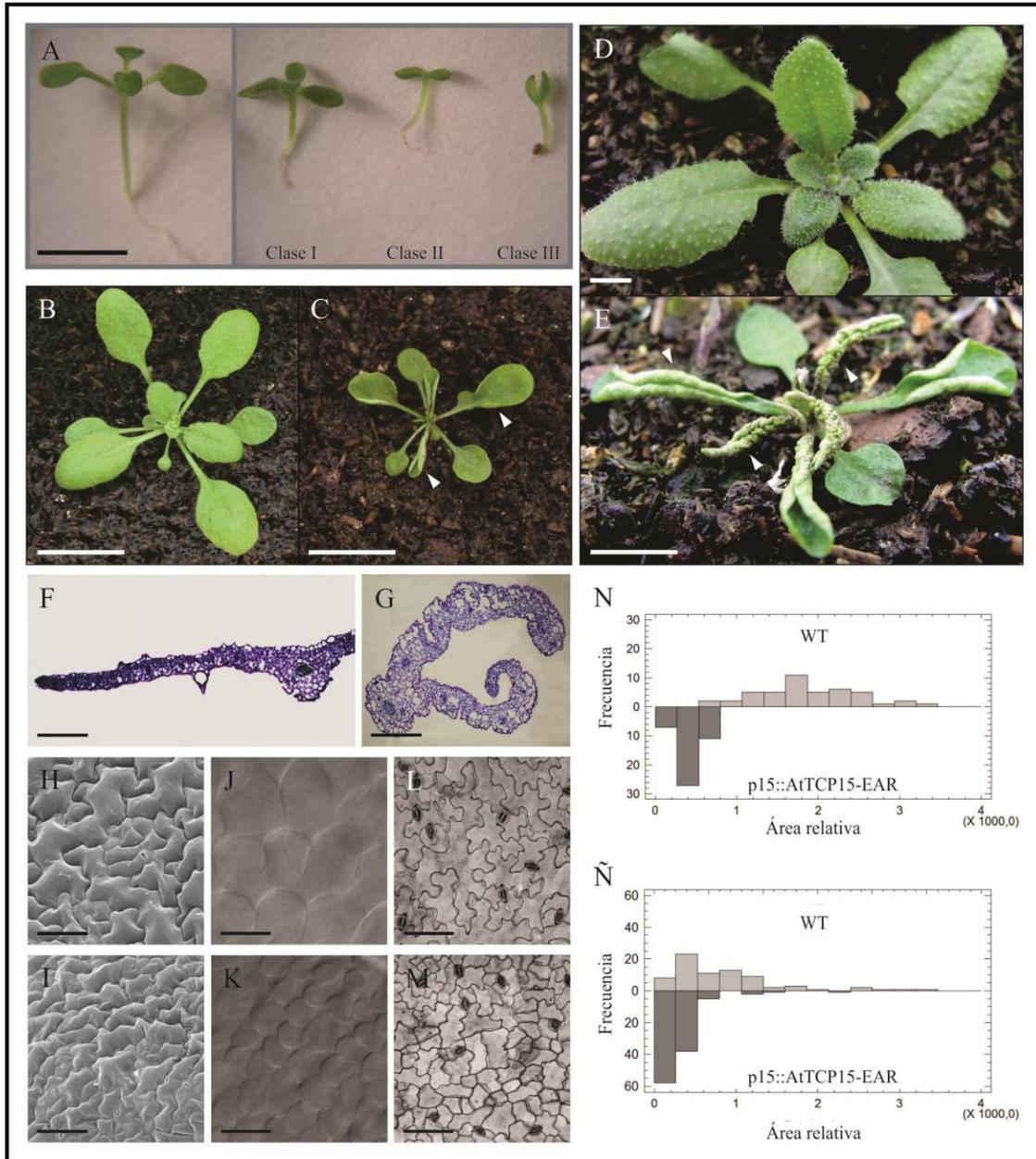


Figura 8.4: Fenotipo de plantas *p15::AtTCP15-EAR* en estadio vegetativo. (A) Plántulas de 15 días de las clases I, II y III, clasificadas de acuerdo a la intensidad del fenotipo observado. La planta de la izquierda es una planta salvaje de la misma edad. (B, D, F, H-J) Plantas salvajes. (C, E, G, K-M) Plantas *p15::AtTCP15-EAR*. (B, C) Plantas de 25 días; las puntas de flecha en (C) indican hojas cuyos márgenes se curvan hacia arriba. (D, E) Plantas de 32 días; las puntas de flecha en (E) muestran las protuberancias encontradas en la cara abaxial de las hojas. (F, G) Corte transversal de hojas de roseta, donde se observan los espacios vacíos entre las células del parénquima esponjoso y la curvatura de las hojas en (G). (H, I) Células de la epidermis adaxial. (J, K) Células del parénquima en empalizada. (L, M) Células de la epidermis abaxial de hojas de roseta. Nótese que para los tres tipos celulares estudiados, el área de las células de plantas *p15::AtTCP15-EAR* es menor. (N, Ñ) Análisis de la distribución de las áreas de las células (en píxeles) del parénquima en empalizada (N) y de la epidermis abaxial (Ñ), de hojas de roseta de plantas salvajes y *p15::AtTCP15-EAR*. Barras de tamaño: (A-E) 0,5 cm, (F-G) 0,1 cm, (H-M) 50 μ m.

relacionado con una detención de la diferenciación celular. En base a estos resultados, podemos postular que AtTCP15-EAR es capaz de inhibir el crecimiento de las hojas, principalmente a causa de una disminución en el tamaño celular. Además, es claro que la expresión de la fusión genera un desbalance en el desarrollo de las hojas, afectando la organización celular tanto en la cara adaxial como en la abaxial.

Una vez que las plantas alcanzan el estadio reproductivo, las inflorescencias presentan una amplia variedad de anomalías morfológicas. En primera instancia, las plantas p15::AtTCP15-EAR presentan menor altura que las plantas salvajes (Fig. 8.5 A). El eje de la inflorescencia sufre un acortamiento drástico debido a la reducción del largo de los internodos, lo cual produce la aparición de las flores en forma de agrupamientos compactos (Fig. 8.5 D) y altera la filotaxia. En ciertos casos, los tallos presentan curvaturas pronunciadas (Fig. 8.5 D), principalmente en los extremos distales donde se ubican las flores. Los pedúnculos florales también están acortados (Fig. 8.5 B, C) y, en ocasiones, se orientan hacia abajo. Las hojas caulinares presentan las mismas características de hiponastia y protuberancias observadas en las hojas de roseta (Fig. 8.5 C). Las flores están alteradas en los cuatro verticilos: los sépalos están acortados, engrosados y su concavidad está aumentada, la elongación de los pétalos y de los filamentos de anteras se ve severamente reducida y se observa el crecimiento de tejidos ectópicos sobre el gineceo y el receptáculo de las flores (Fig. 8.5 G, H). En cortes histológicos transversales de las flores puede observarse que los pétalos no se encuentran en una ubicación habitual, y que el tejido que corresponde al replum y al septum está más engrosado que en los gineceos salvajes (Fig. 8.5 I, J). En las ocasiones en las que alguno de los filamentos de las anteras logra elongarse y fertilizar los óvulos, se forman vainas cortas con un número reducido de semillas y valvas de superficie irregular (Fig. 8.5 E, F).

A fin de realizar un estudio más detallado de las alteraciones observadas en las flores, realizamos microfotografías electrónicas de barrido. Desde los primeros estadios de desarrollo, los sépalos de las plantas p15::AtTCP15-EAR son más cortos, engrosados y cóncavos que los salvajes (Fig. 8.5 G-J; Fig. 8.6 A-B). Debido a que los órganos de protección (sépalos y pétalos) no se desarrollan correctamente, los gineceos están expuestos desde los estadios 6-7 del desarrollo (Fig. 8.6 B), lo cual sólo sucede en las

flores salvajes al momento de la antesis (estadio 13) cuando las papilas estigmáticas están desarrolladas y son receptivas a los granos de polen (Alvarez-Buylla y col., 2010).

Los estambres se ven acortados y presentan constricciones sobre los filamentos (Fig. 8.6 P, Q). Otra característica interesante es que los sépalos de las plantas p15::AtTCP15-EAR carecen de tricomas (Fig. 8.6 B), los cuales se forman normalmente sobre la cara abaxial en estadios tempranos del desarrollo. Al analizar en detalle las células epidérmicas de estos sépalos, observamos que son más pequeñas que las salvajes y no se encuentran las células alargadas propias de este tipo de tejido (Fig. 8.6 Ñ, O), sugiriendo que la diferenciación celular de la cara abaxial de los sépalos está afectada.

A medida que la flores maduran, se desarrollan estructuras ectópicas sobre los gineceos. Los primeros indicios de su crecimiento aparecen alrededor del estadio 10-11 (Fig. 8.6 C, D), momento en el cual también comienzan a desarrollarse las papilas estigmáticas en el extremo distal de los carpelos (Alvarez-Buylla y col., 2010). En ese momento, pueden observarse pequeñas protuberancias sobre el replum, que se desarrollan luego para dar lugar a estructuras filamentosas coronadas por papilas estigmáticas (Fig. 8.6 E - H).

En los casos más extremos, estos filamentos se fusionan y generan láminas terminadas en estigma (Fig. 8.6 I). Los filamentos que surgen del replum mantienen la estructuración y el tipo celular de este último (Fig. 8.6 J), y en las regiones en que no se observan crecimientos, el replum aparece engrosado en relación con el de plantas salvajes (Fig. 8.6 K-L). Cabe aclarar que las estructuras que surgen del receptáculo de las flores (Fig. 8.6 M-N) tienen características similares a las que se encuentran sobre el replum.

8.6 AtTCP15-EAR afecta la expresión de genes que regulan el establecimiento de los límites entre meristemas y órganos laterales

En un intento por desentrañar los procesos responsables de generar las alteraciones observadas en plantas que expresan AtTCP15-EAR, comparamos el

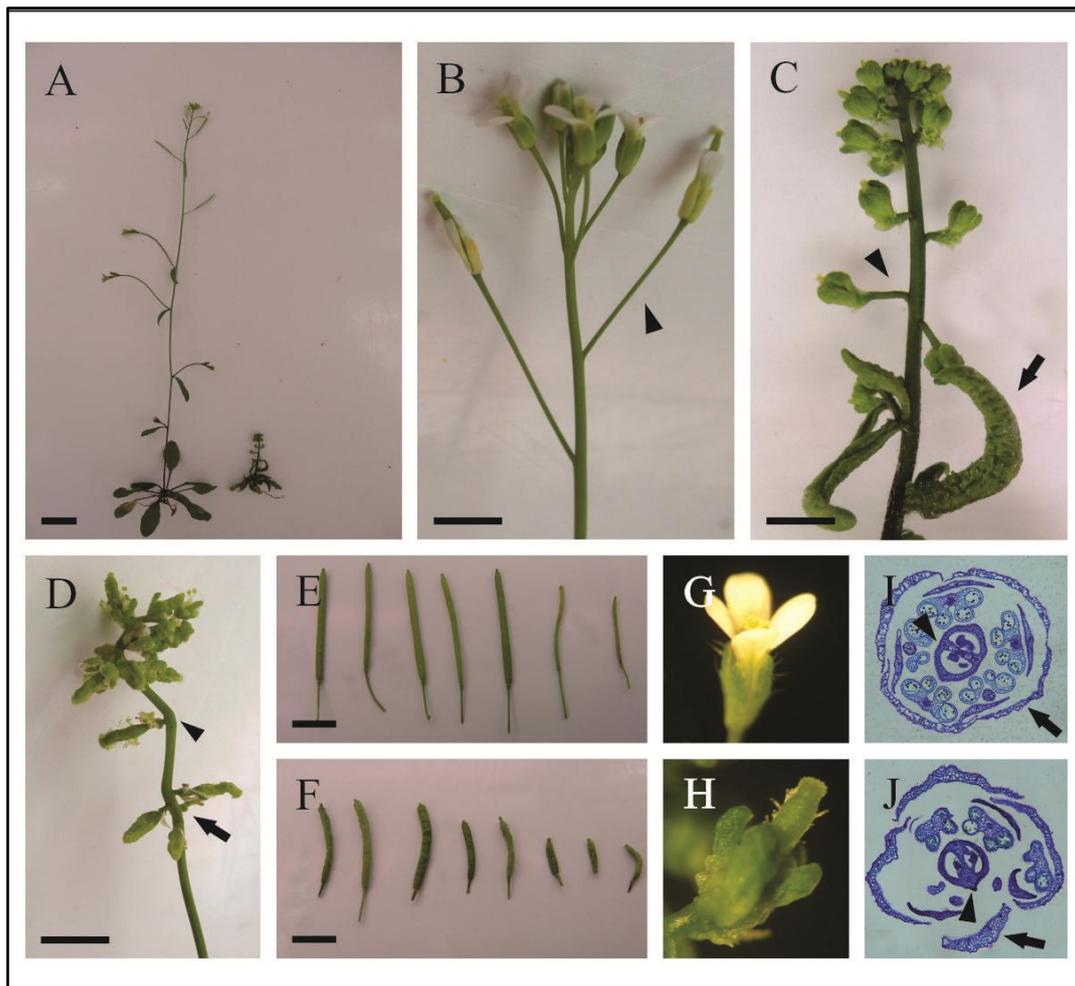


Figura 8.5: Fenotipo de plantas $p15::AtTCP15-EAR$ en estadio reproductivo. (A) Diferencia de estatura entre plantas salvajes (izquierda) y plantas $p15::AtTCP15-EAR$ de fenotipo extremo (derecha). (B-D) Inflorescencias de plantas salvajes (B) y $p15::AtTCP15-EAR$ (C, D). Las puntas de flecha en (B) y (C) muestran la diferencia en el largo de los pedúnculos. La flecha en (C) indica las protuberancias observadas en las hojas caulinares, similares a las observadas en las hojas de roseta. En (D), la punta de flecha indica la curvatura del tallo en el nodo, mientras que la flecha muestra el agrupamiento de silicuas debido al acortamiento de los internodos. (E, F) Silicuas salvajes y $p15::AtTCP15-EAR$, respectivamente. Nótese el menor tamaño y la superficie irregular de las vainas en (F). (G, H) Flores salvajes y $p15::AtTCP15-EAR$, respectivamente. En (H), los pétalos y estambres no elongados se encuentran ocultos detrás de los sépalos. Nótese también el crecimiento de estructuras ectópicas en el gineceo y el receptáculo de la flor. (I, J) Cortes transversales de las flores representadas en (G) y (H). Las flechas muestran el engrosamiento de los sépalos en las plantas $p15::AtTCP15-EAR$ (J), en tanto que las puntas de flecha marcan la protuberancia observada en el replum en los gineceos de estas plantas. Barras de tamaño: (A) 1,5 cm, (B-F) 0,5 cm.

fenotipo de éstas con los generados por otros reguladores del desarrollo. El fenotipo de las plantas $p15::AtTCP15-EAR$ es similar al de aquellas que expresan constitutivamente *LOB* (Shuai y col., 2002), un gen que se expresa específicamente en los bordes entre meristemas y órganos laterales, también conocido como *ASL4* (Majer y Hochholdinger, 2011). Estas plantas son más pequeñas que las salvajes, tienen los pecíolos acortados,

hojas hiponásticas y agrupamientos de flores altamente compactadas con gineceos expuestos a causa de la elongación reducida de sépalos, pétalos y anteras (Shuai y col., 2002). La similitud entre los fenotipos nos llevó a analizar los niveles de expresión de *LOB* en rosetas y flores, observando que las plantas p15::AtTCP15-EAR muestran un aumento de entre 2 a 5 veces en los niveles de transcripto respecto de las plantas salvajes (Fig. 8.7 A). *LOB* es positivamente regulado por *AS1* y *AS2* (Byrne y col., 2002; Shuai y col., 2002), y tanto *LOB* como *AS2* son positivamente regulados por *BOP1* y *BOP2*, dos genes relacionados con el establecimiento y la polaridad de los órganos secundarios (Ha y col., 2007). Medidas de niveles de transcriptos en hojas y flores de plantas p15::AtTCP15-EAR mostraron que *BOP1*, pero no *AS1* o *AS2*, presentan mayores niveles de expresión que en plantas salvajes (Fig. 8.7 A).

Por otro lado, y al igual que *LOB*, la expresión de los genes *CUC* está directamente relacionada con la especificación de las fronteras entre los órganos y los meristemas (Aida y Tasaka, 2006). La familia de genes *CUC*, que codifica proteínas de la familia NAC, está conformada por 3 miembros en *A. thaliana*, los cuales son parcialmente redundantes en su función: *CUC1*, *CUC2* y *CUC3* (Aida et al., 1997; Takada et al., 2001, Vroemen y col., 2003). Los estudios de expresión en las plantas p15::AtTCP15-EAR mostraron que sólo *CUC1* y *CUC2* presentan diferencias significativas en sus niveles de expresión (Fig. 8.7 B). Los niveles de transcriptos de ambos genes están aumentados tanto en rosetas como en flores, con niveles relativos de entre 3 y 6 veces para *CUC1* y de entre 2 y 4 veces para *CUC2*. Dado que los resultados son muy similares en los dos órganos estudiados, por simplicidad en la Figura 8.6 se presentan los resultados obtenidos en flores.

A fin de confirmar estos resultados y de obtener información adicional sobre la expresión de *CUC1* en las plantas p15::AtTCP15-EAR, cruzamos nuestras plantas con una línea reportera de *CUC1*, la cual expresa el gen *gus* bajo el control del promotor y la región codificante de *CUC1*. En plantas salvajes, la expresión de *CUC1* se observa fuertemente en el meristema apical del tallo en los primeros estadios (Fig. 8.7 C), y a medida que las plantas se desarrollan, la expresión se restringe progresivamente a la base de los órganos laterales, detectándose únicamente en el SAM, los meristemas axilares y los receptáculos de las flores cuando las plantas alcanzan el estadio

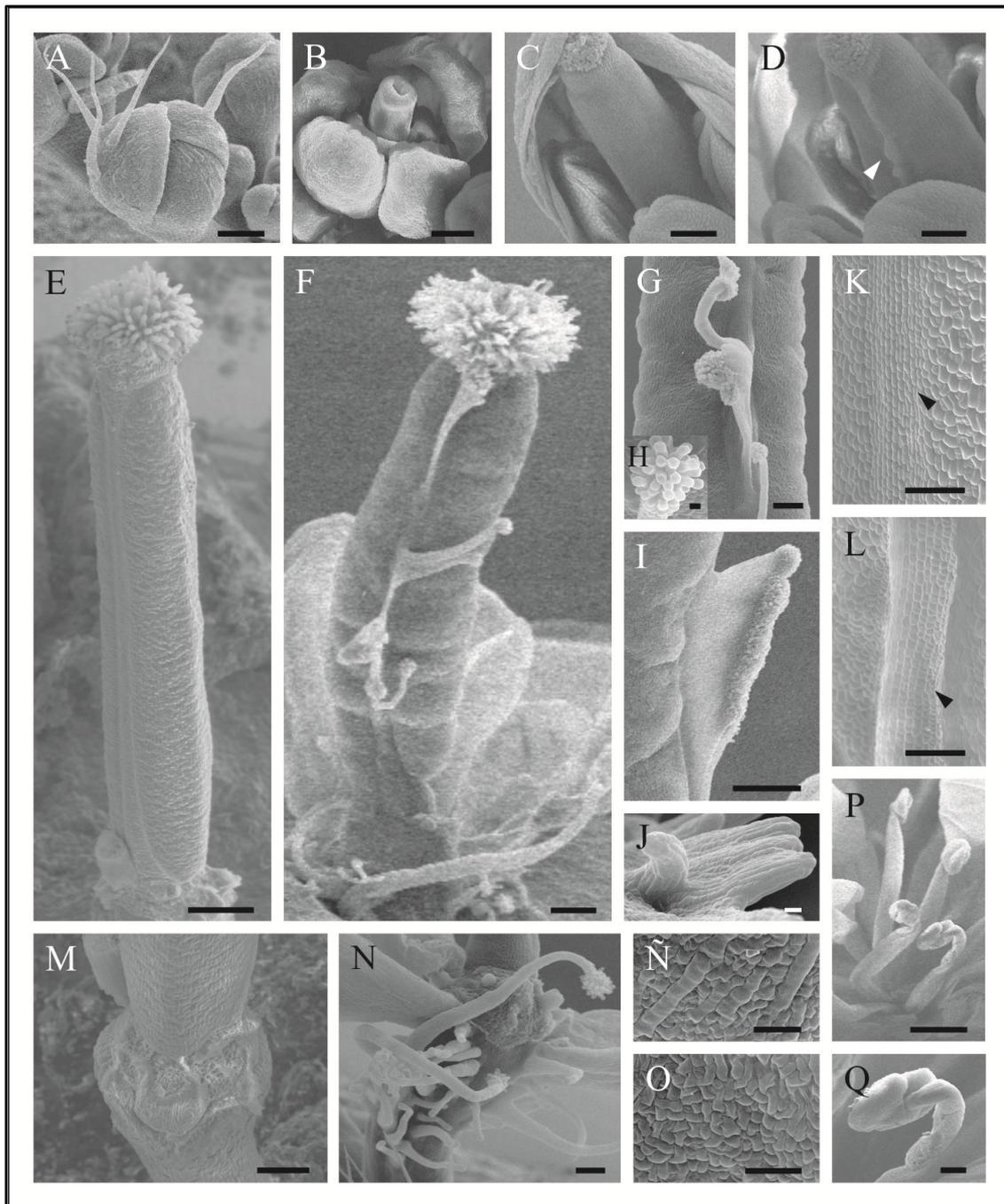


Figura 8.6: Fenotipo de las flores *p15::AtTCP15-EAR*. (A, B) Flores salvajes y *p15::AtTCP15-EAR*, respectivamente, en estadio 6-7 del desarrollo. Obsérvese la ausencia de tricomas en los sépalos de las flores *p15::AtTCP15-EAR*. (C, D) Flores en estadio 10-11; la punta de flecha indica el inicio del desarrollo de estructuras ectópicas sobre el replum de las flores *p15::AtTCP15-EAR* (D), ausentes en las plantas salvajes (C). (E, F) Gineceos maduros (estadio 13-14), salvaje y *p15::AtTCP15-EAR* respectivamente. Nótese la presencia de estructuras filamentosas sobre el replum y la región basal del gineceo en (F). (G, H) Detalle de las estructuras filamentosas (G) y de las papilas estigmáticas (H) que se desarrollan en el extremo de las mismas. (I) Gineceo con fenotipo extremo, donde los filamentos se convierten en una lámina que se extiende a lo largo del replum, coronada por papilas estigmáticas. (J) Detalle de los crecimientos ectópicos en estadios tempranos del desarrollo, donde se observa que están conformados por células similares a las del replum de plantas salvajes (K). (K, L) Replum de gineceo salvaje y *p15::AtTCP15-EAR*, respectivamente. Las puntas de flecha marcan la diferencia en la morfología del replum, el cual se observa cóncavo en (K) y convexo en (L).

