

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



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

**“EL PAPEL DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN  
DE LA FAMILIA TCP EN LA REGULACIÓN DEL  
DESARROLLO Y LA ARQUITECTURA VEGETAL”**

Lic. Victoria Gastaldi

Director de Tesis: Dr. Daniel H. González

Co-director de Tesis: Dr. Leandro E. Lucero

Laboratorio de Biología Molecular

Instituto Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)

**-2020-**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Nacional de Litoral y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por darme la posibilidad de realizar mis estudios de doctorado, de manera gratuita, en una carrera con la máxima acreditación otorgada por la CONEAU. En donde, además, realicé mi carrera de grado y, actualmente, puedo desempeñarme como docente, tarea que disfruto muchísimo. Estoy orgullosa de pertenecer a la gran familia de la Universidad Pública.

A CONICET, por financiar este posgrado durante 5 años de forma integral, habiéndome otorgado una beca doctoral para poder realizar la carrera de doctorado.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral y sus directivos, por cederme un espacio de trabajo y permitirme ser partícipe de esta comunidad científica. Al Dr. Daniel Gonzalez, por dirigirme, no sólo durante mi doctorado, sino también durante mi proyecto final de grado, por las reuniones, discusiones y debates que permitieron formarme en el ámbito científico. Al Dr. Leandro Lucero, uno de los investigadores más apasionados por la ciencia que conocí en este camino, por enseñarme todos sus conocimientos desde mis inicios en la carrera científica, siempre motivándome a aprender experimentos/técnicas nuevas, a leer *papers*, a discutir resultados y por bancarme muchas veces a nivel personal. A las Dras. Elina Welchen, Ivana Viola, Diana Gras y el Dr. Federico Ariel que, si bien no formaron parte directamente de mi tesis doctoral, me ayudaron cuando lo necesitaban, me dieron consejos, discutieron resultados, me nutrieron de sus conocimientos y motivaciones, y compartieron conmigo tanto, momentos profesionales como personales, que los llevaré siempre conmigo. En general quiero agradecer a todo el Laboratorio de Biología Molecular, todos sus integrantes de alguna u otra manera me ayudaron en este arduo camino. Quiero destacar la solidaridad de mis compañeros, el trabajo en equipo y el compañerismo entre becarios, que hizo que el día a día sea siempre mejor.

A la peña de los INTENSOS, a todos estos compañeros hermosos que me dio el IAL, no solo excelentes profesionales, sino que también excelentes AMIGOS. Gracias por esas discusiones eternas, que me nutrieron como persona, esas cervezas interminables que me alegraban los días, esos congresos y seminarios compartidos, esas peñas semanales que hicieron que me lleve millones de recuerdos que me llenan el alma. Gracias infinitas, porque creo que una de las cosas mas valiosas que me llevo de este doctorado, son ustedes, ojalá la vida nos vuelva a cruzar.

A mi familia, mi pilar principal, a mis papás, por darme la posibilidad de estudiar una carrera de grado y de posgrado, por bancarme tantos años de estudio y trabajo, por motivarme siempre a ser mejor persona,

por darme el ejemplo a seguir, por esos *tentempiés* impresionantes que alegraban nuestros encuentros diarios. Ojalá pueda ser, aunque sea un poquito de todo lo espectacular que son ustedes. A mis hermanos, que siempre tienen la palabra justa, me bancan en todas y los amo, no pude haber tenido mejores hermanos que ustedes!!. Gracias a todo *el círculo de la confianza*, que hace que la vida sea hermosa, única e inolvidable, sólo las personas que nos conocen saben lo bien que se la pasa en esta familia!!!

A Ariel, lo más hermoso que me dio el IAL, la persona que me genera sentimientos que nunca tuve en mi vida, que veía y me cambiaba el día, que me enamoró en todos sus aspectos, gracias Arielo, porque no existe compañero de vida mas hermoso que vos, me encanta compartir cada momento, no solo personal sino profesional. Me hiciste crecer muchísimo de manera científica, tus charlas y discusiones, me ayudaron a ver la ciencia desde otro lado. Gracias, porque levantarme con vos todos los días y verte al lado mio, es uno de los regalos más lindos que me dio la vida. Por sumarte a mi *círculo de la confianza*, disfrutar cada día hoy y siempre, juntos.

A mis amigas, Vale, Male, Delfi, Rocha, Dana, Chechu, Agus, Giuli y Belu (un beso al cielo), que muchas veces juntas y otras varias a la distancia, me bancaron, como soy, con mis tiempos, con mis locuras por el estudio y el trabajo, siempre organizando peñas que, aunque sean mensuales, te alegran la vida y te demuestran que siempre están. A Ana, gran amiga y por sobre todo gran persona, que estuvo presente en estos cinco años (y en toda la carrera de grado), siempre, a la distancia, pero siempre, ya sea con laaargos audios de *WhatsApp* o alguna que otra juntada, cuando la vida nos dio el lujo de poder volvernos a reunir. Espero sigamos siendo grandes amigas, porque con vos la vida siempre es más linda!!!

## LUGAR DE REALIZACIÓN DE LA TESIS Y PUBLICACIONES

El presente trabajo de tesis fue llevado a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (Universidad Nacional del Litoral-CONICET). Los resultados obtenidos dieron lugar a las siguientes publicaciones científicas en revistas internacionales con referato estricto:

**Gastaldi, Victoria;** Lucero, Leandro E.; Ferrero, Lucía V.; Ariel, Federico D.; Gonzalez, Daniel H. (2020) Class I TCP transcription factors activate the *SAUR63* gene subfamily in gibberellin-dependent stamen filament elongation. *Plant Physiology*. 182: 2096-2110. DOI: 10.1104/pp.19.01501.

Ferrero, Lucía V.; **Gastaldi, Victoria;** Viola, Ivana L.; Ariel, Federico D.; Gonzalez, Daniel H. (2020) Class I TCP proteins TCP14 and TCP15 are required for elongation and gene expression responses to auxin. *Plant Molecular Biology*. DOI: 10.1007/s11103-020-01075-y.



## 1. ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
LUGAR DE REALIZACIÓN DE LA TESIS Y PUBLICACIONES.....	3
1. ÍNDICE.....	4
2. ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA.....	8
2.1. Abreviaturas y símbolos.....	8
2.2. Nomenclatura para genes y proteínas.....	10
3. RESUMEN.....	11
4. ABSTRACT.....	14
5. INTRODUCCIÓN.....	16
5.1. Arabidopsis como organismo modelo.....	16
5.1.1. El ciclo de vida de Arabidopsis thaliana.....	17
5.2. Desarrollo floral.....	20
5.3. Desarrollo de ramificaciones.....	23
5.4. Hormonas vegetales.....	24
5.4.1. Giberelinas.....	25
5.4.2. Auxinas.....	28
5.4.3. Jasmonatos.....	31
5.4.4. Estrigolactonas.....	34
5.5. Hormonas y desarrollo floral.....	37
5.5.1. Auxinas.....	38
5.5.2. Ácido Jasmónico.....	39
5.5.3. Giberelinas.....	41
5.6. Hormonas y desarrollo de ramas laterales.....	43
5.7. La calidad de la luz como reguladora del desarrollo de ramificaciones.....	49
5.7.1. Síndrome de evasión de la sombra.....	49
5.8. Familia TCP.....	52
5.8.1. Interacción proteína-proteína.....	54
5.8.2. Funciones de los factores de transcripción TCP.....	55
5.8.3. BRC1 como regulador del desarrollo de ramificaciones.....	57
5.9. Familia KNOX.....	58
6. OBJETIVOS.....	62
6.1. Objetivos específicos.....	62
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
7.1. Material vegetal.....	64

7.2.	Cepas empleadas.....	66
7.3.	Vectores utilizados .....	66
7.4.	Condiciones generales de crecimiento de plantas en cámara de cultivo .....	67
7.5.	Análisis de secuencias.....	68
7.6.	Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) .....	68
7.7.	Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....	68
7.8.	Purificación de fragmentos de ADN .....	68
7.9.	Digestión con endonucleasas de restricción .....	69
7.10.	Ligación de moléculas de ADN .....	69
7.10.1.	Generación de construcciones génicas: .....	69
7.11.	Mutagénesis por Quickchange .....	70
7.12.	Determinación de la secuencia de moléculas de ADN .....	70
7.13.	Transformación de <i>Escherichia coli</i> con ADN plasmídico por electroporación.....	70
7.14.	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con ADN plasmídico por electroporación .....	71
7.15.	Preparación de ADN plasmídico .....	71
7.16.	Preparación de ADN genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	72
7.17.	Transformación estable de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	72
7.18.	Análisis de plantas transformadas.....	73
7.19.	Medición de la longitud del filamento del estambre .....	73
7.20.	Medición del número de ramas laterales.....	73
7.21.	Ensayo de decapitación .....	74
7.22.	Toma de muestras para análisis de expresión génica .....	74
7.23.	Preparación y análisis de ARN .....	74
7.24.	Extracción de proteínas totales de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	75
7.25.	Separación de proteínas y análisis por western blot.....	75
7.26.	Microscopía electrónica de barrido.....	76
7.27.	Análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa .....	76
7.28.	Inmunoprecipitación de la cromatina .....	76
7.29.	Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en presencia de acetato de litio .....	77
7.30.	Ensayos de Doble Híbrido en levaduras .....	78
7.31.	Ensayo de Transferencia de Energía Resonante de Förster (FRET).....	78
8.	RESULTADOS.....	81
8.1.	Estudio del papel de los factores de transcripción TCP de clase I durante la elongación del filamento del estambre en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	81
8.1.1.	TCP15 y proteínas TCP de clase I asociadas afectan la elongación del filamento del estambre	81
8.1.2.	Las proteínas TCP de clase I modulan la expresión de los genes de la subfamilia <i>SAUR63</i> .....	86

8.1.3.	La sobreexpresión de <i>SAUR63</i> revierte el defecto en la elongación del filamento del estambre de plantas <i>pTCP15::TCP15-EAR</i> .....	90
8.1.4.	<i>SAUR63</i> es blanco directo de <i>TCP15</i> .....	92
8.1.5.	Genes inducidos por GA y ARF6/8, pero no genes inducidos por JA, se encuentran reprimidos en plantas <i>pTCP15::TCP15-EAR</i> .....	95
8.1.6.	La sobreexpresión de <i>TCP15</i> revierte el defecto en elongación del filamento del estambre en plantas deficientes en GA.....	98
8.1.7.	La inducción de genes de la subfamilia <i>SAUR63</i> por auxinas no se ve comprometida en plantas deficientes en proteínas TCP de clase I .....	101
8.2.	Estudios de la función de <i>KNAT1</i> en la regulación del crecimiento de los estambres .....	103
8.2.1.	Plantas con niveles alterados de <i>KNAT1</i> tienen afectada la elongación del filamento del estambre .....	103
8.2.2.	<i>KNAT1</i> regula la vía de GA durante la elongación del filamento del estambre .....	104
8.2.3.	<i>KNAT1</i> regula de manera negativa y directa la expresión de <i>TCP15</i> .....	106
8.3.	Estudios de la función de <i>TCP14</i> y <i>TCP15</i> en la regulación del desarrollo de ramas axilares en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	110
8.3.1.	Plantas con niveles disminuidos de <i>TCP14</i> y <i>TCP15</i> presentan un menor número de ramas axilares .....	110
8.3.2.	<i>TCP14</i> y <i>TCP15</i> reprimen la expresión de <i>BRC1</i> en yemas axilares.....	112
8.3.3.	La decapitación anula el efecto de la falta de <i>TCP14</i> y <i>TCP15</i> sobre el desarrollo de las ramificaciones .....	115
8.3.4.	<i>TCP14</i> y <i>TCP15</i> participan en la inhibición del desarrollo de ramas axilares en respuesta a un incremento en la proporción de luz roja lejana .....	118
8.3.5.	<i>TCP15</i> interacciona con <i>BRC1</i> .....	120
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES .....	124
9.1.	Estudio del papel de los factores de transcripción TCP de clase I durante la elongación del filamento del estambre de <i>Arabidopsis</i> .....	124
9.2.	Estudios de la función de <i>KNAT1</i> en la regulación de la expresión de los factores de transcripción TCP y su función en el desarrollo de los estambres .....	127
9.3.	Estudios de la función de <i>TCP14</i> y <i>TCP15</i> en la regulación del desarrollo de ramas axilares en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	130
10.	CONCLUSIONES GENERALES.....	135
11.	BIBLIOGRAFÍA .....	137
12.	ANEXOS.....	166
12.1.	Anexo I: Lista de oligonucleótidos utilizados.....	166

12.2. Anexo II: Análisis de enriquecimiento de motivos de las regiones promotoras de los genes de la subfamilia del <i>SAUR63</i> .....	170
12.3. Anexo III: Lista de genes con expresión reducida en plantas <i>myb21 myb24</i> , pero no en plantas <i>pTCP15::TCP15-EAR</i> .....	173
12.4. Anexo IV: Lista de genes con niveles de expresión reducidos en plantas <i>arf6 arf8</i> y <i>pTCP15::TCP15-EAR</i> .....	181

## 2. ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA

### 2.1. Abreviaturas y símbolos

**A:** Adenina

**ABA:** Ácido abscísico

**ABRC:** *Arabidopsis Biological Resource Center*

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico copia

**ADN-T:** ADN de transferencia

**AGI:** *Arabidopsis Genome Initiative*

**amiARN:** Micro ARN artificial

**ANOVA:** Análisis de la varianza

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNasa A:** Ribonucleasa A

**AUX:** Auxinas

**C:** Citosina

**CaMV:** Virus del mosaico de la coliflor

**ChIP:** Inmunoprecipitación de la cromatina

**CK:** Citoquininas

**cm:** Centímetros

**col.:** Colaboradores

**dNTP:** desoxinucleótido trifosfato (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

**DO:** densidad óptica

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**Ej.:** ejemplo

**ET:** etileno

**FAA:** formaldehído, alcohol, acético

**Fig.:** figura

**g:** gravedad

**G:** guanina

**GA:** giberelinas

**GFP:** proteína fluorescente verde

**GUS:**  $\beta$ -glucuronidasa

**h:** hora / horas

**His:** histidina

**IAA:** ácido indolacético  
**JA:** ácido jasmónico  
**LB:** Luria-Bertani  
**Leu:** leucina  
**M:** molar  
**MQ:** agua mili-Q  
**min:** minuto  
**ml:** mililitro/s  
**mM:** milimolar  
**mm:** milímetros  
**MS:** medio de cultivo Murashige-Skoog  
**MUG:** 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-glucurónido  
**NASC:** *Nottingham Arabidopsis Stock Centre*  
**ng:** nanogramos  
**nm:** nanometros  
**nM:** nanomolar  
**PAC:** paclobutrazol  
**PMSF:** fluoruro de fenil metil sulfonilo  
**p/v:** peso en volumen  
**pb:** pares de bases  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa  
**PM:** peso molecular  
**OE:** sobreexpresante  
**ON:** *over night* (durante la noche)  
**RAM:** *Root Apical Meristem* – meristema apical de la raíz  
**rpm:** revoluciones por minuto  
**RT-qPCR:** retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa en tiempo real  
**s:** segundos  
**SA:** ácido salicílico  
**SAM:** *Shoot Apical Meristem* – meristema apical del tallo  
**SDS:** dodecil sulfato de sodio  
**SL:** estrigolactonas  
**SOB:** *Super Optimal Broth* (caldo súper óptimo)  
**T:** timina  
**TAE:** tris, acetato, EDTA  
**Tm:** temperatura de fusión

**U:** unidad / es

**UV:** ultravioleta

**V:** voltio

**v/v:** volumen en volumen

**vol:** volumen/es

**WT:** genotipo salvaje

**X-gluc:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-glucurónido

**μE:** microeinstein

**μg:** microgramos

**μl:** microlitros

**μm:** micrometros

**μM:** micromolar

**°C:** grados centígrados

## 2.2. Nomenclatura para genes y proteínas

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

**Proteínas:** se escriben en mayúscula. Ej.: TCP15

**Genes:** se escriben en mayúscula e itálica. Ej.: *TCP15*.

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

### 3. RESUMEN

La elongación del filamento del estambre es particularmente importante en especies autógamas autopolinizadoras, como *Arabidopsis thaliana*. En estas plantas, el polen fertiliza los óvulos de la misma flor, generalmente antes de que la flor se abra. Los estambres deben elongarse para que las anteras lleguen a la parte superior del gineceo en el estadio correcto de desarrollo (es decir, cuando el estigma se vuelve receptivo y la antera dehisce). Una elongación incorrecta del filamento del estambre puede afectar gravemente al éxito de la reproducción. Como es de esperarse, la elongación del filamento del estambre es un proceso estrictamente controlado y ocurre durante etapas precisas del desarrollo de las flores.

Varias hormonas, incluidas auxinas, giberelinas (GA) y ácido jasmónico (JA), están involucradas en la elongación del filamento del estambre. Plantas defectuosas en la biosíntesis, transporte o percepción de auxinas y mutantes dobles en los factores de respuesta a auxinas (ARF), ARF6 y ARF8, presentan defectos en la elongación de este órgano y la maduración de las anteras. Entre los genes regulados negativamente en flores de plantas mutantes *arf6 arf8*, hay varios genes de la familia SAUR (SMALL AUXIN UP RNA) de la subfamilia SAUR63. Las proteínas SAUR promueven la expansión activando H<sup>+</sup>-ATPasas de la membrana plasmática y la sobreexpresión de los miembros de la subfamilia SAUR63 estimula la elongación del filamento. Por lo tanto, la inducción de genes SAUR por ARF6 y ARF8 puede ser necesaria para estimular el crecimiento del filamento.

Plantas defectuosas en la biosíntesis o percepción de GA también muestran defectos en la elongación del filamento del estambre. Las GA inducen la síntesis de JA y la expresión de los factores MYB para modular el desarrollo del estambre; sin embargo, el fenotipo de estambre corto de plantas deficientes en GA no puede ser rescatado por JA exógeno, lo que sugiere que otras vías dependientes de GA e independientes de JA son necesarias para una correcta elongación del filamento del estambre. En particular, el análisis de datos de expresión global indica que varios genes de la subfamilia SAUR63 también son inducidos por GA. Sin embargo, el mecanismo involucrado en este proceso es en gran parte desconocido.

Los factores de transcripción de la familia TCP regulan varios aspectos del desarrollo de las plantas, incluyendo arquitectura vegetal, morfogénesis y maduración foliar, crecimiento del tallo de la inflorescencia y desarrollo de órganos. Existen 24 proteínas TCP en *Arabidopsis*, 13 asignadas a la clase I y 11 a la clase II. Las proteínas de clase I muestran un alto grado de redundancia funcional, y por lo tanto los fenotipos de desarrollo son generalmente observados sólo en mutantes de orden superior o en plantas que expresan fusiones de las proteínas TCP al dominio EAR, que convierten a los factores de transcripción en formas represoras dominantes.

Durante la primera parte de esta Tesis doctoral, investigamos el papel de TCP15 y factores TCP de clase I relacionados en la elongación del filamento del estambre. Encontramos que las proteínas TCP de clase I participan en la elongación del filamento del estambre induciendo directamente la expresión de genes de la subfamilia SAUR63. Por otro lado, encontramos que las GA inducen la expresión de genes TCP de clase I y de



esta manera inducen la elongación de los estambres. Sumado a esto, hallamos que la inducción de algunos de los genes *SAUR* por GA depende de las proteínas TCP.

Para completar esta vía molecular, encontramos que *KNAT1*, un factor de transcripción de la familia *KNOX*, es capaz de unirse a la región promotora de *TCP15* y reprimir su expresión. De manera independiente a esta regulación, observamos que *KNAT1* también reprime la expresión del gen *GA20ox1*, importante para la biosíntesis de GA. Esto se llevaría a cabo en estadios tardíos del desarrollo floral, en donde el estambre ya se elongó lo suficiente y logró fecundar al gineceo. De esta manera, *KNAT1* reprime la elongación afectando la biosíntesis de GA y reprimiendo la expresión de *TCP15*.

El patrón de ramificación es un componente importante en la arquitectura de las plantas y determina la producción de hojas, frutos y semillas. A medida que se forman los primordios foliares en los extremos del meristema apical del tallo, entre el meristema y el órgano en desarrollo se establece una región de células pequeñas y de división lenta que forma una zona límite. Dentro de esta zona se forman los meristemas axilares. Después de la formación de los mismos, éstos pueden experimentar un crecimiento inmediato y convertirse en una rama lateral o permanecer en un estado de latencia o dormancia. El desarrollo de las yemas axilares depende de numerosos factores, tanto endógenos (como las hormonas y los azúcares) como exógenos (calidad de la luz, intensidad, fotoperíodo, entre otras).

*BRC1*, proteína TCP de clase II, ya ha sido descrita como inhibidora del desarrollo de ramas laterales. Durante la última etapa de esta Tesis doctoral, encontramos una nueva función de las proteínas TCP de clase I *TCP14* y *TCP15* en este proceso, ya que promueven el desarrollo de yemas axilares generando un cambio en la arquitectura vegetal en condiciones normales de crecimiento. Además, encontramos que *TCP15* y *TCP14* promueven el crecimiento de ramas laterales inhibiendo la expresión de *BRC1* de manera indirecta y que, por otro lado, *TCP15* es capaz de interactuar con *BRC1*, lo cual podría ser otro punto de regulación que impide que *BRC1* se una y regule a sus genes blanco.

Como se nombró anteriormente, se sabe que el desarrollo de ramas laterales es un proceso altamente regulado por factores exógenos, para que las plantas adapten su capacidad de ramificación según las condiciones ambientales a las cuales están expuestas. Entre estos factores ambientales, la luz es uno de los más importantes. Cuando las plantas están expuestas a una condición de sombreado, en donde la relación de la luz roja con respecto a la luz roja lejana es menor y las condiciones lumínicas no son las adecuadas, se promueve el crecimiento del tallo principal en búsqueda de una buena calidad de luz y se inhibe el crecimiento de ramas laterales. En este trabajo, encontramos que la expresión de las TCP de clase I, *TCP14* y *TCP15*, es regulada negativamente por la luz roja lejana de manera opuesta a lo ya demostrado para *BRC1*. Por otro lado, hallamos que, en condiciones de luz roja lejana, las plantas mutantes en *TCP14* y *TCP15* responden en menor medida a esta calidad de luz, indicando que están involucradas en la respuesta a esta condición lumínica. Si bien es importante realizar un mayor número de experimentos para profundizar y dilucidar con precisión los mecanismos de acción de las proteínas TCP de clase I en este contexto, este trabajo

de Tesis permitió dilucidar parte del mecanismo y abrir una nueva línea de investigación en el laboratorio que vale la pena continuar estudiando.

## 4. ABSTRACT

Stamen filament elongation is particularly important in self-pollinating autogamous species, such as *Arabidopsis thaliana*. In these plants, the pollen fertilizes the ovules from the same flower, usually before the flower opens. Stamens must elongate for anthers to reach the upper part of the gynoecium at the correct developmental stage (i.e. when the stigma becomes receptive and anthers dehisce). Incorrect stamen filament elongation may severely affect successful reproduction. As expected, elongation of stamen filaments is a strictly controlled process and occurs during specific stages of flower development.

Several hormones, including auxin, gibberellins (GA), and jasmonic acid (JA), are involved in stamen filament elongation. Plants defective in auxin biosynthesis, transport or perception and double mutants in the auxin response factors (ARF), ARF6 and ARF8, show defects in stamen filament elongation and anther maturation. Among the genes downregulated in *arf6 arf8* mutant flowers, there are several genes of the SAUR (SMALL AUXIN UP RNA) family from the SAUR63 subfamily. SAUR proteins promote cell expansion by activating the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and overexpression of members of the SAUR63 subfamily stimulates filament elongation. Therefore, the induction of SAUR genes by ARF6 and ARF8 may be necessary to stimulate filament growth.

Plants defective in GA biosynthesis or perception also present defects in stamen filament elongation. GA induce JA synthesis and the expression of MYB factors to modulate stamen development; however, the short stamen phenotype of GA-deficient plants cannot be rescued by exogenous JA, suggesting that other GA-dependent and JA-independent pathways are required for correct elongation of the stamen filament. Notably, analysis of available global expression data indicates that several SAUR63 subfamily genes are also induced by GA. However, the mechanism involved in this process is largely unknown.

TCP transcription factors regulate various aspects of plant development, including plant architecture, leaf morphogenesis and maturation, inflorescence stem growth, and floral organ development. Twenty-four TCP proteins (TCPs), assigned to either class I (13 proteins) or class II (11 proteins), are encoded in the Arabidopsis genome. Class I proteins show a high degree of functional redundancy, and therefore developmental phenotypes are usually observed only in higher order mutants or plants that express fusions of TCPs to the EAR domain that convert transcription factors into strong dominant repressor forms.

During the first part of this PhD thesis, we investigated the role of TCP15 and related class I proteins in stamen filament elongation. We found that class I TCP proteins participate in stamen filament elongation, directly inducing the expression of genes of the SAUR63 subfamily. On the other hand, we found that GA induce the expression of class I TCPs and thus induce elongation of the stamens. Added to this, we found that the induction of some of the SAUR genes by GA is TCP dependent.

To complete this molecular pathway, we found that KNAT1, a transcription factor of the KNOX family, is able to bind to the promoter region of *TCP15* and repress its expression. Independently of this regulation, we observed that KNAT1 also represses the expression of the *GA20ox1* gene, important for GA biosynthesis.

This would take place in late stages of flower development, when the stamen has already elongated enough and is able to fertilize the gynoecium. Thus, KNAT1 represses elongation, affecting GA biosynthesis and repressing the expression of TCP15 and related TCPs.

The branching pattern is an important determinant of plant architecture and is decisive for the production of leaves, fruits and seeds. As leaf primordia form at the ends of the stem apical meristem, a region of small, slowly dividing cells is established between the meristem and the developing organ, forming a boundary zone. Within this area, axillary meristems are formed. These can undergo immediate growth and become a lateral branch or remain in a dormant state. Axillary bud development depends on numerous endogenous (such as hormones and sugars) and exogenous (quality of light, intensity, photoperiod) factors.

BRC1, a class II TCP protein, has already been described as a repressor of lateral branch development. During the last stage of this doctoral thesis, we found a new function of the class I TCP proteins TCP14 and TCP15 in lateral branch development, since they promote the development of axillary buds, generating a change in plant architecture under normal growing conditions. We also found that TCP15 and TCP14 promote lateral branch growth by indirectly inhibiting the expression of *BRC1*. In addition, we found that TCP15 is able to interact with BRC1, which could be another regulatory mechanism that prevents BRC1 action and regulation of its target genes.

It is well known that lateral branch development is highly regulated by exogenous factors, so that plants can adapt their branching pattern according to the environmental conditions to which they are exposed. Among these environmental factors, light is one of the most important. When the plants are exposed to a shade condition, where the ratio of red light to far red light is lower, the growth of the main stem is promoted and lateral branch growth is inhibited. In this work, we found that the expression of the class I TCPs, TCP14 and TCP15, is negatively regulated by far red light in an opposite way to what has already been demonstrated for BRC1. On the other hand, we found that, under conditions of far red light, mutant plants in *TCP14* and *TCP15* are less sensitive of this light quality, indicating that they are involved in responses to this condition. It is necessary to carry out further experiments to understand the mechanisms of action of class I TCP proteins in this context. This thesis allowed us to elucidate part of this mechanism and open a new line of research in the laboratory that is worth studying further.

# **INTRODUCCIÓN**

## 5. INTRODUCCIÓN

La arquitectura y la morfología de las plantas están determinadas por múltiples procesos que regulan 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 componen [1]. Los órganos se desarrollan a partir de grupos de células indiferenciadas y totipotentes que conforman los meristemas. Estas células son capaces de diferenciarse y generar cualquier tipo celular y, dado que las plantas no poseen la capacidad de trasladarse, esta característica les permite adaptarse a los continuos factores ambientales a los cuales se encuentran expuestas, asegurando su supervivencia [2]. Los patrones de crecimiento, división y diferenciación celular que definen las distintas etapas del desarrollo de las plantas deben estar finamente regulados tanto temporal como espacialmente. Esta regulación ocurre, en gran parte, modulando la abundancia de los transcritos de muchos genes en las células de cada tejido. Debido que todas las células somáticas poseen la misma información genética, la clave para conseguir la especialización estructural y funcional de las células es la expresión diferencial de ciertos genes. Por esta razón, es necesaria una fina y sincronizada regulación de la expresión génica, llevada a cabo a distintos niveles, desde el remodelado de la cromatina hasta la modificación postraduccional de las proteínas, de manera de tener un correcto balance entre la expresión de un gen y los niveles de proteína funcional derivada de dicho gen.

Uno de los niveles más importantes en la regulación de la expresión génica es el llevado a cabo por los factores de transcripción. Éstos son proteínas encargadas de regular directamente la expresión de genes, mediante la unión a sitios específicos dentro de sus promotores, generando de esta manera una activación o represión de la transcripción de los mismos. Por otro lado, las hormonas vegetales (fitohormonas) coordinan las funciones celulares, modulando el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Éstas actúan tanto corriente arriba como corriente abajo de los factores de transcripción, e integran numerosas vías que afectan diversos procesos a nivel de órganos o tejidos.

### 5.1. *Arabidopsis* como organismo modelo

*Arabidopsis* es un género de plantas herbáceas de la familia de las brasicáceas o crucíferas que ha sido objeto de intenso estudio como modelo para la investigación en biología vegetal. Actualmente cuenta con 9 especies y 8 subespecies, entre las que se encuentra *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana* o *Arabidopsis*, Fig. 1). Esta especie puede medir entre diez y treinta centímetros de altura sin incluir la raíz. Las flores son muy pequeñas y hermafroditas (con órganos reproductores masculinos y femeninos), de color blanco, y se agrupan formando pequeños grupos (inflorescencias). El fruto es una silicua de un par de centímetros de largo y dos milímetros de ancho, que puede llegar a contener más de treinta semillas. Éstas se dispersan a través del viento al abrirse la silicua madura. Si bien *Arabidopsis* no es una planta de interés agronómico, ofrece importantes ventajas que la han convertido en la especie más utilizada para la investigación en

genética y biología molecular vegetal. Avances significativos en el entendimiento del crecimiento y el desarrollo de plantas se han realizado basándose en la genética molecular de esta simple angiosperma [3].

*Arabidopsis* fue sugerida por primera vez como un modelo adecuado para estudios biológicos de plantas, especialmente genéticos, a principios de la década de 1940 [4]. Las razones para esto eran que es un verdadero diploide con un ciclo de vida muy corto (6-8 semanas), de fecundación autógena, y que produce numerosas semillas que permanecen viables durante muchos años. Su rápido crecimiento permite el análisis de un gran número de individuos en un mínimo espacio y, por lo tanto, la consiguiente amplificación rápida de los genotipos útiles para posteriores estudios [2]. Estos factores, sumados a la facilidad de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y, por lo tanto, la posibilidad de introducir genes de interés y mantenerlos de forma estable, la han convertido en la planta modelo favorita. Además, presenta un genoma pequeño (de aproximadamente 125 Mpb) con relativamente escasas secuencias repetidas, el cual fue secuenciado completamente en el año 2000 (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). Asimismo, un gran número de líneas mutantes se encuentran disponibles en centros de almacenamiento en EEUU y en el Reino Unido. Para integrar todo el conocimiento que se genera en miles de laboratorios de todo el planeta se han creado varias herramientas que permiten a los investigadores explorar nuevas conexiones. *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR) es uno de los mayores repositorios online de datos y recursos y el *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) y el *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) son los principales centros de conservación, producción y distribución de plantas de *Arabidopsis* (ecotipos y mutantes) a nivel mundial. Debido a todas las características enunciadas y a la gran cantidad de estudios genéticos y moleculares que se han publicado sobre diversos aspectos del desarrollo de *Arabidopsis*, como germinación, floración o la respuesta ante diferentes tipos de estrés, el potencial para su uso en la investigación básica de dicotiledóneas resulta evidente y es por esto que la hemos elegido como modelo de estudio en nuestro laboratorio.