Figura 8.6: (cont..) (M, N) Región basal del gineceo (ginóforo e inicio del pedúnculo) de flores salvajes y *p15::AtTCP15-EAR* respectivamente. Obsérvese en (N) el desarrollo de estructuras filamentosas similares a las observadas sobre el replum. (Ñ, O) Epidermis abaxial de sépalos salvajes y *p15::AtTCP15-EAR* respectivamente. Nótese la ausencia de las células elongadas en (O). (P) Estambres de plantas *p15::AtTCP15-EAR*. (Q) Detalle del extremo superior del estambre, donde se observa el estrangulamiento del filamento de antera. Barras de tamaño; (A-D, N-M, Q) 100 μm , (E-F) 200 μm , (H, J) 10 μm , (G, I, K, L, Ñ-O) 50 μm , (P) 500 μm .

reproductivo (Fig. 8.7 E, G). En las cruizas con *p15::AtTCP15-EAR*, la expresión de *CUC1* se extiende a los cotiledones (Fig. 8.6 D), a la lámina de las hojas, pecíolos, pedicelos y órganos florales (Fig. 8.7 F, H). Estos resultados indican que no sólo los niveles de transcritos de *CUC1* están aumentados, sino que, además, el dominio de expresión de esta proteína está expandido en las plantas que expresan *AtTCP15-EAR*.

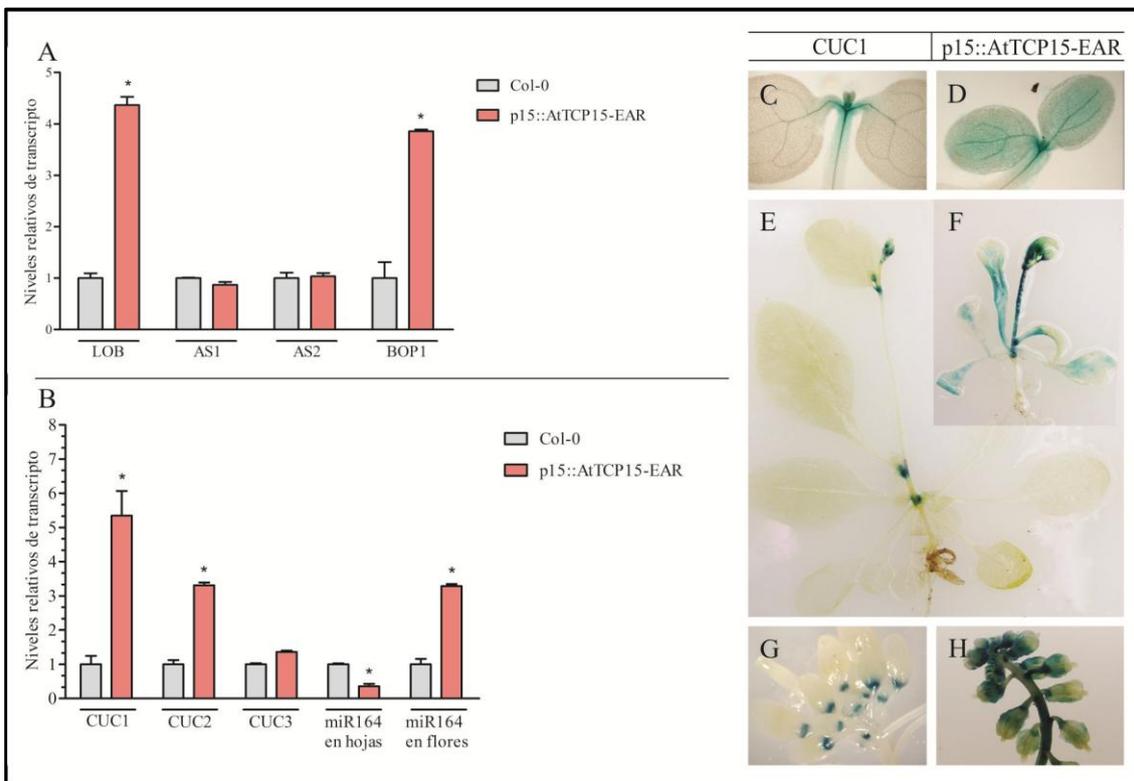


Figura 8.7: Expresión de genes que regulan el establecimiento de los límites entre meristemos y órganos laterales. (A, B) Niveles de expresión relativos medidos en flores de plantas salvajes y *p15::AtTCP15-EAR*. (C-H) Tinción histoquímica mostrando la expresión del reportero *CUC1::GUS* en plantas salvajes (C, E, G) y *p15::AtTCP15-EAR* (D, F, H). (C, D) Plántulas de 10 días. (E, F) Plantas de 40 días. (G, H) Inflorescencias. Obsérvese la expansión de la expresión del gen reportero, hacia los cotiledones (D), hojas y tallo (F), sépalos y pedúnculos (H) en las plantas *p15::AtTCP15-EAR*.

8.7 *AtTCP15-EAR regula genes blanco de proteínas TCP de clase II*

Los micro-ARNs son moléculas de ARN pequeñas, de alrededor de 21 nucleótidos, que regulan la expresión de sus genes blanco tanto en plantas como en animales. En *A. thaliana*, el microARN miR164 regula la expresión de varios miembros de la familia NAC, entre ellos CUC1 y CUC2, y su localización y cantidad es fundamental para la correcta separación de los órganos laterales (Laufs y col., 2004; Mallory y col., 2004). El miR164 está codificado por tres genes en *A. thaliana*, *MIR164A*, *B* y *C* (Bonnet y col., 2004; Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Reinhart y col., 2002; Wang y col., 2004). Sin embargo, el producto de los tres genes es el mismo y por lo tanto no se puede diferenciar el aporte de cada uno al medir los niveles de transcritos del miR164. Como se puede ver en la Figura 8.6 B, los niveles de expresión del miR164 son 3 veces más bajos en las rosetas de las plantas p15::AtTCP15-EAR respecto de las plantas salvajes, pero 3 veces más altos en flores. En base a estos resultados, podemos decir que el aumento en los niveles de expresión de *CUC1* y *CUC2* en rosetas podría explicarse por la disminución en la expresión del miR164. Sin embargo, factores adicionales deben influir sobre la expresión de *CUC1* y *CUC2* en flores. Recientemente, se demostró que *IAA3/SHY2* y *SAUR65* (At1g29460), dos proteínas relacionadas con la respuesta a auxinas, en conjunto con el regulador del desarrollo de hojas *AS1*, son capaces de limitar la expresión de los genes *CUC* (Koyama y col., 2010). Es interesante destacar que los genes que codifican estas proteínas, así como *MIR164A*, son blancos directos de AtTCP3, una proteína TCP de clase II. Como mencionamos anteriormente, la expresión de *AS1* no está alterada en las plantas p15::AtTCP15-EAR (Fig. 8.7 A), pero los niveles de transcritos de *IAA3/SHY2* y *SAUR65* están significativamente reducidos tanto en rosetas como en flores (Fig. 8.8 A). La disminución de la expresión de estos genes podría explicar el aumento de los niveles de transcritos de los genes *CUC*, tanto en hojas como en flores. Más interesante aún, estos resultados sugieren que AtTCP15 influye en la expresión de genes *CUC* a través de una vía que se solapa parcialmente con la vía de acción de proteínas TCP de clase II.

De acuerdo a Koyama y colaboradores (2010), *AS1*, *IAA3/SHY2* y *SAUR65* son directamente regulados por AtTCP3 a través de elementos en *cis* presentes en sus promotores. Como mencionamos en la introducción, las proteínas TCP de clase II reconocen la secuencia GTGGNCCC (Kosugi y Ohashi, 2002; Schommer y col., 2008),

mientras que AtTCP15 y otras proteínas de clase I tienen preferencia por la secuencia GTGGGNCC (Kosugi y Ohashi, 2002; Viola y col., 2011). Dada la similitud entre estas secuencias de unión, decidimos analizar la capacidad de unión de AtTCP15 a las regiones promotoras de los genes blanco que contienen los sitios putativos de unión de proteínas TCP. La proteína recombinante AtTCP15 fue capaz de interactuar con las

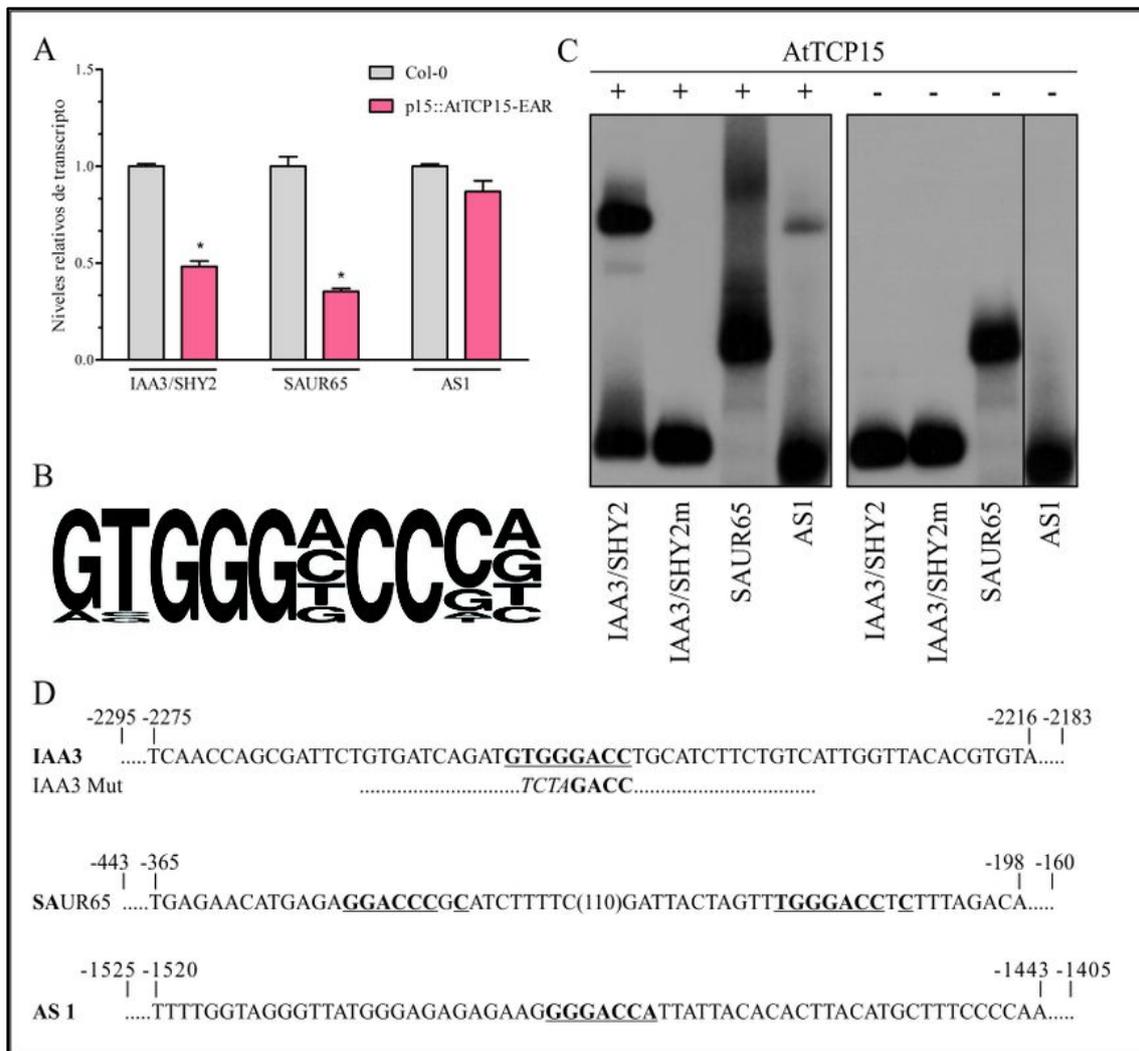


Figura 8.8: AtTCP15 regula la expresión de genes blanco de proteínas TCP de clase II. (A) Niveles de expresión relativos de los genes blanco de AtTCP3, IAA3/SHY2, SAUR65 y ASI, medidos en flores de plantas salvajes y p15::AtTCP15-EAR. (B) Seq-logo de la secuencia consenso de unión de AtTCP15, adaptado de Viola y col. (2011). (C) Ensayo de unión al ADN donde se observa la interacción de la proteína AtTCP15 recombinante con los fragmentos de los promotores de IAA3/SHY2, SAUR65 y ASI que contienen sitios de unión para proteínas TCP. Una versión mutada del promotor de IAA3/SHY2 (IAA3/SHY2m) se utilizó como control de la especificidad de unión. El panel de la derecha muestra la migración de los fragmentos de promotor en ausencia de la proteína recombinante. (D) Secuencia de los fragmentos de los promotores utilizados. En la segunda línea se muestran las mutaciones puntuales introducidas en el sitio de unión de proteínas TCP del promotor de IAA3/SHY2.

regiones promotoras de los tres genes, como lo demuestra la Figura 8.8 C, aunque la eficiencia de unión a los mismos fue diferente: los niveles de unión fueron altos para el caso de IAA3/SHY2, intermedios para SAUR65 y bajos para AS1. Además, la mutación puntual del sitio TCP del promotor de IAA3/SHY2 impidió la unión de AtTCP15, indicando que la interacción con esta secuencia es específica (Fig. 8.8 C-D). La eficiencia de unión observada se correlaciona bien con las preferencias de unión de AtTCP15, la cual aumenta en función del nivel de similitud de los sitios presentes en los promotores respecto del consenso GTGGGNCC (Fig. 8.7 C-D). De acuerdo a estos datos, es posible que las diferencias en las propiedades regulatorias entre proteínas TCP de clases I y II estén basadas, al menos parcialmente, en su afinidad por las diferentes secuencias de ADN presentes en las regiones promotoras

8.8 AtTCP15 es un factor activador de la transcripción

A fin de complementar los resultados obtenidos con las plantas que expresan AtTCP15-EAR y aclarar los posibles escenarios en los cuales AtTCP15 participa, decidimos expresar la forma nativa de AtTCP15 bajo el control del promotor constitutivo 35SCaMV (AtTCP15-OE, Fig. 8.1 D). Las fusiones a dominios dominantes, represores o activadores, son excelentes estrategias al momento de definir los procesos en los cuales participa la proteína estudiada, así como para la detección de posibles genes blanco de los factores de transcripción. Sin embargo, este tipo de sistemas no es suficiente para determinar la actividad propia del factor como un activador o represor de la transcripción. Al utilizar la forma nativa, si AtTCP15 actuara como un represor transcripcional, la sobreexpresión debería generar un fenotipo similar al observado en las plantas AtTCP15-EAR. Si, por el contrario, AtTCP15 actuara como un activador transcripcional, debería generar un fenotipo opuesto (o complementario) al anteriormente descrito para la fusión represora. Por lo tanto, el análisis comparativo del fenotipo y de los perfiles de expresión de los genes blanco nos permitirá determinar la acción de AtTCP15 sobre la transcripción.

8.9 Las plantas que sobre-expresan AtTCP15 tienen un fenotipo complementario al de las plantas p15::AtTCP15-EAR

Aunque las plantas AtTCP15-OE no presentan alteraciones fenotípicas tan drásticas como las plantas p15::AtTCP15-EAR, aun así muestran un gran número de alteraciones morfológicas, y la intensidad del fenotipo observado se correlaciona con los niveles de transcripto medidos por PCR en tiempo real (Fig. 8.1 F).

Las hojas de la roseta de plantas AtTCP15-OE tienen bordes más aserrados que las de plantas salvajes (Fig. 8.9 C), y a medida que maduran desarrollan una marcada epinastia (Fig. 8.9 A, B). Los sépalos son más delgados y alargados que los de las plantas salvajes (Fig. 8.9 F-G) y, en contraposición con lo observado para p15::AtTCP15-EAR, presentan un gran número de tricomas en su cara abaxial (Fig. 8.9 D-E). Los filamentos de las anteras, que normalmente se elongan hasta alcanzar las papilas estigmáticas, a fin de favorecer la polinización (Fig. 8.9 H), sobrepasan visiblemente el extremo del gineceo (Fig. 8.9 I) en el estadio 13 del desarrollo de la flor (Alvarez-Buylla y col., 2010). El desarrollo del gineceo también presenta alteraciones, que varían desde un menor número de papilas estigmáticas hasta el desarrollo de carpelos no fusionados y ausencia total de los tejidos marginales del carpelo (estilo y estigma) (Fig. 8.9 K-O). En general, se puede concluir que los fenotipos ocasionados por la sobreexpresión de AtTCP15 son opuestos a los observados al expresar la forma represora AtTCP15-EAR, lo que sugiere que AtTCP15 actuaría como una proteína activadora de la transcripción.

8.10 AtTCP15 participa en diversos procesos regulados por hormonas vegetales

Diversos indicios nos llevaron a preguntarnos si existía una relación entre la función de AtTCP15 y los diversos procesos regulados por hormonas. El desarrollo de los tricomas en los sépalos es un proceso asociado a una vía regulada en forma conjunta por GA y CK (Gan y col., 2007). Asimismo, el aumento del aserramiento en los márgenes de las hojas está asociado a una respuesta aumentada a CK (Rupp y col., 2009; Greenboim-Wainberg y col., 2005). Por otro lado, los genes postulados como blancos directos de AtTCP15, *IAA3/SHY2* y *SAUR65*, pertenecen a dos de las tres

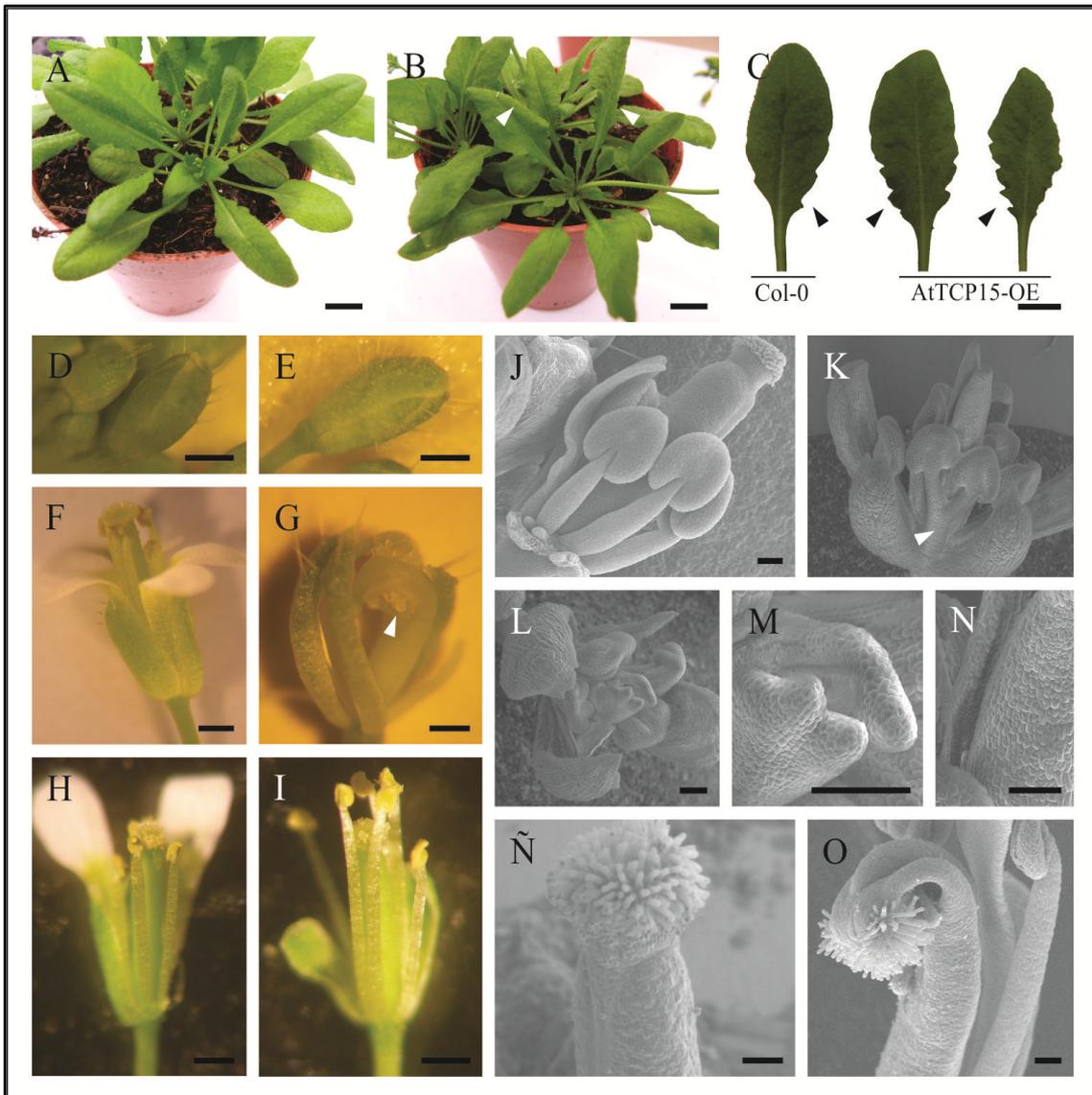


Figura 8.9: Fenotipo de plantas *AtTCP15-OE*. (A, D, F, H, J, Ñ) Plantas salvajes. (B, E, G, I, K-N, O) Plantas *AtTCP15-OE*. (A, B) Plantas de 35 días en estadio vegetativo. Las puntas de flecha en (B) indican las regiones de la lámina de las hojas en donde se observa epinastia. (C) Detalle de las hojas de roseta, donde las puntas de flecha marcan la mayor cantidad de aserramientos observados en las plantas *AtTCP15-OE*. (D, E) Flores en estadios tempranos de desarrollo, donde se observa la mayor cantidad de tricomas presentes en los sépalos de las plantas *AtTCP15-OE*. (F, G) Flores maduras en estadio post-antesis. Nótese los sépalos más delgados y alargados en (G) que los de las plantas salvajes (F), con carpelos no fusionados en su extremo distal y óvulos expuestos (punta de flecha). (H, I) Flores maduras, donde los filamentos de anteras sobrepasan el extremo distal del gineceo en las plantas *AtTCP15-OE* (I). (J-L) Flores en estadio 10-11 del desarrollo. Nótese los carpelos no fusionados en el extremo distal de los gineceos *AtTCP15-OE* (K, L) respecto del salvaje (J). La punta de flecha en (K) muestra la fusión de dos filamentos de anteras. (M) Detalle de (L), donde se observa en mayor detalle el extremo distal de los carpelos y la ausencia de estilo y papilas estigmáticas. (N) Detalle de (K), donde se puede observar la ausencia de replum entre las dos valvas. (Ñ, O) Extremo distal de gineceos en estadio 13-14, de flores salvajes y *AtTCP15-OE* respectivamente. Nótese el extremo distal no fusionado y la curvatura del mismo en O. Barras de tamaño: (A-I) 0,5 cm, (J-O) 100 μ m.

familias de genes de respuesta a auxinas (Hagen y Guilfoyle, 2002). Sumado a esto, el análisis de resultados de microarreglos presentes en bases de datos públicas indica que la expresión de *AtTCP15* sería positivamente regulada por CK (GENEVESTIGATOR, www.genevestigator.com).

En base a todo lo descripto anteriormente, decidimos diseñar una serie de experiencias que nos permitieran dilucidar la relación entre la función de *AtTCP15* y los procesos afectados por auxinas y CK en *A. thaliana*.

8.11 Las citoquininas inducen la expresión de AtTCP15

Para validar los indicios hallados en las bases de datos de microarreglos, tratamos plantas salvajes de *A. thaliana* con 6-bencilaminopurina (BAP), y tomamos muestras de ARN luego de 2 horas de realizado el tratamiento. Como se observa en la Figura 8.10 A, los niveles de transcripto de *AtTCP15* aumentan alrededor de 3,5 veces luego del tratamiento con la hormona. A fin de complementar estos resultados, tratamos con BAP plantas que expresan GUS bajo el control del promotor de *AtTCP15* y realizamos los ensayos de tinción histoquímica dos horas después del tratamiento. Se puede observar que la actividad del promotor de *AtTCP15* aumenta luego del tratamiento con BAP (Fig. 8.10 C-F).

Estos resultados nos permiten concluir que la expresión de *AtTCP15* es positivamente regulada por CK a nivel transcripcional. Ensayos similares realizados con auxinas demostraron que, a diferencia de CK, esta hormona no afecta la expresión de *AtTCP15*.

8.12 Las plantas AtTCP15-OE tienen menores niveles de auxinas que las plantas salvajes

Aunque las auxinas no parecen participar en la regulación de *AtTCP15*, al menos a nivel transcripcional, esta proteína podría estar involucrada en la vía de regulación de auxinas a diferentes niveles. Por un lado, los resultados obtenidos muestran que *AtTCP15* es capaz de unirse a las regiones promotoras de *IAA3/SHY2* y *SAUR65* y que, de acuerdo con esto, los niveles de transcriptos de estos genes están disminuidos en las plantas *p15::AtTCP15-EAR* (Fig. 8.8 A). Las proteínas de la familia

IAA son reguladores negativos de la respuesta a auxinas y actúan uniéndose a los factores de transcripción ARF, alterando su actividad (Reed, 2001). Las proteínas de la familia SAUR se encontraron en soja como factores de respuesta rápida a auxinas, y recientemente se los ha relacionado con la promoción de la expansión celular en anteras e hipocotilos (MacClure y Guilfoyle, 1987; Hagen y Guilfoyle, 2002, Chae y col, 2012; Spartz y col., 2012). A pesar de que la expresión de los genes de ambas familias aumenta significativamente ante un tratamiento con auxinas, su función está relacionada a la inhibición de la respuesta, generando de este modo una retroalimentación negativa. Esto sugeriría que en las plantas p15::AtTCP15-EAR la respuesta a auxinas debería estar aumentada, y disminuida en las plantas AtTCP15-OE. Para comprobar esta hipótesis, realizamos cruza de estas plantas con plantas que expresan el gen *gus* bajo el control del promotor DR5, un promotor sintético altamente sensible a auxinas derivado del gen *GH3* (Ulmasov y col., 1997). En general, se asume que los niveles de expresión del gen *gus* se relacionan directamente con el grado de respuesta de las plantas a auxinas e, indirectamente, con la concentración de esta hormona en las plantas.

Como puede observarse en las fotografías de la Figura 8.10 G, J, la actividad del promotor DR5 se encuentra especialmente en los hidatodos de las hojas en plantas adultas. Sin embargo, en las cruza con p15::AtTCP15-EAR la actividad del promotor está significativamente aumentada y expandida a la lámina de las hojas (Fig. 8.10 H, K). Lo opuesto se observa en la cruza con AtTCP15-OE, donde la expresión del reportero se ve más difusa y deslocalizada que en las plantas control (Fig. 8.10 F, I). Estos resultados están de acuerdo con los resultados antes mencionados e indican que AtTCP15 sería capaz de controlar la respuesta a auxinas, probablemente a través de la regulación de los genes IAA3/SHY2 y SAUR65.

Como dijimos anteriormente, la expresión del reportero DR5 puede relacionarse tanto con la respuesta a auxinas como con los niveles de esta hormona. En un ensayo de microarreglos orientativo realizado con las plantas p15::AtTCP15-EAR, encontramos aumentados ciertos genes que codifican enzimas claves en la biosíntesis de auxinas, específicamente YUCCA1 (YUC1) y YUC4 (Cheng y col., 2006). Por lo tanto, decidimos medir los niveles de expresión de estos genes en las plantas p15::AtTCP15-EAR y AtTCP15-OE, tanto en hojas de roseta como en flores. Dada la similitud de los resultados, por simplicidad se muestran los datos obtenidos del análisis de rosetas de 25

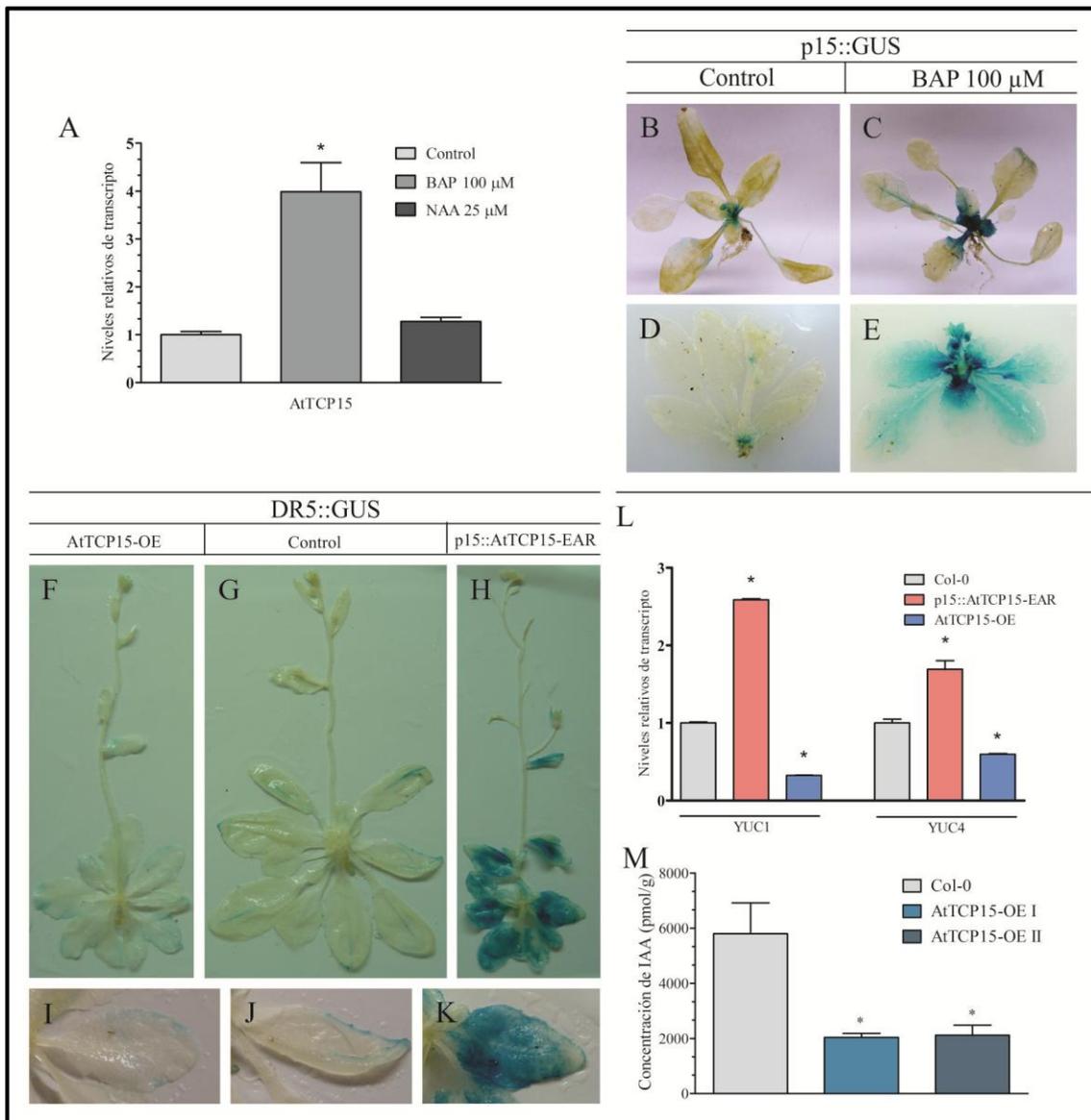


Figura 8.10: Relación de AtTCP15 con las fitohormonas auxinas y CK. (A) Niveles relativos de transcripto de AtTCP15 luego del tratamiento con CK (BAP 100 μ M; 2 horas) y auxinas (NAA 25 μ M; 2 horas), con respecto a plantas no tratadas (Control). (B-E) Actividad del reportero p15::GUS, en condiciones control y luego de 2 horas del tratamiento con BAP 100 μ M, en plantas de 25 (B, C) y 45 (C, D) días. Nótese el aumento de la actividad del promotor luego del tratamiento con BAP, en los dos estadios de desarrollo estudiados. (F-H) Tinción histoquímica de las plantas resultantes de las cruzas entre el reportero DR5::GUS (G) y las plantas p15::AtTCP15-EAR (H) y AtTCP15-OE (F). (I-K) Primer plano de las hojas de roseta, donde se observan en detalle los cambios en el patrón de expresión del reportero. Obsérvese que la expresión de DR5::GUS en condiciones control se restringe a los hidatodos y los márgenes de las hojas (J), mientras que dicha expresión se observa más débil y deslocalizada en la cruz con AtTCP15-OE (I). Contrariamente, la expresión del reportero se ve más fuerte y expandida a la lámina de las hojas en la cruz con p15::AtTCP15-EAR (K). (L) Niveles de expresión relativos de los genes YUC1 y YUC4 en rosetas. (M) Concentración de IAA (pmol/g) en plántulas de 15 días, salvajes y de dos líneas independientes AtTCP15-OE.

días. Como se observa en la Figura 8.10 L, los niveles de transcripto de *YUC1* y *YUC4* se ven significativamente aumentados en las plantas *p15::AtTCP15-EAR*, y disminuidos en las plantas *AtTCP15-OE*

Dado que estas enzimas son claves para la biosíntesis de auxinas, decidimos medir la concentración de esta hormona a través de la cuantificación de ácido 3-indolacético (IAA), la auxina natural más abundante (Bartel, 1997). Para ello, utilizamos plántulas de 15 días, salvajes y de dos líneas independientes de *AtTCP15-OE*. De acuerdo a los resultados obtenidos, la concentración de auxinas está considerablemente disminuida en las plantas *AtTCP15-OE*, las cuales contienen alrededor de un 30% de IAA respecto de las plantas salvajes (Fig. 8.10 M). Este resultado es concordante con los resultados obtenidos en los ensayos de histoquímica de las cruces de *AtTCP15-OE* con *DR5::GUS*, donde se observa una menor expresión del reportero, y con los niveles de expresión disminuidos de *YUC1* y *YUC4* en dichas plantas.

En conjunto, estos resultados nos permiten postular que *AtTCP15* actúa negativamente sobre la vía de auxinas en *A. thaliana*, operando a dos niveles diferentes: por un lado, modula los niveles de auxinas reprimiendo indirectamente la expresión de genes involucrados en su biosíntesis y, al mismo tiempo, activa de manera directa la expresión de genes que reprimen la respuesta a esta hormona.

8.13 AtTCP15 y su relación con las vías de regulación de auxinas y citoquininas en hojas

En función de los resultados obtenidos respecto de la relación de *AtTCP15* con auxinas y CK, decidimos intentar encontrar una conexión entre estas vías de regulación y los fenotipos observados en las plantas *p15::AtTCP15-EAR* y *AtTCP15-OE*.

En primer lugar, los resultados de la disminución de los niveles de transcripto de *IAA3/SHY2* en las plantas *p15::AtTCP15-EAR* nos llevaron a preguntarnos cuál sería el fenotipo de las plantas mutantes en este gen. Las mutantes *shy2-22* y *shy2-24* (nulas) no presentan diferencias morfológicas significativas respecto de las plantas salvajes (Tian y Reed, 1999). Extrañamente, los mismos autores reportaron que las mutantes de

ganancia de función *shy2-2* presentan un fenotipo similar al de las plantas p15::AtTCP15-EAR, con hojas pequeñas y fuertemente hiponásticas, lo cual sugiere que la disminución en los niveles de expresión de *IAA3/SHY2* no sería responsable del fenotipo observado en las hojas de plantas p15::AtTCP15-EAR. En general, las plantas que tienen bajas concentraciones de auxinas libres (mutantes *yucca*, Cheng y col., 2006; mutantes de ganancia de función *iamt1-D*, Qin y col., 2005) o que muestran una respuesta disminuida a esta hormona (mutantes de ganancia de función *shy2-2*, Tian y Reed, 1999; mutantes *bdl*, Hamann y col., 2002) tienen un fenotipo similar al de las plantas p15::AtTCP15-EAR. Sin embargo, las plantas p15::AtTCP15-EAR, además de presentar niveles disminuidos de expresión de *IAA3/SHY2*, muestran una expresión aumentada del reportero DR5 y de los genes *YUC1* y *YUC4*. Por lo tanto, es posible que los cambios mencionados en la homeostasis de auxinas sean una respuesta secundaria, o de compensación, ante algún otro proceso que es alterado por la expresión de AtTCP15-EAR.

Como mencionamos anteriormente, *SAUR65* es el segundo blanco de AtTCP15 relacionado con la vía de auxinas. Es interesante mencionar que, además de *SAUR65*, 26 de los 81 genes *SAUR* de *A. thaliana* (TAIR, www.arabidopsis.org) parecen tener niveles de expresión disminuidos en las plantas p15::AtTCP15-EAR. Además, 18 de estos 26 genes tienen sitios de unión para proteínas TCP en sus regiones promotoras (Tabla 8.1). A fin de intentar ampliar el rango de análisis de estos genes, decidimos incluir cuantificaciones de *SAUR19* en posteriores ensayos. Como se observa en la Figura 8.10 G, los niveles de transcripto de *SAUR19* y *SAUR65* están disminuidos en las plantas p15::AtTCP15-EAR respecto de las plantas salvajes, lo cual nos permite postular que AtTCP15 es capaz de regular a diversos miembros de la familia SAUR. Además, es interesante notar que los genes *SAUR*, que responden a auxinas, se mantienen reprimidos en las plantas p15::AtTCP15-EAR, donde los niveles de expresión del reportero DR5 están aumentados. Por lo tanto, es posible que los genes *SAUR* sean blancos directos de AtTCP15, y que su expresión se mantenga reprimida en dichas plantas debido a la acción dominante del dominio EAR.

Si bien es aún poco lo que se sabe sobre la función de los genes *SAUR* en *A. thaliana*, dos trabajos recientemente publicados los relacionan con la expansión celular en hojas, hipocotilos y filamentos de anteras (Chae y col., 2012; Spartz y col., 2012).

Por lo tanto, la expresión insuficiente de los genes *SAUR* podría explicar el hecho de que las células de las hojas de plantas p15::AtTCP15-EAR son más pequeñas que las de plantas salvajes, quizás debido a una deficiencia en la expansión celular.

Para analizar esta hipótesis, tratamos plantas p15::AtTCP15-EAR con una solución de ácido naftalenacético (NAA), un análogo sintético de la auxina IAA, 3 días a la semana desde los 20 días de desarrollo hasta el momento de formación de las primeras vainas. Como puede observarse en las fotografías de la Figura 8.11, el tratamiento con auxinas promueve una severa epinastia en las hojas de las plantas salvajes (Fig. 8.11 B), en tanto que genera una reversión de la hiponastia de las hojas de roseta y caulinares en las plantas p15::AtTCP15-EAR (Fig. 8.11 D, F). A fin de estudiar los cambios transcripcionales ocasionados por estos tratamientos, tomamos muestras de las hojas de plantas p15::AtTCP15-EAR y salvajes tratadas con NAA y de plantas control, y medimos los niveles de expresión de los genes *SAUR19* y *SAUR65* mediante RT-qPCR. En las plantas salvajes se observa el característico aumento de expresión, de alrededor de 4 veces respecto de las plantas control, ante un tratamiento con auxinas. En las plantas p15::AtTCP15-EAR, donde los genes *SAUR* están normalmente reprimidos, el tratamiento con NAA lleva a un aumento de los niveles de transcritos, aunque éstos nunca alcanzan los valores observados en las plantas salvajes luego del tratamiento (Fig. 8.11 G). En contraposición a lo que sucede en las plantas p15::AtTCP15-EAR, los niveles de expresión de los genes *SAUR* están aumentados en las hojas de las plantas AtTCP15-OE. Es interesante recordar que las hojas de estas plantas presentan una marcada epinastía, fenotipo opuesto y complementario al observado en las hojas de las plantas p15::AtTCP15-EAR.