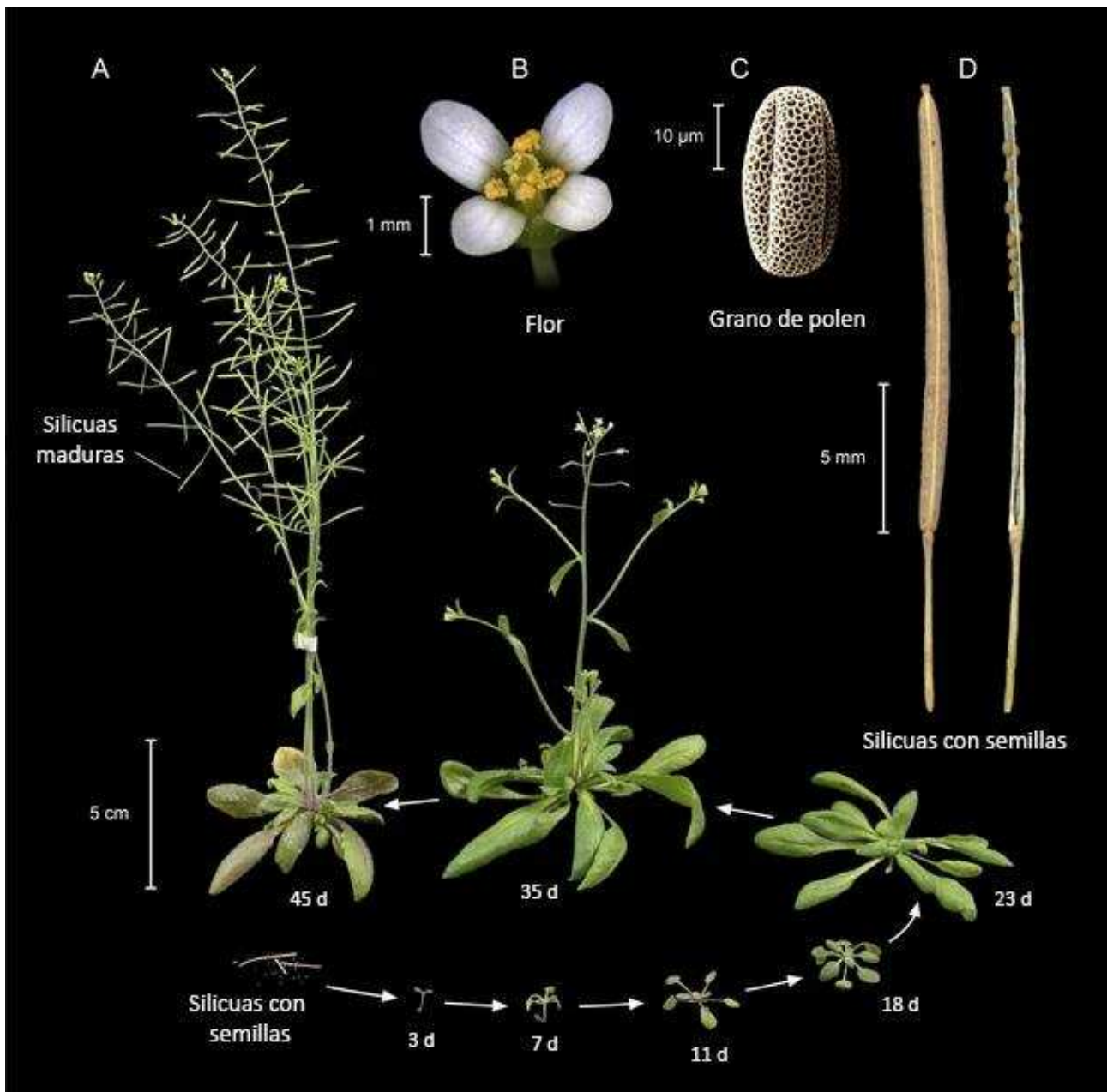
#### 5.1.1. El ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*

El ciclo de vida de *Arabidopsis* puede dividirse en cuatro etapas discretas de desarrollo: fase embrionaria, fase vegetativa juvenil, fase vegetativa adulta y fase reproductiva que culmina con la senescencia. Durante la embriogénesis se establece el plan de desarrollo general. Sin embargo, gran parte de la arquitectura final de la planta se define durante su crecimiento y es altamente dependiente de las condiciones ambientales. En la fase embrionaria se define el patrón apical-basal establecido en los meristemas apicales del tallo (SAM: *Shoot Apical Meristem*) y de la raíz (RAM: *Root Apical Meristem*). Estos meristemas son centros de células madre no diferenciadas en continua división celular. A partir del SAM se generan prácticamente todos los órganos aéreos de las plantas, mientras que a partir del RAM se generan los tejidos correspondientes a las raíces [5]. El hipocotilo constituye el primer órgano de expansión de la plántula. Durante la germinación, luego de la salida de la radícula, el hipocotilo emerge elevando el ápice y los cotiledones para separarlos del suelo y elevarlos hacia la luz. Luego de la germinación, el SAM da lugar al

comienzo de la fase vegetativa juvenil. Durante esta etapa las plántulas desarrollan un par de hojas verdaderas, las cuales presentan tricomas (pelos epidermales) sólo en la superficie adaxial de las hojas. En la fase vegetativa adulta comienzan a desarrollarse hojas verdaderas, que parecen estar ubicadas en un solo plano, en torno al eje central de la planta. Estas hojas desarrollan tricomas en ambas superficies de la lámina [6] y son, en general, ovaladas, con un pecíolo largo y un borde marginal continuo. El número de las hojas de roseta está determinado por una serie de factores que incluyen el genotipo, las condiciones ambientales y el tiempo transcurrido desde la germinación hasta el pasaje a floración [7].

El pasaje a estadio reproductivo está determinado por la aparición del botón floral, conocido como “*bolting*”. La transición del meristema vegetativo a meristema reproductivo está regulada por señales específicas del desarrollo y del medio ambiente como el fotoperiodo, la vernalización o diferentes factores ambientales como el estado nutricional, la temperatura y la disponibilidad de agua. La etapa reproductiva se divide en dos fases: en la primera, denominada “fase reproductiva temprana”, se desarrollan la inflorescencia principal y las hojas caulinares (u hojas reproductivas). En la base de cada hoja, tanto de roseta como caulinar, existe una yema axilar. Algunas de estas yemas se desarrollan dando lugar a ramas, pero la mayoría permanecen durmientes, determinando de esta manera el patrón de ramificación de la planta. Esto depende de numerosos factores tanto endógenos como exógenos, entre los que podemos mencionar las hormonas, los nutrientes y la calidad lumínica. Durante la “fase reproductiva tardía” tendrá lugar la aparición de las inflorescencias secundarias a partir de estas yemas axilares tanto de las hojas caulinares como de las hojas de roseta.

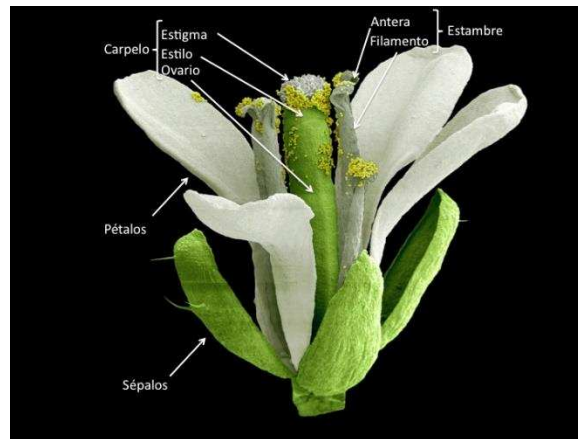




**Figura 1. Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*.** A. Estadios de desarrollo de *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col) desde las semillas (abajo a la izquierda), estableciéndose como plántula (3 días), en estadio vegetativo (18 días) y en estadio reproductivo (23 días). B-D. Fotografías de una flor (B), un grano de polen (C; imagen de microscopía electrónica) y silicuas maduras (D; izquierda: cerrada, derecha: abierta con semillas adheridas). *Figura modificada de Krämer y col., 2015 [8].*

En relación a las flores de *Arabidopsis*, las mismas son radialmente simétricas y están compuestas por un ciclo de cuatro sépalos y un ciclo de cuatro pétalos (estructuras de protección), seguidos por el androceo y el gineceo (estructuras reproductivas). A su vez, el androceo está integrado por cuatro estambres largos y dos cortos (a veces ausentes); cada estambre presenta una antera (donde se produce el polen) y un filamento que establece una conexión entre la antera y el pie de la flor (Fig. 2). A diferencia de la mayoría de las especies

de Angiospermas que presentan polinización cruzada (reproducción alógama), las flores de *A. thaliana* se autopolinizan (sistema reproductivo autógeno). Esto ocurre previo a la antesis floral (apertura de los ciclos de protección), por lo que *A. thaliana* es una planta cleistógama. Para que esto ocurra, es necesaria una sincronización de eventos ontogenéticos extensamente caracterizados para esta especie [9], detallados en la sección 5.2. La autofecundación resulta en el desarrollo de embriones, que luego se convierten en las semillas de la planta que serán más tarde dispersadas.



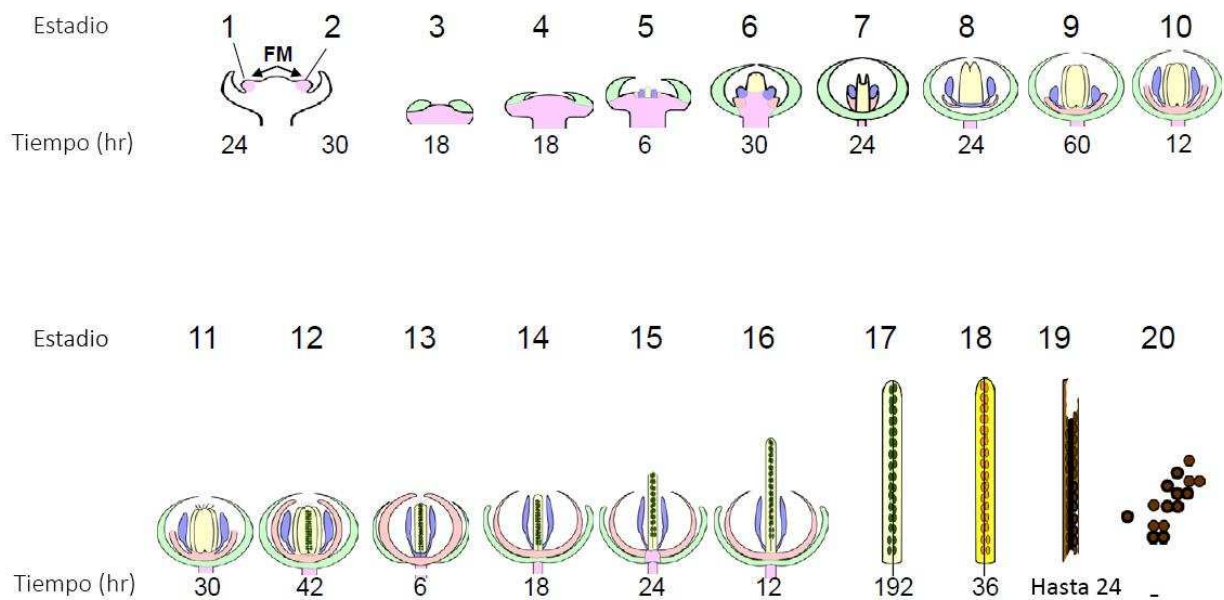
**Figura 2. Flor de *Arabidopsis thaliana*.** Se señalan las diferentes partes de la flor de *Arabidopsis thaliana*. Vista de afuera hacia adentro presenta cuatro sépalos y cuatro pétalos (estructuras de protección de los órganos reproductivos). Luego contiene seis estambres, cuatro largos y dos cortos (estos últimos pueden estar ausentes). A su vez, cada estambre está formado por un filamento y una antera. Esta última es la encargada de producir el polen. En el centro de la flor se encuentra el gineceo, órgano reproductor femenino de la planta, el cual posee en su interior los óvulos a ser fecundados para posteriormente generar el fruto de *Arabidopsis*, denominado silicua o vaina.

## 5.2. Desarrollo floral

El primer paso para la formación de las flores es la transición del meristema vegetativo al meristema apical de la inflorescencia, a partir del cual se formarán los meristemas florales. Este proceso está muy estudiado y se encuentra regulado por diversos factores ambientales y genéticos. Una vez que los primordios florales se establecen, comienzan a expresarse los genes que confieren identidad a los diversos órganos de las flores. El modelo ABCDE para el desarrollo de las flores propone que la identidad de los órganos florales se define mediante cinco clases de genes homeóticos, denominados A, B, C, D y E [10]. Según los modelos de cuarteto floral de especificación de órganos florales [11], el complejo de proteínas de las clases A y E desarrolla sépalos como los órganos florales en el estado fundamental en el primer verticilo floral, el complejo proteico de las clases A, B y E especifica pétalos en el segundo verticilo, el complejo proteico de las clases B, C y E especifica estambres en el tercer verticilo, el complejo proteico de las clases C y E especifica carpelos en el cuarto verticilo y, por último, las proteínas de las clases C, D y E dan lugar a los óvulos. Una vez

que los primordios están formados y la identidad de los estambres está definida, es muy importante que éstos se desarrollen y se elonguen de manera correcta. La elongación del filamento del estambre es particularmente importante en especies autógamas, como *A. thaliana*. En estas plantas, el polen fertiliza a los óvulos de la misma flor, generalmente antes de que la flor se abra. Para que la fertilización ocurra de manera eficiente, los estambres deben elongarse para que la antera alcance la altura del gineceo en el estadio correcto de desarrollo, esto es cuando el estigma se vuelve receptivo y se produce la dehiscencia de las anteras. Una elongación incorrecta del filamento del estambre puede afectar el éxito reproductivo. No es sorprendente que, por ello, la elongación del filamento del estambre sea un proceso estrictamente controlado y ocurra durante estadios específicos del desarrollo floral [12], [13].

El desarrollo de las flores de *A. thaliana* es un proceso complejo, para el cual se han reconocido 20 estadios, representados en la Figura 3 [14], y detallados en la Tabla I.



**Figura 3:** Esquema representativo de los estadios de desarrollo de las flores de *Arabidopsis thaliana* para ver la descripción de cada estadio, ver Tabla I. FM: Meristema Floral. Esquema adaptado de Alvarez-Buylla y col., 2010 [14].

**Tabla I: Estadios de desarrollo floral en *Arabidopsis thaliana* (Adaptado de Smyth y col., 1990)**

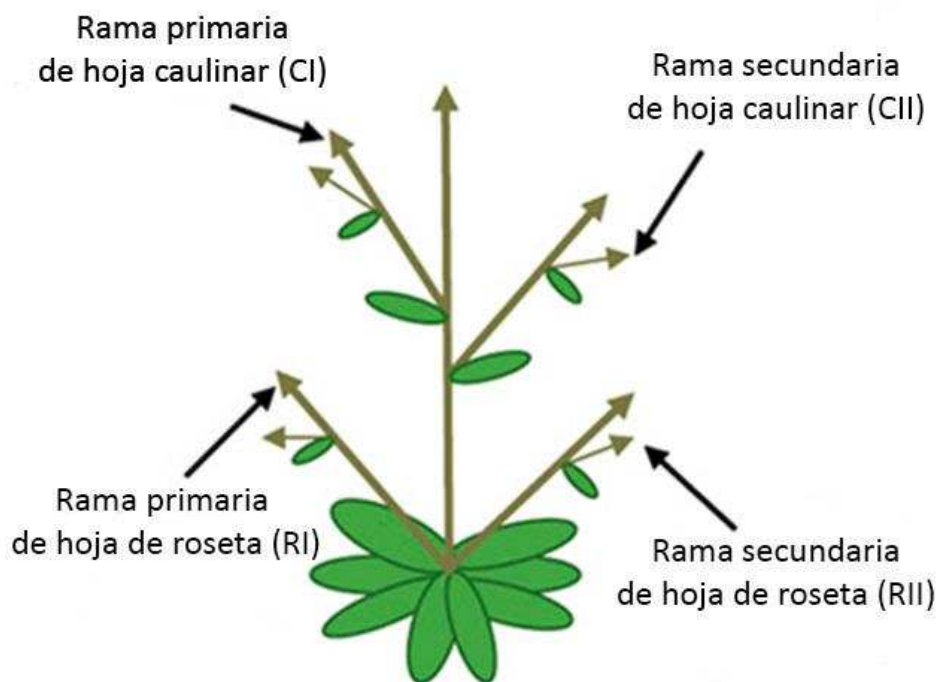
<b>Estadio</b>	<b>Rasgos morfológicos en la flor</b>
1	Inicio de la formación del meristema floral
2	Separación del meristema floral del tallo y la inflorescencia
3	Aparición de los primordios de los sépalos
4	Los sépalos recubren el meristema floral
5	Aparición de los primordios de pétalos y estambres
6	Los sépalos encierran las yemas de los primordios
7	Crecimiento de los estambres largos
8	Aparecen los lóculos en los estambres largos
9	Los primordios de los pétalos se estrechan en la base
10	Los pétalos se sitúan por encima de los estambres cortos
11	Las papilas estigmáticas inician su desarrollo
12	Los estambres largos se sitúan por encima de los pétalos
13	Antesis
<b>Etapas posteriores a la fertilización</b>	
14	Las anteras se extienden por el estigma
15	El estigma crece entre las anteras
16	Senescencia de pétalos y sépalos
17	Caída de sépalos, pétalos y estambres. Crecimiento final de la silicua
18	Se colorea de amarillo la silicua (inicio de la senescencia)
19	Separación de las valvas de la silicua
20	Dispersión de las semillas

**Tabla I: Descripción breve de los estadios del desarrollo floral en *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de Smyth y col., 1990 [9].**

A fines de comprender esta tesis doctoral se hará una breve descripción de los estadios que involucra el desarrollo del órgano en estudio. Durante el estadio 5 del desarrollo floral se hacen visibles los primordios de los estambres largos y, en el caso en que se generen estambres cortos, éstos se desarrollan más tarde a partir de los primordios generados en este estadio. El filamento del estambre se distingue de la antera en el estadio 7 del desarrollo floral. En el estadio 9, los filamentos representan solo un 20% de la longitud total del estambre, considerando las anteras. La fase de elongación del filamento, conocida como de crecimiento pre-antesis, se lleva a cabo entre los estadios 10 y 13; el crecimiento en esta fase es principalmente debido a la expansión celular. Los estambres alcanzan la longitud del gineceo en el estadio 13, cuando la flor se abre (antesis). El crecimiento post-antesis ocurre hasta el estadio 14, cuando el estigma se vuelve receptivo para la polinización. Luego, el estambre cesa su crecimiento. El gineceo continúa elongándose hasta transformarse en el fruto, conocido como silicua.

### 5.3. Desarrollo de ramificaciones

El patrón de ramificación es un componente importante en la arquitectura de las plantas y es el resultado de una compleja regulación espacial-temporal del crecimiento de las yemas axilares, tanto de las hojas de roseta como de las hojas caulinares. La producción de meristemas axilares está estrechamente vinculada con la formación de hojas y su separación del ápice del tallo. A medida que se forman los primordios foliares en los extremos del meristema apical del tallo, entre el meristema y el órgano en desarrollo se establece una región de células pequeñas y de división lenta que forma una zona límite. Dentro de esta zona se forman los meristemas axilares. Después de la formación de los mismos, éstos pueden experimentar un crecimiento inmediato y convertirse en una rama lateral o permanecer en un estado de latencia o dormancia. La latencia no es definitiva, ya que la yema puede reanudar su crecimiento, por ejemplo en caso de un daño en el ápice o al inicio de la floración [15]–[18]. En la figura 4 se presenta un esquema con los diferentes tipos de ramas presentes en *A. thaliana* y la nomenclatura que se utiliza para su descripción, en la cual nos basaremos en este trabajo de tesis.



**Figura 4: Esquema de la estructura de ramas de *Arabidopsis thaliana*.** RI: rama principal de hoja de roseta; RII: rama secundaria de hoja de roseta; CI: rama principal de hoja caulinar; CII: rama secundaria de hoja caulinar. *Figura adaptada de Aguilar-Martinez y col., 2007 [19].*

A nivel de cada yema axilar, se integran diversas señales endógenas y de desarrollo para determinar el destino del brote y establecer el número y posición de los nuevos brotes en crecimiento dentro de las plantas. Esta regulación depende, en gran medida, de factores exógenos [20]–[27], para que las plantas adapten su capacidad de ramificación según las condiciones ambientales a las cuales están expuestas. Entre estos



factores ambientales, la luz es uno de los más importantes [28]; las plantas modulan el crecimiento y desarrollo de las yemas de acuerdo con los parámetros lumínicos que perciben, es decir, la intensidad y la calidad de la luz, dependiendo esto de las distintas longitudes de onda y sus proporciones relativas [29]–[34] y del fotoperiodo, es decir la cantidad de horas de luz y de oscuridad en un ciclo diario de 24 horas [35]. Existen otros reguladores del desarrollo de ramificaciones, como son las hormonas vegetales, entre ellas las auxinas [36]–[38], las citoquininas (CK) [39], [40], las estrigolactonas (SL) [41]–[52] y las giberelinas (GA) [53]–[55]. Los nutrientes, como los azúcares, son otros de los factores importantes que modulan la arquitectura de las plantas [56]. Un modelo simplificado de los factores que afectan el desarrollo de ramificaciones se ilustra en la Figura 5.

En este trabajo de tesis nos centraremos en el estudio de algunos de estos factores involucrados en el desarrollo de ramificaciones laterales, como son las auxinas, utilizando ensayos de decapitación, y la calidad de la luz. Es por ello que dedicaremos unos párrafos de la introducción de esta tesis para describir la acción de estos factores.

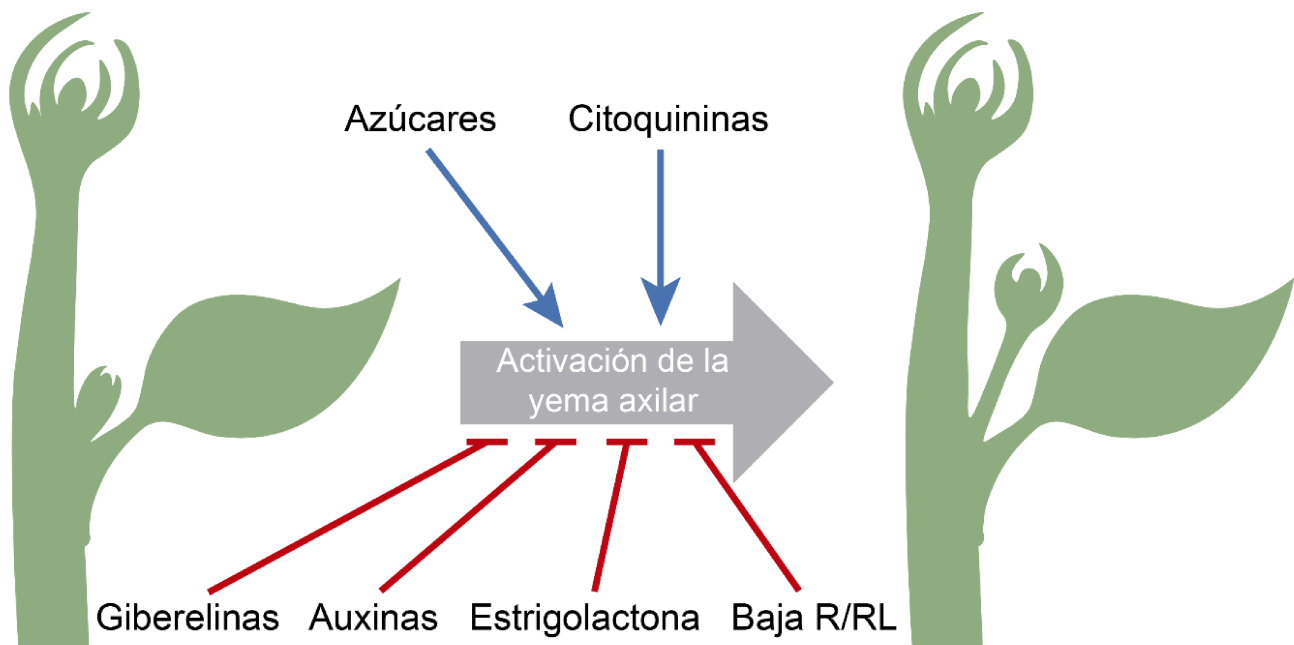


Figura 5: Principales factores que regulan el desarrollo de las ramificaciones en *Arabidopsis thaliana*.

#### 5.4. Hormonas vegetales

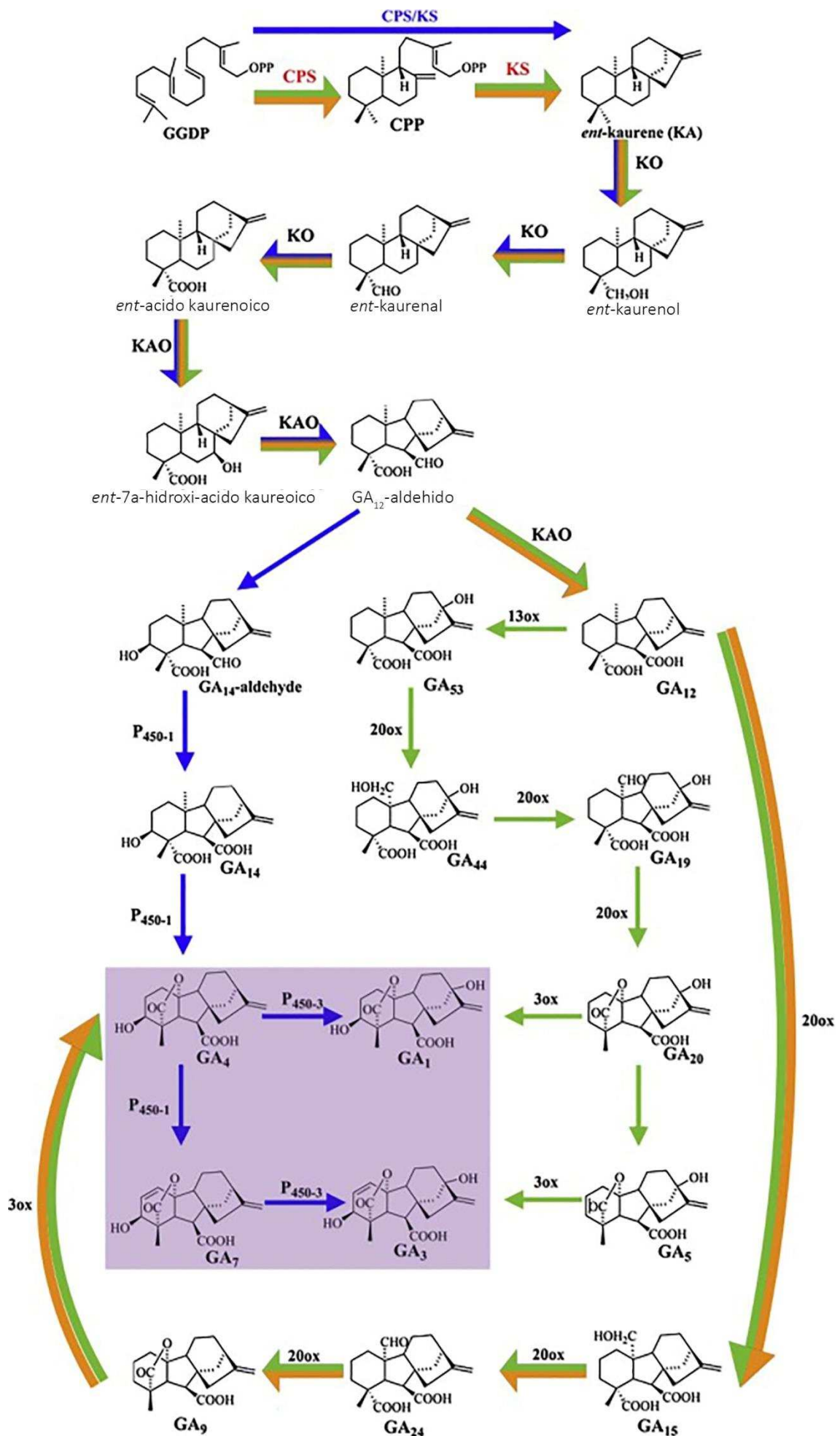
Las hormonas son mensajeros químicos que coordinan las funciones celulares de los organismos multicelulares. Los animales producen muchas hormonas, cada una de las cuales, por lo general, se dirige a un pequeño número de células y desencadena una respuesta específica. Por el contrario, las hormonas vegetales son menores en número, afectan a la mayoría de las células y desencadenan diversas respuestas. Además, la acumulación y los efectos de cada hormona son modulados por factores medioambientales y del desarrollo, así como por otras fitohormonas. Las cinco hormonas vegetales clásicas, que fueron identificadas

en la primera mitad del siglo XX, son: auxinas (aislada en 1926 por F. Fui), CK (1950, F. Skoog), etileno (1901, D. Neljubow), GA (1926, E. Kurosawa), y ácido abscísico (1950, T. Bennett-Clark y N. Kefford). Dentro de los últimos 50 años, aproximadamente, han sido identificados otros compuestos que también cumplen con los criterios para ser considerados hormonas: brasinoesteroides (BR), jasmonatos (JA), salicilatos (SA) y SL. Las funciones de las hormonas vegetales son diversas; todas tienen profundos efectos sobre el crecimiento y el desarrollo, afectan la mayoría de las fases del ciclo de vida de las plantas y están involucradas en respuesta al estrés ambiental, tanto biótico como abiótico. A fines de comprender mejor los resultados presentados en esta tesis, haremos una breve explicación de las vías hormonales estudiadas en este trabajo.

#### 5.4.1. Giberelinas

Las GA son una familia grande de compuestos químicamente relacionados entre sí, pero solo algunos de ellos tienen actividad biológica en plantas. El ácido giberélico ( $GA_3$ ) es el más activo y mejor caracterizado. Estas hormonas regulan múltiples procesos en las plantas, como la germinación, la elongación del hipocotilo, la elongación del tallo, la floración y el desarrollo floral [57]–[64]. La vía de biosíntesis de GA en *Arabidopsis* es compleja e involucra múltiples pasos [65]; un esquema de esta vía se ilustra en la Figura 6.

Los primeros pasos de biosíntesis están ampliamente conservados en las plantas, mientras que los pasos posteriores presentan variaciones entre distintas especies. La síntesis comienza con la formación de un compuesto lineal de 20 carbonos llamado geranilgeranilo difosfato (GGDP). Los primeros pasos son la ciclación del GGDP por las enzimas copalil difosfato sintasa (CPS) y ent-kaureno sintasa (KS) para producir ent-kaureno. El siguiente paso es la producción de  $GA_{12}$  por dos citocromos P450 oxidasas: ent-kaureno oxidasa (KO) y ácido ent-kaurenoico oxidasa (KAO), mediante dos reacciones sucesivas.  $GA_{12}$  puede convertirse en  $GA_{53}$  por hidroxilación en la posición C-13 catalizada por la enzima  $GA_{13}$ -oxidasa (los números en los nombres de las enzimas se refieren a la posición del carbono que modifican y no a las especies de GA sobre las que actúan).  $GA_{12}$  y  $GA_{53}$  están sujetas a modificaciones adicionales en vías paralelas.  $GA_4$  y  $GA_1$  (GA activas) derivan de  $GA_{12}$  y  $GA_{53}$ , respectivamente, después de la modificación secuencial por dos dioxigenasas:  $GA_{20}$ -oxidasa ( $GA_{20}ox$ ) y  $GA_3$ -oxidasa ( $GA_3ox$ ). Una de las vías por las cuales las GA se desactivan involucra a la enzima dioxigenasa  $GA_2$ -oxidasa ( $GA_2ox$ ) (I Rieu y col., 2008). Esta enzima actúa sobre las GA activas ( $GA_4$  y  $GA_1$ ) o precursores C20 inactivos ( $GA_{12}$  y  $GA_{53}$ ) con diferentes consecuencias en el desarrollo de las plantas. Las dioxigenasas  $GA_{20}ox$ ,  $GA_3ox$  y  $GA_2ox$  son codificadas por familias de genes con diferentes especificidades celulares [66]. Esto contribuye a ajustar la síntesis y desactivación de las GA a través de respuestas diferenciales a diversos estímulos ambientales, como la luz y la temperatura, y frente a hormonas, como las auxinas y el ácido abscísico (ABA). Además, existe un mecanismo de regulación de la expresión de estas enzimas por GA que es un importante punto de control de retroalimentación negativa [67].



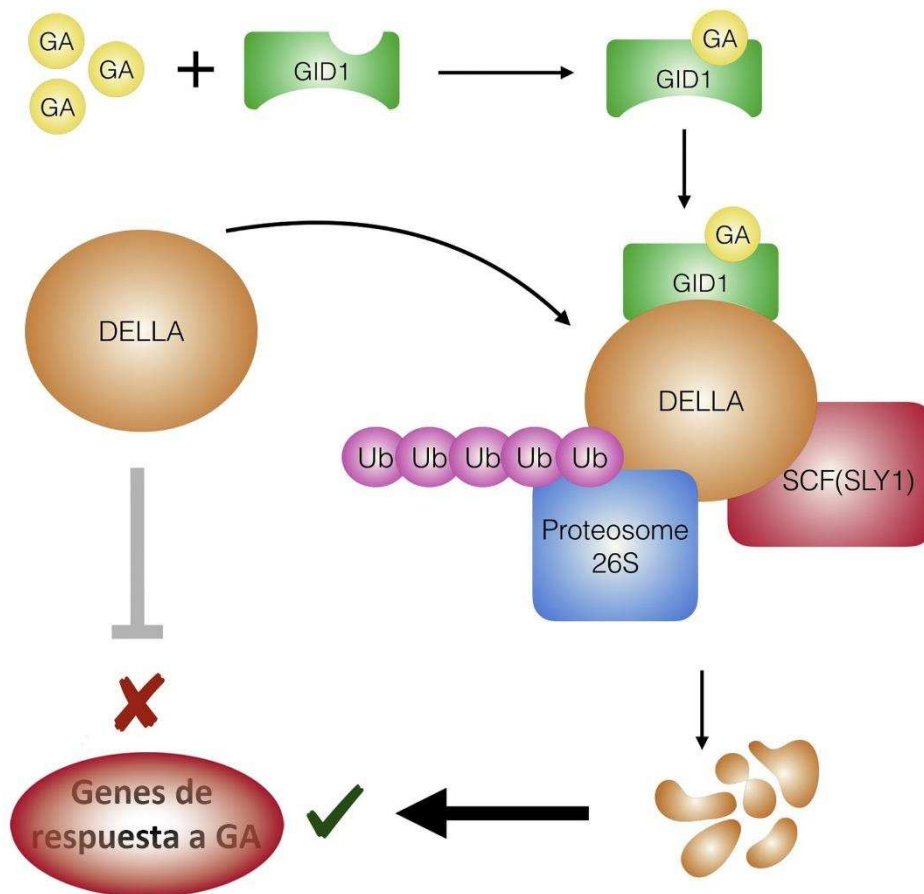


---

**Figura 6: Vías de síntesis y catabolismo de GA.** Existen diferentes rutas en plantas (flechas verdes), hongos (flechas azules) y bacterias (flechas amarillas). Los colores compartidos en las flechas indican que la reacción se ha representado para dos tipos de organismos. Las GA bioactivas se muestran remarcadas en el cuadro violeta. GGDP, geranilgeranil difosfato; CPS, ent-copatil difosfato sintetasa; CPP, ent-copalyl difosfato; KS, ent-kaureno sintasa; CPS/KS, terpeno ciclasa bifuncional; KA, ent-kaureno; KO, ent-kaureno oxidasa; KAO, ácido-kaurenoico oxidasa; 13ox, 13 oxidasa; 20ox, 20 oxidasa, dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato; 3ox, 3 oxidasa; P450-1, citocromo P450 monooxigenasa 1; P450-3, citocromo P450 monooxigenasa 3. *Adaptada de Salazar-Cerezo y col., 2018 [68].*

---

Una vez sintetizadas, las GA son percibidas por los receptores GID (Gibberellin Insensitive Dwarf 1 (GID1a/b/c)) que posteriormente reclutan las proteínas DELLA para producir su ubiquitinación, mediada por el complejo SCF basado en SLY1 (Figura 7) [69]–[71]. La degradación de las proteínas DELLA a través del proteasoma 26S activa las vías ubicadas corriente abajo para promover las respuestas mediadas por las GA [58], [62], [69], [72], [73]. El genoma de *Arabidopsis* codifica cinco proteínas DELLA: GAI, RGA, RGL1, RGL2 y RGL3, que muestran funciones parcialmente redundantes, pero también distintas en la inhibición de las respuestas a GA [74]–[77]. Cuando disminuyen los niveles de GA dentro de la célula, las proteínas DELLA se acumulan en el núcleo e interaccionan con diversos factores de transcripción, impidiendo la unión de éstos a sus genes blancos y, por lo tanto, afectando la funcionalidad de los mismos. La presencia de las GA promueve la degradación de las proteínas DELLA, mediante la vía descrita anteriormente, y por ende deja libre a los factores de transcripción para que regulen la expresión de sus genes blancos (Fig. 7).