En base a estos resultados, podemos sugerir que los genes *SAUR* de *A. thaliana* son regulados por AtTCP15 y por auxinas a través de dos vías paralelas, y que los cambios en la expresión de estos genes podrían ser responsables, al menos en parte, de las alteraciones observadas en el desarrollo de la lámina de las hojas en plantas con niveles alterados de AtTCP15.

Como mencionamos anteriormente, Spartz y colaboradores (2012) reportaron que las plantas amiSAUR19/23/24, las cuales expresan un microARN que disminuye los niveles de transcritos de estos tres genes, tienen hojas más pequeñas debido a una

Genes SAUR	AGI	Sitios de unión TCP
1	AT4G34770	
3	AT4G34790	GGCCCC / TGGACCCAC
13	AT4G38825	GGGCCCTC / GGTCCCAC
14	AT4G38840	GGGCCC
15	AT4G38850	GGGCCC
19	AT5G18010	GGTCCC
20	AT5G18020	GGTCCC
21	AT5G18030	GGTCCCA
22	AT5G18050	
24	AT5G18080	GGTCCC
26	AT3G03850	TGGTCCCA
27	AT3G03840	
28	AT3G03830	
29	AT3G03820	
47	AT3G20220	
50	AT4G34760	GGGGCCAC
56	AT1G76190	
61	AT1G29420	GGGACCCC
62	AT1G29430	TGGGACCA
63	AT1G29440	TGGGACCC
64	AT1G29450	TGGACCC / TGGGACCC
65	AT1G29460	GAGGACCCGC / TGGGACCTC
66	AT1G29500	TGGGACCC / GGACCC
67	AT1G29510	TGGGACCC
68	AT1G29490	
75	AT5G27780	GGTCCCAC

Tabla 8.1: Genes SAUR regulados negativamente en plantas p15::AtTCP15-EAR. De los 81 genes SAUR de *A. thaliana*, 26 muestran menores niveles de expresión en las plantas que expresan la fusión y 18 de ellos tienen sitios de unión de proteínas TCP en sus promotores.

menor expansión celular. Al igual que en estas plantas, las células epidérmicas de las hojas de plantas p15::AtTCP15-EAR son más pequeñas que las salvajes (Fig. 8.4 C) y presentan menores niveles de expresión de diversos genes SAUR, entre ellos SAUR19 (Fig. 8.11 G). Para demostrar fehacientemente en qué medida la morfología de las hojas de plantas p15::AtTCP15-EAR es debida a la menor expresión de los genes SAUR, sería interesante sobreexpresar SAUR19 u otros genes SAUR en las plantas que expresan AtTCP15-EAR, y analizar si se produce una reversión del fenotipo. En este momento contamos en el laboratorio con plantas que sobreexpresan fusiones GFP-SAUR, cedidas gentilmente por el Dr. William Gray de la Universidad de Minnesota (Spartz y col.,

2012), las cuales han sido cruzadas con plantas p15::AtTCP15-EAR. El análisis de estos cruzamientos permitirá dilucidar la relación que existe entre AtTCP15 y los genes *SAUR* respecto de la morfología de las hojas de *A. thaliana*.

Por otro lado, al describir el fenotipo de plantas AtTCP15-OE, mencionamos que las hojas de la roseta presentaban mayor cantidad de aserramientos que las plantas salvajes, un fenotipo normalmente relacionado con un aumento de la biosíntesis de CK (Rupp y col., 1999) o con la respuesta a un tratamiento con CK exógenas (Greenboim-Wainberg y col., 2005). Recientemente, Steiner y colaboradores (2012) reportaron que las mutantes dobles *tcp14tcp15* no presentan aserramientos en las hojas, un fenotipo similar al de las mutantes *spy*. SPY es una N-acetilglucosamina transferasa conocida por mediar la respuesta a CK durante la formación de los aserramientos en hojas y los tricomas en sépalos (Greenboim-Wainberg y col., 2005). Al igual que *spy*, *tcp14tcp15* es menos sensible a la aplicación de CK exógenas y, en contraposición, las plantas que sobreexpresan AtTCP14 muestran una sensibilidad aumentada a esta hormona (Steiner y col., 2012). Por lo tanto, decidimos tratar las plantas AtTCP15-OE con CK a fin de estudiar su comportamiento ante esta hormona. Las plantas fueron tratadas a partir de los 20 días luego de la germinación con 100 μ M BAP, 5 veces por semana. En la Figura 8.11 L, M se puede ver que las hojas de la roseta de plantas AtTCP15-OE presentan una mayor cantidad de aserramientos que las plantas salvajes, y que éstos son más marcados, demostrando una mayor sensibilidad a CK. Steiner y col. (2012) proponen un modelo en el cual, en respuesta a CK, SPY activaría AtTCP14 y AtTCP15 a través de una modificación post-traducciona, lo cual promovería la generación de los aserramientos en los márgenes de las hojas. Nosotros encontramos, además, que las CK inducen la expresión de *AtTCP15*. Por lo tanto, podemos postular que AtTCP15 participaría en la respuesta a CK, y que ejerce su función en respuesta a una activación transcripcional y post-traducciona promovida por esta hormona.

Sumado a estos resultados, los datos obtenidos del microarreglo indican que dos genes que codifican reguladores de respuesta a CK (ARR) de tipo A, *ARR7* y *ARR15*, presentan niveles de expresión disminuidos en las plantas p15::AtTCP15-EAR. Los genes *ARR* de tipo A son transcripcionalmente inducidos por CK y sus productos regulan negativamente la respuesta a esta hormona (Imamura y col., 1999; D'Agostino y col., 2000; To y col., 2004). Para comprobar estos resultados, realizamos

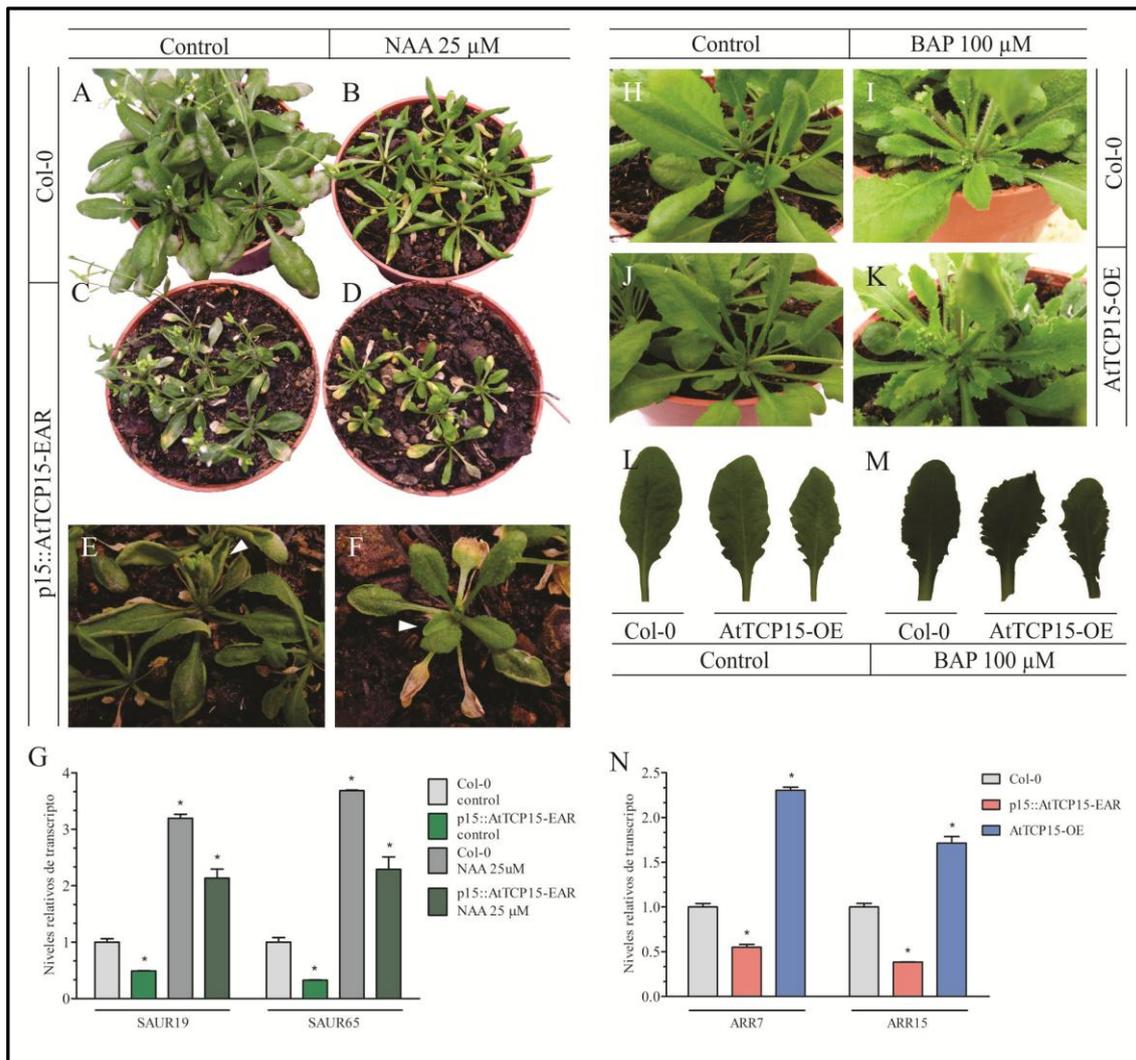


Figura 8.11: Relación de AtTCP15 con auxinas y CK en hojas. (A-D) Plantas salvajes (A, B) y p15::AtTCP15-EAR (C, D), crecidas en condiciones control (A, C) o tratadas con NAA 25 μ M (B, D). Nótese la severa epinastia generada por el tratamiento en las hojas de la roseta de las plantas salvajes (B), así como la reversión de la hiponastia de las hojas de las plantas p15::AtTCP15-EAR (D). (E, F) Primer plano de plantas p15::AtTCP15-EAR en condiciones control (E) o tratadas con NAA 25 μ M (F). Las puntas de flechas indican las hojas caulinares. (G) Niveles de expresión de los genes SAUR19 y SAUR65 en las hojas de las plantas en las condiciones de tratamiento descritas en (A-D). (H-K) Plantas salvajes (H, I) y AtTCP15-OE (J, K), crecidas en condiciones control (H, J) o tratadas con BAP 100 μ M (I, K). Nótese el marcado aumento en el aserramiento de las hojas de las plantas AtTCP15-OE luego del tratamiento con CK. (L, M) Detalle de las hojas de roseta, en condiciones control o tratadas con CK respectivamente, donde pueden apreciarse los aserramientos en mayor detalle. (N) Niveles de expresión de los genes ARR7 y ARR15 en plantas salvajes, p15::AtTCP15-EAR y AtTCP15-OE.

mediciones cuantitativas de los niveles de transcritos de *ARR7* y *ARR15* en plantas p15::AtTCP15-EAR y AtTCP15-OE. Puede verse que los niveles de transcritos de ambos genes están disminuidos en las plantas p15::AtTCP15-EAR y aumentados en las plantas AtTCP15-OE (Fig. 8.11 N). Es interesante destacar, además, que *ARR7* y

ARR15 tienen en sus promotores sitios de unión de AtTCP15, lo cual los convierte en posibles blancos directos del factor de transcripción. Si bien no hemos podido comprobar aún la unión de AtTCP15 a las regiones promotoras de estos genes, estamos llevando a cabo los ensayos necesarios para demostrar la interacción tanto *in vitro* como *in vivo*.

Resumiendo los resultados presentados hasta el momento, podemos concluir que AtTCP15 no sólo sería inducida por CK, sino que también mediaría la respuesta a esta hormona en hojas. Además, AtTCP15 regularía la respuesta a CK, reforzando la retroalimentación negativa clásica de esta respuesta al activar la transcripción de *ARR7* y *ARR15*.

8.14 AtTCP15 y su relación con las vías de regulación de auxinas y citoquininas en flores

Las flores de las plantas que expresan tanto la forma nativa como la forma represora de AtTCP15 presentan una gran cantidad de alteraciones morfológicas en los 4 verticilos. A fin de abordar el estudio de las modificaciones fenotípicas observadas en estas plantas, decidimos evaluar las alteraciones de cada verticilo por separado.

Las primeras evidencias de anomalías fenotípicas fueron observadas en los sépalos. Los sépalos de las plantas p15::AtTCP15-EAR carecen de tricomas mientras que, en contraposición, los de las plantas AtTCP15-OE presentan mayor cantidad de éstos que las plantas salvajes (Fig. 8.12 A, C). Dado que se conoce que la formación de los tricomas es regulada tanto por GA como por CK (Chien y Sussex, 1996; Greenboim-Wainberg y col., 2005), y habiendo determinado la relación entre AtTCP15 y CK, decidimos estudiar el efecto de un tratamiento con esta hormona sobre el desarrollo de los tricomas de los sépalos. Como puede verse en la Figura 8.12 B, D, los sépalos de las plantas p15::AtTCP15-EAR desarrollan tricomas, aunque en menor medida que las plantas salvajes, luego del tratamiento con CK. Este resultado sugiere que este proceso es regulado no sólo por AtTCP15, sino también por una vía independiente a esta TCP, dado que si AtTCP15 fuera la responsable única de mediar la respuesta a CK en relación con la formación de tricomas, las plantas que expresan la forma represora deberían ser insensibles al tratamiento. Además, dado que AtTCP15 es

inducida por CK, se esperaría que la inhibición del desarrollo de tricomas sea aún mayor que antes del tratamiento. En 2007, Gan y colaboradores propusieron un modelo para la regulación del desarrollo de los tricomas de los sépalos, en el cual GA y CK promueven la formación de tricomas a partir de la activación de los factores de transcripción GIS, ZFP8 y GIS2, los cuales a su vez regulan positivamente la expresión de GL1. En medio de ambas hormonas se encuentra SPY, quien regula negativamente la respuesta a GA pero positivamente la respuesta a CK. Recientemente, Steiner y colaboradores (2012) reportaron que AtTCP14 y AtTCP15 promueven la formación de tricomas en los sépalos, de manera dependiente de SPY y CK. Por lo tanto, es posible que el desarrollo de tricomas en los sépalos de AtTCP15-EAR se deba a la activación de AtTCP14 mediada por CK, la cual podría estar compitiendo con AtTCP15 debido al solapamiento de sus funciones.

Las anteras también presentan fenotipos opuestos entre las plantas p15::AtTCP15-EAR y AtTCP15-OE. Mientras que las anteras de las primeras tienen filamentos más cortos que las de plantas salvajes, las anteras de plantas AtTCP15-OE están más elongadas que las de las flores normales al momento de la antesis (Fig. 8.6 P y Fig. 8.12 E, F, respectivamente). Recientemente, Chae y colaboradores (2012)

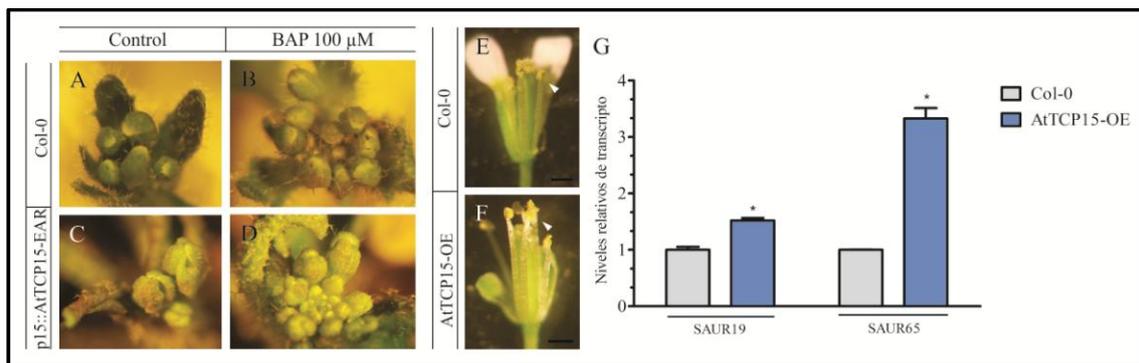


Figura 8.12: Relación de AtTCP15 con auxinas y CK en flores. (A-D) Plantas salvajes (A, B) y p15::AtTCP15-EAR (C, D), crecidas en condiciones control (A, C) o tratadas con BAP 100 μM (B, D). Nótese la ausencia de tricomas en los sépalos de las plantas p15::AtTCP15-EAR (C), y la aparición de los mismos luego del tratamiento con CK (D), aunque en menor medida que en las plantas salvajes (B). (E, F) Flores de plantas salvajes y AtTCP15-OE en estadio 14 (post-antesis). Las puntas de flecha indican el extremo superior del filamento de anteras, que llega al extremo distal del gineceo en las plantas salvajes, pero lo sobrepasa en las plantas AtTCP15-OE. (G) Niveles relativos de expresión de los genes SAUR19 y SAUR65 en las flores de plantas AtTCP15-OE y salvajes.

demonstraron que la sobreexpresión de una forma estabilizada de SAUR63 (GFP-SAUR63) produce filamentos de anteras más largos que los salvajes. Al medir los niveles de expresión de SAUR65 (muy similar a SAUR63, ya que forman parte de la misma subfamilia) en las flores de las plantas AtTCP15-OE pudimos ver un aumento en la expresión, al igual que en el caso de SAUR19 (Fig. 8.12 G). Dado que estos genes están reprimidos en las plantas p15::AtTCP15-EAR (Fig. 8.11 G), podemos postular que AtTCP15 promovería el desarrollo y la elongación de los filamentos de anteras a través de la regulación (posiblemente directa) de genes SAUR.

Por último, discutiremos los resultados obtenidos en relación con los carpelos de las plantas p15::AtTCP15-EAR y AtTCP15-OE, así como su respuesta a los tratamientos con auxinas y CK. Como describimos en los apartados relacionados con los fenotipos producidos por cada una de las construcciones, los carpelos de las plantas p15::AtTCP15-EAR presentan crecimientos ectópicos a lo largo de replum, los cuales comienzan a desarrollarse en el estadio 10-11 de la flor y continúan creciendo hasta formar estructuras filamentosas coronadas por papilas estigmáticas (Fig. 8.6 C-G). Por el contrario, las flores de las plantas AtTCP15-OE presentan carpelos no fusionados en sus extremos distales, con escasa o nula formación de estilo y papilas estigmáticas (Fig. 8.9 J-O).

Hasta el momento, el único trabajo que hemos encontrado en el cual se reporta el crecimiento de estructuras ectópicas en los carpelos de *A. thaliana* es el de Larue y col. (2009), donde se estudian las plantas *cuc2-ID*, mutantes de ganancia de función del gen *CUC2*. Por el contrario, existe una gran cantidad de bibliografía acerca de los genes que regulan la fusión de los carpelos y el desarrollo del estilo y el estigma: entre ellos se puede citar a *AINTEGUMENTA (ANT)*, *CRABS CLAW (CRC)*, *ETTIN (ETT)*, *JAGGED (JAG)*, *LEUNIG (LUG)*, *SEUSS (SEU)*, *NGATHA (NGA)*, *HECATE (HEC)*, *SHATERPROOF (SHP)*, *SPATULA (SPT)* y *STYLISH 1 (STY1)* (Liu y Meyerowitz, 1995; Sessions y Zambryski; 1995; Elliott y col., 1996; Alvarez y Smyth, 1999; Heisler y col., 2001; Franks y col., 2002; Kuusk y col., 2002; Ohno y col., 2004; Gremski y col., 2007; Colombo y col., 2010; Trigueros y col., 2009). Nemhauser y col. (2000) propusieron que el correcto desarrollo del gineceo está dado por la formación de un gradiente de auxinas, con un pico en el extremo apical disminuyendo hacia las regiones basales. Años después, se reportó que STY1 y proteínas NGA promueven la expresión

de *YUC4* en el extremo distal del gineceo, y que esta expresión genera el gradiente propuesto por Nemhauser y colaboradores (Cheng y col., 2006; Sohlberg y col., 2006; Trigueros y col., 2009). Más aún, Ståldal y colaboradores (2008) demostraron que las auxinas son capaces de promover el desarrollo del estilo y el estigma de manera independiente a *STY1/2*, *LUG*, *SEU*, *SPT*, *ETT*, *ANT*, *JAG* o *CRC*, lo que sugiere que actuarían corriente abajo o en paralelo con estos factores. Como hemos mencionado anteriormente, los niveles de expresión de *YUC1* y *YUC4* están disminuidos en las plantas *AtTCP15-OE* (Fig. 8.10 L) y, en concordancia con esto, también la concentración de IAA (Fig. 8.10 M). Por lo tanto, es probable que el fenotipo observado en los carpelos de las plantas *AtTCP15-OE* sea una consecuencia de la disminución de la biosíntesis de auxinas, especialmente por la represión de los genes *YUC* mencionados.