**Figura 7: Modelo de la vía de señalización de GA en plantas.** Las GA son percibidas por los receptores GID1, que posteriormente reclutan a las proteínas DELLA para producir su ubiquitinación mediada por el complejo SCF basado en SLY1. La degradación de las proteínas DELLA a través del proteasoma 26S activa las vías ubicadas corriente abajo para promover las respuestas mediadas por GA. SCF (SLY1, Skp1-cullin-F-box), Ub (ubiquitina). *Adaptada de Salazar-Cerezo y col., 2018 [68].*

#### 5.4.2. Auxinas

Las auxinas han sido reconocidas durante mucho tiempo como hormonas esenciales para casi todos los aspectos del crecimiento y el desarrollo de las plantas [78]. Fueron identificadas como compuestos promotores del crecimiento y su nombre deriva de la palabra griega “*auxein*”, que significa “crecer”. Estas hormonas promueven el crecimiento y la elongación celular, pero también tienen roles críticos en la formación de patrones embrionarios, promoviendo y especificando las posiciones de los tejidos vasculares y el inicio de las raíces laterales y de las hojas, y manteniendo la población de células meristemáticas de las raíces. Controlan diferentes procesos dentro del desarrollo vegetal, incluyendo la dominancia apical, el desarrollo floral, el crecimiento de la raíz, la senescencia, el fototropismo y el geotropismo [79]–[83]. La auxina natural más abundante es el ácido indol-3-acético (IAA).

La biosíntesis de auxinas se puede dividir en dos categorías generales: la biosíntesis *de novo* de auxinas y la liberación a partir de conjugados de auxinas [84]–[89]. El IAA existe tanto en forma libre como en forma

conjugada. El IAA libre es la forma activa de auxina y las auxinas conjugadas se consideran formas de almacenamiento o intermedias destinadas a la degradación [90], [91]. El IAA libre se puede liberar de los conjugados de IAA, tales como los ésteres de IAA y los conjugados de azúcares y aminoácidos de IAA, por hidrólisis [85], [91]–[93]. El IAA libre también se puede producir a partir del ácido indol-3-butírico mediante un proceso similar a la oxidación  $\beta$  de los ácidos grasos en los peroxisomas [94], [95].

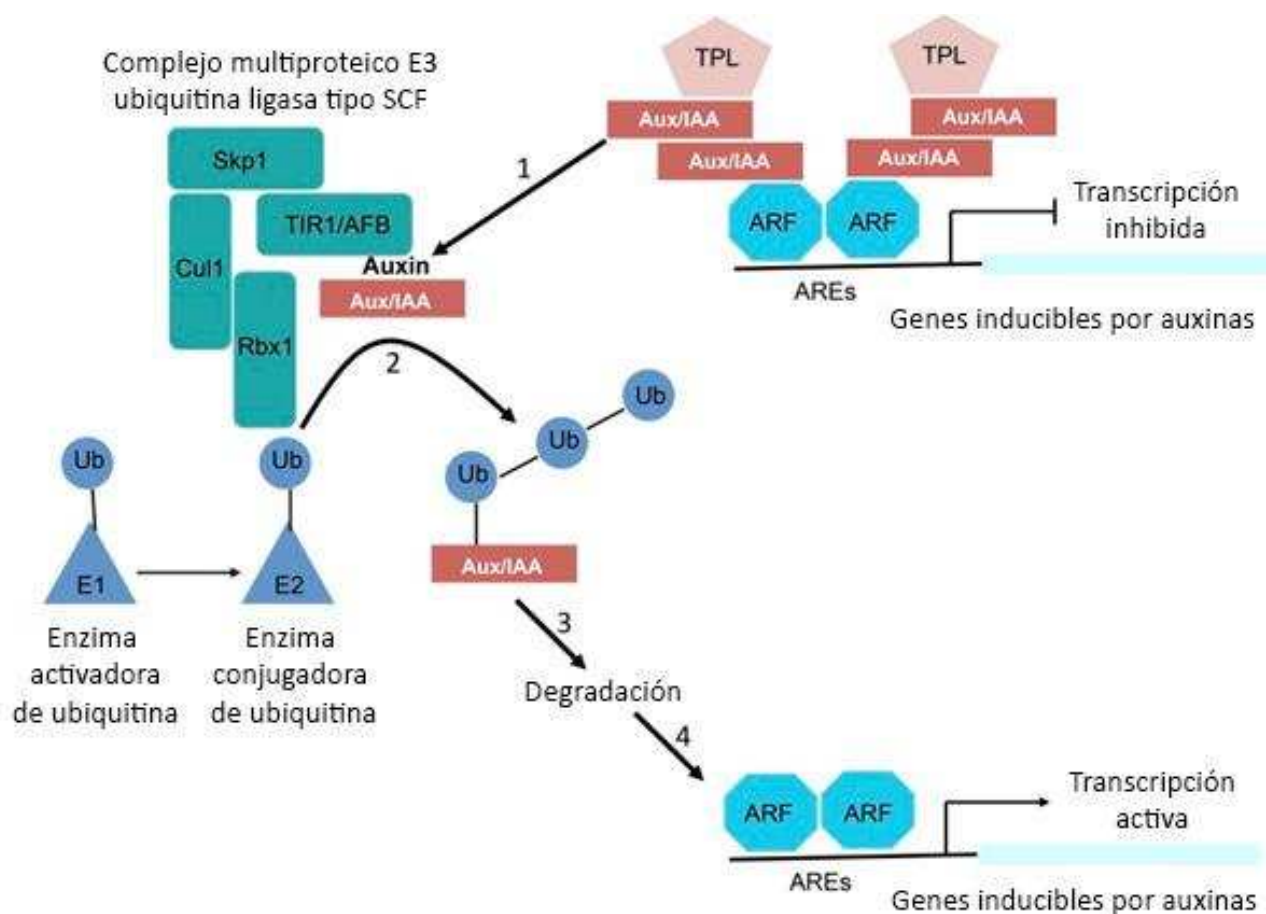
El triptofano (Trp) es uno de los precursores conocidos para la biosíntesis de auxinas y se ha demostrado que suplementar plantas con Trp marcado conduce a la producción de IAA marcado [96], [97]. Hace dos décadas, los experimentos de marcado con isótopos en combinación con el uso de mutantes en la biosíntesis de Trp llevaron a proponer que el IAA también se sintetiza de manera independiente de Trp [96], [97]. Hasta ahora, sin embargo, los componentes moleculares de la vía independiente de Trp no se han identificado. La biosíntesis de IAA, a partir de Trp, comienza con la conversión del Trp en indol-3-piruvato (IPA), intermediario de esta vía, mediante el accionar de las enzimas aminotransferasas de la familia TAA. Luego se produce la descarboxilación oxidativa de IPA, catalizada por la familia de monooxigenasas de flavina codificadas por los genes *YUCCA* (Fig. 8). Esta vía de biosíntesis de auxinas de dos pasos juega un rol esencial en la mayoría de los procesos de desarrollo, incluida la embriogénesis, el crecimiento de las plántulas, la elongación de las raíces, el gravitropismo y el desarrollo de las flores. Está altamente conservada en todo el reino vegetal y se ha caracterizado funcionalmente en varias especies de plantas, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas.



**Figura 8: Vía de biosíntesis de auxinas dependiente de Trp en plantas.** La auxina IAA se sintetiza a partir del aminoácido Trp en dos pasos. El primer paso es la eliminación del grupo amino por la familia de aminotransferasas TAAs para producir IPA. El segundo paso es la descarboxilación oxidativa de IPA catalizada por la familia de proteínas YUCCA (YUCs) para generar IAA, CO<sub>2</sub> y agua. *Figura adaptada de "The Arabidopsis Book", 2014 [98].*

Una vez sintetizadas las auxinas, éstas son reconocidas por una pequeña familia de receptores intracelulares, de los cuales el más caracterizado es TIR1 [99], el cual forma parte del complejo ubiquitin-ligasa SCF<sup>TIR1/AFB</sup>. Cuando TIR1 se une a auxinas, este complejo interacciona con las proteínas Aux/IAA, transfiriéndoles moléculas de ubiquitina y dirigiéndolas a proteólisis vía proteasoma 26S [99], [100]. Las proteínas Aux/IAA son proteínas nucleares que contienen varios dominios altamente conservados y están codificadas por una familia de 29 genes de respuesta temprana a auxinas [101]. Estas proteínas tienen dominios específicos que interaccionan con un grupo de proteínas denominadas factores de respuesta a auxinas (ARF, del inglés *auxin response factors*) [102], [103]. Arabidopsis presenta 23 genes que codifican

proteínas ARF. Todos los ARF tienen dominios de unión al ADN y reconocen secuencias de ADN específicas presentes en los promotores de sus genes blancos, denominadas AuxRE [104]. Algunos ARF funcionan como activadores transcripcionales, mientras que otros funcionan como represores transcripcionales. En presencia de niveles bajos de auxinas, las proteínas Aux/IAA forman dímeros con los ARF para inhibir la actividad de éstos reclutando al correpresor TOPLESS (TPL), lo que resulta en la represión de genes que responden a auxinas [100]. Cuando los niveles de auxinas aumentan, los represores Aux/IAA se unen al complejo SCF<sup>TIR1/AFB</sup>, el cual previamente se unió a las auxinas, y son ubiquitinados y degradados vía proteasoma 26S. De esta manera los ARF se liberan y pueden regular la transcripción de sus genes blanco en respuesta a auxinas (Fig. 9)



**Figura 9: Vía de percepción y señalización de auxinas.** Los genes regulados por auxinas presentan en sus promotores sitios denominados AuxRE que son reconocidos por dímeros de la familia de proteínas ARF. En ausencia de la hormona, los factores de transcripción ARF interaccionan con los represores AUX/IAA, impidiendo que las proteínas ARF regulen a sus genes blancos. En presencia de la hormona, ésta se une a su receptor TIR1, proteína F box perteneciente al complejo Ubiquitina ligasa SCF<sup>TIR1/AFB</sup> (1). Esto conduce a la ubiquitinación de los represores AUX/IAA (2) y su posterior degradación vía proteosoma 26S (3), permitiendo la liberación de los factores de transcripción ARF y la expresión de sus genes blancos (4). *Figura adaptada de Leyser y col., 2018 [105]*

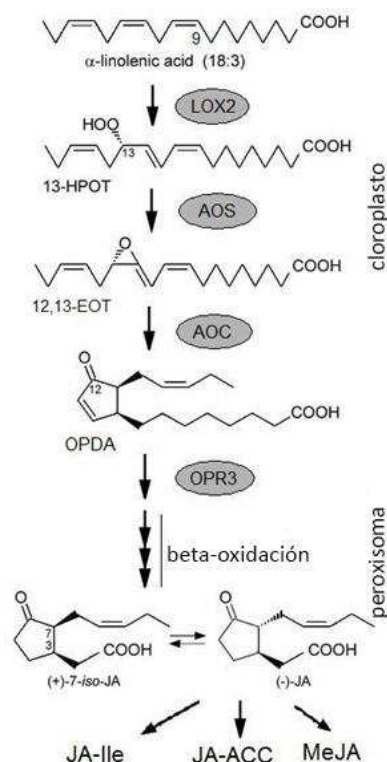
Los genes primarios de respuesta a auxinas incluyen miembros de tres familias: *IAA*, *GH3* y *SAUR* [106]. Los genes *IAA* codifican las proteínas Aux/IAA y los genes *GH3* codifican IAA-amido sintetetasas que convierten la forma activa de las auxinas (IAA) a una forma conjugada inactiva [107]. Por lo tanto, estas dos clases de genes de respuesta a auxinas median una retroalimentación negativa sobre dicha respuesta. Por otra parte, los genes *SAUR* (*SMALL AUXIN UP RNA*) se aislaron por primera vez como genes de respuesta primaria a auxinas. Éstos conforman una familia de genes con aproximadamente 60 a 140 miembros en la mayoría de las especies de angiospermas. A pesar del descubrimiento temprano por su capacidad de respuesta a auxinas, su función y modo de acción permanecieron desconocidos durante mucho tiempo. En los últimos años, la importancia de los genes *SAUR* en la regulación del crecimiento dinámico y adaptativo, y los mecanismos moleculares por los cuales actúan las proteínas SAUR, se fueron comprendiendo cada vez más. Los genes *SAUR* desempeñan un papel central en el crecimiento inducido por auxinas, pero también pueden actuar independientemente de auxinas, siendo regulados de manera específica de tejido por otras vías hormonales y por factores de transcripción [108]. Esta familia de genes se nombrará a lo largo de la sección de resultados, dado que cumple una función muy importante en la elongación celular, particularmente en la elongación del estambre, órgano de estudio en esta tesis doctoral.

#### 5.4.3. Jasmonatos

El JA y sus metabolitos se conocen como jasmonatos. Estas moléculas son importantes en respuesta tanto a estrés biótico como abiótico. Los jasmonatos son hormonas vegetales derivadas de lípidos y la molécula mejor caracterizada es el JA, el cual puede ser modificado por conjugación y metilación, y se ha visto que tiene un rol importante en la reproducción [109]. El JA y el metil jasmonato (MeJA) son esenciales para la maduración del polen, la elongación de los filamentos de los estambres y la dehiscencia de las anteras [110]. Otro proceso importante del desarrollo en el que participa el JA es la regulación de la arquitectura de la raíz. El MeJA es un compuesto volátil que media la comunicación intracelular, intercelular y entre diferentes plantas, modulando respuestas de defensa. Por otra parte, el jasmonoil-isoleucina (JA-Ile) es la forma activa de la molécula implicada en la señalización de los jasmonatos en hojas y posiblemente en las flores de *Arabidopsis* [111].

La síntesis de jasmonatos ocurre principalmente en las hojas, donde los ácidos grasos son liberados de la membrana plasmática de los plástidos por acción de enzimas fosfolipasas y desaturasas. El ácido graso sufre reacciones de oxigenación, oxidación y ciclación por medio de una lipoxigenasa (LOX2), una aleno óxido sintasa (AOS) y una aleno óxido ciclasa (AOC), respectivamente. Así se forma el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), principal precursor de los jasmonatos, el cual se exporta hacia el peroxisoma, único orgánulo donde ocurre la  $\beta$ -oxidación, reduciéndose por la enzima ácido oxo-fitodienoico reductasa 3 (OPR3). Posteriormente, este compuesto es sometido a tres ciclos de  $\beta$ -oxidación para producir el JA. El JA es exportado al citosol por un mecanismo desconocido donde ocurren las diferentes reacciones metabólicas

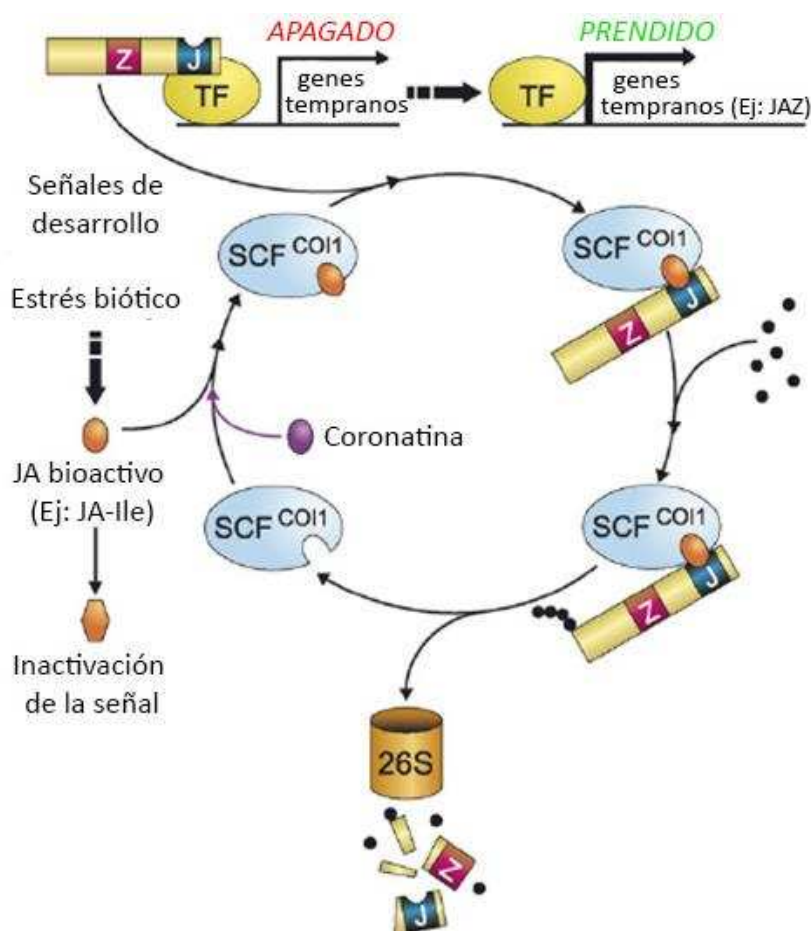
que darán origen a los distintos jasmonatos [112]. Entre las principales transformaciones del JA se encuentra la metilación en el carbono 1 (C1), para producir el compuesto volátil MeJA. Otra modificación relevante es la conjugación del grupo carboxilo al aminoácido isoleucina para formar el JA-Ile. En *A. thaliana*, el JA-Ile se sintetiza por una enzima codificada por el gen *JAR1* (Fig. 10).



**Figura 10: Vía de síntesis de los jasmonatos.** La síntesis de los jasmonatos ocurre a partir del ácido α-linolénico. Se muestran las principales enzimas de la vía. LOX2: Lipoxigenasa 2; AOS: aleno óxido sintasa; AOC: aleno óxido ciclasa; OPR3; ácido oxo-fitodienoico reductasa 3. MeJA: metil-jasmonato; JA-Ile: jasmonoil-isoleucina; JA-ACC: Acido Jasmónico conjugado con el ácido 1- aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). *Adaptado de Yan y col., 2013* [113].

La vía de señalización del JA implica la degradación de un grupo de proteínas represoras, al igual que la mayoría de las vías de señalización hormonales en plantas. Cuando hay baja concentración de JA en la célula, las proteínas represoras JAZ se encuentran interaccionando con factores de transcripción del tipo bHLH, como los MYC2, o factores de transcripción de la familia MYB, impidiendo que éstos regulen a sus genes blancos [114]. Cuando se sintetiza JA, éste se conjuga a Ile, formando JA-Ile, el cual se une a su receptor COI1. COI1 es una proteína F-box perteneciente al complejo SCF<sup>COI1</sup>; este complejo multiproteico SCF pertenece al tipo E3 ubiquitín ligasa que media la ubiquitinación de proteínas para su degradación vía proteasoma 26S. Una vez que el JA-Ile se encuentra unido a su receptor COI1, éste se une a las proteínas JAZ, promoviendo su degradación. Por lo tanto, el complejo SCF<sup>COI1</sup> sirve tanto como receptor para el JA-Ile como para estabilizar la interacción entre la proteína tipo F-box y su sustrato, lo cual permite la degradación del

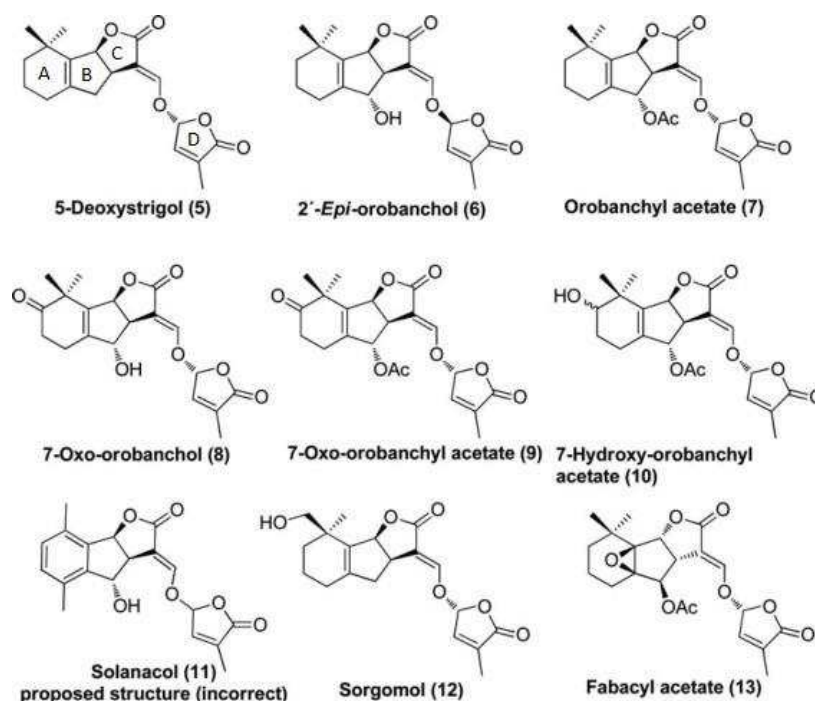
represor JAZ y la liberación de los factores de transcripción, permitiendo la regulación de los genes de respuesta a jasmonatos [115] (Fig. 11).



**Figura 11: Modelo de señalización de JA en plantas.** En células vegetales que contienen niveles bajos de JA, los genes de respuesta a JA se encuentran reprimidos (OFF) por las proteínas JAZ (denotadas con sus motivos ZIM y Jas) que restringen la actividad de los factores de transcripción (TF; por ejemplo, MYC2) involucrados en la expresión de genes de respuesta temprana. La transición del estado reprimido (OFF) al estado activo (ON) de la expresión génica se inicia por señales de desarrollo o ambientales (por ejemplo, estrés biótico) que aumentan la acumulación de jasmonatos bioactivos (óvalo naranja). COI1 es una proteína F-box que determina la especificidad del sustrato de la ubiquitin ligasa, SCF<sup>COI1</sup> (óvalo azul). El jasmonato activo, como el JA-Ile, se une al dominio LRR de COI1, lo que produce la interacción de COI1 con las proteínas JAZ. Esto conduce a la ubiquitinación (marcado con círculos negros) de estas proteínas represoras, produciendo su degradación por el proteasoma 26S. Algunas cepas fitopatógenas de *Pseudomonas syringae* producen un factor de virulencia llamado coronatina (óvalo púrpura) que es estructuralmente similar a JA-Ile. La unión de alta afinidad de la coronatina a los complejos COI1-JAZ promueve la destrucción proteolítica de las proteínas JAZ. Adaptado de Katsir y col., 2008 [115].

5.4.4. *Estrigolactonas*

Las SL son un grupo de compuestos presentes en plantas y su nombre proviene de su primera función identificada como estimulantes de la germinación en especies de la hierba parásita *Striga* [116] y de su estructura química que contiene anillos de lactona. En la Figura 12 se muestran diferentes compuestos naturales aislados que pertenecen a este grupo de hormonas. Se demostró que reprimen el desarrollo de las ramas laterales, promoviendo el estado de dormancia de las mismas [117], [118]. En el tallo, promueven el crecimiento secundario [119] y reprimen la formación de raíces adventicias [120]. En las raíces, regulan la formación de raíces laterales e inducen el alargamiento de los pelos [121], [122]. Las SL también participan en la comunicación en la rizosfera estimulando la germinación de semillas de plantas parásitas incluyendo *Striga* y *Orobanche* [116]. En hongos, las SL se relacionaron con la regulación de la ramificación de las hifas de los hongos micorrícicos arbusculares simbióticos (AMF) [123]. Hallazgos recientes sugieren que las SL son compuestos importantes en la optimización del crecimiento de las plantas y el desarrollo en respuesta a estímulos ambientales. Las SL se producen en plantas primitivas, como musgos, hepáticas y las algas verdes charophyte, pero no en otras algas verdes [124], [125]. En musgos, determinan los patrones de crecimiento y la respuesta entre vecinos [124]. En plantas superiores, las SL regulan tanto la arquitectura de la parte aérea como de la raíz y también pueden afectar la simbiosis fúngica dado que mejoran la absorción de los nutrientes.

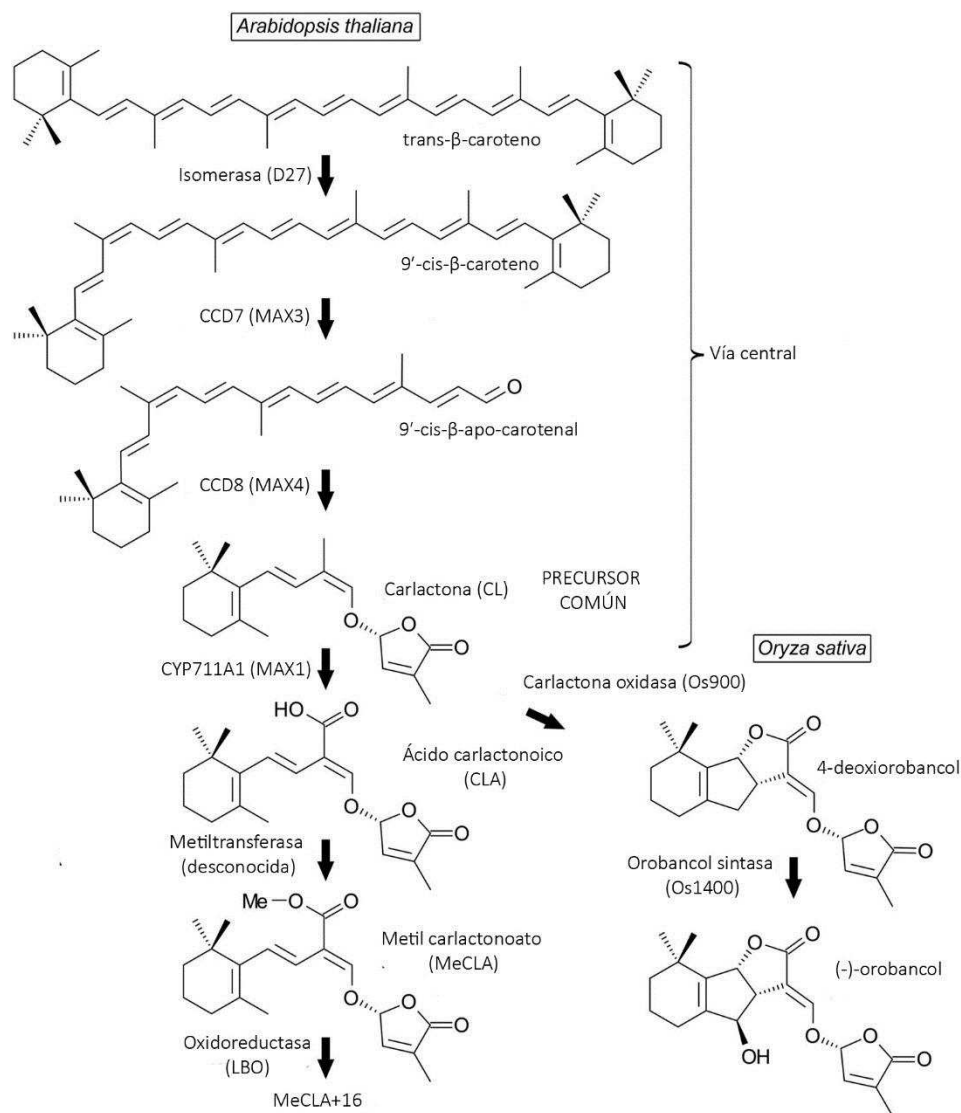


**Figura 12:** Diferentes SL aisladas naturalmente de plantas hasta el momento. Se denomina a los anillos como ABCD, según se ilustra en la primera estructura. *Adaptado de Zwanenburg y col., 2013* [126].



La síntesis de SL se produce principalmente en raíces y también en parte aérea. Se encuentran en una amplia variedad de especies de plantas, incluyendo dicotiledóneas, monocotiledóneas y plantas primitivas [124], [125], [127]–[129]. A pesar de la cantidad de avances en investigaciones sobre esta hormona, tanto la biosíntesis como la percepción de SL aún están lejos de ser completamente dilucidadas. La producción de las SL en la parte aérea de las plantas se origina en el plastidio a partir de los carotenoides [49], [130]. Tres proteínas localizadas en plastidios están involucradas en las primeras etapas de la síntesis de SL (Fig. 13). Una es una carotenoide isomerasa, DWARF27 (D27), que se ha caracterizado hasta ahora en arroz y *Arabidopsis* y, como lo demuestran los estudios *in vitro*, es capaz de convertir el trans- $\beta$ -caroteno en 9'-cis- $\beta$ -caroteno [131]–[133]. Este es el sustrato para que actúen las siguientes enzimas de escisión oxidativa específica de dobles enlaces, dioxigenasas de escisión de carotenoides (CCD) CCD7 y CCD8 [134], [135]. Primero, el enlace 9',10' del  $\beta$ -caroteno es atacado por CCD7 (MAX3) produciendo  $\beta$ -ionona ( $C_{13}$ ) y 9'-cis- $\beta$ -apo-carotenal ( $C_{27}$ ). Este último puede ser escindido y ciclado mediante CCD8 (MAX4), generando un precursor bioactivo de las SL denominado carlactona (CL).

En arroz, la conversión de CL a la estructura de SL canónica de cuatro anillos implica la adición de dos átomos de oxígeno al C19 y el cierre de los anillos para producir 4-deoxiorobancol (4DO; anteriormente conocido como ent-2'-epi-5 -desoxistrigol). Esta reacción es catalizada por un miembro de la familia de proteínas del citocromo P450, MAX1 [50], [136]. MAX1 oxida 4DO para generar orobancol [136]. En *Arabidopsis*, la situación es menos clara, porque tiene un solo gen *MAX1* y la proteína codificada oxida el C19 de CL para producir ácido carlactonoico (CLA), pero aparentemente no cataliza la formación de los anillos [136]–[138] (Fig. 12). El CLA endógeno, mediante la acción de una metil transferasa desconocida [138], produce el carlactonoato de metilo (MeCLA). Basado en la interacción con el receptor D14, se propuso que MeCLA es bioactivo, mientras que CL y CLA no lo son [138].

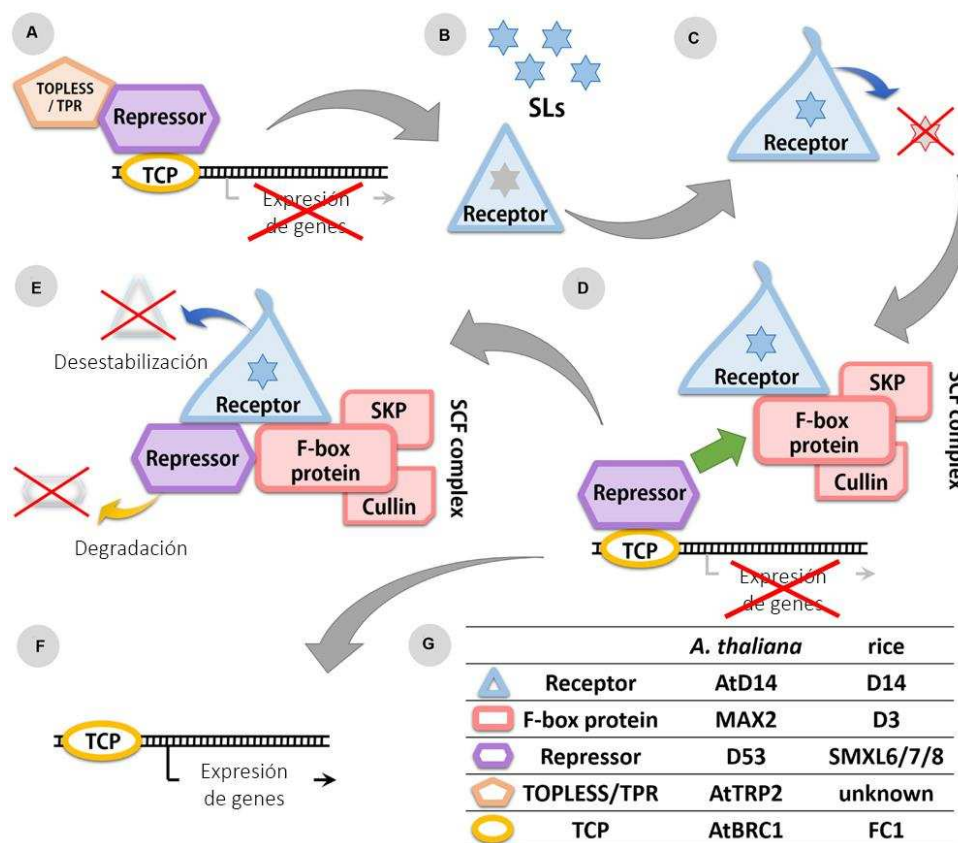


**Figura 13: Vía de biosíntesis de SL en plantas.** Una isomerasa y dos enzimas CCD convierten el β-caroteno en CL, el precursor común de diversas SL. En arroz, el CL es oxidado por dos enzimas tipo citocromo P450 a orobancol, que funciona en la rizosfera como señal de hongos micorrícicos. En Arabidopsis, CL es oxidado por el citocromo P450 MAX1 a CLA, que se convierte en MeCLA. Hay evidencias que sugieren que LBO facilita el procesamiento adicional de un producto desconocido similar a la SL (MeCLA + 16 Da), que se requiere para el control de la ramificación en *Arabidopsis thaliana*. Figura adaptada de Brewer y col., 2016 [139].

Se cree que las SL son percibidas por el receptor AtD14 en Arabidopsis, enzima perteneciente a la superfamilia de las α/β hidrolasas, proteínas capaces de unir e hidrolizar SL *in vitro* [132], [133], [140]–[143]. Cuando la SL se une a D14, se genera un ataque nucleofílico que genera la separación de los anillos ABC del anillo D de la molécula de SL [144]. Esta reacción resulta en un cambio en la conformación del receptor D14 [143], que es crucial para la interacción con otros factores de esta vía, como la proteína F-box MAX2 en Arabidopsis [47], [145], [146]. El complejo activo marca proteínas represoras para su degradación, como la proteína D53. Esto promueve la expresión de genes, como el del factor de transcripción BRC1 en Arabidopsis

[147], [148], del cual hablaremos con más profundidad en los siguientes apartados de la introducción de esta tesis.

En ausencia de la hormona, el represor se encuentra unido a la región promotora de genes de respuesta a SL, impidiendo la transcripción de los mismos. La presencia de la hormona, mediante el mecanismo descrito anteriormente, produce la degradación de estos represores y por lo tanto la transcripción de los genes (Fig. 14).



**Figura 14: Vía de señalización de SL en plantas.** (A) La expresión de factores de transcripción (TF) de la familia TCP se reprime en ausencia de SL. (B) Las SL son reconocidas por el receptor D14. (C) El receptor hidroliza las SL dando como resultado cambios de conformación de la proteína D14. (D) En presencia de SL, el receptor con conformación alterada puede unir la proteína F-box (MAX2/D3) del complejo SCF y el represor SL (D53/SMXL6 a 8). (E) El represor se degrada vía proteasoma. Por otro lado, el receptor se desestabiliza debido a su cambio en la conformación. (F) La degradación del represor permite la expresión de TF de la familia TCP. (G) Lista de componentes identificados de la vía de señalización de SL en arroz y *A. thaliana*. Adaptada de Marzec y col., 2016 [149].

### 5.5. Hormonas y desarrollo floral

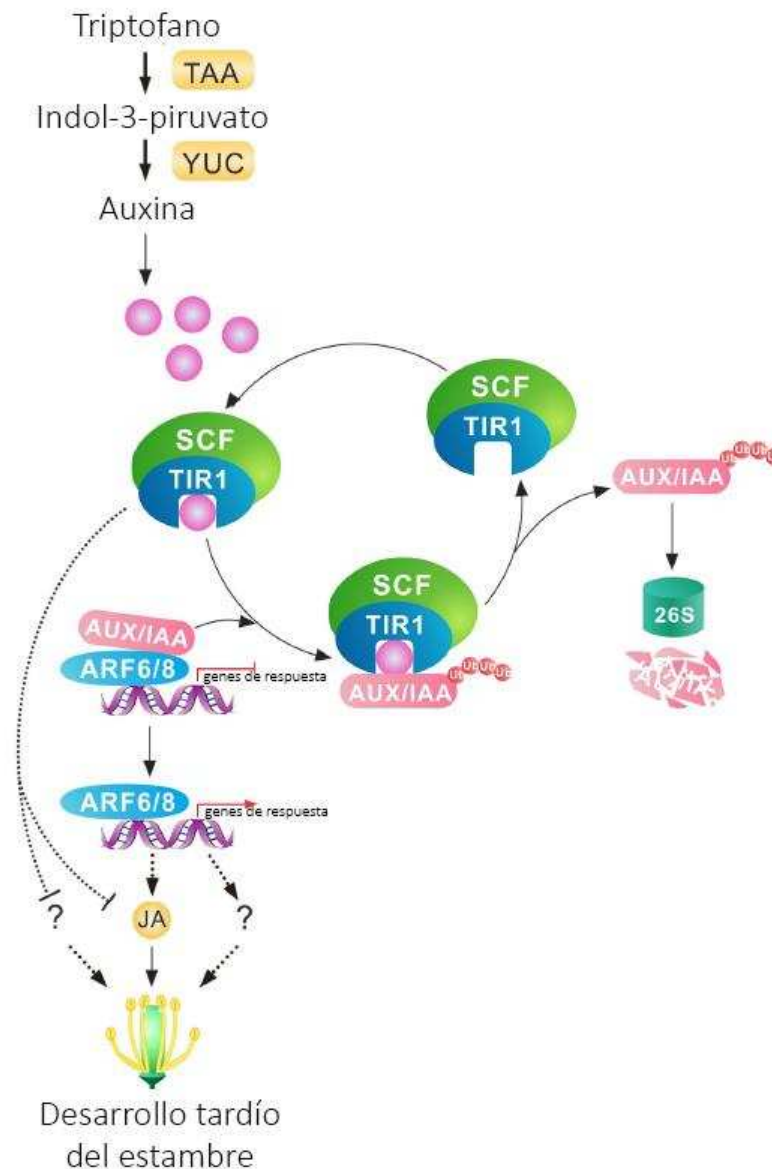
Múltiples hormonas, incluyendo auxinas, GA y JA, están involucradas en la elongación del filamento del estambre [150]. Aquí se explica brevemente la influencia de cada una de estas hormonas en el crecimiento de este órgano para entender con mayor claridad los resultados expuestos posteriormente.

### 5.5.1. Auxinas

Las auxinas, como se describió previamente, controlan numerosos procesos del desarrollo de las plantas, entre ellos el mantenimiento de la dominancia apical, el desarrollo floral, el crecimiento radicular, la senescencia, el fototropismo y el geotropismo [79]–[83], [151]–[154]. Las mutantes dobles en los genes de biosíntesis de auxinas *yuc2 yuc6* y mutantes en genes importantes para el transporte de auxinas, como son *mdr1 pgp1*, muestran anomalías en la elongación del filamento del estambre, la dehiscencia de anteras y la maduración del polen [155]–[157]. Estos estudios indican que la interrupción en la biosíntesis o el transporte de auxinas afecta, en etapas iniciales y tardías, el desarrollo del estambre.

Por otro lado, mutaciones en los genes que codifican los receptores de auxinas (TIR1 y AFB) y mutantes en genes que codifican las proteínas AUX/IAA afectan el desarrollo del estambre. La mutante cuádruple *tir1 afb1 afb2 afb3* presenta fenotipo de filamentos cortos en los estadios 11 a 13 del desarrollo floral y muestra una dehiscencia de anteras temprana y maduración precoz del polen durante los estadios 12 y 13 [157], [158]. Mutantes *iaa16-1*, *crane* y *msg2-1*, las cuales son mutantes de ganancia de función de *IAA16*, *IAA18* e *IAA19* respectivamente, exhiben filamentos de estambres más cortos en el estadio 13 del desarrollo floral [12], [159], [160].

Mutantes dobles en los genes *ARF6* y *ARF8* presentan defectos en la elongación del filamento del estambre y la maduración de la antera [12], [157], [161]–[163]. Particularmente, para la elongación del filamento del estambre se requiere la variante de *splicing* ARF8.4 de *ARF8* y la correcta expresión del gen inducible por auxinas *IAA19* [164]. El transporte de auxinas desde el tapetum, a través de la lámina media y hacia el filamento, es requerido para coordinar la maduración de la antera con el crecimiento del filamento [165].



**Figura 15: Modelo simplificado del mecanismo molecular del desarrollo de los estambres mediado por auxinas.** Las auxinas se sintetizan principalmente a partir del triptófano mediante las enzimas triptófano aminotransferasa (TAA) y YUCCA (YUC). Las auxinas son percibidas por sus receptores (TIR1/AFBs), que posteriormente reclutan proteínas AUX/IAA para su degradación, dejando libres a los factores de transcripción ARF6 y ARF8. ARF6 y ARF8 regulan la biosíntesis de JA, hormona esencial para el desarrollo tardío del estambre. Sin embargo, otros compuestos o señales no identificados son necesarios para las etapas iniciales del desarrollo del estambre y para la elongación del mismo. *Adaptado de Song y col., 2013 [150].*

### 5.5.2. Ácido Jasmónico

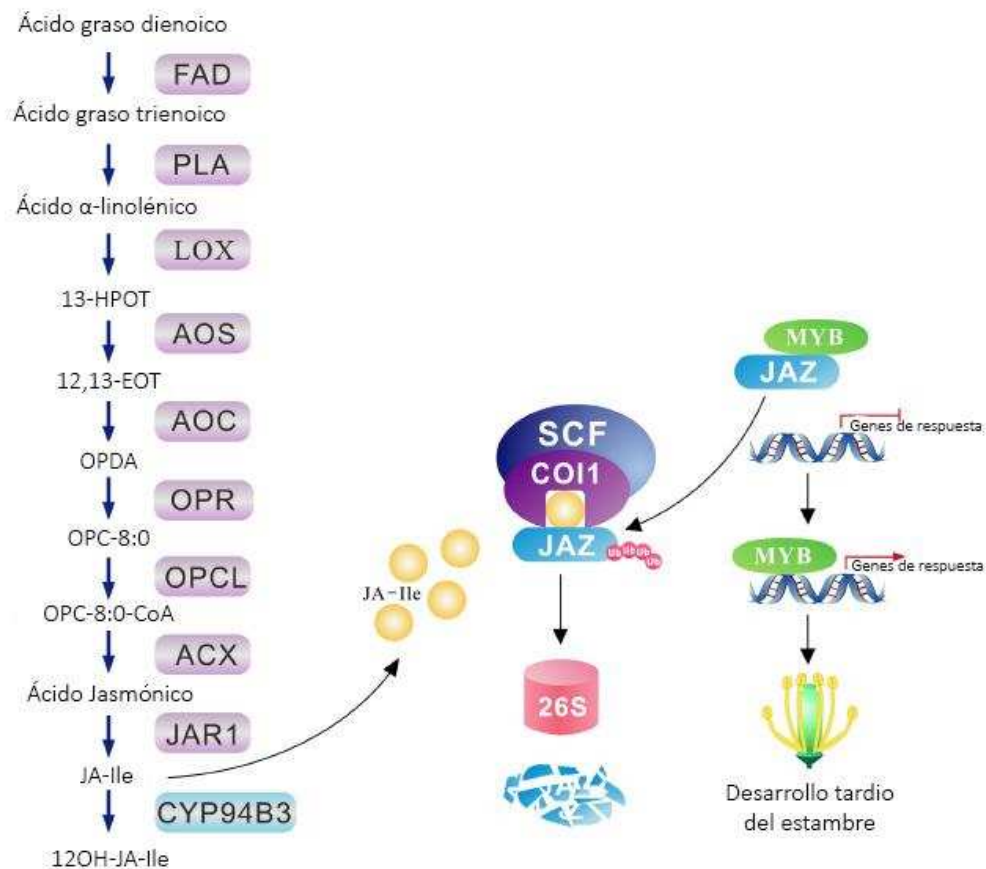
El JA regula diversos procesos dentro de las plantas, entre ellos el desarrollo de los estambres, el crecimiento de la raíz, la formación de tricomas, la senescencia foliar, la acumulación de antocianinas y la defensa contra insectos y patógenos [73], [115], [166]–[175]. Se ha observado que mutaciones en los genes

que codifican enzimas de la biosíntesis de JA, descritas anteriormente, generan una deficiencia en la elongación del filamento del estambre, un retraso en la dehiscencia de las anteras y un polen inviable hacia el final del estadio 13 del desarrollo floral [176]–[185]. La aplicación exógena de JA en estas mutantes puede restaurar el desarrollo de estambres.

Factores de transcripción de la familia MYB, como MYB21, MYB24 y MYB57, son esenciales para el desarrollo del estambre y su expresión está regulada por JA [163], [166], [186]–[191]. Se especula que el JA se sintetiza frente a alguna señal durante el desarrollo floral, y posteriormente la hormona es percibida por COI1, que recluta a las proteínas JAZ para su degradación, dejando libre a los factores de transcripción MYB21, MYB24 y MYB57, esenciales para el desarrollo del estambre, para cumplir su función. Mutantes en componentes de la vía de señalización del JA causan defectos en el desarrollo del estambre. Las mutantes *coi1-1*, *myb21 myb24*, *myb21 myb24 myb57* y las plantas transgénicas que sobreexpresan JAZ en su forma dominante, JAZ1Δ3A o JAZ10.4, presentan esterilidad masculina debido a una falla en el desarrollo del estambre, ya sea por falla en la elongación, retraso en la dehiscencia y/o producción de polen inviable [163], [166], [187], [192]–[195].

El mismo fenotipo de esterilidad masculina observado en las mutantes de la vía de JA (como *coi1-1* y *opr3*) se reportó para la doble mutante *arf6-2 arf8-3*, la cual presenta alterado el desarrollo de los estambres en el estadio 12 del desarrollo floral, observándose estambres cortos, una falla en la dehiscencia de anteras y polen inviable [161], [178], [196]. Estudios posteriores mostraron que ARF6 y ARF8 regulan la expresión de genes importantes en la biosíntesis de JA (*DAD1*, *LOX2*, *AOS* y *OPR3*) y, como consecuencia, regulan la biosíntesis de ácido jasmónico en yemas florales [161]–[163].

Sin embargo, otros componentes no identificados también estarían involucrados en el desarrollo de estambres regulado por auxinas a través de ARF6 y ARF8, dado que el tratamiento con JA de los pimpollos florales puede rescatar el correcto desarrollo de las anteras, pero no la elongación de los filamentos de los estambres, en la doble mutante *arf6 arf8* [161].



**Figura 16: Modelo simplificado del mecanismo molecular del desarrollo del estambre mediado por JA.** Frente a una señal del desarrollo floral, se sintetiza JA, el cual se conjuga con isoleucina (Ile), transformándose en un compuesto activo. El JA-Ile es percibido por COI1, el cual recluta las proteínas JAZ para su ubiquitinación y posterior degradación a través del proteasoma 26S. La degradación de las proteínas JAZ libera los factores ubicados corriente abajo, como MYB21, MYB24 y MYB57 (indicados como MYB en el esquema), para regular el desarrollo tardío del estambre. FAD, ácido graso desaturasa; PLA/DAD1, fosfolipasa A1/defectuosa en dehiscencia de anteras1; LOX, 13-lipoxigenasa; AOS, aleno óxido sintasa; AOC, óxido de aleno ciclasa; OPR/DDE1, OPDA reductasa/dehiscencia retardada 1; OPCL, OPC-8:0 CoA ligasa; ACX, acil-CoA oxidasa; JAR1, *jasmonate resistant 1*/jasmonato-amido sintetasa; 13-HOPT, ácido 13-hidroperoxilinoico; 12,13-EOT, ácido 12,13-epoxioctadecatrienoico; OPDA, ácido (9S,13S)-12-oxo-fitodienoico; OPC-8:0 ácido 3-oxo-2(cis-2'-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico; JA-Ile jasmonoil-L-isoleucina; 12OH-JA-Ile, 12-hidroxi-JA-Ile. *Adaptado de Song y col., 2013 [150].*

### 5.5.3. Giberelinas

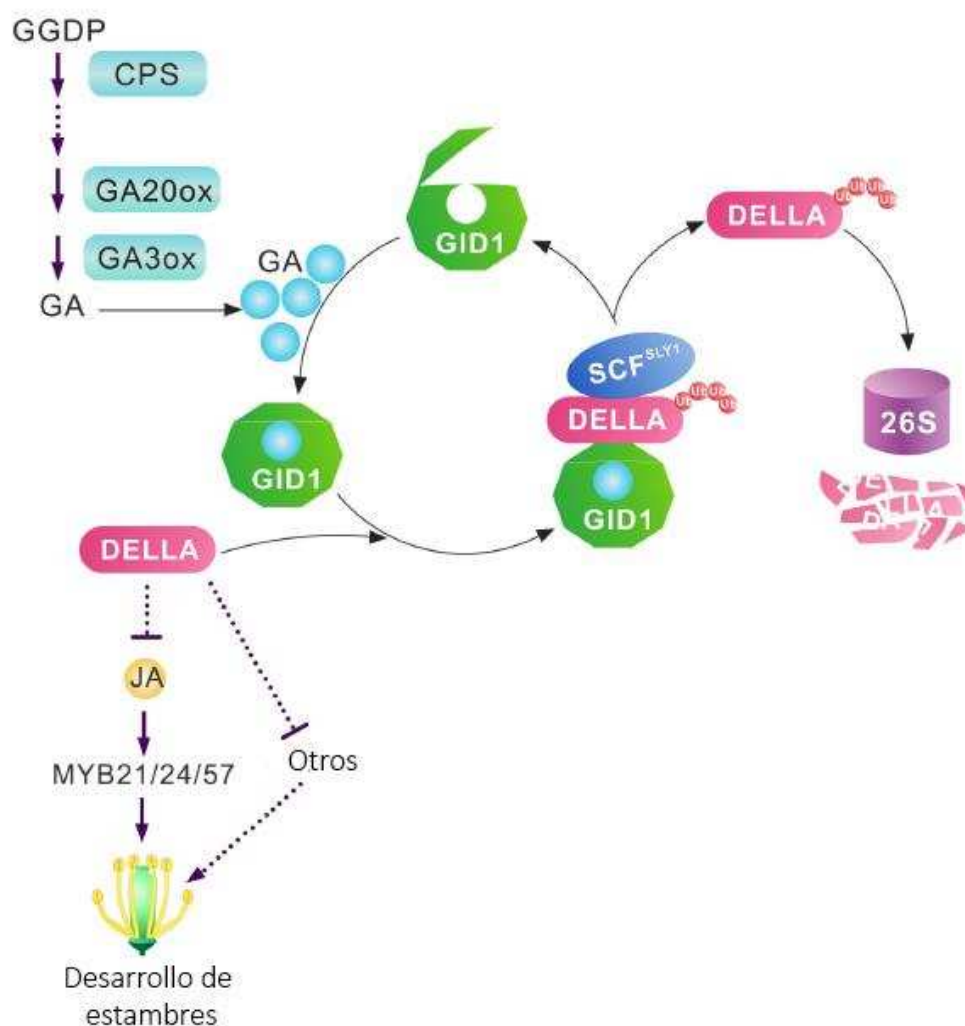
Las GA regulan múltiples procesos del desarrollo de las plantas, incluidas la germinación, la elongación del hipocotilo y del tallo, la floración y el desarrollo floral [57]–[61], [63], [64]. Mutantes *ga1-3* de *Arabidopsis*, deficientes en GA por la mutación del gen que codifica la ent-CDP sintasa (CPS), presentan esterilidad masculina debido a un acortamiento del filamento de los estambres y una interrupción en el desarrollo de las anteras en el estadio 10 del desarrollo floral [197], [198]. Mutaciones en los genes que codifican las

enzimas de biosíntesis de GA *GA20-oxidasa (GA20ox)* y *GA3-oxidasa (GA3ox)* afectan la elongación del filamento y el desarrollo de anteras en estadios 11 y 12 del desarrollo floral [199]–[201].

A su vez, mutaciones de genes involucrados en la señalización de esta hormona afectan el desarrollo de los estambres [70]. La mutante triple *gid1a gid1b gid1c* tiene alterada la elongación del filamento y el desarrollo de las anteras, afectando estadios tempranos del desarrollo floral. El análisis genético de mutantes DELLA demostró que, entre las cinco proteínas DELLA de Arabidopsis (RGA, GAI, RGL1, RGL2 y RGL3), RGA y RGL2 juegan un papel principal en la represión del desarrollo del estambre [54], [198], [202], [203].

Un análisis posterior mostró que las proteínas DELLA suprimen la biosíntesis de JA, que es requerido para la activación de los factores de transcripción MYB21/24/57 y es esencial para el desarrollo tardío del estambre, luego del estadio 12 [189]. Además de la regulación de la biosíntesis de JA, las proteínas DELLA actúan a través de la regulación del miR159 y los factores de transcripción MYB33 y MYB65 para controlar el desarrollo temprano de la antera (estadio floral 9) [204]–[206]. Se especula, entonces, que las GA actúan a través del JA para controlar el desarrollo tardío del estambre, mientras que otros componentes no relacionados con JA, incluidos MYB33, MYB65, MIR159 y otros componentes aún no identificados, son necesarios para controlar de forma coordinada el desarrollo temprano de los estambres. En concordancia con esto, se observó que la aplicación exógena de JA es incapaz de recuperar el desarrollo del estambre en mutantes *ga1-3 rga rgl1 gai* [189].





**Figura 17: Modelo simplificado del mecanismo molecular del desarrollo de estambres mediado por GA.** Las GA se sintetizan a partir de GGDP a través de reacciones secuenciales de varias enzimas, entre ellas CPS, GA20ox y GA3ox. Una vez sintetizadas, las GA son percibidas por los receptores GID1a/b/c, que reclutan a las proteínas DELLA para su ubiquitinación mediada por el complejo SCF basado en SLY1. La degradación posterior de las proteínas DELLA a través del proteasoma 26S regula la biosíntesis de JA que, en consecuencia, activará a los factores de transcripción MYB21/24/57, esenciales para el desarrollo tardío del estambre. No se descarta la posible existencia de otros componentes, dado que la aplicación de JA no es capaz de revertir los defectos de desarrollo ocasionados por la deficiencia en GA. CPS, ent-copatil difosfato sintasa; GA20ox, GA20-oxidasa; GA3ox, GA3-oxidasa; GGDP, geranilgeranil difosfato. *Adaptado de Song y col., 2013 [150].*

### 5.6. Hormonas y desarrollo de ramas laterales

La ramificación originada a partir de una yema axilar es un proceso de desarrollo que presenta alto grado de plasticidad, en el cual los brotes axilares se forman en la axila de cada hoja y posteriormente pueden activarse para dar ramas. Como se describió anteriormente, hay múltiples factores, tanto endógenos como exógenos, que regulan el desarrollo de ramas en *Arabidopsis*. Tres clases de hormonas vegetales, auxinas,

CK y SL (o sus derivados) son fundamentales para el control de la activación del brote. Estas hormonas se mueven a lo largo de las plantas y forman una red de señales sistémicas. En la última década se realizó un gran progreso para comprender los mecanismos de control de las ramificaciones. Los estudios realizados han llevado a la propuesta de dos modelos. El primero consiste en el transporte de auxinas basado en el modelo de canalización; el segundo modelo implica segundos mensajeros y señalización entre las tres hormonas mencionadas anteriormente.

Las auxinas se sintetizan en el ápice del tallo y son las encargadas de mantener la dominancia apical, es decir el crecimiento del tallo principal y la inhibición del desarrollo de las ramas laterales [56], [207]–[213]. Las auxinas producidas en el ápice del tallo se transportan hacia las raíces a lo largo del tallo a través del transporte polar de auxinas (PAT) [85], [214], [215]. Experimentos clásicos han demostrado que, al cortar el ápice del tallo (decapitación) y eliminar la fuente principal de auxinas, se induce la formación de ramas laterales. Posteriormente, si se añaden auxinas al ápice del tallo decapitado, el crecimiento de los brotes axilares se inhibe, sugiriendo que las auxinas originadas en la punta del tallo son las encargadas de inhibir el crecimiento de ramas laterales [36]. Sin embargo, recientemente se ha reportado que las auxinas no son capaces de inhibir eficientemente el crecimiento de las yemas axilares después de la decapitación en algunas especies de plantas, incluidas *A. thaliana* y *Pisum sativum* (arveja), dentro de aproximadamente 24 horas después del tratamiento y en condiciones de iluminación adecuadas [216]–[218].

Existen evidencias genéticas y modelos del transporte de auxinas en plantas que refuerzan la hipótesis según la cual el influjo y eflujo de auxinas de las yemas axilares es importante para regular el crecimiento del brote [219]–[221]. Este modelo está basado en el principio por el cual las yemas latentes tienen su propio PAT que transporta las auxinas hacia el tallo principal como prerequisite para su crecimiento [221]–[225]. Luego de la decapitación, el agotamiento de auxinas en el tallo estimula el flujo de auxinas hacia fuera de las yemas [85].

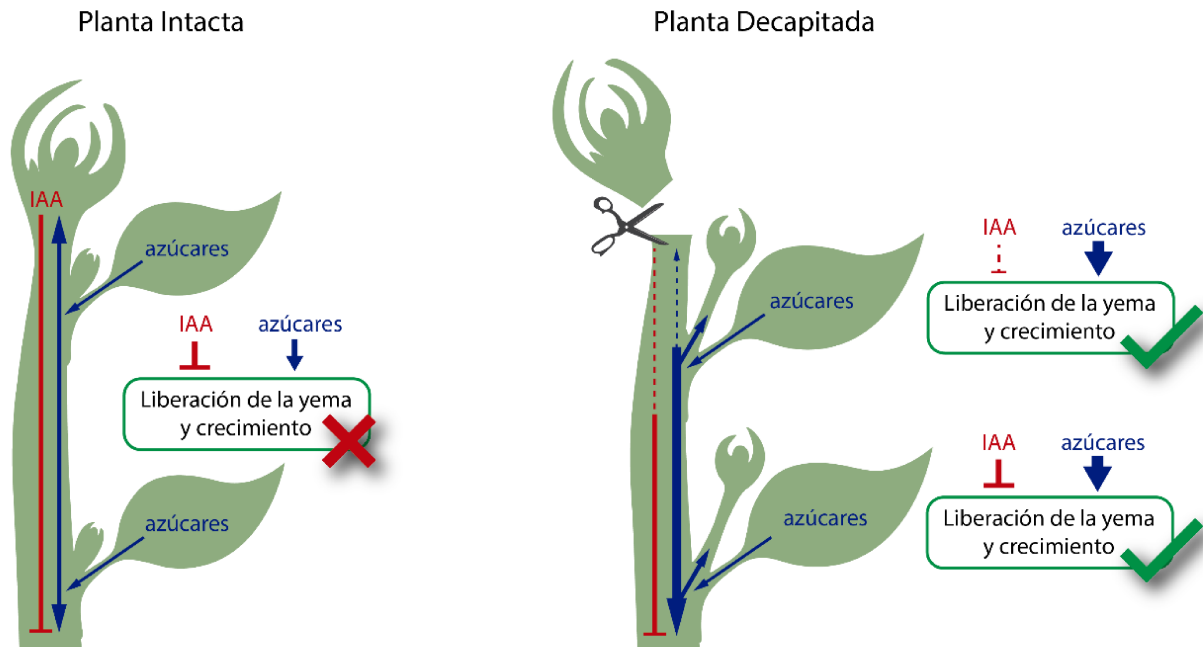
El PAT es el movimiento direccional célula a célula de las auxinas, el cual ocurre a través de un transporte activo mediado por proteínas especializadas en el flujo de entrada y salida de esta hormona [226], [227]. Han sido identificados tres clases principales de transportadores de auxinas: las proteínas exportadoras PIN-FORMED (PIN), las proteínas exportadoras ABCB/MDR/PGP y las proteínas AUX/LAX, encargadas de la importación de las auxinas hacia el interior de las células [228], [229]. Las proteínas de la familia PIN han sido ampliamente estudiadas como transportadores de eflujo de auxinas [227]. La localización subcelular de las proteínas PIN en la membrana plasmática determina la dirección del transporte de auxinas en plantas [227]. Al menos cinco miembros de la familia de transportadores ABCB han sido reportados como mediadores de la exportación de auxinas [230]. Así como las proteínas PIN, los transportadores ABCB contribuyen significativamente al transporte direccional de auxinas en las células [219], [230]. De acuerdo con Balla y col. [219], la exportación temprana de auxinas de los brotes axilares observada después de la decapitación podría ser un flujo de difusión o transporte de auxinas polar mediada por transportadores PIN

y ABCB. Si bien se ha demostrado que estos transportadores de auxinas desempeñan un papel en la activación de los brotes en estado de dormancia, Balla y col. [219] demostraron que la polarización de las proteínas PIN1 para establecer la exportación direccional de auxinas de las yemas axilares activadas es un proceso gradual inicialmente observable a las 6 horas y más pronunciado 48 horas después de la decapitación en plantas de arvejas.

Como se mencionó anteriormente, está ampliamente aceptado que el crecimiento lateral de las yemas puede ser reducido por las auxinas suministradas al tallo de las plantas decapitadas; sin embargo, la inhibición del crecimiento suele ser incompleta, incluso en las especies modelo como arveja y *A. thaliana* [216]–[218], [231]. Investigaciones posteriores revelaron la existencia de una desconexión entre el suministro de auxinas apical y el crecimiento de los brotes axilares. Primero, el tratamiento con auxinas en tallos decapitados no puede evitar el crecimiento inicial del brote [218]. Segundo, el agotamiento de auxinas en los tallos causado por la decapitación o por el tratamiento con inhibidores del transporte de auxinas no siempre promueve el crecimiento de las yemas [216], [218], [232]. Tercero, las auxinas no son suficientes para inhibir el crecimiento de los brotes axilares después de la decapitación en algunas especies (incluida *A. thaliana*) y bajo algunas condiciones, incluidas las altas irradiaciones de luz [216]. Finalmente, en estudios en los que la punta del tallo y las yemas están separados por una larga distancia, el crecimiento del brote después de la decapitación se observa antes del cambio en el contenido de IAA en el tallo adyacente a la yema [56], [218], [233]. Recientemente, se reportó que el desencadenante inicial del crecimiento de las yemas después de la decapitación podría ser el desvío de los fotosintatos disponibles, principalmente azúcares, hacia yemas axilares latentes [56], [234]. Mas aún, estudios independientes confirmaron que la tasa y el grado de ramificación en rosa (*Rosa hybrida* L.) y sorgo (*Sorghum bicolor* L.) se correlacionan con la disponibilidad de sacarosa y/o el área fotosintética de la hoja [235]–[238]. Se ha postulado que, luego de la decapitación, se generen cambios en los niveles de trehalosa-6-fosfato, una molécula señal de importancia emergente cuyos niveles están relacionados con los de sacarosa [234]. Por lo tanto, se ha planteado la hipótesis de que las primeras etapas de crecimiento de los brotes, luego de la decapitación, ocurren independientemente de la dinámica de las auxinas en el tallo.

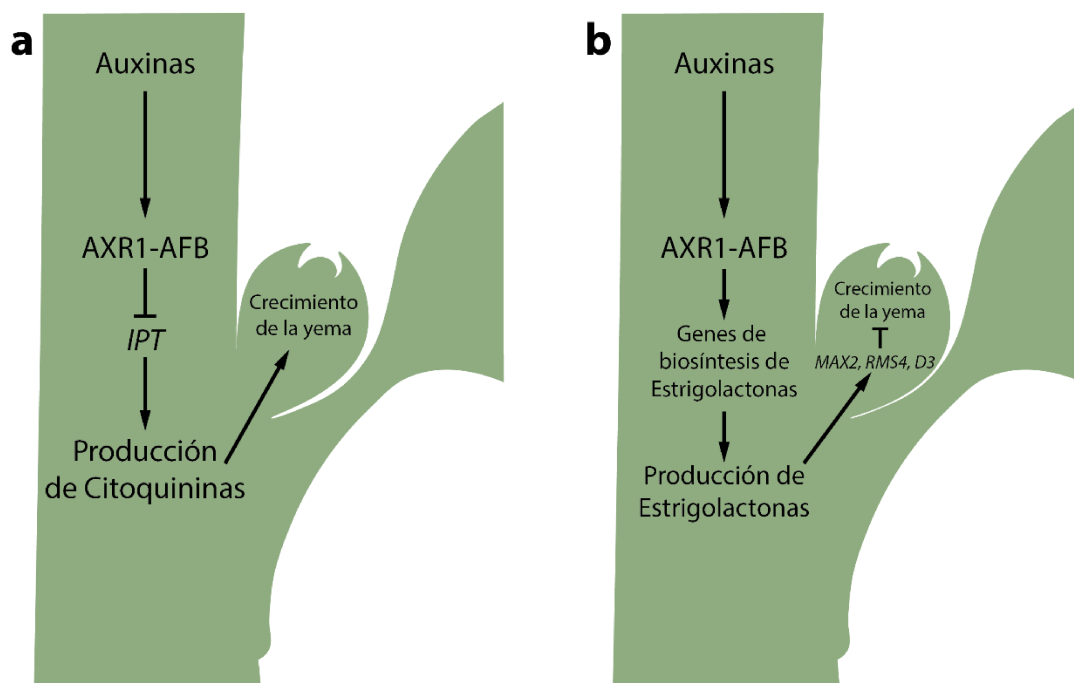
Aunque es reconocido, entonces, que las auxinas juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la dominancia apical, su regulación sobre ésta sería durante el crecimiento tardío de las yemas axilares. En 1924, se propuso que el acceso de las plantas a los nutrientes es el principal factor que regula el crecimiento de las yemas axilares [207], [239], [240]. Es por ello que, basándose en estos reportes, se ha propuesto que la demanda de azúcares en el ápice del tallo limita la cantidad de azúcares disponibles para los brotes axilares. Luego de la decapitación, los azúcares se acumulan en las yemas axilares dentro de un lapso de tiempo consistente con el crecimiento de las yemas. También se demostró que la respuesta a la decapitación se puede imitar suministrando azúcares exógenos a las plantas intactas. Con estos hallazgos, las disparidades mencionadas anteriormente entre el contenido de auxinas y el crecimiento de la yema axilar pueden explicarse teniendo en cuenta la disponibilidad de azúcar para los brotes [56]. Todos estos hallazgos

llevan a plantear el esquema que se presenta en la Figura 18, donde se observa que el agotamiento de auxinas no es suficiente para inducir el crecimiento de las yemas después de la decapitación. Por el contrario, se ha demostrado que los azúcares son necesarios y suficientes para la liberación de las yemas axilares de la dominancia apical [56].