En contraposición, en los gineceos de las plantas *p15::AtTCP15-EAR* la situación debería ser la opuesta, con elevados niveles de biosíntesis de auxinas debido al aumento en la expresión de *YUC1* y *YUC4* (Fig. 8.10 L). En sólo un trabajo se ha reportado que el exceso de auxinas en los carpelos genera la formación de estructuras compuestas por células uniformes de tipo replum o estilo y terminadas en papilas estigmáticas (Ståldal y col., 2008). Dado que las auxinas podrían desplazarse a lo largo del gineceo, y que son promotoras de la formación de órganos secundarios, sumado a que el tejido del replum retiene características meristemáticas y presenta naturalmente un máximo de auxinas respecto a los márgenes y las valvas (Ferrandiz y col., 2010), es posible que sobre el replum de las plantas *p15::AtTCP15-EAR* se formen diversos puntos en los cuales las auxinas se acumulen, promoviendo la proliferación y división celular y generando el crecimiento de las estructuras observadas. Además, cabe recordar que los niveles de expresión de *CUC1* y *CUC2* están aumentados en las flores de las plantas *p15::AtTCP15-EAR*, y que plantas con elevados niveles de *CUC2* (Larue y col., 2009) también presentan este tipo de estructuras sobre el replum.

Por otro lado, resulta interesante el efecto observado en los gineceos de las plantas *p15::AtTCP15-EAR* y *AtTCP15-OE* luego de un tratamiento con CK. Como puede verse en la Figura 8.12 D-E, el tratamiento con BAP profundiza el fenotipo de las plantas *p15::AtTCP15-EAR*, generando el crecimiento de una estructura de tipo laminar a lo largo del replum, o en los márgenes entre el replum y las valvas, completamente

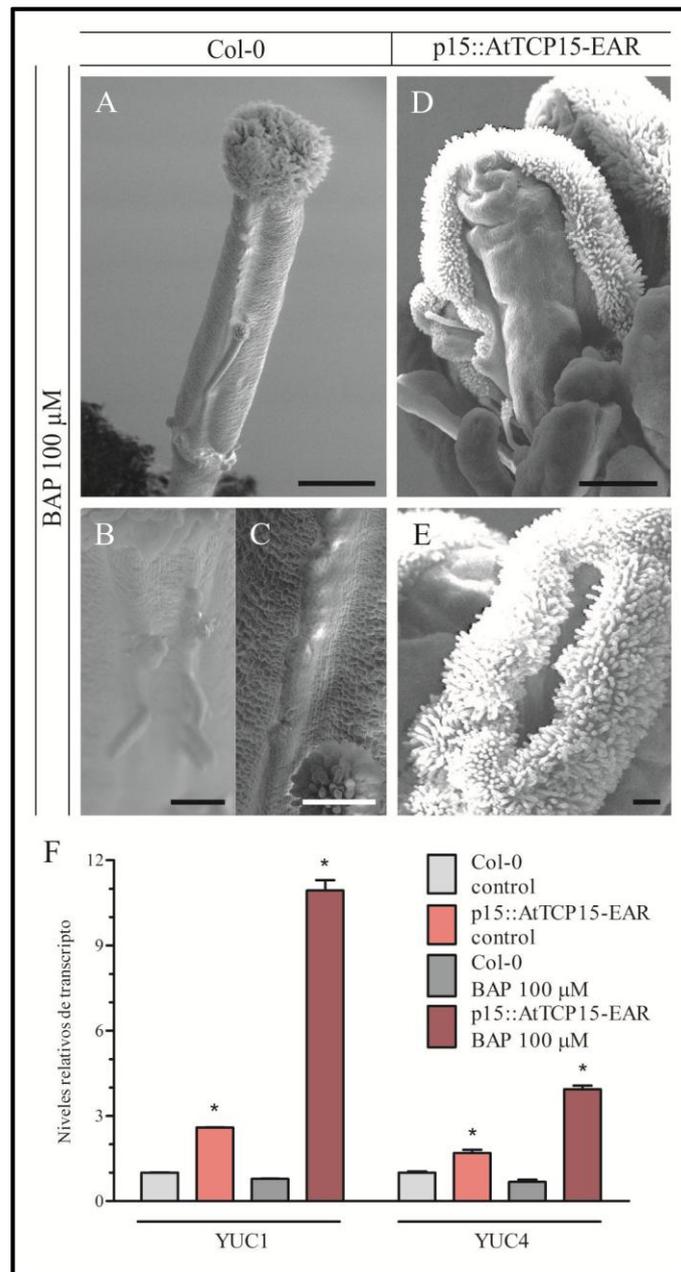


Figura 8.13: Efecto de CK sobre flores de plantas *p15::AtTCP15-EAR*. (A) Gineceo maduro (estadio 13-14) de flor salvaje tratada con BAP 100 μ M. Obsérvese el crecimiento de estructuras filamentosas coronadas por papilas estigmáticas sobre el replum. (B, C) Detalle de los crecimientos ectópicos observados en (A), donde puede verse que los mismos surgen tanto desde los márgenes de las valvas (B) como del replum (C). (D) Gineceo maduro de flor *p15::AtTCP15-EAR* tratada con BAP 100 μ M. Nótese la formación de una estructura laminar coronada por papilas estigmáticas creciendo sobre todo el replum y la irregularidad de la superficie de las valvas. (E) Detalle lateral de las papilas estigmáticas ectópicas formadas sobre los carpelos de plantas *p15::AtTCP15-EAR*. Al igual que en las plantas salvajes, estos crecimientos surgen tanto del replum (D) como de los márgenes de las valvas (E). (F) Niveles de expresión relativos de los genes *YUC1* y *YUC4* en flores salvajes y *p15::AtTCP15-EAR*, en condiciones control y luego del tratamiento con CK. Barras de tamaño: (A, D) 500 μ m, (B, C, E) 100 μ m.

cubierta por papilas estigmáticas. El exceso de proliferación del replum ante un tratamiento con CK ha sido recientemente reportado por Marsch-Martinez y colaboradores (2012), y nosotros lo corroboramos en nuestras condiciones de trabajo (Fig. 8.13 A-C). Probablemente, el exacerbado fenotipo de los gineceos de las plantas p15::AtTCP15-EAR se deba a un aumento de los niveles de expresión de la forma represora, ya que la fusión está expresada bajo el control del promotor propio y su expresión es inducida por CK. Además, también ha sido reportado que las CK promueven la biosíntesis de auxinas a través de la inducción de la expresión de diversos genes, entre ellos los genes *YUC* (Jones y col., 2010) y que, como mencionamos anteriormente, la expresión de *YUC4* en el extremo distal de los carpelos es indispensable para la formación del estilo y las papilas estigmáticas (Ståldal y col., 2008). A pesar de que no observamos alteraciones significativas en los niveles de expresión de *YUC1* y *YUC4* en las flores salvajes luego del tratamiento con CK, la inducción de ambos genes en las flores p15::AtTCP15-EAR es de entre 10 y 4 veces, respectivamente (Fig. 8.13 F). En base a estos resultados, es posible que la sobreexpresión de *YUC1* y *YUC4* en las flores p15::AtTCP15-EAR sea responsable de la diferenciación de los tejidos ectópicos en estructuras coronadas por papilas estigmáticas.

Por otro lado, el resultado obtenido al tratar con CK las plantas AtTCP15-OE es completamente diferente. Como se puede ver en la Figura 8.13, el tratamiento con CK induce una elevada proliferación de tejidos, los cuales surgen principalmente del replum y la región basal del gineceo (Fig. 8.14 D). Dichos tejidos dan lugar a estructuras carpeloides altamente ramificadas (Fig. 8.14 D, G), formadas por células similares a las del replum o el estilo (Fig. 8.14 H), generalmente terminadas en papilas estigmáticas (Fig. 8.14 D). En los casos más extremos, observamos la generación de flores dentro de flores, las cuales se desarrollan a partir de la región del ginóforo (Fig. 8.14 E), o la formación de estructuras petaloides y sepaloides, a partir de las cuales se desarrollan papilas estigmáticas e incluso óvulos (Fig. 8.14 F-K). La cantidad de estructuras diversas generadas sobre los carpelos de las plantas AtTCP15-OE da a entender que las células, luego del tratamiento con CK, adquieren la capacidad de desdiferenciarse, proliferar y volver a diferenciarse en diversos tipos de tejidos. Es decir que, luego del tratamiento con CK, las células de los carpelos de plantas AtTCP15-OE adquieren

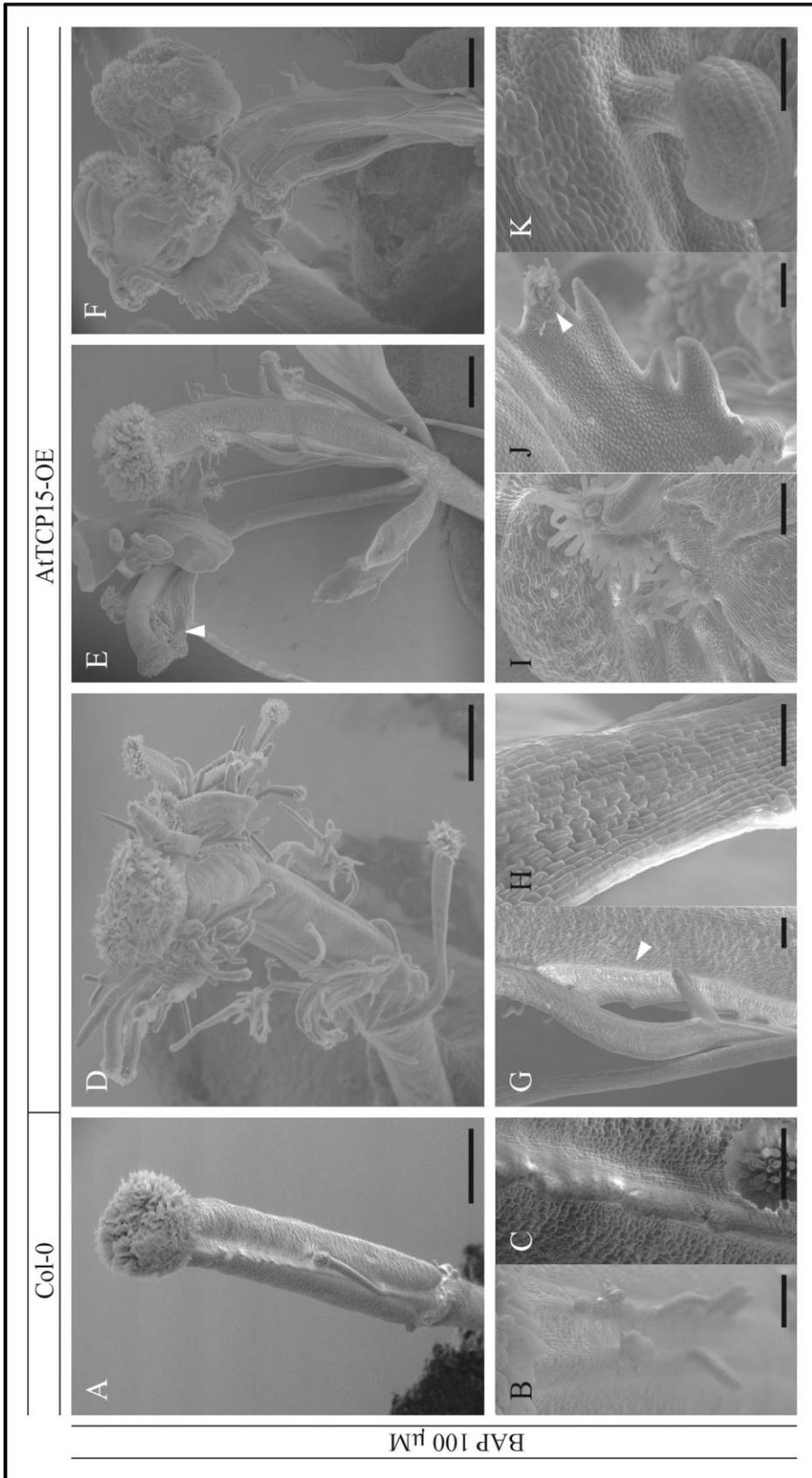


Figura 8.14: Efecto de CK sobre flores de plantas *AtTCP15-OE*. (A) Gineceo maduro (estadio 13-14) de flor salvaje tratada con BAP 100 μM . Obsérvese el crecimiento de estructuras filamentosas coronadas por papilas estigmáticas sobre el replum. (B, C) Detalle de los crecimientos ectópicos observados en (A), donde puede verse que los mismos surgen tanto desde los márgenes de las valvas (B) como del replum (C). (D-F) Gineceos maduros de flores *AtTCP15::OE* tratadas con BAP. (D) Nótese el desarrollo de estructuras carpeloideas ramificadas (puntas de flecha), terminadas en papilas estigmáticas, sobre el replum y la región del ginóforo. (Continúa en la página siguiente)

Figura 8.14: (cont.) (E) Desarrollo de una flor a partir del ginóforo de otra. Obsérvese que la flor pequeña presenta los 4 verticilos, aunque la fusión de los carpelos no es completa en el extremo distal (punta de flecha). (F) Sobreproducción de tejidos diversos en el extremo distal del gineceo. (G, H) Detalle de (F), donde puede verse el crecimiento del replum (punta de flecha en G), y la ramificación de la estructura carpeloide, formada por células tipo replum (H). (I-K) Detalle del extremo distal del gineceo mostrado en (F). (I) Estructuras de morfología y tipo celular sepaloide, con papilas estigmáticas en los márgenes. (J) Estructura petaloide (tipo celular cónico), con desarrollo de estigma en los extremos de los aserramientos (punta de flecha). (K) Formación de un óvulo a partir de tejido de características petaloides. Barras de tamaño: (A, D, E, F) 500 μm , (B, C, G, I, J) 100 μm , (H, K) 50 μm .

propiedades meristemáticas. Es sabido que los meristemas se mantienen como tales gracias a la expresión de ciertos genes capaces de conservar el estado indiferenciado de las células y que éstos promueven la biosíntesis de CK, haciendo que la relación CK/auxinas sea máxima en los meristemas apicales o florales (Su y col., 2011). Teniendo en cuenta que las plantas AtTCP15-OE tienen bajos niveles de auxinas, es posible que las células de estas plantas se encuentren en un estado más susceptible al efecto desdiferenciador de las CK.

En un intento por aclarar los procesos que ocurren en los gineceos ante un tratamiento con CK, decidimos estudiar los cambios en la expresión de los genes de meristema *STM*, *KNATI* y *CUC1* luego del tratamiento con la hormona. En los tres casos, la expresión de los genes se extiende fuera de los dominios habituales, hacia las regiones apicales del gineceo y el replum. Como puede verse en la Figura 8.15, la expresión de estos genes se mantiene en el tiempo, incluso cuando los crecimientos ectópicos sobre el replum se encuentran en estadios avanzados de desarrollo. Además, pudimos observar la expresión del reportero DR5 en el extremo de los filamentos (Fig. 8.14 G), tal como lo reportaran Marsch-Martinez y col. (2012), lo cual sugiere que el máximo de auxinas es necesario para la formación de este tipo de estructuras. En la región apical del gineceo. De acuerdo a esto, será interesante determinar qué ocurre con los patrones de expresión de estos genes luego del tratamiento con CK en plantas con niveles alterados de AtTCP15.

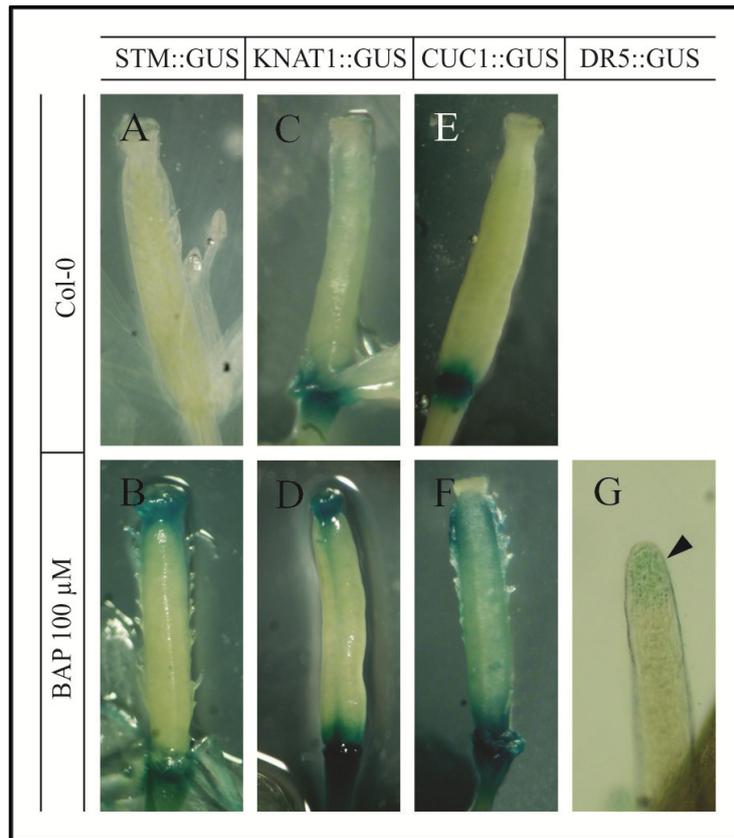


Figura 8.15: El tratamiento con CK provoca la expresión ectópica de genes de meristema y DR5 en carpelos. Los ensayos histoquímicos se realizaron luego de un tratamiento prolongado de las plantas reporteras con BAP 100 μ M, de acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. (A, B) La expresión del gen reportero gus bajo el control del promotor de STM desaparece en el gineceo de flores maduras, pero se expresa especialmente en los extremos distales y basales luego del tratamiento con CK. (C-F) La expresión de KNAT1 y CUC1 se restringe a los pedúnculos en flores maduras (C y E, respectivamente), pero la región de expresión se extiende al extremo distal de los carpelos y la región apical del replum en el caso de KNAT1 (D) y al replum y las valvas en el caso de CUC1 (F). (G) Expresión de DR5 en el extremo de un filamento surgido del replum de plantas DR5::GUS tratadas con CK.

En conclusión, estos resultados nos permiten postular que AtTCP15 es fundamental para el correcto desarrollo de las flores, ya que está involucrada en la formación de los tricomas de los sépalos, en conjunto con las CK, en la elongación de los filamentos de las anteras, probablemente a través de la regulación de los genes *SAUR*, y en el desarrollo del gineceo, regulando la biosíntesis de auxinas y la respuesta a CK.

CONCLUSIONES

9 CONCLUSIONES

AtTCP11, AtTCP15 y AtTCP16 son factores de transcripción de *A. thaliana*, pertenecientes a la familia de factores TCP de clase I, exclusivos del reino vegetal. Durante el desarrollo de este trabajo de tesis, hemos estudiado a estos factores de transcripción a través de diversos métodos y con variadas estrategias que nos han permitido dilucidar, al menos en parte, su función en este organismo modelo.

AtTCP11 se expresa en los diferentes estadios de la planta, desde meristema y primordios de hojas en plántulas, hasta en hojas y granos de polen en plantas maduras. La expresión de la forma represora dominante AtTCP11-EAR afecta principalmente el desarrollo de tallos secundarios, hojas, pecíolos y pedúnculos, sugiriendo que AtTCP11 participa en la regulación del desarrollo de órganos secundarios. Además, AtTCP11 parece tener un rol importante en el desarrollo de los granos de polen. El hecho de que las anomalías morfológicas ocurran en los mismos órganos donde se detecta la expresión del gen es un indicio de que su función está asociada a estos órganos, posiblemente relacionada con la regulación de la proliferación o la expansión celular. Por otro lado, la expresión ectópica de la forma nativa de AtTCP11 no genera diferencias morfológicas observables respecto de las plantas salvajes, sugiriendo que la funcionalidad de AtTCP11 podría requerir la actuación de un factor o factores adicionales, que podrían ser limitantes. Esto no sería extraño, ya que se ha demostrado que AtTCP11 es capaz de unirse al ADN en forma de homo o heterodímeros con otras proteínas TCP de clase I, siendo la eficiencia de dichas uniones mayor en el caso de los heterodímeros (Viola y col., 2011). Los factores que interactúan con AtTCP11 *in vivo*, así como los genes blancos de este factor de transcripción, aún deben ser determinados.

La expresión de AtTCP16 se detecta especialmente en cotiledones, hojas y flores. Las mutantes *tcp16* presentan alteraciones morfológicas leves, que implican el desarrollo de flores con 5 pétalos y la generación de inflorescencias con mayor número de ramificaciones secundarias y de pimpollos. La expresión de la forma represora de AtTCP16 genera plantas con cotiledones lobulados, hojas de roseta y caulinares

redondeadas y flores en las que los verticilos externos no se elongan correctamente. Además, estas plantas desarrollan meristemas ectópicos sobre la cara adaxial de los cotiledones, los cuales se generan exclusivamente sobre una bifurcación del haz vascular central de los cotiledones. Estos meristemas ectópicos expresan genes característicos de estas estructuras, tales como *STM*, *KNAT1*, *CUC1* y *CLV3*, y retienen todas las características propias de un meristema apical, ya que son capaces de desarrollar hojas, flores, vainas y semillas. El grado de desarrollo de estos meristemas ectópicos disminuye cuando AtTCP16-EAR se expresa en plantas con alteraciones en la función de *STM*, lo cual indica que esta proteína es necesaria, al menos parcialmente, para la formación de los meristemas ectópicos. Del mismo modo, la aparición de los meristemas ectópicos demuestra la participación de AtTCP16 en la regulación de la expresión de ciertos genes exclusivos de meristema.

La expresión de AtTCP15 parece no ser vital para *A. thaliana*, dado que la línea mutante carente de esta proteína es capaz de continuar su ciclo biológico sin mayores alteraciones, lo cual es usual entre las proteínas TCP debido a la gran redundancia funcional entre sus miembros. Sin embargo, la función de AtTCP15 se hace evidente al convertirla en una forma represora dominante, y la comparación entre el fenotipo de las plantas que expresan esta forma con aquellas que expresan AtTCP15 de manera ectópica permiten concluir que la misma es una proteína activadora de la transcripción. Hemos encontrado dos posibles blancos directos de AtTCP15, *IAA3/SHY2* y *SAUR65*, y comprobado, al menos *in vitro*, la unión de AtTCP15 a los sitios TCP presentes en los promotores de estos genes. En este punto, es interesante recordar que ambos genes son blancos directos de otra proteína TCP, AtTCP3, miembro de la clase II. Esto indica que AtTCP15 y AtTCP3 afectarían el desarrollo vegetal mediante vías parcialmente solapadas.

La función de AtTCP15 es importante para la correcta morfología de *A. thaliana*, y su efecto parecer ser ubicuo y mantenerse a lo largo de todos los estadios y órganos de la planta. En hojas, afecta principalmente la formación de la lámina y de los aserramientos de los márgenes de la misma. En el primer caso, el efecto parece estar ligado a la modificación de la homeostasis de auxinas y a los cambios en los niveles de expresión de genes *SAUR*, entre ellos *SAUR19* y *SAUR65*. Comprobar estos resultados abrirá nuevos caminos, no sólo respecto de la función de AtTCP15 sino de la regulación

de la morfología de los órganos mediada por auxinas y sus vías de respuesta. AtTCP15 estaría involucrada en la regulación de la homeostasis de auxinas, así como en los procesos que esta hormona controla, a dos niveles. Por un lado, es capaz de regular de manera indirecta la expresión de genes claves para su biosíntesis (*YUC1* y *YUC4*), al tiempo que es capaz de regular, probablemente en forma directa, la expresión de genes de respuesta a esta hormona. Es posible que la continuidad de estos estudios nos permitan encontrar una nueva función para los genes *SAUR*, independiente de su respuesta a auxinas y vinculada con AtTCP15, en el control de la morfología de la lámina de las hojas.

Por otro lado, la regulación de la respuesta a CK también está alterada en las plantas que expresan distintas formas de AtTCP15. *ARR7* y *ARR15*, genes de respuesta a CK y reguladores negativos de la misma, poseen sitios TCP en sus promotores y sus niveles de expresión se encuentran alterados en nuestras plantas, lo que permitiría postularlos como posibles blancos directos de AtTCP15. Además, AtTCP15 parece mediar al menos en parte la respuesta a CK, dado que las plantas que sobreexpresan la forma nativa poseen mayor cantidad y profundidad de aserramientos que las hojas salvajes, una característica normalmente asociada a mayores niveles de respuesta a esta hormona (Rupp y col., 1999; Greenboim-Wainberg y col., 2005). Por lo tanto, es posible que AtTCP15 promueva la respuesta a CK en hojas, reforzando a su vez la retroalimentación negativa de la respuesta característica de esta hormona a través de la activación de la expresión de *ARR7* y *ARR15*. Además, en los últimos años se ha propuesto que la formación de los aserramientos en los márgenes de las hojas depende de la interacción entre las auxinas y *CUC2* (Bilsborough y col., 2011), y cabe recordar que ambos son regulados por AtTCP15. Por lo tanto, es posible que AtTCP15 sea un punto de convergencia entre auxinas, CK y genes *CUC*, necesarios para la regulación de la formación de los aserramientos en los márgenes de las hojas.

AtTCP15 también tiene un rol importante en el control de la morfología de los órganos florales, especialmente del gineceo. La correcta formación de este órgano depende de la expresión de un gran número de genes (Ferrandiz y col., 2010), así como de la formación de un máximo de auxinas en el extremo distal del mismo (Nemhauser y col., 2000), generado principalmente por la expresión de *YUC4* (Cheng y col., 2006; Sohlberg y col., 2006; Trigueros y col., 2009). En las plantas que sobreexpresan

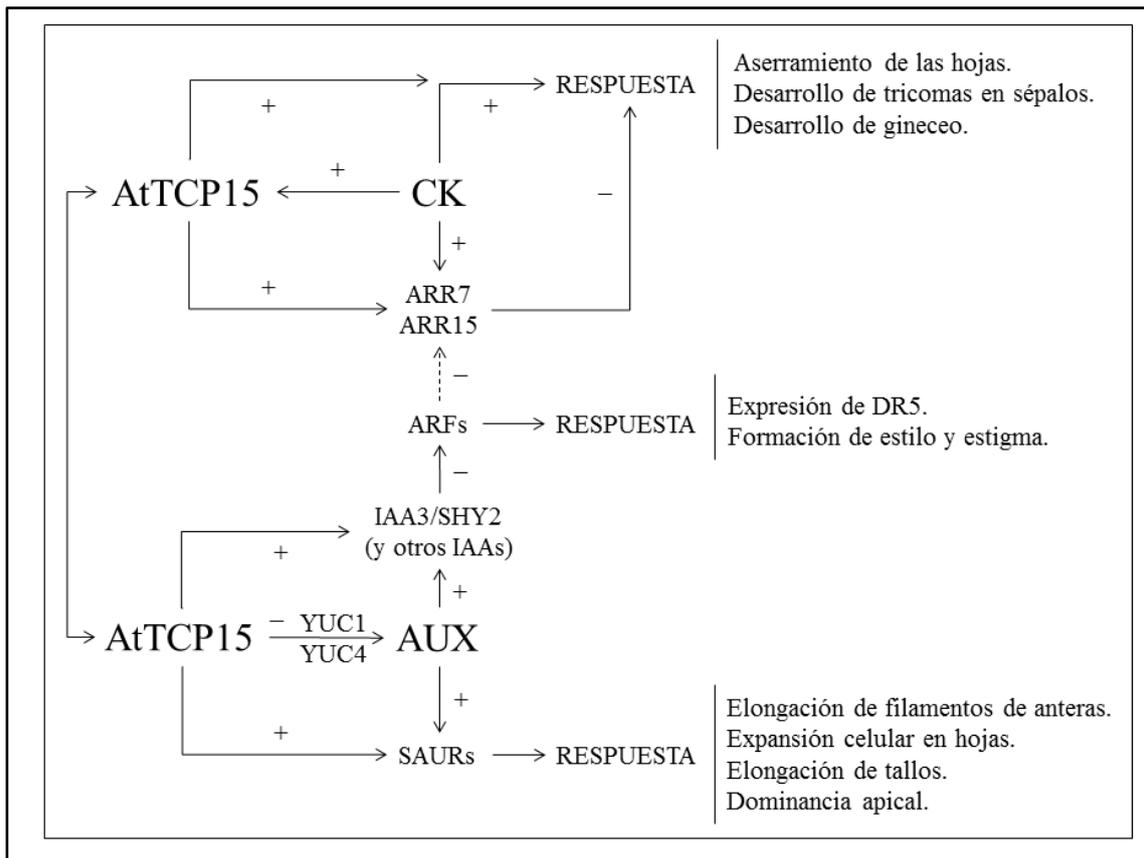


Figura 9.1: *AtTCP15* y su interacción con las vías de regulación de auxinas y CK. A modo de resumen, se presenta un cuadro sinóptico que representa las interacciones de *AtTCP15* con las vías de auxinas y CK, y su influencia en la regulación del desarrollo de *A. thaliana*.

AtTCP15, el extremo distal de los carpelos no se encuentra fusionado, y los tejidos marginales de carpelos, estilo y estigma, no se forman adecuadamente. De acuerdo con esto, los niveles de expresión de *YUC1* y *YUC4* se encuentran disminuidos en estas plantas, así como la concentración de auxinas. Por lo tanto, es posible que los menores niveles de auxinas sean responsables del fenotipo observado en los gineceos de *AtTCP15*.

AtTCP15 modifica la respuesta de las plantas a CK también durante el desarrollo del gineceo. Por un lado, en las plantas *p15::AtTCP15-EAR* se exagera la formación de estructuras laminares y papilas estigmáticas a lo largo del replum, lo cual podría ser causado por una activación de *AtTCP15* tanto a nivel transcripcional como post-traducciona (Steiner y col., 2012). En estas plantas, las CK promueven un aumento en los niveles de transcripto de *YUC1* y *YUC4*. Dado que estos genes están

involucrados en la formación de estilo y estigma, la sobreproducción de estructuras terminadas en estigma podría ser causada por dicho aumento que, a su vez, produciría un aumento en los niveles de auxinas en las plantas p15::AtTCP15-EAR. Por otro lado, en plantas que sobreexpresan AtTCP15, la aplicación de CK exógenas genera el crecimiento de una gran cantidad de estructuras carpeloides, sepaloideas y petaloideas a partir del gineceo, e incluso da lugar a la formación de flores completas a partir del ginóforo de otras. Esto sugiere que las células de estos gineceos estarían expuestas a condiciones que permiten su reversión a un estado indiferenciado, el que sería provocado por el tratamiento con la hormona. El hecho de que el tratamiento con CK promueve la expresión ectópica de genes de meristema, tales como *STM*, *KNATI* y *CUCI* en carpelos maduros, apoya esta conclusión. Una posibilidad es que, dado que los carpelos de las plantas AtTCP15-OE tendrían menores niveles de auxinas, las células estarían expuestas a una relación CK/auxinas alta, más similar a la que se encuentra en los meristemas (Su y col., 2011). En suma, AtTCP15 es una pieza importante para la correcta formación de los carpelos, regulando la biosíntesis de auxinas y la respuesta de las células a CK. Además de esto, AtTCP15 promueve la formación de tricomas en los sépalos y regula la elongación de los filamentos de anteras, esto último posiblemente a través del control de la expresión de genes *SAUR*. En general, se puede decir que AtTCP15 actúa de manera ubicua en *A. thaliana*, participando en el desarrollo de diversos órganos, especialmente a través de su participación a distintos niveles en las vías de regulación de auxinas y CK. En la Figura 9.1 se muestra un cuadro que resume los distintos hallazgos realizados durante el desarrollo de esta tesis sobre la función de AtTCP15, así como hipótesis de trabajo a ser confirmadas mediante el desarrollo de nuevos experimentos.

En conclusión, los factores de transcripción TCP de clase I estudiados en el presente trabajo están involucrados en un gran número de procesos, especialmente relacionados con el desarrollo de órganos secundarios. Este trabajo de tesis aporta información relevante sobre las funciones de tres proteínas TCP de clase I de *A. thaliana*, ampliando el conocimiento sobre esta subfamilia y generando nuevas bases para estudios posteriores.

BIBLIOGRAFIA

10 BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal, P.; Das Gupta, M.; Joseph, A. P.; Chatterjee, N.; Srinivasan, N. y Nath, U. (2010) *Identification of specific DNA binding residues in the TCP family of transcription factors in Arabidopsis*. Plant Cell 22: 1174–89.

Aguilar-Martínez, J. A.; Poza-Carrión, C. y Cubas, P. (2007) *Arabidopsis BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds*. Plant Cell.19: 458–472.

Aida, M. y Tasaka, M. (2006) *Genetic control of shoot organ boundaries*. Curr. Opin. in Plant Biol. 9: 72–7.

Aida, M.; Ishida, T.; Fukaki, H.; Fujisawa, H. y Tasaka, M. (1997) *Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant*. Plant Cell 9:841–57.

Alexander, M.P. (1969) *Differential staining of aborted and nonaborted pollen*. Stain Technol. 41: 117–22.

Almeida, J.; Rocheta, M. y Galego, L. (1997) *Genetic control of flower shape in A. majus*. Development 124: 1387–92.

Alonso-Cantabrana, H.; Ripoll, J. J.; Ochando, I.; Vera, A.; Ferrandiz, C. y Martínez-Laborda, A. (2007) *Common regulatory networks in leaf and fruit patterning revealed by mutations in the Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES1 gene*. Development 134: 2663–71.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. y Lipman, D.J. (1990) *Basic local alignment search tool*. J. Mol. Biol. 215: 403–10.

Alvarez, J. y Smyth, D.R. (1999) *CRABS CLAW and SPATULA, two Arabidopsis genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS*. Development 126: 2377–86.

Alvarez-Buylla, E.R.; Benítez, M.; Corvera-Poiré, A.; Chaos Cador, A.; de Folter, S.; Gamboa de Buen, A.; Garay-Arroyo, A.; García-Ponce, B.; Jaimes-Miranda, F.; Pérez-Ruiz, R. V.; Piñeyro-Nelson, A. y Sánchez-Corrales, Y. E. (2010) *Flower Development*. En: *The Arabidopsis Book*. The American Society of Plant Biologists. <http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0127>.

An, J.; Guo, Z.; Gou, X. y Li, J. (2012) *TCPI positively regulates the expression of DWF4 in Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.* 6: 1117–8.

Attallah, C. V.; Welchen, E. y Gonzalez, D. H. (2007) *The promoters of Arabidopsis thaliana genes AtCOX17-1 and -2, encoding a copper chaperone involved in cytochrome c oxidase biogenesis; are preferentially active in roots and anthers and induced by biotic and abiotic stress*. *Plant Physiol.* 129: 123–34.

Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J.G.; Smith, J. A. y Struhl, K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing and Wiley, Interscience, New York.

Baba, K.; Nakano, T.; Yamagishi, K. y Yoshida, S. (2001) *Involvement of a nuclear-encoded basic helix-loop-helix protein in transcription of the light-responsive promoter of psbD*. *Plant Physiol.* 125: 595–603.

Bai, F.; Reinheimer, R.; Durantini, D.; Kellogg, E. A. y Schmidt, R. J. (2012) *TCP transcription factor; BRANCH ANGLE DEFECTIVE 1 (BAD1); is required for normal tassel branch angle formation in maize*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: 12225–30.

Barkoulas, M.; Galinha, C.; Grigg, S.P. y Tsiantis, M. (2007) *From genes to shape: regulatory interactions in leaf development*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 660–6.

Bartel, B. (1997) *AUXIN BIOSYNTHESIS*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:51–66.

Barton, M. K. (2010) *Twenty years on: the inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo*. *Dev. Biol.* 341:95–113.

Belles-Boix, E.; Hamant, O.; Witiak, S. M.; Morin, H.; Traas, J. y Pautot, V. (2006) *KNAT6: an Arabidopsis homeobox gene involved in meristem activity and organ separation*. Plant Cell 18: 1900–7.

Bennett, T.; Sieberer, T.; Willett, B.; Booker, J.; Luschnig, C. y Leyser O. (2006) *The Arabidopsis MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport*. Curr. Biol. 16: 553–63.

Bharathan, G.; Goliber, T.E.; Moore, C.; Kessler, S.; Pham, T. y Sinha, N.R. (2002) *Homologies in leaf form inferred from KNOX1 gene expression during development*. Science 296: 1858–60.

Bilsborough, G.D.; Runions, A.; Barkoulas, M.; Jenkins, H.W.; Hasson, A.; Galinha, C.; Laufs, P.; Hay, A.; Prusinkiewicz, P. y Tsiantis, M. (2011) *Model for the regulation of Arabidopsis thaliana leaf margin development*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108:3424–9.

Birnboim, H. y Dolly, J. (1979) *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nuc.Acids. Res. 7: 1513–5.

Bonnet, E.; Wuyts, J.; Rouzé, P. y Van de Peer, Y. (2004) *Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in Arabidopsis thaliana and Oryza sativa identifies important target genes*. Proc Natl Acad Sci USA. 101:11511–6.

Borghi, L.; Bureau, M. y Simon, R. (2007) *Arabidopsis JAGGED LATERAL ORGANS is expressed in boundaries and coordinates KNOX and PIN activity*. Plant Cell 19:1795–808.

Bowman, J. L. y Floyd, S. K. (2008) *Patterning and polarity in seed plant shoots*. Annu. Rev. Plant. Biol. 59: 67–88.

Bowman, J. L.; Drews, G. N. y Meyerowitz, E. M. (1991) *Expression of the Arabidopsis floral homeotic gene AGAMOUS is restricted to specific cell types late in flower development*. Plant Cell 3: 749–58.

Braun, N.; de Saint Germain, A.; Pillot, J. P.; Boutet-Mercey, S.; Dalmais, M.; Antoniadis, I.; Li, X.; Maia-Grondard, A.; Le Signor, C.; Bouteiller, N.; Luo, D.; Bendahmane, A.; Turnbull, C. y Rameau, C. (2012) *The pea TCP transcription factor PsBRC1 acts downstream of strigolactones to control shoot branching*. *Plant Physiol.* 158: 225–38.

Brewer, P. B.; Howles, P.A.; Dorian, K.; Griffith, M. E.; Ishida, T.; Kaplan-Levy, R. N.; Kilinc, A. y Smyth, D. R. (2004) *PETAL LOSS, a trihelix transcription factor gene, regulates perianth architecture in the Arabidopsis flower*. *Development* 131: 4035–45.

Broholm, S. K.; Tähtiharju, S.; Laitinen, R. A.; Albert, V. A.; Teeri, T. H. y Elomaa, P. (2008) *A TCP domain transcription factor controls flower type specification along the radial axis of the Gerbera (Asteraceae) inflorescence*. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 9117–22.

Busch, A. y Zachgo, S. (2007) *Control of corolla monosymmetry in the Brassicaceae Iberis amara*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104: 16714–9.

Bylesjö, M.; Segura, V.; Soolanayakanahally, R.Y.; Rae, A.M.; Trygg, J.; Gustafsson, P.; Jansson, S. y Street N.R. (2008) *LAMINA: a tool for rapid quantification of leaf size and shape parameters*. *BMC Plant Biol.* 8: 82.

Byrne, M.E.; Barley, R.; Curtis, M.; Arroyo, J. M.; Dunham, M.; Hudson, A. y Martienssen, R.A. (2000) *Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis*. *Nature* 408: 967–71.

Chae, K.; Isaacs, C. G.; Reeves, P. H.; Maloney, G. S.; Muday, G. K.; Nagpal, P. y Reed, J. W. (2012) *Arabidopsis SMALL AUXIN UP RNA63 promotes hypocotyl and stamen filament elongation*. *Plant J.* 71: 684–97.

Charrier, B.; Champion, A.; Henry, Y. y Kreis, M. (2002) *Expression profiling of the whole Arabidopsis shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. *Plant Physiol.* 130: 577–90.

Chen, C.; Ridzon, D. A.; Broomer, A. J.; Zhou, Z.; Lee, D. H.; Nguyen, J. T.; Barbisin, M.; Xu, N. L.; Mahuvakar, V. R.; Andersen, M. R.; Lao, K. Q.; Livak, K. J. y Guegler, K. J. (2005) *Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR*. *Nucleic Acids Res.* 33:e179.

Cheng, Y.; Dai, X. y Zhao, Y. (2006) *Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20:1790–9.

Chien, J.C. y Sussex, I.M. (1996) *Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.* *Plant Physiol.* 111: 1321–8.

Clough, S. J. y Bent, A. F. (1998) *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16:735–43.

Coen, E. S. (1996) *Floral symmetry*. *EMBO J.* 15: 6777–88.

Colombo, M.; Brambilla, V.; Marcheselli, R.; Caporali, E.; Kater, M.M. y Colombo, L. (2010) *A new role for the SHATTERPROOF genes during Arabidopsis gynoecium development*. *Dev. Biol.* 337: 294–302.

Comelli, R. N. y Gonzalez, D. H. (2009) *Divergent regulatory mechanisms in the response of respiratory chain component genes to carbohydrates suggests a model for gene evolution after duplication*. *Plant Signal Behav.* 4: 1–3.

Comelli, R.; Viola, I. y Gonzalez, D. H. (2009) *Characterization of promoter elements required for expression and induction by sucrose of the Arabidopsis COX5b-1 nuclear gene; encoding the zinc-binding subunit of cytochrome c oxidase*. *Plant Mol. Biol.* 69: 729–43.

Corley, S. B.; Carpenter, R.; Copsey, L. y Coen, E. (2005) *Floral asymmetry involves an interplay between TCP and MYB transcription factors in A. majus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 5068–73.

Costa, M. M. R.; Fox, S.; Hanna, A. I.; Baxter, C. y Coen, E. (2005) *Evolution of regulatory interactions controlling floral asymmetry*. *Development* 132: 5093–101.