**Figura 18: La dominancia apical está controlada por los azúcares y, en segunda instancia, por las respuestas hormonales.** La dominancia apical se mantiene en plantas intactas predominantemente limitando el acceso de los azúcares a las yemas axilares. Luego de la decapitación, los azúcares se acumulan rápidamente en las yemas axilares y, como el contenido de azúcar de las yemas supera un umbral, se liberan los brotes. En contraste, la pérdida del suministro apical de auxinas da como resultado un agotamiento de auxinas en el tallo. Sin embargo, el agotamiento de auxinas diferirá espacial y temporalmente a lo largo del tallo porque es relativamente lento y, por lo tanto, los brotes superiores se verán afectados antes que los inferiores. En este modelo, las auxinas están predominantemente involucradas en el crecimiento de las ramificaciones en las etapas posteriores, mientras que los azúcares son los principales responsables de la liberación inicial de los brotes. Los diagramas lineales revelan mecanismos en cada brote; el ancho de las líneas indica abundancia; con líneas discontinuas se indican niveles bajos. *Figura adaptada de Mason y col 2014 [56].*

Para llevar a cabo la inhibición de las yemas axilares, las auxinas regulan la producción de segundos mensajeros que se mueven directamente hacia la yema para regular la actividad de las mismas. Dos candidatos propuestos como segundos mensajeros son las CK y las SL. Las auxinas regulan la producción de SL, induciendo la transcripción de genes de biosíntesis de esta hormona en *A. thaliana*, como son los genes *MAX3* y *MAX4* [43], [128], [146], [223], [241]–[243]. Se ha visto que si se remueve la fuente de auxinas mediante decapitación se produce una fuerte disminución en los niveles de transcritos de genes de biosíntesis de SL, disminuyendo los niveles de la hormona [43], [146], [241]–[243]. Un efecto similar, pero en sentido opuesto, se observó con la regulación por parte de las auxinas sobre los niveles de CK. Las auxinas reducen la síntesis de CK regulando negativamente la transcripción de los genes de la familia *IPT* (isopentenil transferasa), claves en la síntesis de esta hormona [244], [245]. Por otro lado, se ha visto que las auxinas regulan los niveles de CK regulando los niveles de enzimas relacionadas con el catabolismo de estas hormonas, como *CKX2* [246].



**Figura 19: Modelo de segundo mensajero para la activación de brotes.** En este modelo, las auxinas regulan la producción de un segundo mensajero, que se mueve directamente hacia la yema para controlar su actividad. Las CK y las SL son candidatos como segundos mensajeros, ya que las auxinas regulan ambas vías de biosíntesis. (A) Las auxinas regulan la biosíntesis de CK regulando negativamente los genes *ADENYLATE ISOPENTENYLTRANSFERASE (IPT)* en el tallo. Los niveles de CK en el tallo y en el brote aumentan cuando se elimina la fuente de auxinas apical (decapitación), lo que sugiere que las CK recientemente sintetizadas se transportan hacia la yema axilar. (B) Las auxinas también aumentan la transcripción de genes de biosíntesis de SL, *MAX3* en *Arabidopsis thaliana*, *RMS5* en arveja, *DWARF17 (D17)* en arroz y *DAD3* en petunia. Esto probablemente lleva a un aumento de los niveles de SL. *Adaptada de Domagalska y col., 2011 [224].*

El descubrimiento de las SL como hormonas vegetales se llevó a cabo gracias a la identificación de una clase de genes inhibidores del desarrollo de las ramificaciones a través de análisis de mutantes que presentaban un gran número de ramas axilares. Se postuló que estos genes estaban involucrados en la síntesis o señalización de un nuevo inhibidor de las ramificaciones, móvil a través del xilema [247]. A estos genes, conservados en monocotiledóneas y dicotiledóneas, se los denominó *D* (*DWARF*) o *HTD* (*HIGH TILLERING DWARF*) en arroz, *RMS* (*RAMOSUS*) en arveja, *DAD* (*DECREASED APICAL DOMINANCE*) en petunia y *MAX* (*MORE AXILLARY GROWTH*) en *Arabidopsis* [43], [48]–[52], [140], [145], [146], [248].

Análisis de experimentos con injertos llevaron a la identificación de candidatos de genes de biosíntesis de estos compuestos cuya actividad en las raíces suprimía el desarrollo de ramificaciones en el tallo de las mutantes [50], [217]. Dos de estos genes codifican las dioxigenasas *CCD7* y *CCD8* que clivan carotenoides y están localizadas en los plástidos [48], [49], [146] [48], [49], [146], [249]. Las mutantes *ccd7* y *ccd8* de arroz, arveja y *Arabidopsis* son deficientes en SL y son rescatadas por tratamientos con SL natural o el análogo sintético GR24 [117], [118].

Existen evidencias que indican que el control de la biosíntesis de SL ocurre tanto a nivel ambiental como a nivel hormonal. Los niveles de SL en la raíz aumentan en condiciones de baja cantidad de fosfato, condición donde es crucial la atracción de micorrizas y la limitación del crecimiento de las ramificaciones [250]. Además, las SL regulan de manera negativa su propia biosíntesis, lo cual involucra la señalización de estas hormonas, dado que las mutantes en la vía de señalización de SL muestran niveles aumentados de transcriptos de *CCD7* y *CCD8* [43], [146], [242], [243]. Además, la mutante en la vía de señalización de arroz *d3*, que tiene las proteínas *CCD7/8* funcionales, sobrepone SL bajo las mismas condiciones [118].

Las mutantes *max* de *Arabidopsis* tiene un mayor número de ramas y las yemas axilares de estas mutantes no se inhiben frente al agregado exógeno de auxinas [48], [251]. Esto indica la existencia de una interacción entre auxinas y SL. Mutaciones en los genes *MAX*, a su vez, tienen incrementado el transporte de auxinas en el tallo y la expresión de algunos transportadores, incluidos algunos exportadores de auxinas de la familia PIN [241], [251], [252]. Estos cambios promueven un eflujo de auxinas desde la yema y un incremento del desarrollo de ramificaciones [221]. Reduciendo el transporte de auxinas en estas mutantes se restaura el desarrollo de ramificaciones al nivel de plantas salvajes [251]. Datos similares se obtuvieron de estudios del transporte de auxinas en la mutante *d27*, gen involucrado en la biosíntesis de SL en arroz [131]. Se ha postulado que uno de los mecanismos mediante los cuales las SL regulan el desarrollo del brote es influyendo sobre el transporte de auxinas mediante la regulación de las proteínas PIN.

Una correlación positiva entre auxinas y los niveles de transcriptos de *CCD7/8* fue detectada originalmente en experimentos en donde se removía el ápice del tallo, disminuyendo los niveles de auxinas en las plantas, o mediante la inhibición del transporte de auxinas [146], [242]. Más recientemente, estudios moleculares y genéticos en *Arabidopsis* indicaron que las auxinas mantienen la expresión de *CCD7/8* (y probablemente el nivel de SL) requeridos para la supresión del desarrollo de ramificaciones. En primer lugar, se observó que la aplicación de SL suprime la inducción del desarrollo de ramificaciones observado en plantas

mutantes en genes de la vía de señalización de auxinas, como son las mutantes *tir1* y *afb1,2,3*, entre otras [241], [243]. En segundo lugar, los niveles de transcritos de *CCD7/8* se encuentran disminuidos en plantas mutantes en genes de la vía de señalización de auxinas como *axr1*, proteína relacionada al complejo ubiquitin ligasa. En tercer lugar, las regiones promotoras de los genes que codifican *CCD7/8* presentan elementos de respuesta a auxinas [243].

Por otro lado, se postula que las SL promueven la inhibición del desarrollo de las ramas laterales mediante la inducción del gen *BRC1* [147], [253]. De este modo, se plantea que, por un lado, las SL regularían la abundancia de las proteínas PIN1 afectando el transporte de auxinas y, por otro lado, promoverían un aumento de la expresión del gen *BRC1* en yemas axilares inhibiendo la producción de ramas [147], [254].

### 5.7. La calidad de la luz como reguladora del desarrollo de ramificaciones

La luz es el factor ambiental más importante que regula el desarrollo de ramas laterales [28]. Existen diferentes parámetros relacionados con la luz que son percibidos por las plantas y modulan el crecimiento y el desarrollo de las ramas. La calidad de la luz detectada por las plantas les brinda información importante sobre la época del año o el momento del día y también les permite conocer la presencia de plantas vecinas, lo cual genera un ambiente de competencia no adecuado para su óptimo crecimiento. Esto ayuda a que las plantas adapten su crecimiento de acuerdo a las condiciones ambientales en las cuales se están desarrollando [255]–[258]. Algunas señales lumínicas son percibidas mediante diferentes tipos de fotorreceptores, como los fitocromos (PHY), los criptocromos (CRY), las fototropinas (PHOT) y zeitlupe (ZTL), entre otros [259], [260]. El conocimiento de las vías de transducción de señales y los factores endógenos regulados por las condiciones lumínicas durante el desarrollo de ramas laterales es aún escaso. El proceso mayormente estudiado es el síndrome de evasión de la sombra inducido por la baja relación rojo/rojo lejano (R/FR).

#### 5.7.1. Síndrome de evasión de la sombra

Cuando las plantas crecen en un ambiente poblado, parte del espectro de la luz que incide sobre ellas cambia, ya que se reducen la intensidad de la luz transmitida, la relación R/FR y la intensidad de la luz azul [261]. La mayoría de las plantas responden a estas condiciones reduciendo el número de ramas laterales y promoviendo un crecimiento del tallo principal en búsqueda de la luz fotosintéticamente activa [29]–[31]. Este crecimiento o respuesta ante la calidad de la luz se denomina Síndrome de Evasión de la Sombra o SAS (de sus siglas en inglés *Shade Avoidance Syndrome*).

El fitocromo B (PHYB) juega un rol fundamental en la detección de la relación R/FR en las plantas. La inactivación de la forma activa Pfr del PHYB por una alta cantidad de FR, como en condiciones de sombra, desencadena el SAS y por ende la inhibición del desarrollo de ramas laterales [32]–[34]. La contribución de otros fotorreceptores al SAS ha sido poco investigada. La luz azul, por si sola, puede desencadenar el

crecimiento de la yema tan eficientemente como la luz blanca [262], sugiriendo que la baja intensidad de luz azul, como sucede bajo la sombra, puede también ser una señal que contribuya a la inhibición del desarrollo de ramas en el SAS.

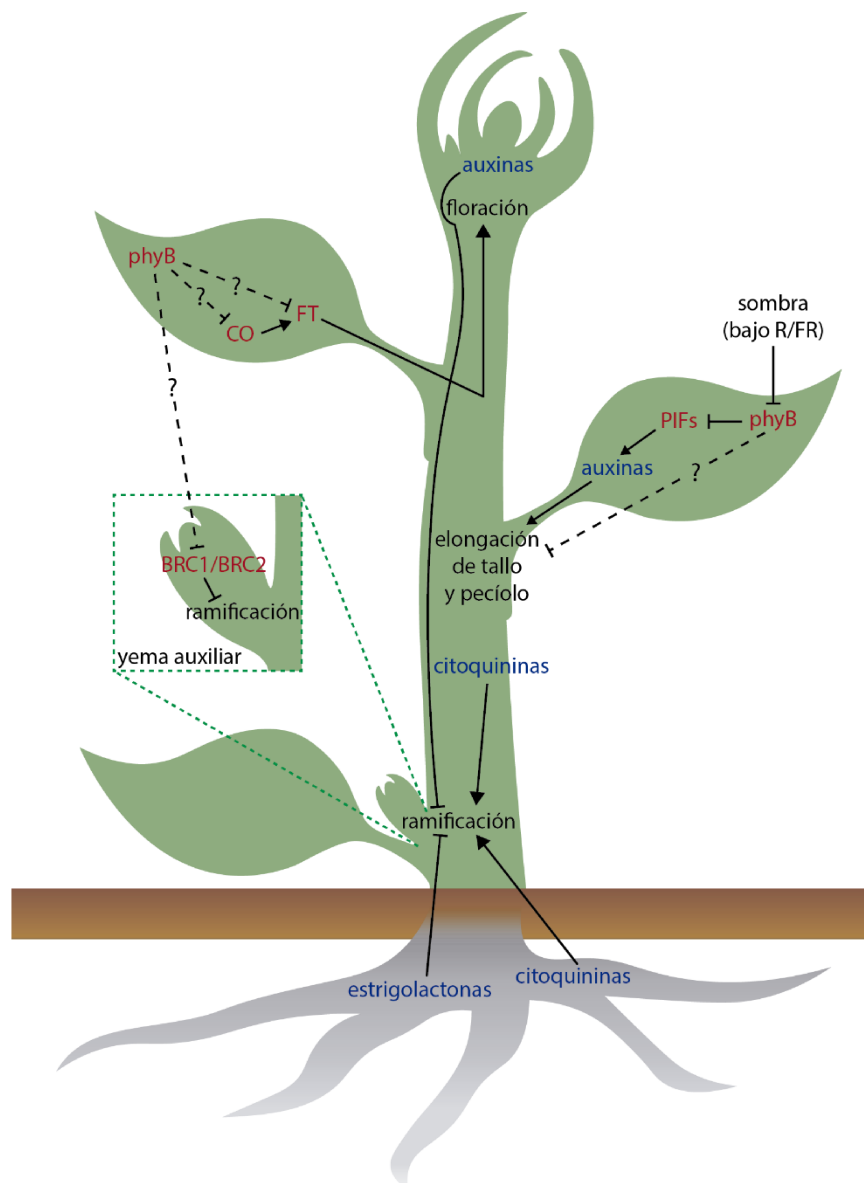
Se sabe muy poco hasta el momento sobre los actores moleculares que desencadenan la regulación del desarrollo de ramificaciones en condiciones de baja relación R/FR. La activación del PHYB bajo una relación alta de R/FR regula de manera negativa los niveles de *BRC1* y *BRC2* en Arabidopsis [32] y la transcripción de su homólogo *TB1* de sorgo [33], [263]. Por el contrario, un incremento en la proporción de luz FR promueve la expresión de *BRC1* y así contribuye a una inhibición en la producción de ramas axilares en una condición de sombra [34]. Curiosamente, los niveles de transcrito de *BRC2* se mantienen estables en estas condiciones, lo que sugiere que *BRC2* tiene un rol diferente al de *BRC1*. Estudios de perfiles transcripcionales de la mutantes *brc1* bajo condiciones de sombreado mostraron una importante represión de genes relacionados con el ABA [34].

Se ha visto que los factores regulados por la luz interaccionan también con las auxinas durante la regulación del desarrollo de ramas laterales bajo condiciones de sombreado. Genes de respuesta a auxinas son regulados de manera positiva en segmentos del tallo en plantas mutantes *phyb* de Arabidopsis. Estas mutantes presentan una reducción constitutiva del desarrollo de yemas, incluso en SAS [264], sugiriendo que el PHYB promueve el crecimiento de ramas a través de la represión de la señalización de auxinas. Sin embargo, es necesario profundizar las investigaciones para descifrar el rol exacto de las auxinas en el desarrollo de ramas en una condición de baja relación R/FR. En plantas de sorgo, la inhibición de las yemas laterales en mutantes *phyb* y bajo condiciones de alta proporción de FR está relacionada con un incremento de los niveles de transcritos del gen *SbMAX2*, relacionado con la señalización de SL, en yemas [33]. La regulación del gen *SbMAX2* mediada por la sombra puede ser también independiente de la señalización de SL, como sucede en Arabidopsis, donde la mutante *max2* tiene fenotipos pleiotrópicos comparados con los de otras mutantes *max* de Arabidopsis. Por ejemplo, las mutantes *max2* tienen afectada la germinación y la desetiología de las plántulas mientras que las mutantes en los genes de biosíntesis de SL, como *max3* y *max4*, no presentan estos fenotipos. Esto sugiere que MAX2 está involucrado en la regulación de la fotomorfogénesis en plántulas de manera independiente de las SL [265]. Además, la sobreexpresión de MAX2 en plantas mutantes de Arabidopsis deficientes en SL, como son las mutantes *max1*, *max3* y *max4*, reduce parcialmente el desarrollo de ramas [266], pero la razón de este efecto aún no es clara [267].

El efecto de la sombra está también caracterizado por una disminución en la intensidad de la luz. Sigue siendo motivo de debate si la baja intensidad de la luz contribuye al SAS o si el SAS responde principalmente a los cambios en la calidad de la luz que perciben las plantas [30], [268]–[270]. De hecho, resultados obtenidos en Arabidopsis sugieren que existe una fina regulación del desarrollo de ramas mediante estos dos parámetros, donde la reducción del crecimiento de las ramas solo ocurre cuando tanto la relación R/FR como la intensidad de la luz son bajas (como en una condición de sombra), mientras esto no ocurrirá cuando solo la relación R/FR es baja (como cuando la planta crece rodeada de plantas pero no recibe sombra) [271]. Esta



interacción entre las respuestas a la intensidad de la luz y a la relación R/FR les permite a las plantas distinguir entre dos ambientes, una sombra establecida *versus* evasión de plantas vecinas, y regular finamente su ajuste del desarrollo al entorno. Probablemente, existen variaciones importantes entre especies. Curiosamente, en *Arabidopsis* la intensidad de la luz no actuaría en el desarrollo de las ramas a través de la regulación negativa de la asimilación de los fotosintatos, que sí tiene lugar en condiciones de sombra, pero sí mediante diferentes vías y de manera autónoma a la desencadenada por una relación baja de R/FR y mecanismos asociados con el PHYB [271].



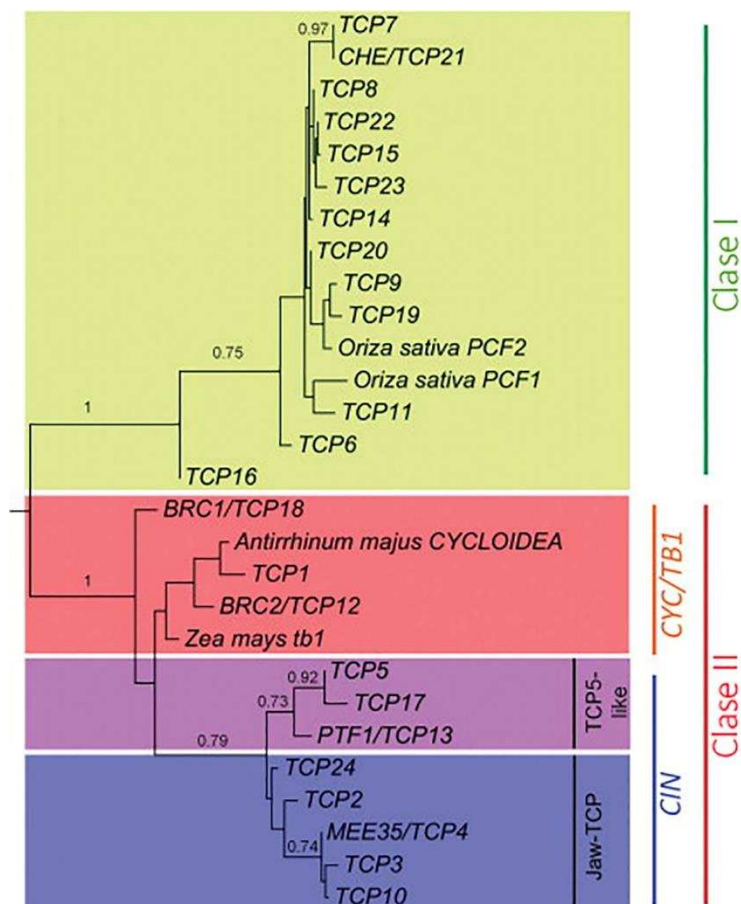
**Figura 20: Regulación del crecimiento de las yemas laterales mediado por el PHYB.** Cuando las plantas son sometidas a la sombra (es decir baja relación R/FR), se produce la inactivación del PHYB en hojas, lo cual produce que se desreprima la expresión de *BRC1* y *BRC2* en las yemas axilares, promoviendo de esta manera la inhibición del crecimiento de las mismas. Esta regulación requiere de alguna señal que se transporte desde las hojas hacia las yemas axilares, la cual aún no fue descrita. *Figura adaptada de Wang y col., 2015 [272].*

## 5.8. Familia TCP

Las proteínas de la familia TCP (TCP) son factores de transcripción exclusivos de plantas involucrados en la regulación de diversos procesos relacionados con el crecimiento, entre ellos el desarrollo y la senescencia de las hojas, la formación de ramificaciones laterales, la morfogénesis floral, el desarrollo de gametofitos, la germinación, el ritmo circadiano, la regulación del ciclo celular, la señalización hormonal y las respuestas de defensa [273], [274]. El nombre de la familia se debe a la presencia de un dominio proteico altamente conservado, denominado TCP, identificado a partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los primeros miembros aislados de la misma: TB1 (*teosinte branched 1*) de maíz (*Zea mays*), CYCLOIDEA (CYC) de *Antirrhinum majus* y PCF1 y 2 (*Proliferating Cell Factor*) de arroz (*Oryza sativa*) [275]. El dominio TCP consiste en una secuencia de 59 aminoácidos localizada hacia el extremo amino terminal de todos los miembros de la familia y presenta la capacidad de unir secuencias específicas de ADN y de establecer interacciones proteína-proteína [275]. Hasta hace un tiempo, mediante análisis de alineamiento de secuencias, se creía que la estructura secundaria del dominio TCP era similar a la de la familia de factores de transcripción bHLH [276]. Recientemente, Sun y colaboradores cristalizaron el dominio TCP de la proteína PCF6 de arroz y revelaron que este responde a una estructura tipo RHH [277]. El dominio TCP posee tres láminas  $\beta$  cortas seguidas de una estructura hélice-rulo-hélice (HLH), distinta de la estructura canónica bHLH. Este plegamiento del dominio presenta una alta similitud con los represores transcripcionales RHH (*ribbon-helix-helix*), una familia de proteínas de unión al ADN de estructura tridimensional conservada, indicando que las proteínas TCP deberían ser reclasificadas a proteínas del tipo RHH [277].

En base a las características presentes tanto dentro como fuera del dominio TCP, las proteínas se dividen en dos subfamilias, denominadas PCF y CYC/TB1, o clases I y II, respectivamente [275], [278]. Como ambas clases se detectan incluso en las especies más simples de plantas, no ha sido posible determinar cuál corresponde al tipo ancestral. La clase I está comprendida por proteínas estrechamente relacionadas, mientras que las proteínas de clase II caen en dos grupos bien definidos, CININNATA (CIN) y CYC/TB1 [279]. Existen ciertas diferencias en las secuencias de los dominios TCP de ambas clases. El dominio TCP de las proteínas de clase II presenta una inserción de cuatro aminoácidos en la región básica en comparación con las TCP de clase I. Además, la longitud de las hélices predichas y los residuos en el bucle no están perfectamente conservados entre las dos clases. Las dos clases comparten una secuencia blanco central de unión al ADN (GGNCCC) [280]–[282]. Por fuera del dominio TCP, los miembros de la clase I comparten secuencias cortas que lo flanquean [274]. Por su parte, diversos miembros de la clase II tienen un motivo conservado de 18-20 aminoácidos rico en argininas, denominado dominio R, que formaría una  $\alpha$ -hélice [275], [283]. Adicionalmente, la mayor parte de los miembros del clado CYC/TB1 contienen un motivo ECE poco conservado (ácido glutámico-cisteína-ácido glutámico), no caracterizado funcionalmente hasta el momento y que se encuentra entre los dominios TCP y R [279]. Finalmente, el clado CIN presenta dos subclados más, los genes *jaw-TCP* [284] y los genes similares a *TCP5* (*TCP5-like*) [285]. Los genes CIN denominados *jaw-TCP*

son regulados post-transcripcionalmente por el microARN *mir319* en todas las angiospermas analizadas hasta la fecha, mientras que los genes pertenecientes al subclado *TCP5-like* no presentan esta regulación.



**Figura 21:** Árbol filogenético esquemático de la familia TCP, mostrando las diferentes clases y clados mencionados en el texto. *Figura modificada de "Plant transcription factors. Evolutionary, structural, and functional aspects" Capítulo 9, 2016 [286].*

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 [287]. 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) [280] y de *Arabidopsis thaliana* (TCP4, TCP15 y TCP20) [288], [289] sugirieron que la secuencia consenso de unión de las TCPs de clase I puede definirse como GTGGNCC, mientras que las proteínas de clase II muestran preferencia por la secuencia GTGGNCCC. Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo han 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 [281]. 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, TCP16, una proteína de clase I con Asp11, muestra preferencia por la secuencia de unión de las proteínas de clase II [281]. A partir de esto se ha propuesto 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*.

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 blancos, regulando la expresión de los mismos en forma antagónica [280], [290]. Sin embargo, estudios con plantas mutantes o que expresan de manera constitutiva formas nativas o modificadas de las TCPs sugieren la existencia de una redundancia parcial en las funciones de las diversas TCPs que se superpone con funciones específicas para cada una de ellas. Hasta el momento, la existencia de funciones solapadas entre las proteínas TCP de clase I y II ha sido demostrada en algunos trabajos. En este sentido, se ha reportado en *Arabidopsis* que *LIPOXYGENASE2 (LOX2)*, un gen relacionado con la biosíntesis de JA, es regulado tanto por TCP20 (proteína TCP de clase I) como por TCP4 (TCP de clase II), aunque la primera inhibe la expresión de *LOX2* y la segunda la induce [288], [291]. Aunque la hipótesis de la existencia de funciones antagónicas entre los miembros de las clases I y II plantea que la unión al ADN se da en los mismos sitios blanco, TCP20 y TCP4 unen regiones diferentes del promotor de *LOX2*, lo cual sugiere la existencia de mecanismos alternativos para la acción antagónica de las proteínas de ambas clases [291]. También se ha observado la existencia de procesos que son regulados de manera conjunta por proteínas TCP de clase I y II, como la inducción de la floración [292] y la inducción de la expresión de genes que participan en la respuesta a auxinas, como *IAA3* y *SAUR65* [293]–[296]. Sin embargo, se ha reportado que hay genes que son blancos para cada clase, como *AS1*, *AGO7* y *TAS3*, que son regulados positivamente por miembros del clado CIN (clase II) [293], [297], [298], y genes de respuesta a citoquininas, como *ARR7* y *ARR15*, cuya expresión se ve afectada por las proteínas TCP de clase I TCP14 y TCP15 [296], y *ARR16*, que es regulado en forma directa por TCP4 del clado CIN [299].

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

### 5.8.1. Interacción proteína-proteína

Los factores de transcripción TCP pueden unir ADN en forma de homo o heterodímeros. Diversos estudios proveen evidencia de que estas proteínas pueden formar heterodímeros con miembros de su misma

clase o entre miembros de clases diferentes [280], [285], [289], [300]. Además, existen numerosos ejemplos que demuestran que las proteínas TCP pueden interactuar con proteínas de otras familias. La capacidad de interacción con distintos factores proteicos que poseen las proteínas TCP contribuye en gran medida a la diversidad funcional que poseen. Como ejemplo se pueden citar las interacciones de las proteínas de clase I TCP14 y/o TCP15 con SRFR1, un regulador negativo de la inmunidad desencadenada por efectores (ETI, *Effector Trigger Immunity*) [301], PRR2, un factor de transcripción específico de plantas que está involucrado tanto en el desarrollo vegetal [302] como en la inmunidad [303], CCA1 (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1), PRR3 y PRR5, componentes del reloj circadiano [304], DA1, DAR1 y DAR2, receptores de ubiquitina que modulan el crecimiento de los órganos a través de la represión de la proliferación celular y la estimulación de la endoreduplicación [305], DOF6, un factor de transcripción que modula la germinación [306], [307], la MAP kinasa MPK8, que participa en la promoción de la germinación [308], la N-acetilglucosamina transferasa SPINDLY (SPY) [309], y la enzima SCE1, que cataliza la sumoilación de proteínas [310]. Se ha reportado, además, que las proteínas TCP de clase I interactúan con proteínas DELLA, mediando la respuesta a estas hormonas durante la germinación y el crecimiento del tallo [311], [312] y que, frente un aumento de temperatura, interactúan con PIF4 modulando la expresión de un conjunto de genes blancos, promoviendo la elongación del hipocotilo [313]. Estos hallazgos sugieren que las proteínas TCP pueden ser modificadas de manera postraducciona y además pueden ser dirigidas a diferentes genes blancos a través de la interacción con una variedad de factores de transcripción u otras proteínas. Estas interacciones podrían proporcionar así una especificidad adicional a la acción de las proteínas TCP.

### 5.8.2. Funciones de los factores de transcripción TCP

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

Las proteínas de la clase II participan en procesos de morfogénesis en hojas y flores, en la regulación de la simetría floral y en la inhibición del desarrollo de ramificaciones axilares [274], [283]. En todos los casos, la acción de estas proteínas parece estar relacionada con la regulación, ya sea positiva o negativa, de la proliferación y el crecimiento celular. En relación con el papel de las proteínas TCP durante la expansión celular, se ha sugerido que TCP1 estaría involucrada en la regulación de este proceso en hojas [293]. Se ha observado, además, que las proteínas TCP de clase II participan en la regulación de la homeostasis hormonal. Por ejemplo, la proteína TCP3 activa de manera indirecta la transcripción del gen que codifica la proteína DELLA GAI [293]. En *Solanum lycopersicum*, Lanceolate (LA) activa indirectamente la transcripción de

*SlGa20ox1*, que promueve la biosíntesis de GA [314]. En *Antirrhinum majus*, la proteína CIN activa el gen que codifica el receptor de CK *AHK4* [295]. En contraste, TCP4 activa la transcripción del gen *ARR16* de manera directa, lo que a su vez inhibe la respuesta a CK [299], [315]. Por otro lado, la proteína BRC1 influye positivamente en las respuestas a ABA, mientras que TCP4 controla la síntesis de JA y, a través de ello, la senescencia foliar [288]. TCP3 y proteínas relacionadas modifican la homeostasis de auxinas [293] y TCP1 modula la síntesis de BR [316] (Guo y col., 2010). Por último, la expresión de *BRC1* es inducida por SL. A su vez, *BRC1*, probablemente en forma indirecta, promueve la expresión de *MAX2*, proteína F-box involucrada en la percepción de SL. En arroz, *FC1/OsTB1* se une y reprime a *OsMADS57*, que codifica un represor de la expresión del gen *D14*, el cual codifica una proteína que participa en la conversión de SL a su forma activa [317]. Por otro lado, dos reportes implican a las TCP CIN de clase II en la regulación de genes de biosíntesis de auxinas durante la elongación del hipocotilo bajo condiciones de luz normal [318] y sombra [319]. En el primer caso, estarían involucradas las proteínas del subclado CIN *jaw-TCP* y en el segundo caso las *TCP5-like*. Además, se ha visto que proteínas TCP del subclado CIN *jaw-TCP* regulan negativamente la acción de PIF3 durante la apertura de los cotiledones que ocurre como resultado de la desetiolación [320]. En cuanto a las proteínas TCP de clase I, también existen evidencias que vinculan a algunas de ellas con la regulación de la proliferación y el crecimiento celular. Los primeros miembros de la clase I (PCF1 y PCF2) fueron identificados en arroz a partir de su interacción con una región requerida para la expresión del gen *PCNA*, regulador del ciclo celular en tejidos meristemáticos [287]. Con posterioridad se estableció la interacción de una proteína de clase I de Arabidopsis (TCP20) con motivos presentes en promotores de genes expresados durante la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular, como *PCNA2* y genes de proteínas ribosomales [321]. La proteína TCP20 también ha sido relacionada con la regulación de la expresión del gen de ciclina *CYCB1;1* durante la transición G2/M [290] y se ha informado que TCP15 modula la expresión de genes reguladores del ciclo celular [322]. Li y colaboradores [290] sugirieron que el crecimiento de los órganos estaría regulado por actividades antagónicas de proteínas TCP de las clases I y II sobre la proliferación y el crecimiento celular y que esto se daría a través de la interacción de estas proteínas con un mismo grupo de genes. De esta manera, proteínas de la clase I estimularían la proliferación celular en determinadas regiones del meristema o primordio y, subsecuentemente, proteínas de la clase II reprimirían estos procesos a medida que las células van saliendo de la zona de proliferación. Sin embargo, este modelo no parece tener validez general, ya que en algunos casos las funciones de las proteínas TCP de las clases I y II no parecen ser antagónicas, sino ir en el mismo sentido.

En cuanto al papel de las proteínas TCP de clase I en el desarrollo de las hojas, se ha observado que la mutación simultánea de los genes *TCP14* y *TCP15* de Arabidopsis genera alteraciones en el desarrollo de este órgano. La lámina se ensancha hacia la base, las hojas tienen pecíolos más cortos y anchos y los márgenes tienden a curvarse hacia arriba a medida que las hojas maduran [323]. Esta diferencia fenotípica se ve considerablemente aumentada cuando *TCP14* o *TCP15* se expresan fusionadas al dominio represor EAR [323]. Steiner y colaboradores [309] observaron que las hojas de las mutantes en *TCP14* y *TCP15* poseen

márgenes lisos y son menos sensibles a la acción de las CK. Estos autores observaron que TCP14 y TCP15 regulan la respuesta a esta hormona en hojas y flores mediante la unión a SPY, una N-acetilglucosamina transferasa de Arabidopsis que promueve la respuesta a CK y reprime la vía de señalización de GA [309]. Además, las CK promueven la transcripción de *TCP15*. Se ha propuesto que TCP14 y TCP15 actúan de manera redundante en el control de la proliferación celular durante el desarrollo de hojas y otros tejidos. El efecto más importante se observa sobre la longitud de los entrenudos de los tallos, que es menor en las plantas mutantes dobles *tcp14 tcp15* [323]. El silenciamiento de *TCP8* y *TCP22* en estas mutantes genera fenotipos más severos aún [311].