Crawford, B. C. W.; Ditta, G. y Yanofsky, M. F. (2007) *The NTT gene is required for transmitting-tract development in carpels of Arabidopsis thaliana*. Curr. Biol. 17: 1101–8.

Crawford, B.; Nath U.; Carpenter, R. y Coen, E. (2004) *CINCINNATA controls both cell differentiation and growth in petal lobes and leaves of A. majus*. Plant Physiol. 135: 244–53.

Cubas, P.; Coen, E. y Zapater, J. M. (2001) *Ancient asymmetries in the evolution of flowers*. Curr Biol. 11: 1050–2.

Cubas, P.; Lauter, N.; Doebley, J. y Coen, E. (1999) *The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development*. Plant J. 18: 215–22.

Cubas, P.; Vincent, C. y Coen, E. (1999) *An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry*. Nature 401: 157–61.

Czechowski, T.; Stitt, M.; Altmann, T.; Udvardi, M. K. y Scheible, W. R. (2005) *Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis*. Plant Physiol. 139:5–17.

D'Agostino, I. B.; Deruère, J. y Kieber, J. J. (2000) *Characterization of the response of the Arabidopsis response regulator gene family to cytokinin*. Plant Physiol. 124:1706–17.

Danisman, S.; Van Der Wal, F.; Dhondt, S.; Waites, R.; de Folter, S.; Bimbo, A.; van Dijk, A. D.; Muino, J. M.; Cutri, L.; Dornelas, M. C.; Angenent, G. C. y Immink, R. G. (2012) *Arabidopsis class I and class II TCP transcription factors regulate jasmonic acid metabolism and leaf development antagonistically*. Plant Physiol. 159: 1511–23.

Dinneny, J. R.; Weigel, D. y Yanofsky, M. F. (2005) *A genetic framework for fruit patterning in Arabidopsis thaliana*. Development 132: 4687–96.

Doebley, J.; Stec, A. y Gustus, C. (1995) *teosinte branched1 and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance*. Genetics 141: 333–46.

Doebley, J.; Stec, A. y Hubbard, L. (1997) *The evolution of apical dominance in maize*. *Nature* 86: 485–8.

Durgbanshi, A.; Arbona, V.; Pozo, O.; Miersch, O.; Sancho, J. V. y Gómez-Cadenas, A. (2005) *Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*. *J. Agric Food Chem.* 53:8437–42.

Efroni, I.; Blum, E.; Goldshmidt, A. y Eshed, Y. (2008) *A protracted and dynamic maturation schedule underlies Arabidopsis leaf development*. *Plant Cell* 20: 2293–306.

Eklund, D. M.; Staldal, V.; Valsecchi, I.; Cierlik, I.; Eriksson, C.; Hiratsu, K.; Ohme-Takagi, M.; Sundstrom, J. F.; Thelander, M.; Ezcurra, I. y Sundberg, E. (2010) *The Arabidopsis thaliana STYLISH1 protein acts as a transcriptional activator regulating auxin biosynthesis*. *Plant Cell* 22: 349–63.

Elliott, R. C.; Betzner, A. S.; Huttner, E.; Oakes, M. P.; Tucker, W.Q.J.; Gerentes, D.; Perez, P. y Smyth, D.R. (1996) *AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth*. *Plant Cell* 8: 155–68.

Endrizzi, K.; Moussian, B.; Haecker, A.; Levin, J. Z. y Laux, T. (1996). *The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in Arabidopsis shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE*. *Plant J.* 10: 967–9.

Fambrini, M.; Salvini, M. y Pugliesi, C. (2011) *A transposon-mediate inactivation of a CYCLOIDEA-like gene originates polysymmetric and androgynous ray flowers in Helianthus annuus*. *Genetica* 139: 1521–9.

Flanagan, C. A.; Hu, Y. y Ma, H. (1996) *Specific expression of the AGL1 MADS-box gene suggests regulatory functions in Arabidopsis gynoecium and ovule development*. *Plant J.* 10: 343–53.

Fletcher, J. C y Meyerowitz, E. M. (2000) *Cell signaling within the shoot meristem*. *Curr Opin Plant Biol.* 3:23–30.

Franks, R. G.; Wang, C. X.; Levin, J. Z. y Liu, Z. C. (2002) *SEUSS, a member of a novel family of plant regulatory proteins, represses floral homeotic gene expression with LEUNIG*. *Development* 129: 253–63.

Furutani, M.; Vernoux, T.; Traas, J.; Kato, T.; Tasaka, M. y Aida, M. (2004) *PINFORMED1 and PINOID regulate boundary formation and cotyledon development in Arabidopsis embryogenesis*. *Development* 131: 5021–30.

Galego, L. y Almeida, J. (2002) *Role of DIVARICATA in the control of dorsoventral asymmetry in A. majus flowers*. *Genes Dev.* 16: 880–91.

Gan, Y.; Liu, C.; Yu, H. y Broun, P. (2007) *Integration of cytokinin and gibberellin signalling by Arabidopsis transcription factors GIS, ZFP8 and GIS2 in the regulation of epidermal cell fate*. *Development* 134: 2073–81.

Gaudin, V.; Lunness, P. A.; Fobert, P. R.; Towers, M.; Riou-Khamlichi, C.; Murray, J. A.; Coen, E. y Doonan, J. H. (2000) *The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the Cycloidea gene*. *Plant Physiol.* 122: 1137–48.

Giegé, P.; Sweetlove, L. J.; Cognat, V. y Leaver, C. J. (2005) *Coordination of nuclear and mitochondrial genome expression during mitochondrial biogenesis in Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 1497–512.

Giraud, E.; Ng, S.; Carrie, C.; Duncan, O.; Low, J.; Lee, C. P.; Van Aken, O.; Millar, A. H.; Murcha, M. y Whelan, J. (2010) *TCP transcription factors link the regulation of genes encoding mitochondrial proteins with the circadian clock in Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22: 3921–4.

Gomez-Mena, C.; de Folter, S.; Costa, M. M. R.; Angenent, G. C. y Sablowski, R. (2005) *Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene AGAMOUS during early organogenesis*. *Development* 132: 429–38.

Gomez-Roldan, V.; Fermas, S.; Brewer, P. B.; Puech-Pagès, V.; Dun E.A.; Pillot J.P.; Letisse F.; Matusova R.; Danoun S.; Portais J.C.; Bouwmeester H.; Bécard G.; Beveridge C.A.; Rameau C.; Rochange S.F. (2008) *Strigolactone inhibition of shoot branching*. Nature 45: 189–94.

Gonzalez, D. H.; Welchen, E.; Attallah, C. V.; Comelli, R. N. y Mufarrege, E. M. (2007) *Transcriptional coordination of the biogenesis of the oxidative phosphorylation machinery in plants*. Plant J. 51: 105–16.

Gordon, S. P.; Chickarmane, V. S.; Ohno, C. y Meyerowitz, E. M. (2009) *Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem*. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 106: 16529–34.

Greenboim-Wainberg, Y.; Maymon, I.; Borochoy, R.; Alvarez, J.; Olszewski, N.; Ori, N.; Eshed Y. y Weiss D. (2005) *Cross talk between gibberellin and cytokinin: the Arabidopsis GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling*. Plant Cell 17: 92–102.

Gremski, K.; Ditta, G. y Yanofsky, M. F. (2007) *The HECATE genes regulate female reproductive tract development in Arabidopsis thaliana*. Development 134: 3593–601.

Groszmann, M.; Paicu, T. y Smyth, D. R. (2008) *Functional domains of SPATULA, a bHLH transcription factor involved in carpel and fruit development in Arabidopsis*. Plant J. 55: 40–52.

Gu, Q.; Ferrandiz, C.; Yanofsky, M. F. y Martienssen, R. (1998) *The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development*. Development 125: 1509–17.

Guo, M.; Thomas, J.; Collins, G. y Timmermans, M. C. (2008) *Direct repression of KNOX loci by the ASYMMETRIC LEAVES1 complex of Arabidopsis*. Plant Cell 20:48–58.

Guo, Z.; Fujioka, S.; Blancaflor, E. B.; Miao, S.; Gou, X. y Li, J. (2010) *TCP1 modulates brassinosteroid biosynthesis by regulating the expression of the key biosynthetic gene DWARF4 in Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 22: 1161–73.

Ha, C. M.; Jun, J. H.; Nam, H. G. y Fletcher, J. C. (2007) *BLADE-ON-PETIOLE 1 and 2 control Arabidopsis lateral organ fate through regulation of LOB domain and adaxial-abaxial polarity genes*. *Plant Cell* 19:1809–25.

Hagen, G. y Guilfoyle, T. (2002) *Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors*. *Plant Mol. Biol.* 49: 373–85.

Hamann, T.; Benkova, E.; Bäurle, I.; Kientz, M. y Jürgens, G. (2002) *The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning*. *Genes Dev.* 16:1610–5.

Hammani, K.; Gobert, A.; Hleibieh, K.; Choulier, L.; Small, I. y Giegé, P. (2011) *An Arabidopsis dual-localized pentatricopeptide repeat protein interacts with nuclear proteins involved in gene expression regulation*. *Plant Cell* 23: 730–40.

Hanahan, D. (1983) *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. *J. Mol. Biol.* 166: 557–80.

Hao, J.; Tu, L.; Hu, H.; Tan, J.; Deng, F.; Tang, W.; Nie, Y. y Zhang, X. (2012) *GbTCP; a cotton TCP transcription factor; confers fibre elongation and root hair development by a complex regulating system*. *J. Exp. Bot.* 63: 6267–81.

Harmer, S. L. (2009) *The circadian system in higher plants*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 357–77.

Hay, A.; Barkoulas, M. y Tsiantis, M. (2006) *ASYMMETRIC LEAVES1 and auxin activities converge to repress BREVIPEDICELLUS expression and promote leaf development in Arabidopsis*. *Development* 133: 3955–61.

Heim, M. A.; Jakoby, M.; Werber, M.; Martin, C.; Weisshaar, B. y Bailey, P. C. (2003) *The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity*. *Mol. Biol. Evol.* 20: 735–47.

Heisler, M. G. B.; Atkinson, A.; Bylstra, Y. H.; Walsh, R. y Smyth, D. R. (2001) *SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein*. *Development* 128: 1089–98.

Heisler, M. G.; Ohno, C.; Das, P.; Sieber, P.; Reddy, G. V.; Long, J. A. y Meyerowitz, E. M. (2005) *Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem*. *Curr. Biol.* 15: 1899–911.

Hempel, F. D.; Weigel, D.; Mandel, M. A.; Ditta, G.; Zambryski, P. C.; Feldman, L. J. y Yanofsky, M. F. (1997) *Floral determination and expression of floral regulatory genes in Arabidopsis*. *Development* 124: 3845–53.

Hervé, C.; Dabos, P.; Bardet, C.; Jauneau, A.; Auriac, M. C.; Ramboer, A.; Lacout, F. y Tremousaygue, D. (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: 1462–77.

Hibara, K.; Takada, S. y Tasaka, M. (2003) *CUC1 gene activates the expression of SAM-related genes to induce adventitious shoot formation*. *Plant J.* 36: 687–96.

Hiratsu, K.; Matsui, K.; Koyama, T. y Ohme-Takagi, M. (2003) *Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis*. *Plant J.* 34: 733–9.

Howarth, D.; Donoghue, M. (2006) *Phylogenetic analysis of the “ECE” (CYC/TB1) clade reveals duplications predating the core eudicots*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 9101–6.

Huang, J.; Struck, F.; Matzinger, D. F. y Levings, C. S. (1994) *Flower-enhanced expression of a nuclear-encoded mitochondrial respiratory protein is associated with changes in mitochondrion number*. *Plant Cell* 6: 439–48.

Hubbard, L.; McSteen, P.; Doebley, J. y Hake, S. (2002) *Expression patterns and mutant phenotype of teosinte branched1 correlate with growth suppression in maize and teosinte*. Genetics 162: 1927–35.

Husbands, A.; Bell, E. M.; Shuai, B.; Smith, H. M. y Springer, P. (2007) *LATERAL ORGAN BOUNDARIES defines a new family of DNA-binding transcription factors and can interact with specific bHLH proteins*. Nucleic Acids Res. 1–9.

Imamura, A.; Hanaki, N.; Nakamura, A.; Suzuki, T.; Taniguchi, M.; Kiba, T.; Ueguchi, C.; Sugiyama, T. y Mizuno, T. (1999) *Compilation and characterization of Arabidopsis thaliana response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction*. Plant Cell Physiol. 40:733–42.

Ingram, G.C. y Waites, R. (2006) *Keeping it together: co-ordinating plant growth*. Curr. Opin. Plant. Biol. 9: 12–20.

Ishida, T.; Aida, M.; Takada, S. y Tasaka, M. (2000) *Involvement of CUPSHAPED COTYLEDON genes in gynoecium and ovule development in Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Phys. 41: 60–7.

Jackson, D.; Veit, B. y Hake, S. (1994) *Expression of maize KNOTTED1 related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot*. Development 120: 405–13.

Jasinski, S.; Piazza, P.; Craft, J.; Hay, A.; Woolley, L.; Rieu, I.; Phillips, A.; Hedden, P. y Tsiantis, M. (2005) *KNOX action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities*. Curr. Biol. 15: 1560–5.

Jefferson, R. A.; Kavanagh, T. A. y Bevan, M. W. (1987) *Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants*. EMBO Journal 6: 3901–7.

Jones, B.; Gunnerås, S. A.; Petersson, S. V.; Tarkowski, P.; Graham N.; May, S.; Dolezal, K.; Sandberg, G. y Ljung, K. (2010) *Cytokinin regulation of auxin synthesis in Arabidopsis involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction*. Plant Cell 22: 2956–69.

Jones-Rhoades, M. W. y Bartel, D. P. (2004) *Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA*. Mol. Cell. 14:787–99.

Kebrom, T. H.; Burson, B. L. y Finlayson, S. A. (2006) *Phytochrome B represses Teosinte Branched1 expression and induces sorghum axillary bud outgrowth in response to light signals*. Plant Physiol. 140: 1109–17.

Kieffer, M.; Master, V.; Waites, R. y Davies, B. (2011) *TCP14 and TCP15 affect internode length and leaf shape in Arabidopsis*. Plant J. 68: 147–58.

Kosugi, S. y Ohashi, Y. (1997) *PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene*. Plant Cell 9: 1607–19.

Kosugi, S. y Ohashi, Y. (2002) *DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family*. Plant J. 30: 337–48.

Koyama, T.; Furutani, M.; Tasaka, M. y Ohme-Takagi, M. (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: 473–84.

Koyama, T.; Mitsuda, N.; Seki, M.; Shinozaki, K. y Ohme-Takagi, M. (2010, a) *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: 3574–88.

Koyama, T.; Ohme-Takagi, M. y Sato, F. (2011) *Generation of serrated and wavy petals by inhibition of the activity of TCP transcription factors in Arabidopsis thaliana*. Plant Signal Behav. 6: 697–9.

Koyama, T.; Sato, F. y Ohme-Takagi, M. (2010, b) *A role of TCP1 in the longitudinal elongation of leaves in Arabidopsis*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74: 2145–47.

Kumaran, M. K.; Bowman, J. L. y Sundaresan, V. (2002) *YABBY polarity genes mediate the repression of KNOX homeobox genes in Arabidopsis*. Plant Cell 14: 2761–70.

Kuusk S.; Sohlberg, J. J.; Long, J. A.; Fridborg, I. y Sundberg, E. (2002) *STY1 and STY2 promote the formation of apical tissues during Arabidopsis gynoecium development*. Development 129: 4707–17.

Kuusk, S.; Sohlberg, J. J.; Eklund, D. M. y Sundberg, E. (2006) *Functionally redundant SHI family genes regulate Arabidopsis gynoecium development in a dose-dependent manner*. Plant J. 47: 99–111.

Kuusk, S.; Sohlberg, J. J.; Long, J. A.; Fridborg, I. y Sundberg, E. (2002) *STY1 and STY2 promote the formation of apical tissues during Arabidopsis gynoecium development*. Development 129: 4707–17.

Larue, C. T.; Wen, J. y Walker, J. C. (2009) *A microRNA-transcription factor module regulates lateral organ size and patterning in Arabidopsis*. Plant J. 58:450–63.

Laufs, P.; Peaucelle, A.; Morin, H. y Traas, J. (2004) *MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems*. Development 131: 4311–22.

Lee, C. P.; Eubel, H. y Millar, A.H. (2010) *Diurnal changes in mitochondrial function reveal daily optimization of light and dark respiratory metabolism in Arabidopsis*. Mol Cell Proteomics 9: 2125–39

Lenhard, M.; Bohnert, A.; Jurgens, G. y Laux, T. (2001) *Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS*. Cell 105: 805–14.

Li, C.; Potuschak, T.; Colón-Carmona, A.; Gutiérrez, R. A. y Doerner, P. (2005) *Arabidopsis TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways*. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 102: 12978–83.

Li, J.; y Chory, J. (1998) *Methods in Molecular Biology. Arabidopsis Protocols. Preparation of DNA from Arabidopsis*. (Eds.: José M. Martínez-Zapater y Julio Salinas), Humana Press. USA. 82: 55–60.

Li, Z. Y.; Li, B. y Dong, A. W. (2012) *The Arabidopsis transcription factor AtTCP15 regulates endoreduplication by modulating expression of key cell-cycle genes*. Mol. Plant. 5: 270–80.

Li, Z.; Li, B.; Shen, W. H.; Huang, H. y Dong, A. (2012) TCP transcription factors interact with AS2 in the repression of class-I KNOX genes in Arabidopsis thaliana. Plant J. 71: 99–107.

Liljegren, S. J.; Ditta, G. S.; Eshed, H. Y.; Savidge, B.; Bowman, J. L. y Yanofsky, M. F. (2000) *SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis*. Nature 404: 766–70.

Lin, W. C.; Shuai, B. y Springer, P. S. (2003) *The Arabidopsis LATERAL ORGAN BOUNDARIES-domain gene ASYMMETRIC LEAVES2 functions in the repression of KNOX gene expression and in adaxial-abaxial patterning*. Plant Cell 15: 2241–52.

Lincoln, C.; Long, J.; Yamaguchi, J.; Serikawa, K. y Hake, S. (1994) *A knotted1-like homeobox gene in Arabidopsis is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants*. Plant Cell 6: 1859–76.

Liu, C.; Thong, Z. y Yu, H. (2009) *Coming into bloom: the specification of floral meristems*. Development 136: 3379–91.

Liu, Z. y Meyerowitz, E. M. (1995) *LEUNIG regulates AGAMOUS expression in Arabidopsis flowers*. Development 121: 975-91.

Lohmann, J. U.; Hong, R. L.; Hobe, M.; Busch, M. A.; Parcy, F.; Simon, R. y Weigel, D. (2001) *A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis*. Cell 105: 793–803.

Luo D.; Carpenter R.; Copsey L.; Vincent C.; Clark J. y Coen E. (1999) *Control of organ asymmetry in flowers of A. majus*. Cell 99: 367–76.

Luo, D.; Carpenter, R.; Vincent, C.; Copsey, L. y Coen, E. (1996) *Origin of floral asymmetry in A. majus*. Nature 383: 794–9.

Lupas, A.; Van Dyke, M. y Stock, J. (1991) *Predicting coil coils from protein sequences*. Science 252; 1162–4.

MacClure, B. A. y Guilfoyle, T. (1987) *Characterization of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs*. Plant Mol Biol. 9: 611–23.

Majer, C. y Hochholdinger, F. (2011) *Defining the boundaries: structure and function of LOB domain proteins*. Trends in Plant Sc. 16: 47–52.

Mallory, A. C.; Dugas, D. V.; Bartel, D. P. y Bartel, B. (2004) *MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs*. Curr. Biol. 14: 1035–46.

Manevski, A.; Bertoni, G.; Bardet, C.; Tremousaygue, D. y Lescure, B. (2000) *In synergy with various cis-acting elements; plant interstitial telomere motifs regulate gene expression in Arabidopsis root meristems*. FEBS Lett. 483: 43–6.

Marsch-Martínez, N.; Ramos-Cruz, D.; Irepan Reyes-Olalde, J.; Lozano-Sotomayor, P.; Zúñiga-Mayo, V.M. y de Folter, S. (2012) *The role of cytokinin during Arabidopsis gynoecia and fruit morphogenesis and patterning*. Plant J. 72:222–34.

Martín-Trillo, M. y Cubas, P. (2010) *TCP genes: a family snapshot ten years later*. Trends Plant Sci. 15: 31–9.

Masuda, H. P.; Cabral, L. M.; De Veylder, L.; Tanurdzic, M.; de Almeida Engler, J.; Geelen, D.; Inzé, D.; Martienssen, R. A.; Ferreira, P. C. y Hemerly, A. S. (2008) *ABAP1 is a novel plant Armadillo BTB protein involved in DNA replication and transcription*. EMBO J.; 27: 2746–56.

Millar, A. H.; Whelan, J.; Soole, K. y Day, D. A. (2011) *Organisation and regulation of mitochondrial respiration in plants*. Annu. Rev. Plant Biol. 62: 79–104.

Mufarrege, E.; Curi, G. y Gonzalez, D. H. (2009) *Common sets of promoter elements determine the expression characteristics of three Arabidopsis genes encoding isoforms of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 6b*. Plant Cell Physiol. 50: 1393–9.

Nag, A.; King, S. y Jack, T. (2009) *miR319a targeting of TCP4 is critical for petal growth and development in Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA. 106: 22534–39.

Nath, U. y Sarvepalli, K. (2011) *Interaction of TCP4-mediated growth module with phytohormones*. Plant Signal Behav. 6: 1440–43.

Nath, U.; Crawford, B. C.; Carpenter, R. y Coen, E. (2003) *Genetic control of surface curvature*. Science 299: 1404–07.

Navaud, O.; Dabos, P.; Carnus, E.; Tremousaygue, D. y Hervé, C. (2007) *TCP transcription factors predate the emergence of land plants*. J. Mol. Evol. 65: 23–33.

Nemhauser, J. L.; Feldman, L. J. y Zambryski, P. C. (2000) *Auxin and ETTIN in Arabidopsis gynoecium morphogenesis*. Development 127:3877–88.

Norberg, M.; Holmlund, M. y Nilsson, O. (2005) *The BLADE ON PETIOLE genes act redundantly to control the growth and development of lateral organs*. Development 132: 2203–13.

Nordström, A.; Tarkowski, P.; Tarkowska, D.; Norbaek, R.; Astot, C.; Dolezal, K. y Sandberg G. (2004). *Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: a factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101: 8039–44.

Ohno, C. K.; Reddy, G. V.; Heisler, M. G. y Meyerowitz, E. M. (2004) *The Arabidopsis JAGGED gene encodes a zinc finger protein that promotes leaf tissue development*. Development 131: 1111–22.

Ooms, G.; Hooykaas, P. J.; Van Veen, R. J.; Van Beelen, P.; Regensburg-Tuink, T.J. y Schilperoort, R.A. (1982) *Octopine Ti-plasmid deletion mutants of*

agrobacterium tumefaciens with emphasis on the right side of the T-region. Plasmid 7: 15–29.

Ori, N.; Cohen, A. R.; Etzioni, A.; Brand, A.; Yanai, O.; Shleizer, S.; Menda, N.; Amsellem, Z.; Efroni, I.; Pekker, I.; Alvarez, J. P.; Blum, E.; Zamir, D. y Eshed, Y. (2007) *Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. Nat Genet. 39: 787–91.*

Ori, N.; Eshed, Y.; Chuck, G.; Bowman, J. L. y Hake, S. (2000) *Mechanisms that control knox gene expression in the Arabidopsis shoot. Development 127: 5523–32.*

Ostergaard, L. (2009) *Don't 'leaf' now. The making of a fruit. Curr. Opin. in Plant Biol. 12: 36–41.*

Pagnussat, G. C.; Yu, H. J.; Ngo, Q. A.; Rajani, S.; Mayalagu, S.; Johnson, C. S.; Capron, A.; Xie, L. F.; Ye, D. y Sundaresan, V. (2005) *Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in Arabidopsis. Development 132: 603–14.*

Palatnik, J. F.; Allen, E.; Wu, X.; Schommer, C.; Schwab, R.; Carrington, J. C. y Weigel, D. (2003) *Control of leaf morphogenesis by micro-RNAs. Nature 425: 257–63.*

Palatnik, J. F.; Wollmann, H.; Schommer, C.; Schwab R.; Boisbouvier, J.; Rodriguez, R.; Warthmann, N.; Allen, E.; Dezulian, T.; Huson, D.; Carrington, J. C. y Weigel, D. (2007) *Sequence and expression differences underlie functional specialization of Arabidopsis microRNAs miR159 and miR319. Dev Cell. 13: 115–25.*

Payne, T.; Johnson, S. D. y Koltunow, A. M. (2004) *KNUCKLES (KNU) encodes a C2H2 zinc-finger protein that regulates development of basal pattern elements of the Arabidopsis gynoecium. Development 131: 3737–3749.*

Peaucelle, A.; Morin, H.; Traas, J. y Laufs, P. (2007) *Plants expressing a miR164-resistant CUC2 gene reveal the importance of postmeristematic maintenance of phyllotaxy in Arabidopsis. Development 134:1045–50.*

Pinyopich, A.; Ditta, G. y Yanofsky, M. F. (2001) *Roles of SEEDSTICK MADS box gene during ovule and seed development*. 12th International Conference on Arabidopsis Research University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin.

Popov, V. N.; Eprintsev, A. T.; Fedorin, D. N. y Igamberdiev, A. U. *Succinate dehydrogenase in Arabidopsis thaliana is regulated by light via phytochrome A*. FEBS Lett. 584: 199–202.

Preston J.C. y Hileman L.C. (2009) *Conservation and diversification of the symmetry developmental program among close relatives of snapdragon with divergent floral morphologies*. New Phytol. 182: 751–62.

Pruneda-Paz, J. L. y Kay, S. A. (2010) *An expanding universe of circadian networks in higher plants*. Trends Plant Sci. 15: 259–65.

Pruneda-Paz, J. L.; Breton, G.; Para, A. y Kay, S. A. (2009) *A functional genomics approach reveals CHE as a component of the Arabidopsis circadian clock*. Science 323: 1481–5.

Qin, G.; Gu, H.; Zhao, Y.; Ma, Z.; Shi, G.; Yang, Y.; Pichersky, E.; Chen, H.; Liu, M.; Chen, Z. y Qu, L. J. (2005) *An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates Arabidopsis leaf development*. Plant Cell 17: 2693–704.

Ragni, L.; Belles-Boix, E.; Gunl, M. y Pautot, V. (2008) *Interaction of KNAT6 and KNAT2 with BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE in Arabidopsis inflorescences*. Plant Cell 20: 888–900.

Rajani, S. y Sundaresan, V. (2001) *The Arabidopsis myc/bHLH gene ALCATRAZ enables cell separation in fruit dehiscence*. Curr. Biol. 11: 1914–22.

Rast, M. I. y Simon, R. (2008) *The meristem-to-organ boundary: more than an extremity of anything*. Curr. Opin. Genet. Dev. 18: 287–94.

Reddy, G. V. (2008) *Live-imaging stem-cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex*. Curr. Opin. Plant Biol. 11: 88–93.

Reed, J. W. (2001) *Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis*. Trends Plant Sci. 6:420–5.

Reinhart, B. J.; Weinstein, E. G.; Rhoades, M. W.; Bartel, B. y Bartel, D. P. (2002) *MicroRNAs in plants*. Genes Dev. 16: 1616–26.

Rodriguez, R. E.; Mecchia, M. A.; Debernardi, J. M.; Schommer, C. y Weigel, D.; Palatnik, J. F. (2010) *Control of cell proliferation in Arabidopsis thaliana by microRNA miR396*. Development 137: 103–12.

Roeder, A. H. K.; Ferrandiz, C. y Yanofsky, M. F. (2003) *The role of the REPLUMLESS homeodomain protein in patterning the Arabidopsis fruit*. Curr. Biol. 13: 1630–1635.

Rueda-Romero, P.; Barrero-Sicilia, C.; Gómez-Cadenas, A.; Carbonero, P. y Oñate-Sánchez, L. (2012) *Arabidopsis thaliana DOF6 negatively affects germination in non-after-ripened seeds and interacts with TCP14*. J Exp Bot. 63: 1937–49.

Rupp, H. M.; Frank, M.; Werner, T.; Strnad, M. y Schmülling, T. (1999) *Increased steady state mRNA levels of the STM and KNAT1 homeobox genes in cytokinin overproducing Arabidopsis thaliana indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem*. Plant J. 18: 557–63.

Sambrook, J.; Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sarojam, R.; Sappl, P. G.; Goldshmidt, A.; Efroni, I.; Floyd, S. K.; Eshed, Y. y Bowman, J. L. (2010) *Differentiating Arabidopsis shoots from leaves by combined YABBY activities*. Plant Cell 22: 2113–30.

Sarvepalli, K. y Nath, U. (2011) *Hyper-activation of the TCP4 transcription factor in Arabidopsis thaliana accelerates multiple aspects of plant maturation*. Plant J. 67: 595–607.

Savidge, B.; Rounsley, S. D. y Yanofsky, M. F. (1995) *Temporal relationship between the transcription of 2 Arabidopsis MADS box genes and the floral organ identity genes*. Plant Cell 7: 721–33.

Sawa, S., Watanabe, K., Goto, K., Liu, Y. G., Shibata, D., Kanaya, E; Morita, E. H. y Okada, K. (1999) *FILAMENTOUS FLOWER, a meristem and organ identity gene of Arabidopsis, encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domains*. Genes. Dev. 13: 1079–88.

Schommer, C.; Palatnik, J. F.; Aggarwal, P.; Chételat, A.; Cubas ,P.; Farmer, E. E.; Nath, U. y Weigel, D. (2008) *Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets*. PLoS Biol. 6: 1991–2001.

Schoof, H.; Lenhard, M.; Haecker, A.; Mayer, K. F.; Jürgens, G. y Laux, T. (2000) *The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes*. Cell 100: 635–44.

Sessions, A.; Nemhauser, J. L.; McColl, A.; Roe, J. L.; Feldmann, K. A. y Zambryski, P. C. (1997) *ETTIN patterns the Arabidopsis floral meristem and reproductive organs*. Development 124: 4481–91.

Sessions, R. A. y Zambryski, P. C. (1995) *Arabidopsis gynoeceium structure in the Arabidopsis gynoeceium structure in the wild and in ettin mutants*. Development 121: 1519–32.

Shuai, B.; Reynaga-Peña, C. G. y Springer, P. S. (2002) *The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family*. Plant Physiol. 129: 747–61.

Sieber, P.; Wellmer, F.; Gheyselinck, J.; Riechmann, J. L. y Meyerowitz, E. M. (2007) *Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the MIR164 family in developmental robustness*. Development 134: 1051–60.

Siegfried, K.R.; Eshed, Y.; Baum, S. F.; Otsuga, D.; Drews, G. N. y Bowman, J. L. (1999) *Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in Arabidopsis*. Development 126: 4117–28.

Silver, J.; Limjoco, T. y Feinstone, S. (1995) *Site-specific mutagenesis using the polymerase chain reaction*. En: PCR Strategies (Eds.:Innis, M. A.; Gelfand, D. H. y Sninsky, J. J.), Academic Press, San Diego, p.179–88.

Skoog, F. y Miller, C. O. (1957) *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 54: 118–30.

Sohlberg, J. J.; Myrenås, M.; Kuusk, S.; Lagercrantz, U.; Kowalczyk, M.; Sandberg, G. y Sundberg, E. (2006) *STY1 regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the Arabidopsis gynoecium*. Plant J. 47: 112–23.

Sorefan, K.; Girin, T.; Liljegren, S. J.; Ljung, K.; Robles, P.; Galvan-Ampudia, C. S.; Offringa, R.; Friml, J.; Yanofsky, M. F. y Ostergaard, L. (2009) *A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in Arabidopsis*. Nature 459: 583–6.

Spartz, A. K.; Lee, S. H.; Wenger, J. P.; Gonzalez, N.; Itoh, H.; Inzé, D.; Peer, W. A.; Murphy, A. S.; Overvoorde, P. J. y Gray, W. M. (2012) *The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion*. Plant J. 70: 978–90.

Spinelli, S. V.; Martin, A.P.; Viola, I. L.; Gonzalez, D. H. y Palatnik, J. F. (2011) *A mechanistic link between STM and CUC1 during Arabidopsis development*. Plant Physiol. 156: 1894–904.

Ståldal, V.; Sohlberg, J. J.; Eklund, D. M.; Ljung, K. y Sundberg, E. (2008) *Auxin can act independently of CRC, LUG, SEU, SPT and STY1 in style development but not apical-basal patterning of the Arabidopsis gynoecium*. New Phytol. 180: 798–808.

Steiner, E.; Efroni, I.; Gopalra, j M.; Saathoff, K.; Tseng, T. S.; Kieffer, M.; Eshed, Y.; Olszewski, N. y Weiss, D. (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: 96–108.

Su, Y. H.; Liu, Y. B. y Zhang, X. S. (2011) *Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development*. Mol. Plant. 4: 616–25.

Sugio, A.; Kingdom, H. N.; MacLean, A. M.; Grieve, V. M. y Hogenhout, S. A. (2011) *Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108: 1254–63.

Suzuki, T.; Sakurai, K.; Ueguchi, C. y Mizuno, T. (2001) *Two types of putative nuclear factors that physically interact with histidine containing phosphotransferase (Hpt) domains, signaling mediators in His-to-Asp phosphorelay, in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 42: 37–45.

Takada, S.; Hibara, K.; Ishida, T. y Tasaka, M. (2001) *The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of Arabidopsis regulates shoot apical meristem formation*. Development 128: 1127–35.

Takeda, T.; Amano, K.; Ohto, M.; Nakamura, K.; Sato, S.; Kato T.; Tabata, S. y Ueguchi, C. (2006) *RNA interference of the Arabidopsis putative transcription factor TCP16 gene results in abortion of early pollen development*. Plant Mol Biol. 61: 165–77.

Takeda, T.; Suwa, Y.; Suzuki, M.; Kitano, H.; Ueguchi-Tanaka, M.; Ashikari, M.; Matsuoka, M. y Ueguchi, C. (2003) *The OsTBI gene negatively regulates lateral branching in rice*. Plant J. 33: 513–20.

Tatematsu, K.; Nakabayashi, K.; Kamiya, Y. y Nambara, E. (2008) *Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in Arabidopsis thaliana*. Plant J. 53: 42–52.

Tatematsu, K.; Ward S.; Leyser, O.; Kamiya, Y. y Nambara, E. (2005) *Identification of cis-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in Arabidopsis*. Plant Physiol. 138: 757–66.

Thompson, J. D.; Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994) *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Res. 22: 4673–80.

Tian, Q. y Reed, J. W. (1999) *Control of auxin-regulated root development by the Arabidopsis thaliana SHY2/IAA3 gene*. Development 126: 711–21.

To, J. P.; Haberer, G.; Ferreira, F. J.; Deruère, J.; Mason, M. G.; Schaller, G. E.; Alonso, J. M.; Ecker, J. R. y Kieber, J. J. (2004) *Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling*. Plant Cell 16: 658–71.

Trémousaygue, D.; Garnier, L.; Bardet, C.; Dabos, P.; Hervé, C. y Lescure, B. (2003) *Internal telomeric repeats and “TCP-domain” protein binding sites co-operate to regulate gene expression in Arabidopsis thaliana cycling cells*. Plant J. 33: 957–66.

Trémousaygue, D.; Manevski, A.; Bardet, C.; Lescure, N. y Lescure, B. (1999) *Plant interstitial telomere motifs participate in the control of gene expression in root meristems*. Plant J. 20: 553–61.

Trigueros, M.; Navarrete-Gomez, M.; Sato, S.; Christensen, S.K.; Pelaz, S.; Weigel, D.; Yanofsky, M.F. y Ferrandiz, C. (2009) *The NGATHA genes direct style development in the Arabidopsis gynoecium*. Plant Cell 21: 1394–409.

Ulmasov, T.; Murfett, J.; Hagen, G. y Guilfoyle, T. J. (1997) *Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements*. Plant Cell 9: 1963–71.

Umehara, M.; Hanada, A.; Yoshida, S.; Akiyama, K.; Arite, T.; Takeda-Kamiya, N.; Magome, H.; Kamiya, Y.; Shirasu, K.; Yoneyama, K.; Kyojuka, J. y Yamaguchi, S. (2008) *Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones*. Nature 455: 195–200.

van Mourik, S.; van Dijk, A. D.; de Gee, M.; Immink, R. G.; Kaufmann, K.; Angenent, G. C.; van Ham, R. C. y Molenaar, J. (2012) *Continuous-time modeling of cell fate determination in Arabidopsis flowers*. BMC Syst. Biol. 4: 101.

Vanneste, S. y Friml, J. (2009) *Auxin: a trigger for change in plant development*. Cell 136: 1005–16.

Viola, I.; Reinheimer, R.; Ripoll, R.; Uberti Manassero, N. y Gonzalez, D. *Determinants of the DNA binding specificity of class I and class II TCP transcription factors*. J. Biol. Chem. 287: 347–56.

Viola, I.; Uberti Manassero, N.; Ripoll, R. y Gonzalez, D. (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: 143–55.

Vroemen, C. W.; Mordhorst, A. P.; Albrecht, C.; Kwaaitaal, M. A. y de Vries, S. C. (2003) *The CUP-SHAPED COTYLEDON3 gene is required for boundary and shoot meristem formation in Arabidopsis*. Plant Cell 15: 1563–77.

Wang, X. J.; Reyes, J. L.; Chua, N. H. y Gaasterland, T. (2004) *Prediction and identification of Arabidopsis thaliana microRNAs and their mRNA targets*. Genome Biol. 5: R65.

Weir, I.; Lu, J.; Cook, H.; Causier, B.; Schwarz-Sommer, Z. y Davies, B. (2004) *CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in A. majus*. Development 131: 915–22.

Welchen, E. y Gonzalez, D. H. (1995) *Differential expression of the Arabidopsis cytochrome c genes Cytc-1 and Cytc-2: evidence for the involvement of TCP-domain protein binding elements in anther- and meristem-specific expression of the Cytc-1 gene*. Plant Physiol. 139: 88–100.

Welchen, E. y Gonzalez, D. H. (2006) *Over-representation of elements recognized by TCP-domain transcription factors in the upstream regions of nuclear genes encoding components of the mitochondrial oxidative phosphorylation machinery*. Plant Physiol. 141: 540–45.

Welchen, E.; Chan R. L. y Gonzalez, D. H. (1997) *The promoter of the Arabidopsis nuclear gene COX5b-1; encoding subunit 5b of the mitochondrial cytochrome c oxidase; directs tissue-specific expression by a combination of positive and negative regulatory elements*. J. Exp. Bot. 55: 1997–2004.

Welchen, E.; Chan, R. L. y Gonzalez, D. H. (2002) *Metabolic regulation of genes encoding cytochrome c and cytochrome c oxidase subunit Vb in Arabidopsis*. Plant Cell Environ. 25: 1605–15.

Welchen, E.; Viola, I. L.; Kim, H. J.; Prendes, L. P.; Comelli, R. N.; Hong, J. C. y Gonzalez, D. H. (2009) *A segment containing a G-box and an ACGT motif confers differential expression characteristics and responses to the Arabidopsis Cytc-2 gene; encoding an isoform of cytochrome c*. J. Exp. 60: 829–45.

Xu, B.; Li, Z.; Zhu, Y.; Wang, H.; Ma, H.; Dong, A. y Huang, H. (2008) *Arabidopsis genes AS1, AS2, and JAG negatively regulate boundary-specifying genes to promote sepal and petal development*. Plant Physiol. 146:566–75.

Yamaguchi, T.; Nukazuka, A. y Tsukaya, H. (2012) *Leaf adaxial-abaxial polarity specification and lamina outgrowth: evolution and development*. Plant Cell Physiol. 53:1180–94.

Yanai, O.; Shani, E.; Dolezal, K.; Tarkowski, P.; Sablowski, R.; Sandberg, G.; Samach, A. y Ori N. (2005) *Arabidopsis KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis*. Curr. Biol. 15: 1566–71.

Yanai, O.; Shani, E.; Russ, D. y Ori, N. (2011) *Gibberellin partly mediates LANCEOLATE activity in tomato*. Plant J. 68: 571–82.

Yang, J. Y.; Iwasaki, M.; Machida, C.; Machida, Y.; Zhou, X. y Chua, N. H. (2008) *β Cl1, the pathogenicity factor of TYLCCNV, interacts with AS1 to alter leaf development and suppress selective jasmonic acid responses*. Genes Dev. 22: 2564–77.

Yang, X.; Pang, H. B.; Liu, B. L.; Qiu, Z. J.; Gao, Q.; Wei, L.; Dong, Y. y Wang, Y. Z. (2012) *Evolution of double positive autoregulatory feedback loops in CYCLOIDEA2 clade genes is associated with the origin of floral zygomorphy*. Plant Cell 24: 1834–47.

Yanofsky, M. F.; Ma, H.; Bowman, J. L.; Drews, G. N.; Feldmann, K. A. y Meyerowitz, E. M. (1990) *The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene Agamous resembles transcription factors*. Nature 346: 35–9.

Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S. y Madden, T. L. (2012) *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC Bioinformatics.13:134.

Yuan, Z.; Gao, S.; Xue, D.W.; Luo, D.; Li, L. T.; Ding, S. Y.; Yao, X.; Wilson, Z. A.; Qian, Q. y Zhang, D. B. (2009) *RETARDED PALEA1 controls palea development and floral zygomorphy in rice*. Plant Physiol. 149: 235–44.

Zhao, Y.D. (2010) *Auxin biosynthesis and its role in plant development*. Annu. Rev. Plant Biol. 61: 49–64.