Los factores de transcripción TCP de clase I también han sido relacionados con la regulación del desarrollo de los órganos florales [309], [323]. TCP14 y TCP15 parecen regular el tamaño, la forma y la proliferación celular en los cuatro verticilos. Un trabajo realizado previamente en nuestro laboratorio por Lucero y colaboradores [296] reportó que plantas que sobreexpresan *TCP15* desarrollan flores con defectos en la fusión de los carpelos y un reducido número de papilas estigmáticas. En contraste, la expresión de TCP15 fusionada al dominio represor EAR genera el desarrollo de estructuras ectópicas formadas por papilas estigmáticas en el replum, un tabique membranoso que divide la cavidad del ovario en dos y que persiste en los frutos al caer las valvas después de la dehiscencia. La comparación de los fenotipos observados en plantas con niveles alterados de TCP15 luego de tratamientos con CK y el análisis en estas plantas de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de auxinas sugiere que TCP15 modula el desarrollo del gineceo regulando la homeostasis de auxinas y la respuesta a CK.

También se ha reportado que las TCP de clase I reprimen indirectamente la biosíntesis de ABA y que median la respuesta a GA durante la germinación y el crecimiento del tallo de la inflorescencia [311], [312]. Esto ocurre a través de la inhibición de las proteínas TCP por interacción con proteínas DELLA, reguladores negativos de la respuesta a GA. Como mencionamos antes, algunas proteínas TCP de clase I también están involucradas en vías de JA, regulando la expresión de *LOX2* de manera antagónica con TCP de clase II. Por otro lado, TCP8, TCP9 y TCP20 interactúan con WRKY28 y SARD1, o con NAC019, lo que activa o reprime la transcripción de *ICS1*, involucrado en la biosíntesis de ácido salicílico.

### 5.8.3. *BRC1* como regulador del desarrollo de ramificaciones

El primer miembro caracterizado de la familia TCP fue TB1, estudiado en maíz por Doebley y colaboradores (1995, 1997) [324], [325], incluso antes de ser nombrada la familia por Cubas y colaboradores en 1999 [275]. Estos autores encontraron que *TB1* afecta el desarrollo de los meristemas axilares de maíz, inhibiendo el desarrollo en los nodos inferiores y promoviendo el crecimiento y la formación de inflorescencias femeninas en los nodos superiores. En la mutante *tb1*, los meristemas axilares inferiores se desarrollan para dar lugar a ramificaciones basales, mientras que los superiores generan ramificaciones terminadas en inflorescencias masculinas, generando un fenotipo que recuerda al antecesor del maíz,

teosinte [324]. Posteriormente, Hubbard y col. (2002) [326], demostraron que el aumento del número de ramificaciones en la mutante *tb1* se debía no sólo a la elongación de los meristemas inferiores, sino también al desarrollo de los meristemas axilares.

El desarrollo de las ramificaciones axilares es uno de los procesos más importantes para determinar la arquitectura de las plantas. Desde la caracterización de *TB1* hasta la actualidad, una gran cantidad de estudios han relacionado a las proteínas TCP con el desarrollo de las ramificaciones secundarias en diferentes especies. En arroz, el número total de ramificaciones se reduce significativamente en plantas que sobreexpresan *OstTB1*, pero aumentan en *fc1*, una mutante de pérdida de función de este gen, sugiriendo que *OstTB1* actúa como un regulador negativo del crecimiento de las ramificaciones en esta especie, al igual que *TB1* en maíz [327]. Se ha demostrado también que *SbTB1* (homólogo de *TB1* en sorgo) aumenta sus niveles de expresión en plantas cultivadas en condiciones de sombra, inhibiendo el desarrollo de las yemas axilares y promoviendo la dominancia apical, respuesta típica de plantas cultivadas en estas condiciones [263]. Se propuso la existencia de un nexo entre las vías reguladas por luz y el desarrollo de ramificaciones secundarias mediado por *OstTB1*, debido a que *OstTB1* es negativamente regulado por el fitocromo PHYB en condiciones de luz fotosintéticamente activa.

*BRC1 (AtTCP18)* y *BRC2 (AtTCP12)* son los homólogos más cercanos a *TB1* en *Arabidopsis thaliana* [19]. Como las mutantes *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 sombra, debido a una alta población vegetal, 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 SL, mencionadas en los incisos 5.6.2 y 5.6.3. Aunque las auxinas no parecen ejercer un control directo sobre la expresión de *BRC1*, la actividad de *BRC1* 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*. Como se explicó anteriormente, los productos de estos genes promueven la síntesis y actividad de las SL, 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 [117], [118], [251].

### 5.9. Familia KNOX

La superclase TALE constituye una familia de proteínas presentes en plantas, hongos y animales. Se caracterizan por poseer un homeodominio con una inserción de tres aminoácidos en el rulo que conecta las hélices I y II [328]. En animales y hongos, las proteínas TALE están divididas en dos clases: PBC y MEIS. En plantas, se dividen en las clases KNOX y BEL [329]. Estos genes constituyen una de las clases más antiguas de genes *homeobox* en plantas. La clase KNOX contiene el dominio KNOX, una región conservada localizada hacia el N-terminal del homeodominio, que está compuesta por dos bloques (KNOX A y KNOX B) y un motivo



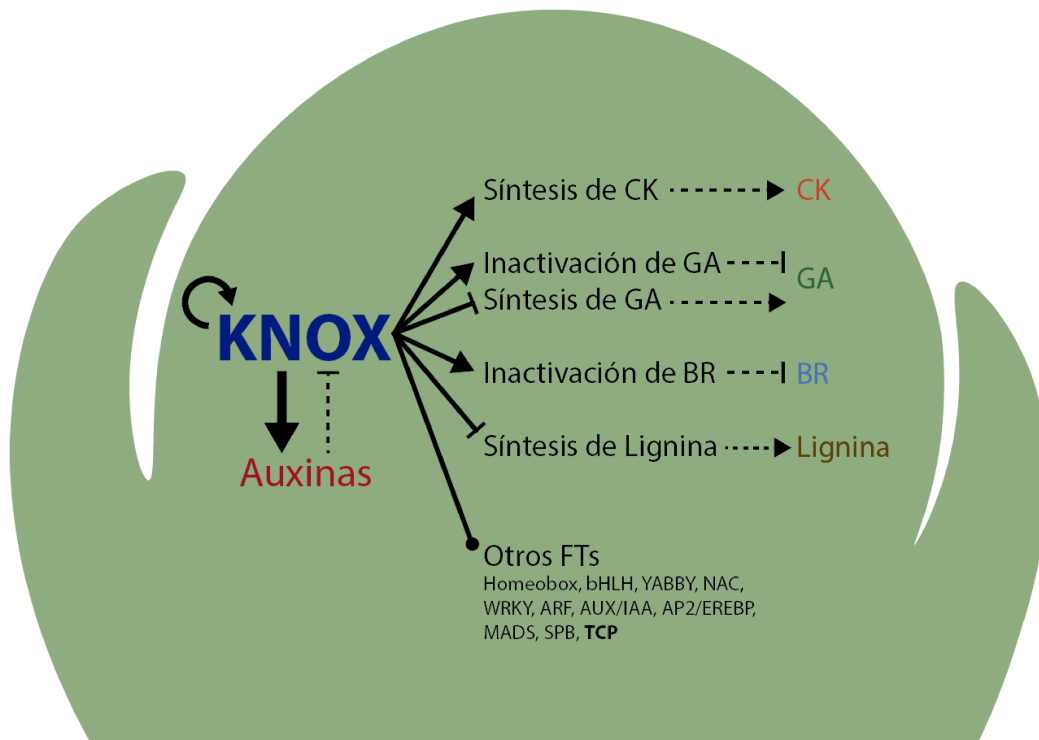
más corto adyacente al homeodominio llamado ELK [330]. Esta familia de proteínas se ha dividido en dos clases, KNOX I y II, de acuerdo a secuencias conservadas dentro y fuera del homeodominio y a la posición de los intrones en los genes [331]. Además, estos genes difieren en su patrón de expresión. Diversos estudios indicaron que las proteínas KNOX unen secuencias de ADN que contienen, en la región central, TGAC [332]–[334]. El genoma de *Arabidopsis* codifica cuatro proteínas KNOX de clase I: *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, *BREVIPEDICELLUS (BP o KNAT1)*, *KN1-like in Arabidopsis thaliana2 (KNAT2)* y *KNAT6*. Éstas regulan varios aspectos del desarrollo y juegan un rol clave en el mantenimiento de las células pluripotentes del SAM [335]. Mutantes *stm* tienen afectado el mantenimiento del SAM, mientras que mutantes *bp* tienen reducida la longitud del pedúnculo (tallo de la flor), presentan entrenudos más cortos y tienen reducida la dominancia apical [336]–[339].

Datos de inmunoprecipitación de la cromatina seguida de secuenciación (ChIP-seq) combinada con análisis de transcriptómica permitieron dilucidar en gran parte la vía ubicada corriente abajo de las proteínas KNOX en inflorescencias de maíz y arroz [340], [341]. Se identificaron más de 5000 blancos directos de KN1 en meristema de inflorescencia de maíz y un número similar se detectó para OSH1 de arroz. La categoría más enriquecida de blancos de KN1 son factores de transcripción, entre ellos ARF, AUX/IAA, AP2/EREBP, bHLH, YABBY, MADS, NAC, SPB, TCP y WRKY. En el caso de OSH1 se encontró que se activa a sí mismo y a otros cuatro genes *KNOX* [342]. Se sabe que STM de *Arabidopsis* activa a *CUC1*, el cual es esencial para la formación del límite (*boundary*) de los órganos, de manera directa [343]. También se vió que KN1 y OSH1 tienen como blancos directos a los genes *CUC* [341], [344], [345].

Como se dijo anteriormente, muchos de los blancos de KN1 y OSH1 son factores de transcripción involucrados en el desarrollo de hojas y flores, como son *HDZIII*, *YABBY* y *MADS*. Esto sugiere que las proteínas KNOX no solo están involucradas en el mantenimiento del SAM, sino también en la diferenciación de órganos. Estudios de plantas que sobreexpresan estos factores de transcripción sugieren que las hormonas se encuentran corriente debajo de los genes KNOX. La sobreexpresión de *KN1* en plantas de tabaco produce raíces ectópicas en las hojas, fenotipo reportado para plantas de tabaco transgénicas que sobreexpresan genes de biosíntesis de CK como *IPT* [346]–[348]. Medidas de niveles hormonales en plantas que sobreexpresan los genes *KNOX* revelaron que los niveles de muchas hormonas se encuentran alterados [349], [350]. La diferencia más notable se observó en los niveles de GA y CK. Los niveles de GA activas estaban muy reducidos, mientras que los niveles de CK estaban dramáticamente aumentados. Una cuantificación más detallada de GA y sus precursores en plantas sobreexpresantes de *NTH15* (ortólogo de *STM* en tabaco) reveló que sus niveles estaban altamente disminuidos, mientras que un intermediario de la vía que se encuentra corriente arriba, GA19, estaba incrementado [351]. Análisis más exhaustivos demostraron que *NTH15* se une de manera directa a un intrón de *NTC12*, un gen que codifica la GA20-oxidasa que produce GA20 a partir de GA19, y reprime su expresión en el SAM [352]. Una represión similar ha sido reportada en *Arabidopsis* [353]. Además, KN1 de maíz activa un gen del catabolismo de GA, *GA2-oxidasa*, por unión directa a un intrón [354].

Así, las proteínas KNOX regulan directamente la biosíntesis y el catabolismo de las GA y de esta manera previenen la acumulación de las mismas.

Un modelo simplificado de las vías que regulan las proteínas KNOX se ilustra en la figura 22.



**Figura 22:** Modelo simplificado de las vías reguladas por las proteínas KNOX en el SAM de angiospermas. *Adaptada de Tsuda y col., 2015 [355].*

## **OBJETIVOS**

## 6. OBJETIVOS

En función de lo descrito hasta aquí, resulta evidente que las proteínas de la familia TCP participan en múltiples aspectos del desarrollo vegetal y que varios de estos procesos están regulados no sólo a través del control del crecimiento y la proliferación celular, sino también a través de la modulación de diferentes vías de señalización hormonales. También sabemos que las proteínas TCP participan de la respuesta a señales del entorno y ambientales. En base a esto, hemos decidido plantear como objetivo general del presente trabajo de Tesis estudiar la función que desempeñan miembros de esta familia de factores de transcripción de clase I, con particular interés en el desarrollo de la arquitectura vegetal, y su respuesta a factores endógenos y ambientales utilizando como modelo plantas de *Arabidopsis thaliana*.

### 6.1. *Objetivos específicos*

1. Estudiar el papel de TCP15 en el desarrollo de los estambres, particularmente en la elongación del filamento de los mismos.
2. Estudiar el papel de TCP15 en el desarrollo de ramificaciones axilares.
3. Identificar genes cuya expresión esté regulada directa o indirectamente por TCP15 durante los procesos mencionados.
4. Identificar posibles blancos directos del accionar de TCP15.
5. Establecer las redes regulatorias relacionadas con el accionar de TCP15 en los procesos en estudio.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Material vegetal

Los ensayos realizados durante la etapa experimental de este trabajo se llevaron a cabo utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana* ecotipos Columbia (Col-0), Landsberg erecta (Ler) y Nossen (NO), las cuales fueron provistas por Lehle Seeds (Tucson, AZ, USA) o por *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) de la Ohio State University, USA. El origen de otras líneas se describe a continuación:

***tcp14-4*, *tcp15-3*, *tcp14-4 tcp15-3***, fueron cedidas gentilmente por el Dr. Martin Kieffer (University of Leeds, UK).

***amiR-27***, fueron cedidas gentilmente por los Dres. Jean-Michel Davière y Patrick Achard (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Estrasburgo, Francia)

***ga1*, *SALK\_109115***, inserción de T-DNA interrumpiendo la región codificante del gen de la enzima de biosíntesis de giberelinas ent-copalil difosfato sintasa (*CPS*), adquirida del ABRC.

***bp-1***, mutante puntual en el gen *AtKNAT1*, en ecotipo Ler, adquirida del ABRC.

***35S::KNAT1***, en ecotipo NO, resistente a kanamicina, descrita en Ori y col., [356], adquirida del ABRC.

***pKNAT1::KNAT1-GFP***, *background* mutante *bp-1*, cedidas gentilmente por el laboratorio del Dr. Xuncheng Liu, perteneciente a la Academia China de Ciencias en Guangzhou, China.

***35S::TCP15***, línea 5 y línea 12 (L5 y L12), ambas en ecotipo Col-0, resistentes a kanamicina, fueron generadas previamente en el laboratorio [357].

***35S::TCP15-RFP***, en ecotipo Col-0, resistentes a higromicina, fueron generadas previamente en el laboratorio [358].

***pTCP15::TCP15-EAR***, en ecotipo Col-0, resistentes a kanamicina, fueron obtenidas previamente en el laboratorio [294].

***pKNAT1::GUS***, ecotipo Col-0, resistencia a kanamicina, adquirida del ABRC.

***pTCP15::GUS***, ecotipo Col-0, resistente a kanamicina, fueron generadas previamente en el laboratorio [294].

**pTCP15::TCP15-GFP-GUS**, ecotipo Col-0, resistente a kanamicina, fueron generadas previamente en el laboratorio [313].

**pTCP15::TCP15-GFP**, *background tcp15* ecotipo Col-0, resistente a higromicina, fueron generadas previamente en el laboratorio [313].

**brc1-2**, ecotipo Col-0, fueron cedidas gentilmente por la Dra. Pilar Cubas del Laboratorio de Genética Molecular de Plantas del Centro Nacional de Biotecnología de Madrid, España.

**tcp14xtcp15xbrc1-2**, se obtuvieron en este trabajo de tesis, mediante cruce y posterior análisis genotípico. Para verificar la presencia de los fragmentos de T-DNA y la homocigosis de cada mutación, se realizaron reacciones de amplificación (PCR, descrita en la sección 7.6), utilizando los oligos detallados en la tabla del Anexo I, a partir de ADN genómico (sección 7.16).

**35S::SAUR63-GFP**, ecotipo Col-0, resistencia a BASTA, generadas en este trabajo de tesis (clonado detallado en la sección 7.10.1.)

**pSAUR63::SAUR63-GUS**, ecotipo Col-0, resistencia a BASTA, generadas en este trabajo de tesis (clonado detallado en la sección 7.10.1.).

**pSAUR63mut::SAUR63-GUS**, ecotipo Col-0, resistencia a BASTA, generadas en este trabajo de tesis (clonado detallado en la sección 7.10.1.).

**ga1-3 + 35S::TCP15-RFP**, se obtuvieron en esta tesis, mediante transformación de plantas *ga1* con la construcción que sobreexpresa TCP15-RFP, mediante la técnica de *floral dip* descrita en la sección 7.17. Las plantas T1 (primera generación de transformantes) se seleccionaron mediante la resistencia higromicina.

**35S::SAUR63-GFP + pTCP15::TCP15-EAR**, se obtuvieron en esta tesis, mediante transformación de plantas *35S::SAUR63-GFP* (mediante la técnica descrita en la sección 7.17.), con la construcción que expresa la forma represora de TCP15 bajo la regulación de su propio promotor. La selección de las plantas transformantes se realizó utilizando kanamicina (resistencia de la construcción *pTCP15::TCP15-EAR*) y BASTA (resistencia otorgada por la construcción *35S::SAUR63-GFP*).

**bp-1 + pTCP15::TCP15-EAR**, fueron generadas, durante este trabajo de tesis, transformando la mutante *bp-1* con la construcción que expresa *TCP15-EAR* bajo el control de su propio promotor, mediante la técnica descrita en la sección 7.17. Las T1 fueron seleccionadas mediante resistencia a kanamicina.

**35S::KNAT1 + 35S::TCP15-RFP**, se obtuvieron en este trabajo de tesis, mediante la transformación de plantas *35S::KNAT1* con la construcción que sobreexpresa *TCP15-RFP*, mediante la técnica de *floral dip*, descrita en la sección 7.17. Las hijas de las transformantes fueron seleccionadas mediante la resistencia a

kanamicina (marcador de selección de la construcción *35S::KNAT1*) e higromicina (selección otorgada por la construcción *35S::TCP15-RFP*).

***pSAUR63::SAUR63-GUS* + *pTCP15::TCP15-EAR***, se obtuvieron durante esta tesis, mediante transformación de plantas *pSAUR63::SAUR63-GUS* con la construcción que expresa *pTCP15::TCP15-EAR*. Las plantas transformantes fueron seleccionadas con kanamicina (resistencia otorgada por la construcción *pSAUR63::SAUR63-GUS*) y con higromicina (marcador de selección de la construcción *pTCP15::TCP15-EAR* en el vector pCambia, obtenido previamente en el laboratorio).

## 7.2. Cepas empleadas

*Escherichia coli*: DH5 $\alpha$ : (supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 (Na1r) thi-1 relA1) [359].

*Agrobacterium tumefaciens*: LB4404: presenta resistencia cromosómica al antibiótico rifampicina (50  $\mu$ g/ml). Esta cepa utiliza el sistema binario de transformación de *Agrobacterium* y posee el plásmido pTi/pRi desarmado pAL4404 (cuyo agente selectivo es la estreptomina, 300  $\mu$ g/ml) en la cepa Ach5. Esta cepa, además, posee el plásmido pTi/pRi pTiAch5 [360].

*Saccharomyces cerevisiae*: Mav203 (Invitrogen): MAT $\alpha$ ; leu2-3,112; trp1-901; his3 $\Delta$ 200; ade2-101; cyh2R; can1R; gal4 $\Delta$ ; gal80 $\Delta$ ; GAL1::lacZ; HIS3UASGAL1::HIS3@LYS2; SPAL10::URA3 [361].

## 7.3. Vectores utilizados

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

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

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

**pBI101.3**. Permite expresar en plantas el gen de interés, bajo su propio promotor, fusionado al gen reportero *GUS* [362]. Este vector confiere resistencia a kanamicina tanto en bacterias como en plantas.



#### 7.4. Condiciones generales de crecimiento de plantas en cámara de cultivo

Las semillas fueron esterilizadas en la superficie mediante un primer lavado con etanol 70% (v/v) (2 min) y luego con una solución de lavandina 5% y SDS 1% (15 min). Luego de este paso de desinfección, las semillas se lavaron 5 veces con agua destilada estéril y finalmente se resuspendieron en agar-agar 0,1% (p/v) estéril. Las plantas fueron cultivadas en tierra o en placas de cultivo que contenían medio MS 0,5X y agar-agar 0,8% (p/v) en condiciones de temperatura normal (23°C) simulando un fotoperiodo de día largo, el cual consiste en 16 h de luz ( $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y 8 h de oscuridad. Para el crecimiento y selección de plantas en placas se empleó el medio comercial Murashige y Skoog (MS) basal suplementado con vitaminas (M519) de PhytoTechnology Laboratories.

Para los tratamientos con hormonas las plantas se cultivaron en macetas llenas de tierra en condiciones de día largo a una intensidad de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una temperatura de 22-24°C. Para los tratamientos con AUX, GA y Paclobutrazol (PAC), las inflorescencias de las plantas se rociaron con 100 mM de Picloram (auxina sintética), 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$  y 10 Mm de PAC (disueltos en etanol, llevadas a sus respectivas concentraciones finales con agua y 0.1% de Tween). Las muestras se recogieron 4 h más tarde para el análisis de expresión. Los controles (Mock) se trataron con las soluciones respectivas sin el reactivo (agua + 0.1% de Tween, sin hormona/inhibidor).

Para los análisis fenotípicos en luz roja lejana, se crecieron plantas en condiciones de temperatura normal (23°C) simulando un fotoperiodo de día largo, el cual consiste en 16 h de luz ( $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y 8 h de oscuridad. Una vez que las plantas pasaban a estadio reproductivo y elongaban el tallo principal aproximadamente 1 cm de largo, se trasladaron a estantes con el mismo fotoperíodo y las mismas condiciones de temperatura pero suplementado con luz roja lejana (R:FR = 0.11) según se describe en [363], hasta 15 días luego de la floración, en el cual se cuantificó el número de ramas. Como control, se cuantificó el número de ramas de plantas en los mismos estadios de desarrollo y crecidas en las mismas condiciones, sin suplemento de luz roja lejana (R:FR=2.7).

Para las medidas de expresión génica en muestras enriquecidas en yemas axilares en condiciones de luz roja lejana, se procedió de la misma manera que para el análisis fenotípico, con la diferencia que, una vez expuestas a luz roja lejana (R:FR = 0.11), se dejaron en esa condición 1 hora, 2 horas y 4 horas, respectivamente, y se tomaron muestras, por triplicado biológico, en cada tiempo. Como control se tomaron muestras de plantas, en los mismos estadios de desarrollo, que no fueron expuestas a luz roja lejana (R:FR=2.7).

### 7.5. Análisis de secuencias

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

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

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

### 7.7. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

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

---

**TAE 1X:** Tris 5,5 g/L, EDTA 0.75 g/L, ácido acético glacial 0,1% (v/v).

**Solución de siembra:** Glicerol 30% (v/v), Xyleno cianol 0,25% (p/v), Azul de bromofenol 0,25% (p/v) y Gel Red 1/1.000 (Biotium®)

---

### 7.8. Purificación de fragmentos de ADN

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

### 7.9. 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  $\mu\text{g}$  de ADN a digerir en un volumen final que varió entre 20 y 30  $\mu\text{l}$ , dependiendo de la cantidad de ADN. Para la digestión de los vectores provenientes de mini preparaciones de ADN, se adicionó a la reacción de corte la enzima ARNasa A (Promega) en una concentración final de 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### 7.10. Ligación de moléculas de ADN

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

#### 7.10.1. Generación de construcciones génicas:

**pSAUR63::SAUR63-GUS:** para generar esta construcción se cortó con las enzimas *Sall* y *BamHI*, 1256 pb región promotora del gen *SAUR63* fusionada a la región codificante clonada previamente en el vector pBluescriptSK-. Luego, se purificó la banda liberada y se ligó en el vector pBI101.3 [362], cortado con las mismas enzimas.

**pSAUR63mut::SAUR63-GUS:** para generar esta construcción, primero realizamos la mutagénesis dirigida, con la metodología descrita en el punto 7.11, sobre la construcción clonada previamente en el laboratorio en el vector pBluescriptSK-, la misma que utilizamos en el clonado anterior, que contiene la región promotora del *SAUR63* fusionada a la región codificante del mismo. Luego de mutagenizar el promotor, se cortó con las enzimas de restricción *Sall* y *BamHI*, de la misma manera que en la construcción anterior sin mutagenizar, se purificó la banda liberada y se ligó en el vector pBI101.3 [362], cortado con las mismas enzimas.

**35S::SAUR63-GFP:** Para obtener la construcción que sobreexpresa la proteína SAUR63 fusionada a la proteína fluorescencia verde GFP, primero se amplificó la región codificante para *SAUR63*, obviando el codón de terminación, utilizando oligonucleótidos específicos (Anexo I) y el fragmento obtenido se clonó en los sitios *BamHI* y *XhoI* del vector de entrada pENTR-3C (Thermo Fisher Scientific). Luego se realizó una recombinación LR en el vector binario pFK-248 [364], según recomienda el proveedor de la enzima

Todas las construcciones descritas hasta aquí fueron introducidas en *Escherichia Coli* según metodología descrita en la sección 7.13. Luego se introdujeron en *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 de acuerdo a la metodología descrita en la sección 7.14. Las líneas transgénicas de *Arabidopsis* fueron

generadas por el método de transformación por inmersión floral mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (descrito en la sección 7.17) [365].

Las construcciones de TCP15 para el ensayo de doble híbrido en levaduras (secciones 7.29 y 7.20) se encontraban disponibles en el laboratorio y, las construcciones de BRC1 para ese mismo ensayo, fueron cedidas gentilmente por la Dra. Pilar Cubas del Laboratorio de Genética Molecular de Plantas del Centro Nacional de Biotecnología de Madrid, España. Estas construcciones fueron transformadas en cepas Mav203 de *Saccharomyces cerevisiae*, según metodología descrita en la sección 7.29.

Las construcciones de BRC1 y sus respectivos controles utilizadas para el ensayo de FRET fueron cedidas por la Dra. Pilar Cubas. La construcción de TCP15 utilizada para FRET fue realizada, en parte en nuestro laboratorio, en el cual contábamos con TCP15 clonada en el vector de entrada pENTR-3C (Thermo Fisher Scientific) [313], sin codón de STOP. Luego, la recombinación a su vector destino fue realizada por el Dr. Leandro Lucero en España en el laboratorio de la Dra. Pilar Cubas. Los vectores de destino contienen el sistema LexA ER-LBD inducible por estradiol. El vector pAB117 y el pAB118 contienen la proteína GFP y mCherry para fusionar a la proteína de interés, respectivamente. El control negativo del experimento, se realizó con una fusión que contiene una versión trunca de la Luciferasa (Lucif-mCherry). El control de *photobleaching*, se realizó con el vector de pAB119, que contiene GFP fusionado a mCherry.

### 7.11. Mutagénesis por Quickchange

La mutagénesis se llevó a cabo mediante el método *QuickChange* descrito por Xia y col., [366], utilizando *Phusion DNA polymerase* (Thermo Fisher Scientific). Los cebadores utilizados para la mutagénesis se encuentran detallados en la tabla del Anexo I.

### 7.12. Determinación de la secuencia de moléculas de ADN

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

### 7.13. Transformación de *Escherichia coli* con ADN plasmídico por electroporación

La preparación de células de *E. coli* competentes para transformación por electroporación se realizó según las recomendaciones del fabricante del equipo de electroporación (Micro Pulser™, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). Luego de la electroporación, las células de *E. coli* se recuperaron en 1 ml de medio

SOB, se incubaron durante 1 h a 37°C y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en 100 µl de medio LB y se sembró en placas de Petri con LB-agar suplementado con el antibiótico adecuado. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C. Luego de la aparición de colonias, las mismas se utilizaron para realizar PCR de colonia, como se describió anteriormente. Cuando la PCR fue positiva (presencia de un amplicón del tamaño adecuado) se procedió al repique de la colonia correspondiente para realizar posteriormente mini-preparación de ADN plasmídico.

---

**Medio Luria-Bertani (LB):** Peptona de carne 10 g/L; NaCl 5 g/L; extracto de levadura 5 g/L.

**Medio LB sólido:** Medio LB, agar 15 g/L.

---

#### 7.14. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con ADN plasmídico por electroporación

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

#### 7.15. 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 Bimboim y Doly [220]. Se centrifugaron 1,5 ml de un cultivo saturado de células cultivadas en medio LB con el antibiótico adecuado, a 5000 x g durante 5 min. El sedimento celular fue resuspendido en 100 µl de solución de miniprep I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 8,0). Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente se agregaron 200 µl de solución de miniprep II (NaOH 0,2 M, SDS 0.1% (p/v)), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente, se agregaron 150 µL de acetato de potasio 5 M (pH 5,2) y se incubó nuevamente en hielo durante 15 min, se centrifugó a 12000 x g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se trató con 400 µL de una mezcla de fenol saturado en Tris-HCl (pH 8,0) y cloroformo (1:1) a fin de remover las proteínas de la muestra. Luego se centrifugó durante 5 min a 8000 x g a temperatura ambiente y el ADN de la fase acuosa se precipitó durante 2 h a -20°C con 2 vol. de etanol absoluto frío en medio acetato de sodio 0,3 M (pH 5,2). El ADN plasmídico se recuperó mediante centrifugación a 12000 x g durante 10 min a 4°C y se lavó con etanol 70% (v/v) para eliminar sales. Se centrifugó, se secó el precipitado y se resuspendió en 30 µl de agua destilada

estéril. Cuando se necesitó preparar ADN plasmídico de alta calidad, se utilizó el kit comercial “Mini-preps DNA Purification” (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### 7.16. Preparación de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*

La extracción de ADN genómico se realizó sobre una hoja de roseta, la cual fue disgregada durante 10 segundos con un pilón plástico a temperatura ambiente. Luego, se adicionaron 700  $\mu$ l de solución de extracción, se mezcló en vórtex durante 15 segundos y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se precipitó con 600  $\mu$ l de isopropanol y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, el precipitado con el ADN genómico se secó y se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua MQ estéril. Las preparaciones de ADN genómico de *A. thaliana* se guardaron hasta su uso a -20°C.

---

**Solución de extracción:** Tris-HCl 200 mM pH 8,0; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5% (p/v).

---

#### 7.17. Transformación estable de plantas de *Arabidopsis thaliana*

El método utilizado para transformar de manera estable plantas de *A. thaliana* fue el de inmersión floral (*floral dip*) descrito por Clough y Bent [365]. Se prepararon, aproximadamente, 4 macetas con tierra para cada una de las construcciones a introducir en las plantas. Se sembraron alrededor de 10 semillas por maceta, lo que permitió luego seleccionar las que mostraban un aspecto más saludable y reducir el número de plantas por maceta a 4. Las plantas se cultivaron en una cámara de temperatura, humedad y fotoperíodo controlados, según las condiciones de cultivo antes descritas, hasta la floración (aproximadamente 4 semanas). A partir de este momento, se empezaron a cortar las inflorescencias para aumentar el número de flores por planta a ser sometida al evento de transformación. Para preparar la suspensión de transformación se cultivaron células de *A. tumefaciens* previamente transformadas según se describe en el apartado 6.17. Se realizó un pre-inóculo de 30 ml de medio LB suplementado con rifampicina 50  $\mu$ g/ml y estreptomina 300  $\mu$ g/ml para seleccionar la cepa de *A. tumefaciens* y un antibiótico adecuado para seleccionar el plásmido utilizado en la transformación. Este pre-inóculo se cultivó hasta saturación durante 24 h a 28°C y una agitación de 160 rpm. Con este cultivo, se inoculó un Erlenmeyer con 300 ml de medio LB suplementado de la misma manera que en el paso anterior, dejándose crecer los cultivos hasta llegar a la fase estacionaria (12-16 h, 28°C, con agitación). Las células fueron cosechadas por centrifugación a 5000 rpm durante 20 min. Los sedimentos se resuspendieron cuidadosamente en 500 ml de solución de infiltración (sacarosa 5%), a la que se le adicionaron 250  $\mu$ l del detergente Silwet L-77 (OSI Specialties, Inc.) al momento de hacer la transformación. Esta suspensión de *A. tumefaciens* se colocó en un vaso de precipitado sobre un agitador magnético de manera de lograr una agitación suave. Las plantas fueron sumergidas durante 1 minuto tratando de evitar que el líquido entre en contacto con la tierra. Luego, las macetas se ubicaron en forma horizontal en una bandeja, se taparon con nylon para conservar un ambiente húmedo y se llevaron a cámara

de cultivo. Transcurridas 24-48 h, se colocaron las macetas en posición vertical y se les agregó abundante agua, permitiendo que las plantas se desarrollaran hasta la formación y maduración de las semillas (4-5 semanas aproximadamente para nuestras condiciones de cultivo). Finalmente, se recolectaron las semillas de cada maceta por separado, se limpiaron de los restos de vainas y tierra y se guardaron a 4°C hasta su posterior análisis. A partir de las semillas obtenidas se seleccionaron entre diez y quince líneas independientes para buscar plantas T3 y T4 homocigotas. Las plántulas transgénicas fueron seleccionadas en placas o en tierra dependiendo de la resistencia aportada por el ADN-T.

#### *7.18. Análisis de plantas transformadas*

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

#### *7.19. Medición de la longitud del filamento del estambre*

Las longitudes de estambre mostradas en la Fig. 24A se midieron con un calibre bajo un microscopio estereoscópico. Alternativamente, se fotografiaron flores en diferentes etapas usando un microscopio estereoscópico Leica MZ10F equipado con una cámara digital y se determinó la longitud del filamento usando el software Image J [367] (como se ilustra en la Figura 24C). Como las flores de *Arabidopsis* de tipo salvaje tienen cuatro estambres largos y dos cortos, solo se consideraron los estambres largos en cada flor.

#### *7.20. Medición del número de ramas laterales*

Las plantas se sembraron y crecieron en tierra en condiciones de día largo, como se detalla en el inciso 7.4. Luego de realizado el *bolting*, es decir el pasaje al estadio reproductivo, y que el tallo se haya elongado 1 cm, se dejaron crecer 10 días más y se contó el número de ramas laterales (RI) que tenían al menos 5 cm de longitud. El mismo recuento se realizó luego de 15 días de la floración.

### 7.21. Ensayo de decapitación

Las plantas se sembraron y crecieron en tierra, en condiciones de día largo, como se detalla en el inciso 7.4. Luego de realizado el *bolting*, es decir el pasaje al estadio reproductivo, y que el tallo se haya elongado 2 cm, se cortó el ápice del mismo (como control dejamos el mismo número de plantas sin decapitar), se dejaron creciendo 10 días y contamos el número de ramas laterales (RI) elongadas al menos 5 cm. El mismo recuento se realizó luego de 15 días de la floración.

### 7.22. Toma de muestras para análisis de expresión génica

Para la toma de muestras para extracción de ARN de flores, se tomaron flores en diferentes estadios del desarrollo floral, utilizando pinzas antiestáticas de precisión. En el caso de la toma de muestra específica de estambres, se diseccionó la flor bajo microscopio estereoscópico, descartando el resto de los órganos florales, guardando en nitrógeno líquido solamente los estambres.

Para las mediciones de genes en yemas axilares, se obtuvo muestra enriquecida en yemas, utilizando un sacabocado de un diámetro adecuado para eliminar las hojas de roseta. Se tomó la muestra una vez que la planta pasaba a estadio reproductivo, es decir aparecía el meristema floral y, el tallo, presentaba 1 cm de largo. El mismo criterio se tomó para las muestras analizadas luego del ensayo de decapitación. Se decapitaban las plantas cuando el tallo principal tenía 1 cm de largo, se dejaban creciendo en cámara el tiempo adecuado de cada experimento, y se tomaba la muestra utilizando sacabocado.

### 7.23. Preparación y análisis de ARN

La preparación de ARN se realizó a partir de plantas aisladas utilizando el reactivo *TRIzol* seguido de precipitación con LiCl. La retrotranscripción (RT) se realizó con un cebador oligo (dT)18 y la enzima MMLV transcriptasa reversa (Promega) utilizando 1,5-2,0 µg de ARN total. La PCR en tiempo real (qPCR) se realizó en un aparato StepOne (Applied Biosystems) usando los cebadores específicos enumerados en el Anexo I y SYBR Green. La expresión de los genes se calculó en relación con *ACTINA* (*ACT2* y *ACT8*; [368]), utilizando el método  $\Delta\Delta C_t$ . Los resultados presentados son de tres réplicas biológicas. El *software* GraphPad Prism 6 se utilizó para analizar los datos y producir los gráficos. Se compararon todos los tratamientos y genotipos utilizando test T para analizar si las diferencias eran estadísticamente significativas.

---

#### **Reactivo de TRIZOL:**

**Preparación de fenol ácido:** Se fundió el fenol (guardado en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) en un baño a  $68^{\circ}\text{C}$ , se adicionó 0,1% de hidroxiquinoleína (antioxidante, inhibidor de ARNasas) y agua bidestilada para saturar. Luego de un día de equilibrado, se recambió el agua de la fase superior por agua nueva y se repitió este paso



una vez más. Se fraccionó en frascos y se almacenó en heladera. De esta manera el fenol se mantuvo estable hasta 1 año.

**Preparación de 100 ml de Trizol:** 38 ml de fenol ácido, 0,8 M tiocianato de guanidina (9,453 g), 0,4 M tiocianato de amonio (3,045 g), 0,1 M NaAc (3,34 ml del stock 3 M, pH 5,0), 5% glicerol (5,75 mL del stock 87%), H<sub>2</sub>O hasta 100 mL.

---

#### *7.24. Extracción de proteínas totales de Arabidopsis thaliana*

Para la extracción de proteínas totales, las flores de Arabidopsis se cosecharon y se pulverizaron en un mortero enfriado previamente con nitrógeno líquido. Luego se agregaron 100 µl de solución de extracción de proteínas por cada 100 mg de tejido molido. Se centrifugó durante 20 min a 16.000 x g y 4°C, y finalmente se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL, teniendo así los extractos proteicos listos para continuar con los ensayos de western blot. La concentración de proteínas totales en las muestras se determinó mediante la técnica de Bradford [369], utilizando como patrón una solución de albúmina sérica bovina (Invitrogen). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro Novaspec Pro (Biochrom).

---

**Solución de extracción de proteínas:** Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v), DTT 1 mM, y una tableta del Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche).

---

#### *7.25. Separación de proteínas y análisis por western blot*

La separación de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) se llevó a cabo en geles verticales según lo descrito por Laemmli [370]. Las proteínas se resolvieron en geles de separación con una concentración final de acrilamida del 8% (p/v), con geles superiores de concentración del 6% (p/v). Los extractos proteicos a sembrar fueron mezclados con solución de siembra Laemmli 5X en una relación 4:1, respectivamente, y luego incubados durante 5 min a 95°C con el fin de desnaturalizar las proteínas de las muestras. Luego se llevó a cabo la corrida electroforética en solución de corrida 1X. A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Roche), pre-activada con metanol 100%, por el método estándar de transferencia húmeda en tanque, con solución de transferencia 1X. Para determinar el peso molecular de las bandas y para confirmar la eficiencia de transferencia se utilizó el marcador de peso molecular proteico PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Terminada la transferencia, se dejó incubando toda la noche la membrana en solución de bloqueo. Las transferencias se hibridaron con anticuerpos policlonales de conejo contra RGA (Agrisera, dilución 1:1000) durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Después de 3 lavados de 10 min con solución TBS-T 1X, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario anti-IgG policlonal conjugado con HBR (Agrisera AS09602; dilución 1:20.000) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente, se realizaron 4 lavados

de 10 min con solución TBS-T 1X, se transfirió la membrana a un folio de plástico transparente, se le agregó por arriba 1 mL del sustrato ECL™ Prime Western Blotting System (GE Healthcare), se eliminaron los excesos de líquido, y finalmente se realizó la exposición a temperatura ambiente durante tiempos variables en películas radiográficas ECL Hyperfilm (Amersham) según la intensidad de la señal deseada.

---

**Solución de siembra Laemmli 5X:** 312,5 mM Tris-HCl pH 6,8; glicerol 50% (v/v), SDS 10% (p/v); azul de bromofenol 0,05% (p/v); β-mercaptoetanol 25% (v/v).

**Solución de corrida 1X:** Tris-Base 25 mM; glicina 19,2 mM; SDS 0,1% (p/v).

**Solución de transferencia 1X:** Tris-Base 2,5 mM; glicina 19,2 mM; metanol 5% (v/v).

**Solución TBS-T 1X:** Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween-20 0,1% (v/v).

**Solución de bloqueo:** leche en polvo 5% (p/v) en TBS-T 1X.

---

### 7.26. Microscopía electrónica de barrido

Las flores se fijaron en FAA (formaldehído: alcohol etílico: ácido acético: agua, 10:50:5:35) y se transfirieron a etanol 70% durante 24 h. Después de la deshidratación con una serie de soluciones de etanol (80%, 96% y 100%), las muestras se transfirieron a acetona para desecación utilizando CO<sub>2</sub> en un secador de punto crítico (Emitech K850). Finalmente, las muestras fueron recubiertas con oro-paladio y fotografiadas con un microscopio electrónico de barrido Philips XL30 TMP New Look (Eindhoven, Países Bajos) del Museo Bernardino Rivadavia (Buenos Aires, Argentina).

### 7.27. Análisis histoquímico de la actividad β-glucuronidasa

Para analizar la actividad β-glucuronidasa en forma histoquímica, las plántulas fueron transferidas a una solución de citrato de sodio 50 mM (pH 7,0), Tritón X-100 0,1% y X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-glucuronido) 2 mM. A continuación, se sometieron a vacío entre 5 y 15 min y se incubaron a 37°C en oscuridad durante toda la noche. Luego de la incubación, se agregó etanol 70% para decolorar los tejidos y las muestras se guardaron en esta solución a temperatura ambiente hasta ser fotografiadas. Las imágenes digitalizadas se tomaron con una cámara LUMIX DMC-FZ35 (Panasonic) sobre microscopio óptico o lupa estereoscópica y se procesaron con el software Adobe Photoshop CS5.

### 7.28. Inmunoprecipitación de la cromatina

Para los experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), plantas de Arabidopsis del ecotipo Col-0, *pKNAT1::KNAT1-GFP* (background *bp*), *35S::TCP15-RFP* y *pTCP15::TCP15-GFP* (background *tcp15*) se cultivaron en tierra en condiciones de día largo. El ensayo de ChIP se realizó como se describe en Ariel y col. [371] utilizando anticuerpos anti-RFP (632496; Clontech), anti-GFP (ab6556; Abcam) o antiIgG

(ab6702; Abcam). Después del entrecruzamiento y la extracción y lisis de los núcleos, la cromatina se sonicó en un baño de agua Bioruptor Pico (Diagenode; 10 ciclos de 30 s prendido/30 s apagado, pulsos de baja intensidad, en microtubos Bioruptor). Para la inmunoprecipitación, las muestras se incubaron durante 12 h a 4°C con Proteína A Dynabeads (Invitrogen) recubiertas con los anticuerpos correspondientes. El ADN inmunoprecipitado se recuperó mediante extracción con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitación con etanol. La cuantificación de las regiones genómicas inmunoprecipitadas se realizó mediante qPCR usando los cebadores enumerados en el Anexo I y el kit comercial iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Una fracción de cromatina sonicada sin inmunoprecipitar se procesó en paralelo y se consideró como la muestra de entrada (*input*).

---

**Extracción Buffer I:** 20mM Tris-HCl pH8, 0,4M de sacarosa, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM beta mercaptoetanol, inhibidor de proteasas: Complete Protease Inhibitor Cocktail 1% (p/v) (Roche).

**Extracción Buffer II:** 10mM Tris-HCl pH8, 0,25M de sacarosa, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM beta mercaptoetanol, 1% de Triton X100, inhibidor de proteasas: Complete Protease Inhibitor Cocktail 1% (p/v) (Roche).

**Extracción Buffer II:** 10mM Tris-HCl pH8, 1,7M de sacarosa, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM beta mercaptoetanol, 0.15% de Triton X100, inhibidor de proteasas: Complete Protease Inhibitor Cocktail 1% (p/v) (Roche).

**Solución de lisis nuclear:** Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, SDS 1% (p/v), PMSF 1 mM, inhibidor de proteasas Complete Protease Inhibitor Cocktail 1% (p/v) (Roche).

**Solución de dilución de CHIP:** Triton X-100 1,1% (v/v), EDTA 1,2 mM, Tris-HCl 16,7 mM pH 8,0, NaCl 167 mM.

---

### 7.29. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de acetato de litio

Las transformaciones de levaduras se realizaron según el método descrito por Gietz y col. [372] con algunas modificaciones tomadas de Ausubel y col. [373].

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

Para la transformación se emplearon 50 µl de células competentes que se incubaron con un volumen no mayor a 10 µl del ADN correspondiente (5 µl de cada construcción para los ensayos de Doble Híbrido en

levaduras Y2H) y 300  $\mu$ l de solución PEG 40%/TE 1X/LiAc 100 mM, durante 30 min a 30°C con agitación. Posteriormente las células se sometieron a un shock térmico de 42°C durante 15 min e inmediatamente se las centrifugó a 12000 rpm durante 30 segundos. El sedimento celular se lavó con 200  $\mu$ l de solución TE 1X estéril y se resuspendió en 100  $\mu$ l de TE para ser sembrado en placas de Petri que contenían el medio de cultivo mínimo suplementado con los aminoácidos y bases correspondientes.

---

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

**Medio mínimo:** (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/l; glucosa 20 g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/l; MgSO<sub>4</sub> 0,5 g/l; NaCl 0,1 g/l; CaCl<sub>2</sub> 0,1 g/l; inositol 0,1 g/l; piridoxina-HCl 1mg/l; ácido nicotínico 1 mg/l; tiamina-HCl 10 mg/l. En función de la cepa de *S. cerevisiae* empleada y las transformantes a seleccionar, el medio mínimo fue suplementado con las siguientes concentraciones finales de aminoácidos y bases: uracilo 20 mg/l; adenina (sulfato) 40 mg/l; L-histidina 20 mg/l. En los medios sólidos se adicionó agar-agar como agente solidificante a una concentración final de 15 g/l.

---

### 7.30. Ensayos de Doble Híbrido en levaduras

Los ensayos de Doble Híbrido en levaduras [374] se realizaron siguiendo las instrucciones descritas en el manual Yeast Protocols Handbook (Clontech Laboratories). Se tomaron 2-3 colonias de levaduras co-transformadas con las construcciones a analizar crecidas en medio selectivo SD -trp -leu, y se resuspendieron en agua bidestilada estéril. La suspensión se llevó a una DO<sub>600</sub> = 0,5 y se realizaron 3 diluciones seriadas 1/10. Se sembraron en placas con medio selectivo SD -trp -leu como control de crecimiento y SD -trp -leu -his para el ensayo de interacción entre las proteínas en estudio, y se incubaron a 30 °C durante 3-5 días hasta la observación de crecimiento de colonias. El medio de selección SD -trp -leu -his se suplementó con 60 mM de 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) para reducir la autoactivación propia de algunas construcciones.

---

**Medio selectivo SD -trp -leu -his:** Yeast Nitrogen Base (YNB) 7,6 g/L, glucosa 20 g/L, suplemento DO -trp -leu -his 0,62 g/L, Agar 15 g/L.

---

### 7.31. Ensayo de Transferencia de Energía Resonante de Förster (FRET)

Este ensayo se realizó en colaboración con el Laboratorio de Genética Molecular de Plantas del Centro Nacional de Biotecnología de Madrid, España, dirigido por la Dra. Pilar Cubas. El FRET se llevó a cabo mediante el método y las condiciones descritas en Nicolas y col., [375]. En breve, plantas de *Nicotiana benthamiana* de dos semanas, fueron infiltradas con medios de cultivo que contienen *A. tumefaciens* con las construcciones previamente descritas, y tratadas con 20mM de  $\beta$ -estradiol 48hs posterior a la infiltración. El experimento de FRET se realizó 24hs posteriores a la inducción utilizando el microscopio confocal SPS5 Leica. El fotoblanqueo (*bleaching*) del aceptor (mCherry) fue realizado con una longitud de onda de 543 nm.

La emisión del donante (GFP) fue colectada desde 450 a 520 nm mientras que la fluorescencia del aceptor (mCherry) fue adquirida entre 580 y 650 nm.

## **RESULTADOS**

## 8. RESULTADOS

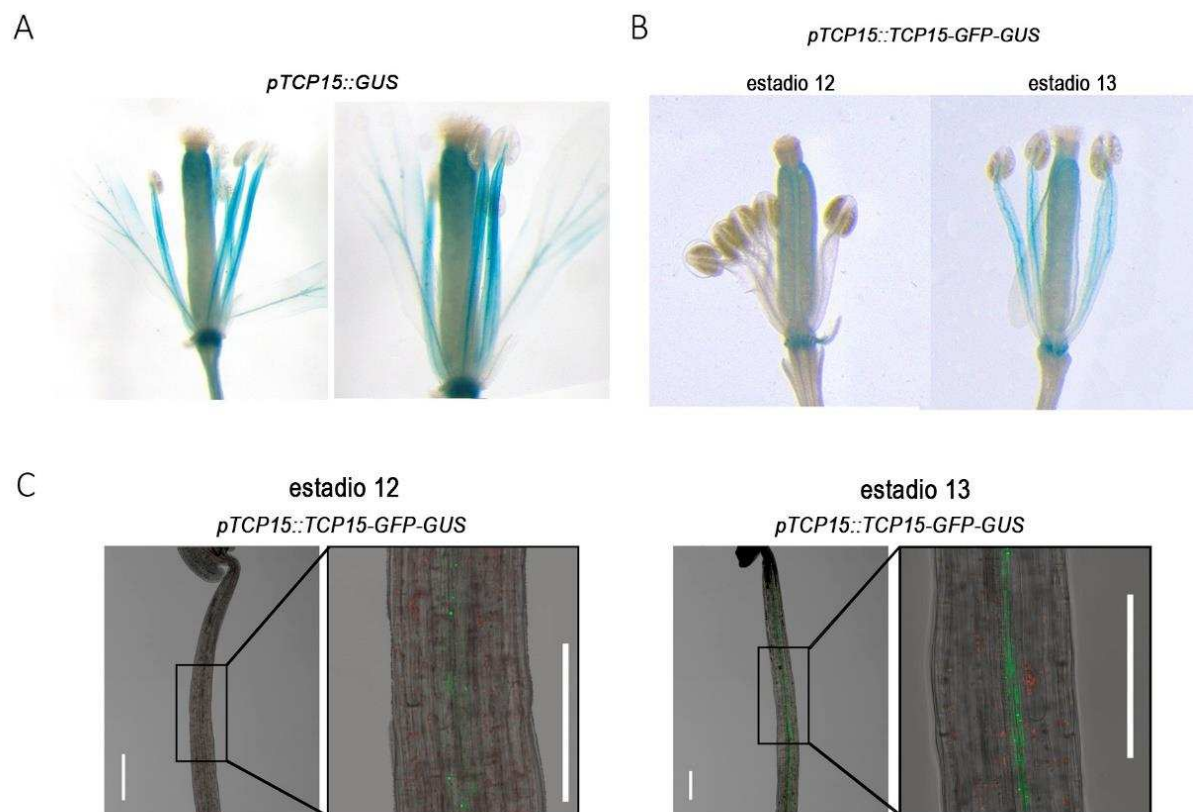
### 8.1. Estudio del papel de los factores de transcripción TCP de clase I durante la elongación del filamento del estambre en *Arabidopsis thaliana*

El proceso de fecundación permite en las plantas la formación de semillas y, por lo tanto, la reproducción y la propagación de la especie. En plantas autógamas (plantas que poseen órganos reproductores femeninos y masculinos en la misma flor, y que además se autofecundan) la fecundación se produce cuando el polen, presente en las anteras del estambre, se deposita sobre las papilas estigmáticas del gineceo y es posteriormente dirigido hacia el ovario para fecundar a los óvulos allí presentes. Para que esto ocurra en forma eficiente, el filamento del estambre debe elongarse en el momento oportuno y de manera adecuada, hasta alcanzar la altura del gineceo para la fecundación.

Estudios preliminares indicaron que los promotores de los genes TCP de clase I *TCP14* y *TCP15* dirigen la expresión de genes reporteros en el filamento del estambre. En base a esto, nos propusimos evaluar si las proteínas TCP de clase I están involucradas en modular la elongación del filamento para promover una correcta fecundación y asegurar la descendencia.

#### 8.1.1. *TCP15* y proteínas TCP de clase I asociadas afectan la elongación del filamento del estambre

Para comenzar con el estudio de la función de las proteínas TCP de clase I en la elongación del filamento del estambre, analizamos plantas que tienen el promotor de *TCP15* controlando la expresión del gen reportero *GUS*. Observamos que el mismo es activo en filamentos de estambres (Fig. 23A). La expresión del gen reportero fue principalmente observada en la vasculatura, extendiéndose al tejido periférico. Un análisis de los reporteros *GFP* y *GUS* indicaron que el promotor de *TCP15* es activo en filamentos de estambres en estadio 12 y su actividad se incrementa en estadio 13, principalmente en tejido vascular (Fig. 23B y C). No se detectó expresión de los reporteros en estadios tempranos del desarrollo floral.



**Figura 23: Análisis de la expresión de genes reporteros ubicados bajo el control del promotor de *TCP15*.** (A) Patrón de expresión del gen reportero *GUS* en flores de plantas que contienen la región promotora de *TCP15* fusionada al mismo. (B) y (C) Expresión de los reporteros GFP y GUS en filamentos de estambre de plantas que contienen una fusión de la región promotora de *TCP15* a la región codificante de *TCP15* y a las regiones codificantes de los reporteros GFP y GUS (*pTCP15::TCP15-GFP-GUS*). Se muestran estambres de flores en diferentes estadios. Barra de escala: 0,2 mm

Para evaluar un posible rol de *TCP15* en este órgano, se analizó la longitud de los estambres de plantas que expresan *TCP15* fusionado al dominio represor EAR bajo el control del promotor de *TCP15* (plantas *pTCP15::TCP15-EAR*). El dominio EAR es un dominio represor dominante de la transcripción que consta de 6 aminoácidos, que existe naturalmente en las plantas y produce una represión de la transcripción mediante la remodelación de la cromatina (Kagale y col., 2011). Se asumió que, al expresar *TCP15-EAR* bajo el control del promotor de *TCP15*, esto causará la represión de los genes blancos de *TCP15*. Mediante esta estrategia, se esperaba descubrir un posible rol de *TCP15* en el filamento del estambre incluso en presencia de redundancia funcional con otras proteínas TCP de clase I. Se observó que la longitud del estambre de plantas *pTCP15::TCP15-EAR* estaba reducida en un 30% a un 40% con respecto a plantas salvajes (Fig. 24, A y B). Como análisis complementario, plantas que expresaban *TCP15* en su forma nativa o fusionada a la proteínas roja fluorescente (RFP) bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*35S::TCP15* y *35S::TCP15-RFP*, respectivamente) fueron utilizadas para analizar el efecto que produce un incremento en la



expresión de TCP15. Ambas líneas de plantas presentaron filamentos más largos que flores de plantas salvajes (Fig. 24, A y B). Estos resultados sugieren que TCP15 promueve la elongación del filamento del estambre. Dado que la expresión de la forma represora de TCP15 (TCP15-EAR) causa el efecto opuesto a la sobreexpresión de la proteína nativa, se puede concluir que TCP15 actúa como un activador durante este proceso. Si TCP15 estimula la elongación del filamento, es de esperar que la pérdida de función de TCP15 afecte la longitud del estambre. Por lo tanto, se cuantificó la longitud del filamento en una línea que presenta mutaciones en TCP15 y en el gen relacionado TCP14, observando que en esta doble mutante no había diferencias significativas con flores salvajes (Fig. 24, A y B). Este resultado puede explicarse teniendo en consideración la redundancia funcional que existe entre proteínas TCP de clase I, como se ha observado en otros procesos [294], [323], [376]. Análisis de los niveles de expresión de proteínas TCP de clase I en filamentos de estambres, usando datos disponibles en la base de datos TRAVA (*Transcriptome Variation Analysis*; <http://travadb.org/>; [377]), indicaron que varios genes TCP se expresan en este órgano, incluyendo TCP7, TCP8, TCP14, TCP15, TCP21 y TCP22 (Tabla II). Entre éstos, TCP7 es el que presenta mayor nivel de expresión, representando el 29% de todos los transcritos TCP de clase I, similar a la suma de TCP14 y TCP15 (27%). Desafortunadamente, la única mutante insercional disponible para TCP7 no muestra niveles de transcritos reducidos [376].

**Tabla II.** Niveles de expresión de genes TCP de clase I en filamentos de estambres

Gen	AGI	Nivel de expresión <sup>a</sup>	% del total <sup>b</sup>
TCP6	AT5G41030	1	0
TCP7	AT5G23280	1959	29
TCP8	AT1G58100	754	11
TCP9	AT2G45680	252	4
TCP11	AT2G37000	0	0
TCP14	AT3G47620	968	14
TCP15	AT1G69690	885	13
TCP16	AT3G45150	0	0
TCP19	AT5G51910	50	1
TCP20	AT3G27010	284	4
TCP21	AT5G08330	956	14
TCP22	AT1G72010	640	9
TCP23	AT1G35560	68	1

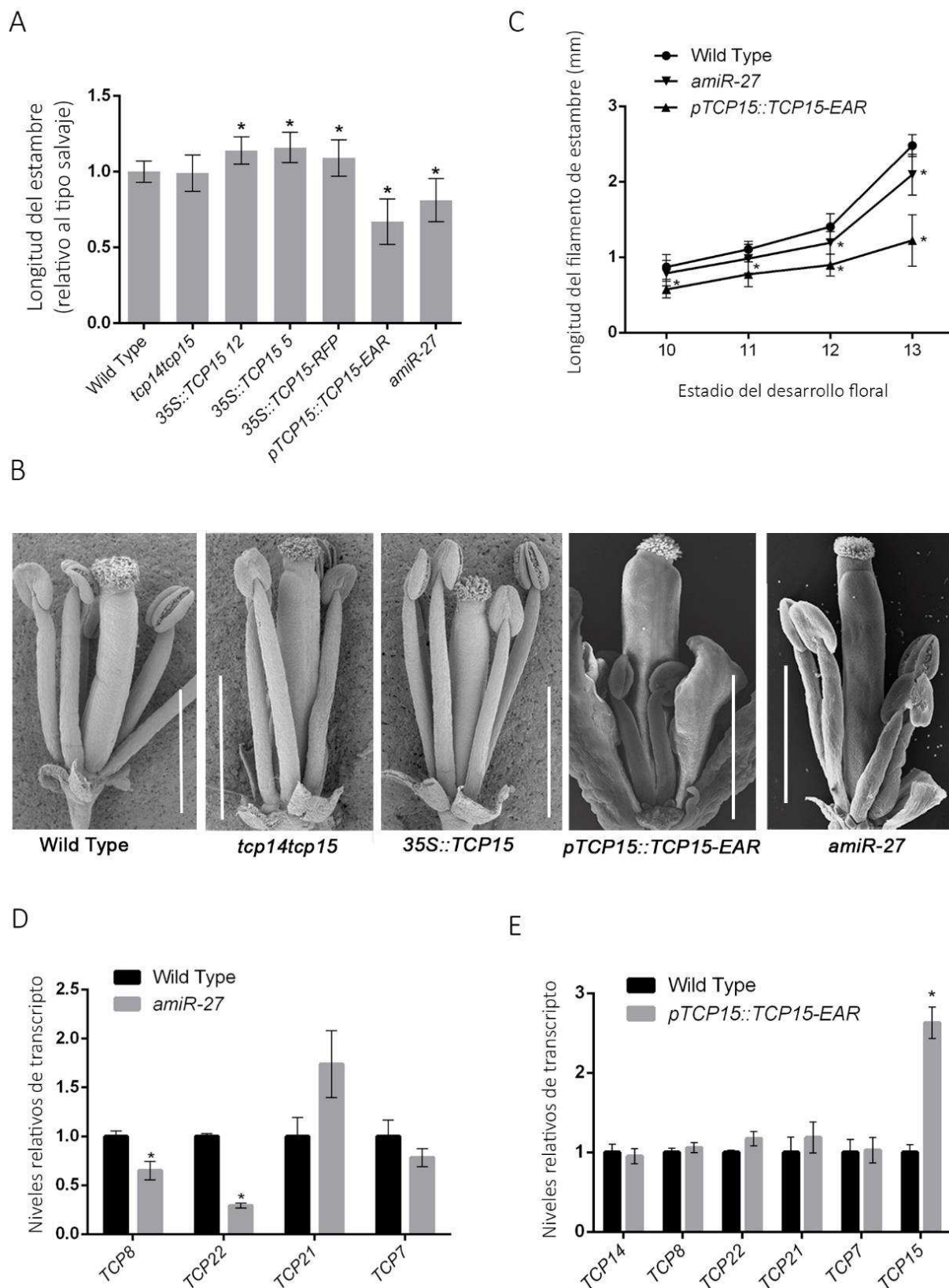
Los niveles de expresión fueron obtenidos de la base de datos TRAVA (*Transcriptome Variation Analysis*; <http://travadb.org/>; [377]). Corresponden al filamento del estambre de flores maduras antes de la antesis

<sup>a</sup> Recuento de lecturas normalizadas a la mediana.

<sup>b</sup> Fracción del total de lecturas para todas las TCP de clase I.

Para lidiar con el problema que impone la redundancia génica, se emplearon plantas que expresan un microARN artificial que tiene como blancos a *TCP8* y *TCP22* en el fondo genético de la doble mutante *tcp14 tcp15* [311]. Se midieron los niveles de transcritos de ambos genes *TCP* en los filamentos de estambres de estas plantas (denominadas *amiR-27*) y se encontró que tienen disminuida su expresión en aproximadamente un 35% y un 70%, respectivamente, mientras que la expresión de *TCP7* y *TCP21* no estaba afectada significativamente (Fig. 24D). El análisis del fenotipo de plantas *amiR-27* indicó que éstas presentan filamentos de estambres más cortos que las plantas salvajes (Fig. 24A y B), lo cual sugiere que la disminución de la expresión de *TCP8*, *TCP22*, *TCP14* y *TCP15* afecta la elongación del filamento del estambre. En conjunto, estos resultados indican que varias *TCP* de clase I relacionadas con *TCP15* participan de manera redundante en la elongación del filamento del estambre. En el caso de las plantas *pTCP15::TCP15-EAR*, no se observaron cambios en la expresión de otros genes *TCP* de clase I, más allá de *TCP15* (Fig. 24E). Los transcritos de *TCP15* en estas plantas estaban 2,5 veces aumentados con respecto a los de plantas salvajes (Fig. 24E). Estos niveles aumentados representan los niveles endógenos de *TCP15* más los niveles de *TCP15-EAR* originados en el transgén, por lo cual podría concluirse que el transgén se está expresando en niveles similares a los del gen endógeno de la planta. Todos estos resultados llevan a concluir que el fenotipo de filamentos de estambres más cortos es debido al efecto de la forma represora de *TCP15* y no a cambios en la expresión de otras *TCP* de clase I.

Las medidas de la longitud de los filamentos de estambres en diferentes estadios de desarrollo floral indicaron que las plantas *amiR-27* tienen filamentos de estambres más cortos que los de plantas salvajes en los estadios 12 y 13 (antes y durante la antesis floral, respectivamente, Fig. 24C), lo que sugiere que las proteínas *TCP* son particularmente importantes durante estadios tardíos del crecimiento, cuando se acelera la elongación [157]. Por el contrario, flores de plantas *pTCP15::TCP15-EAR* muestran filamentos de estambres cortos ya en el estadio 10 de desarrollo (Fig. 24C). Esto implica que *TCP15* y otras *TCP* pueden tener una función durante estadios tempranos del crecimiento del filamento. Sin embargo, la mayor diferencia de crecimiento en estas plantas fue observada también entre los estadios 12 y 13, de nuevo marcando un rol particular de las *TCP* de clase I durante esos estadios específicos. Esto concuerda con los análisis de expresión de los reporteros GFP y GUS (Fig. 23), donde se observó que el promotor de *TCP15* es activo en filamentos de estambres a partir del estadio 12 y que su actividad se incrementa en estadio 13, no detectándose actividad en estadios más tempranos.



**Figura 24: TCP15 y TCP de clase I relacionadas participan en la elongación del filamento del estambre. (A)** Longitud del filamento del estambre, en relación con el tipo salvaje, en flores en estadio 13 de desarrollo floral, de diferentes líneas de plantas con funciones de las proteínas TCP alteradas. Las barras indican la media±SEM (n = 19-43 estambres, dependiendo de la línea). **(B)** Imágenes tomadas mediante Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) de flores en

estadios 13-15 de desarrollo floral de plantas de tipo salvaje (Col-0) y plantas con funciones de proteínas TCP alteradas, como se indica. Se eliminaron órganos florales para permitir la visualización de los estambres. Barras de escala: 1 mm. **(C)** Longitud del filamento del estambre de plantas de tipo salvaje, *pTCP15::TCP15-EAR* y *amiR-27* en estadios 10-13 del desarrollo floral. Las barras indican la media $\pm$ SD (n = 10–54 estambres, según la etapa). **(D)** Niveles de transcritos en flores en estadio 13-15 de plantas *amiR-27*. Los valores son relativos a los de plantas de tipo salvaje. Las barras indican la media $\pm$ SE de tres réplicas biológicas. **(E)** Niveles de transcritos en flores en estadio 13-15 de plantas *pTCP15::TCP15-EAR*. Los valores son relativos a los de plantas de tipo salvaje. Las barras indican la media $\pm$ SE de tres réplicas biológicas. Los asteriscos en (A), (C), (D) y (E) indican diferencias significativas con las plantas de tipo salvaje (P <0.05; prueba t de Student).

### 8.1.2. Las proteínas TCP de clase I modulan la expresión de los genes de la subfamilia SAUR63

Para profundizar en el mecanismo de acción de TCP15, se analizó un transcriptoma de plantas *pTCP15::TCP15-EAR*, realizado previamente en nuestro laboratorio [296]. Entre los genes que ya se ha visto que están involucrados en la elongación del filamento del estambre, no se encontró evidencia de cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo del JA o genes MYB relacionados (Tabla III). La expresión de *ARF8* no estaba significativamente afectada, mientras que *ARF6* mostró solo un 40% de disminución en la expresión con respecto a plantas salvajes (Tabla III). Dado que el transcriptoma fue realizado con muestras de ARN de roseta, confirmamos estos resultados midiendo los transcritos de *ARF6* y *ARF8* en flores de plantas *pTCP15::TCP15-EAR* mediante una retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa (RT-qPCR; Fig. 25), no observándose diferencia significativa en los niveles de expresión de ambos genes en flores de plantas *pTCP15::TCP15-EAR* con respecto a plantas salvajes. Por otra parte, al analizar el transcriptoma se encontró que la mayoría de los genes miembros de la subfamilia SAUR63 (compuesta por *SAUR61-68* y *SAUR75*; [378]) estaban reprimidos en plantas *pTCP15::TCP15-EAR* (Tabla III). La única excepción fue *SAUR68*, cuya expresión estaba por debajo de los niveles basales. Los genes SAUR se identificaron por primera vez en soja como genes cuya expresión se induce rápidamente por auxinas [379], pero la función de la mayoría de las proteínas SAUR en plantas es sólo parcialmente conocida. Arabidopsis presenta 79 genes SAUR [378] que se agrupan en subfamilias y presentan funciones redundantes.

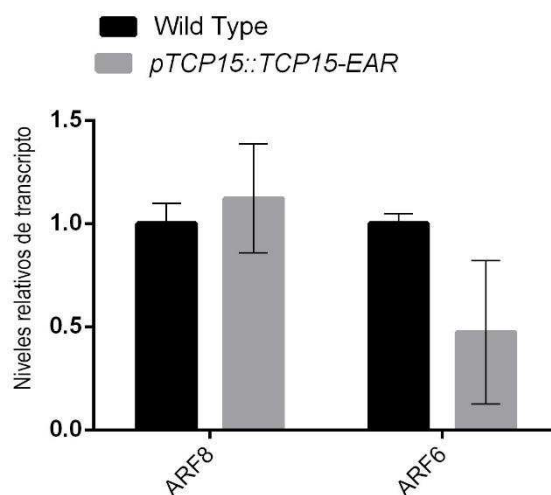
Líneas de plantas transgénicas que expresan construcciones de microARN artificiales que silencian la expresión de una subfamilia de genes SAUR (*SAUR61-SAUR68* y *SAUR75*) presentan una menor elongación del filamento de los estambres [380]. En contraste, las plantas transgénicas que expresan *SAUR63-GFP* o *SAUR63-GUS* presentan pétalos y filamentos de estambre más largos. Las proteínas SAUR son degradadas de manera muy rápida dentro de la célula, pero se ha encontrado que su fusión a GFP y/o GUS las estabiliza, aumentando su vida media, lo cual genera una ganancia de función [380], [381]. Debido a lo expuesto anteriormente, la disminución en los niveles de expresión de los genes de la subfamilia SAUR63 podría explicar el fenotipo de filamentos de estambres cortos de las plantas *pTCP15::TCP15-EAR*.

**Tabla III.** Niveles de expresión de genes relacionados con la elongación del filamento del estambre en plantas *pTCP15::TCP15-EAR*

ID de la sonda	AGI	Nombre	Cambio en la expresión <sup>a</sup>	P
<i>Genes de síntesis de JA</i>				
A_84_P18289	AT2G44810	<i>DAD1</i>	0.34	0.3335
A_84_P15574	AT3G45140	<i>LOX2</i>	0.28	0.6584
A_84_P13078	AT5G42650	<i>AOS</i>	-0.38	0.4058
A_84_P853664	AT2G06050	<i>OPR3</i>	-0.26	0.8151
<i>Genes MYB regulados por JA</i>				
A_84_P19845	AT3G27810	<i>MYB21</i>	0.09	0.6923
A_84_P825353	AT5G40350	<i>MYB24</i>	-0.13	0.8349
A_84_P767898	AT5G06100	<i>MYB33</i>	0.03	0.7715
A_84_P15465	AT3G01530	<i>MYB57</i>	0.20	0.4211
A_84_P16408	AT3G11440	<i>MYB65</i>	0.00	0.9881
<i>Genes de factores de respuesta a auxinas</i>				
A_84_P21873	AT1G30330	<i>ARF6</i>	-0.70	0.0442
A_84_P18731	AT5G37020	<i>ARF8</i>	-0.20	0.4085
<i>Genes de la subfamilia SAUR63</i>				
A_84_P537376	AT1G29420	<i>SAUR61</i>	-1.19	0.0395
A_84_P10257	AT1G29430	<i>SAUR62</i>	-1.73	0.0136
A_84_P279980	AT1G29440	<i>SAUR63</i>	-1.97	0.0076
A_84_P19713	AT1G29450	<i>SAUR64</i>	-2.29	0.0077
A_84_P15930	AT1G29460	<i>SAUR65</i>	-1.91	0.0085
A_84_P11207	AT1G29500	<i>SAUR66</i>	-2.06	0.0085
A_84_P22555	AT1G29510	<i>SAUR67</i>	-2.08	0.0076
A_84_P563710	AT5G27780	<i>SAUR75</i>	-1.40	0.0488

Los datos de expresión fueron obtenidos de la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO). Códigos GSE57742, GSE57743 y GSE57744 [296]

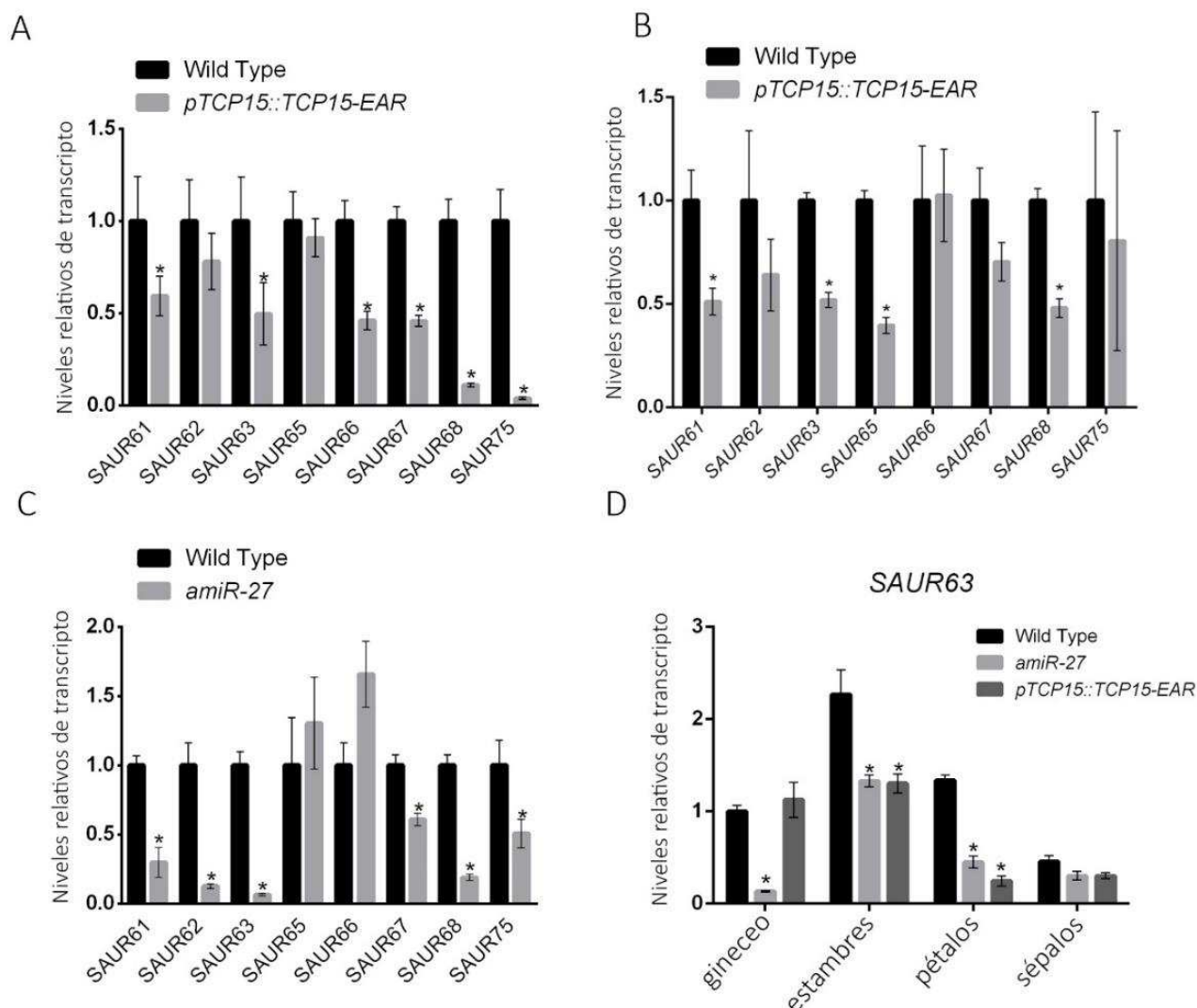
<sup>a</sup>  $\log_2$  (*pTCP15::TCP15-EAR*/wild-type)



**Figura 25: Niveles de transcritos de *ARF6* y *ARF8* en flores de plantas *pTCP15::TCP15-EAR*.** Los niveles de transcritos se determinaron mediante RT-qPCR en muestras de flores, en estadio 13 del desarrollo floral, de plantas *pTCP15::TCP15-EAR*. Los valores están relativizados a los de plantas salvajes. Las barras indican la media $\pm$ SE de tres réplicas biológicas.

Para confirmar la represión de los genes de la subfamilia *SAUR63* en órganos florales de plantas *pTCP15::TCP15-EAR*, se realizaron análisis de RT-qPCR utilizando ARN extraído de flores. Se observó una reducción de la expresión de la mayoría de los genes de la subfamilia, con excepción de *SAUR62* y *SAUR65* (Fig. 26A). La represión de múltiples genes de la subfamilia *SAUR63* se evidenció también aislando ARN de estambres (Fig. 26B). La mayoría de estos genes, excepto *SAUR65* y *SAUR66*, también mostraron una reducción de la expresión en flores de plantas *amiR-27* (Fig. 26C), lo que indica que las proteínas TCP de clase I son necesarias para la correcta expresión de estos genes. Las diferencias observadas entre plantas *pTCP15::TCP15-EAR* y *amiR-27* probablemente reflejen cambios en las preferencias de regulación por parte de las proteínas TCP clase I. Notablemente, *SAUR63* fue reprimido en todas las muestras analizadas (Fig. 26, A-C).

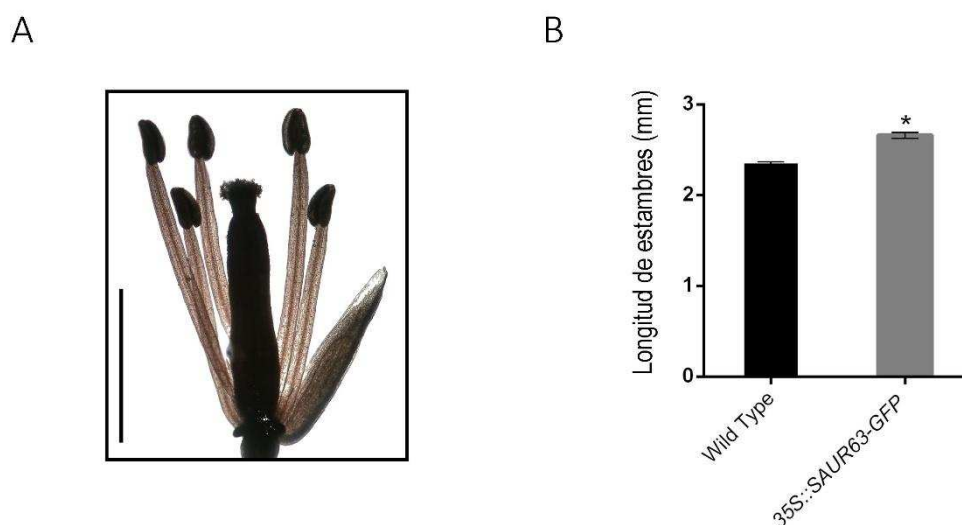
De acuerdo a esto, se eligió al gen *SAUR63* como representante del grupo para medir su expresión en diferentes órganos florales. La mayor expresión de *SAUR63* fue observada en estambres de plantas salvajes (Fig. 26D). En plantas *pTCP15::TCP15-EAR* y *amiR-27*, se observó una reducción de la expresión de *SAUR63* en estambres y pétalos (Fig. 26D). En plantas *amiR-27*, pero no en las *pTCP15::TCP15-EAR*, se observó una disminución de la expresión también en gineceo (Fig. 26D), lo que indica que otras TCP de clase I, distintas a *TCP15*, regularían la expresión de *SAUR63* en este órgano. Estos resultados muestran que la regulación de *SAUR63* mediada por las proteínas TCP de clase I probablemente se extiende a otros órganos florales además de los estambres.



**Figura 26: Niveles de transcritos de genes de la subfamilia *SAUR63* en plantas con funciones alteradas de las proteínas TCP. (A) y (B) Niveles de transcritos, determinados por RT-qPCR, en flores y estambres, respectivamente, de plantas *pTCP15::TCP15-EAR*. (C) Niveles de transcritos, determinados por RT-qPCR, en flores de plantas *amiR-27*. (D) Niveles de transcritos de *SAUR63*, determinados por RT-qPCR, en diferentes órganos de flores de plantas de tipo salvaje, *pTCP15::TCP15-EAR* y *amiR-27*. Se usaron flores en estadio 13 del desarrollo floral. Las barras indican la media±SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con las plantas de tipo salvaje ( $P < 0.05$ ; prueba *t* de Student).**

### 8.1.3. La sobreexpresión de SAUR63 revierte el defecto en la elongación del filamento del estambre de plantas *pTCP15::TCP15-EAR*

Para evaluar si la expresión reducida de los genes de la subfamilia *SAUR63* es la causa del fenotipo de filamentos de estambres cortos observados en plantas *pTCP15::TCP15-EAR*, se generaron y analizaron plantas *pTCP15::TCP15-EAR* que expresan *SAUR63* bajo el promotor *35SCaMV*. Dado que las plantas *pTCP15::TCP15-EAR* producen pocas semillas (son en gran medida infértiles), obtuvimos primero plantas transformadas con la construcción *35S::SAUR63-GFP*, que tienen flores con estambres largos (Fig. 27). Se debe mencionar que la fusión a otra proteína es necesaria para lograr la expresión estable de las proteínas SAUR, que de otra manera son rápidamente degradadas [380], [381].



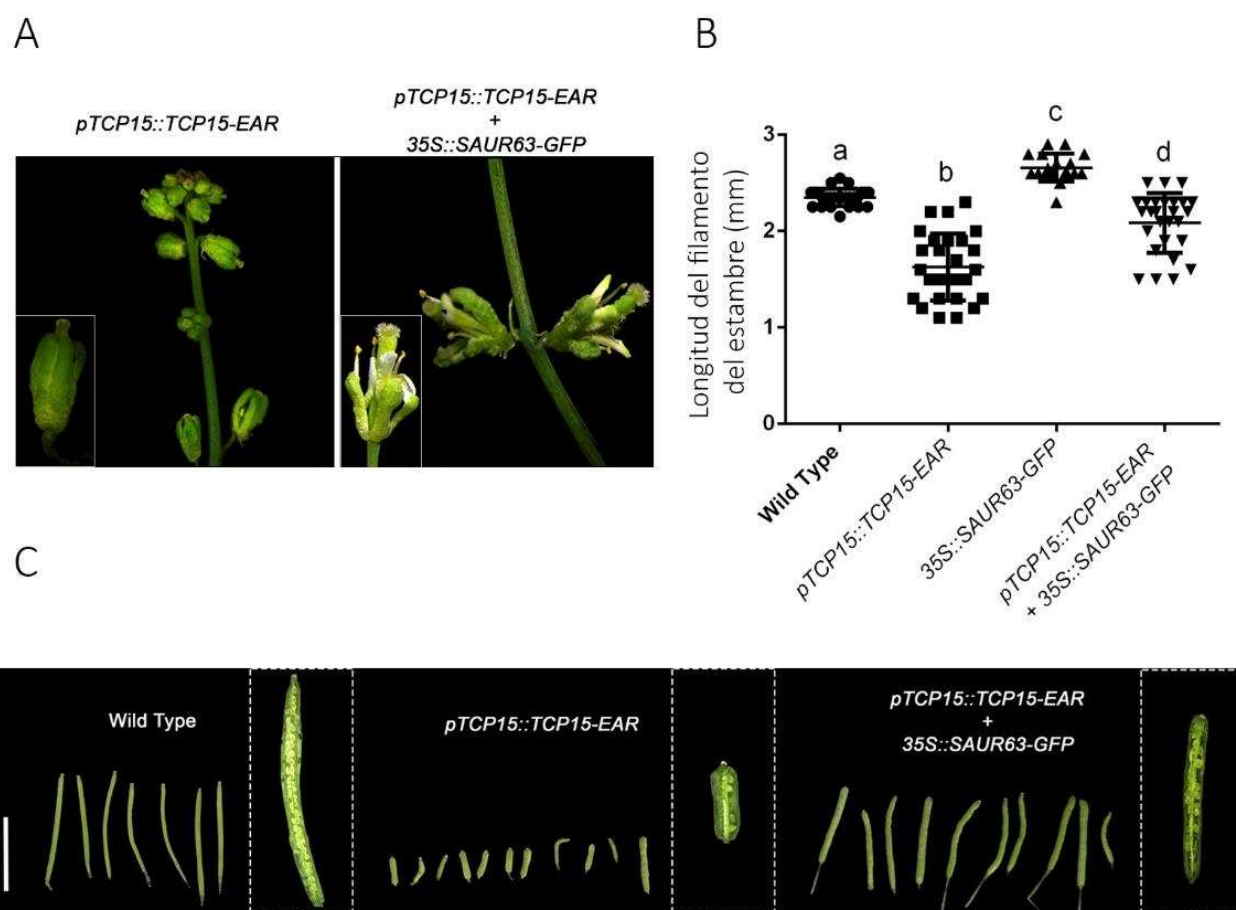
**Figura 27: Longitud de estambres de plantas *35S::SAUR63-GFP*.** (A) Imagen representativa de una flor de la línea que sobreexpresa *SAUR63-GFP* utilizada para ser transformada con la construcción *pTCP15::TCP15-EAR*. Barra de escala: 1,5 mm. (B) Longitud de estambres de flores de plantas *35S::SAUR63-GFP* y plantas de tipo salvaje en estadio 13 del desarrollo floral. Las barras indican la media $\pm$ SE. El asterisco indica una diferencia significativa con el tipo salvaje ( $P < 0.05$ ; prueba *t* de Student;  $n = 18$  estambres).

Posteriormente, se transformaron plantas salvajes y plantas *35S::SAUR63-GFP* en paralelo con la construcción *pTCP15::TCP15-EAR*, y luego se analizó el fenotipo de al menos 10 plantas independientes de una población T1 en cada fondo genético. En el fondo genético salvaje, la expresión de *TCP15-EAR* causó defectos en el desarrollo de la roseta y la inflorescencia, en forma similar a lo reportado previamente [294], [323]. Particularmente, la inflorescencia mostró una reducción en la longitud del tallo y los pedúnculos, las flores presentaron pétalos y estambres más cortos, los sépalos estaban curvados hacia adentro, y se observó, en el gineceo, la formación de tejido estigmático en el replum (Fig 28A, izq). En el fondo genético *35S::SAUR63-GFP* se observaron fenotipos similares, excepto en los estambres, los cuales fueron considerablemente más largos, sobresaliendo de los sépalos y alcanzando la altura del gineceo (Fig. 28A,



derecha). Los pétalos también se elongaron en comparación con las transformantes en el fondo genético salvaje (Fig. 28A). El incremento en la elongación de los estambres y los pétalos en plantas *pTCP15::TCP15-EAR* que expresan SAUR63-GFP está de acuerdo con la observación de que los niveles de transcritpo de SAUR63 están reducidos en ambos órganos en plantas *pTCP15::TCP15-EAR* (Fig. 26D).

Medidas de la longitud del filamento del estambre indicaron que el efecto de expresar TCP15-EAR fue más pronunciado en plantas salvajes que en plantas *35S::SAUR63-GFP* (Fig. 28B). En efecto, la mediana de la longitud del filamento del estambre para la población de plantas analizadas decreció en un 15% en el fondo genético *35S::SAUR63-GFP* y en un 36% en el fondo genético salvaje luego de la expresión de TCP15-EAR. Además, la expresión de SAUR63-GFP rescató parcialmente la fertilidad, observándose el crecimiento de las silicuas y la producción de semillas, lo cual está considerablemente afectado en plantas *pTCP15::TCP15-EAR* (Fig. 28C). Así, estos resultados sugieren que la reducción en la elongación del filamento del estambre en las plantas *pTCP15::TCP15-EAR* es debida, en gran medida, a la represión de la expresión de SAUR63 y genes relacionados mediada por TCP15-EAR.



**Figura 28: La sobreexpresión de SAUR63 rescata el fenotipo de estambres cortos y los fenotipos de infertilidad de las plantas *pTCP15::TCP15-EAR*.** (A) Fenotipo de plantas *pTCP15::TCP15-EAR* en fondos genéticos salvaje (Col-0) y *35S::SAUR63-GFP*. Se muestra una imagen representativa de diez transformantes independientes analizadas para cada fondo genético. Barras de escala: 1 mm. (B) Longitud del filamento del estambre en flores en estadio 13 del desarrollo

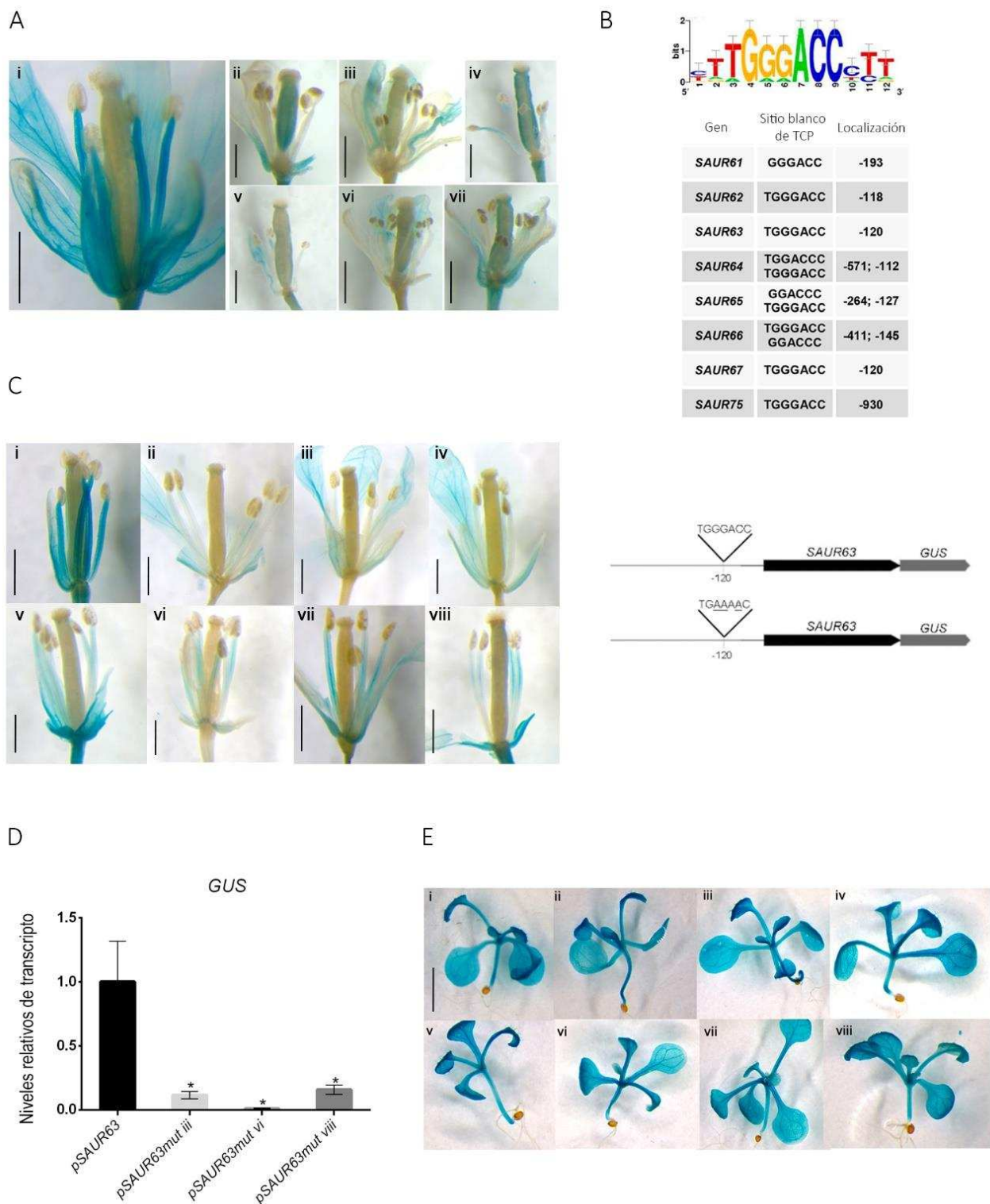
floral de plantas salvajes, plantas *35S::SAUR63-GFP* y plantas que expresan *TCP15-EAR* bajo el control del promotor *TCP15* en fondos genéticos salvaje o *35S::SAUR63-GFP*. Las barras indican la media $\pm$ SEM (n = 18–27 estambres, dependiendo de la línea). Las letras diferentes indican diferencias significativas (P <0.05; ANOVA unidireccional para comparaciones múltiples). **(C)** Imágenes de silicuas obtenidas de plantas salvajes, *pTCP15::TCP15-EAR* y plantas *pTCP15::TCP15-EAR* que sobreexpresan *SAUR63-GFP*. Barras de escala: 1 cm.

---

#### 8.1.4. *SAUR63* es blanco directo de *TCP15*

Para analizar en mayor detalle la regulación de los genes de la subfamilia *SAUR63* mediada por *TCP15*, se focalizó el estudio en el gen *SAUR63* como miembro representativo de esta subfamilia. Obtuvimos plantas que expresan la región codificante del gen *SAUR63* fusionada al gen reportero *GUS* bajo el control del promotor de *SAUR63*. El análisis de numerosas líneas independientes reveló una fuerte actividad de *GUS* en filamentos de estambres, como así también en pétalos (Fig. 29A, izq), lo que concuerda con lo reportado previamente por Chae y col. (2012) [380]. Luego, transformamos una de estas líneas con la construcción *pTCP15::TCP15-EAR*. Varias líneas transformadas presentaron una disminución fuerte de la expresión del gen reportero *GUS* en filamentos de estambres (Fig. 29A), indicando que *TCP15-EAR* reprime la actividad del promotor de *SAUR63* en filamentos.

Notablemente, las regiones promotoras de todos los genes de la subfamilia *SAUR63*, excepto *SAUR68*, contienen secuencias que coinciden estrechamente con el sitio consenso que unen los factores de transcripción de la familia TCP (GGGNCC; Fig. 29B; [280], [281]). De hecho, un análisis de enriquecimiento de motivos en los promotores de los genes de la subfamilia *SAUR63*, utilizando la plataforma *Regulatory Sequence Analysis Tool* (<http://rsat.eead.csic.es/plants/>) arrojó la secuencia TGGGACC como motivo enriquecido en estos promotores (Fig. 29B; Anexo II). Esta secuencia es reconocida eficientemente por *TCP15* y otras proteínas TCP de clase I *in vitro* [280], [289] e *in vivo* [292]. Esto sugiere que *SAUR63* y genes relacionados podrían ser blancos directos de las proteínas TCP. Para evaluar el rol del posible sitio de unión de proteínas TCP en el promotor de *SAUR63*, se mutó la secuencia TGGGACC a TGAAAAC y luego se obtuvieron plantas que expresan *SAUR63-GUS* bajo el control del promotor mutado. Distintas líneas de estas plantas (8 de 10 líneas independientes analizadas) mostraron una fuerte disminución en la expresión de *GUS* en los filamentos del estambre al ser comparadas con líneas que expresan *SAUR63-GUS* bajo el control del promotor nativo (Fig. 29C). Notablemente, la expresión en pétalos resultó afectada, pero de manera menos significativa, mientras que se observó una fuerte expresión de *GUS* en rosetas de todas las líneas analizadas (Fig 29E). La reducción en la expresión del gen reportero *GUS* en plantas que expresan *SAUR63-GUS* bajo el control del promotor mutado fue también observada mediante RT-qPCR (Fig 29D). Los resultados indican que el sitio TGGGACC es un elemento *in cis* activo en la región promotora de *SAUR63*, y que el mismo dirige la expresión en filamentos de estambres. Además, estos resultados sugieren que *SAUR63* puede ser un blanco directo de *TCP15* y otras TCP de clase I.

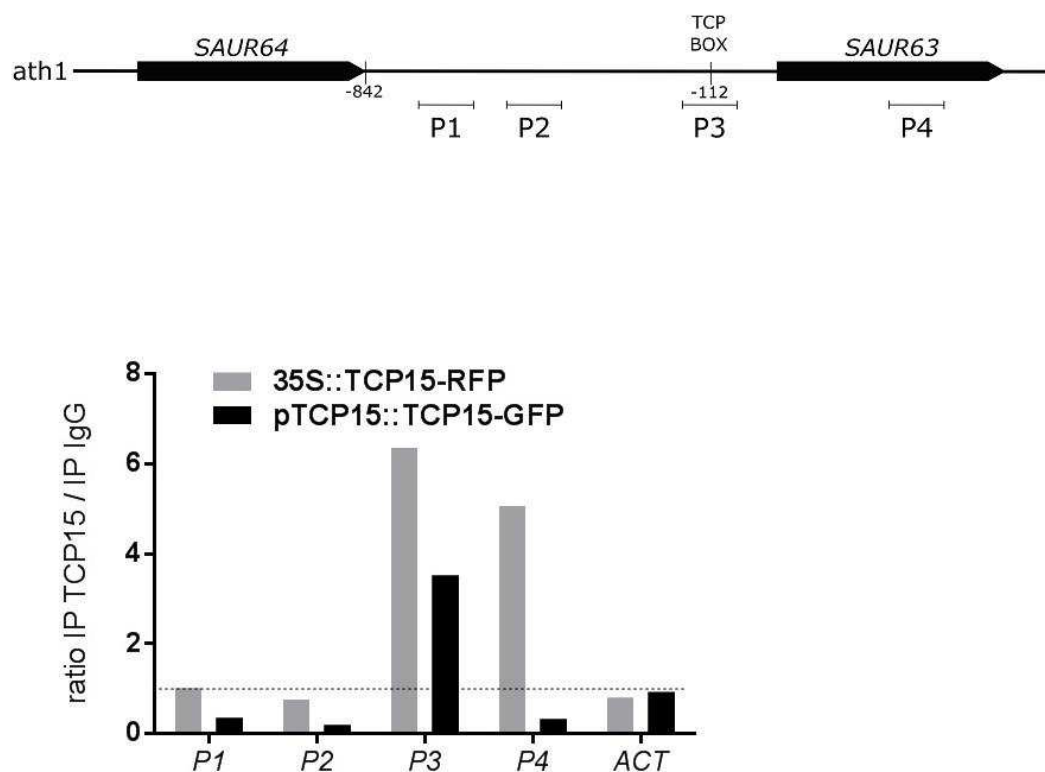


**Figura 29: El sitio TGGGACC es un elemento activo en la región promotora de SAUR63.** (A) Expresión del gen reportero *GUS* en una línea representativa que contiene una fusión de *SAUR63* a *GUS* bajo el control del promotor de *SAUR63*, ya sea en fondo genético salvaje (i), o luego de la transformación de esta línea con la construcción *pTCP15::TCP15-EAR* (ii-vii, diferentes transformantes independientes). Las barras representan 1 mm. (B) Enriquecimiento de secuencias unidas por proteínas TCP en las regiones promotoras de los genes de la subfamilia *SAUR63*. Se muestra un logo de la secuencia sobrerrepresentada en los promotores de los genes de la subfamilia *SAUR63*, obtenido utilizando la plataforma *rsat*

(<http://rsat.eead.csic.es/plants/>), junto con una lista de las secuencias y sus ubicaciones en los respectivos promotores. Las secuencias provienen de la cadena codificante y los números son relativos al sitio de inicio de la transcripción, a excepción de *SAUR75*, cuya secuencia corresponde a la cadena complementaria y es relativa al sitio de inicio de la traducción. **(C)** Expresión de *SAUR63-GUS* bajo el control del promotor nativo de *SAUR63* (i; se muestra una línea representativa), o bajo el control de una versión mutada del promotor en la que se modificó la secuencia TGGGACC ubicada en -120 (ii–viii son diferentes líneas independientes). Las barras representan 1 mm. Del lado derecho se muestran los esquemas de las construcciones utilizadas para la transformación. **(D)** Cuantificación por RT-qPCR de los niveles de transcripto del gen reportero *GUS* en flores de líneas representativas de las mostradas en (C). Las barras indican la media±SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ; prueba *t* de Student). **(E)** Expresión en rosetas de *SAUR63-GUS* bajo el control del promotor nativo o del promotor mutado de *SAUR63*. (i) Una línea representativa que expresa *SAUR63-GUS* bajo el control del promotor nativo. (ii–viii) Diferentes líneas que expresan *SAUR63-GUS* bajo el control del promotor de *SAUR63* mutado. Los números de las líneas corresponden a los que se muestran en (C).

---

La unión directa de TCP15 al promotor de *SAUR63* *in vivo* fue analizada mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en plantas *35S::TCP15-RFP* y *pTCP15::TCP15-GFP*. El ChIP seguido de qPCR resultó en un enriquecimiento relativo del fragmento P3 del promotor de *SAUR63*, que incluye el sitio TGGGACC, en ambas líneas analizadas (Fig. 30). Para comparar, se analizaron dos fragmentos localizados más lejos corriente arriba en el promotor de *SAUR63* y genes de actinas, los cuales no se encontraron enriquecidos (Fig. 30). Por otra parte, un fragmento localizado corriente abajo, dentro de la región codificante de *SAUR63*, mostró solo enriquecimiento en las muestras de plantas *35S::TCP15-RFP* (Fig. 30). En base a los resultados descriptos, se puede considerar al gen *SAUR63* como blanco directo de TCP15 *in vivo*.



**Figura 30: El gen SAUR63 es blanco directo de TCP15.** Análisis de ChIP de la unión de TCP15-GFP a la región promotora de SAUR63. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes, uno con plantas 35S::TCP15-RFP y el otro con plantas que expresan TCP15-GFP bajo el control del promotor TCP15 nativo en fondo mutante *tcp15*. Se usaron pares de cebadores para la amplificación de diferentes regiones del gen SAUR63 (P1–P4) y de los genes ACT2 y ACT8 (ACT; control), detallados en el Anexo I. A la izquierda se muestra un esquema de la región genómica analizada, que indica la ubicación de los diferentes fragmentos. Los resultados se expresan como la relación de la señal obtenida después de la inmunoprecipitación con anticuerpos específicos y con anti-IgG (control).

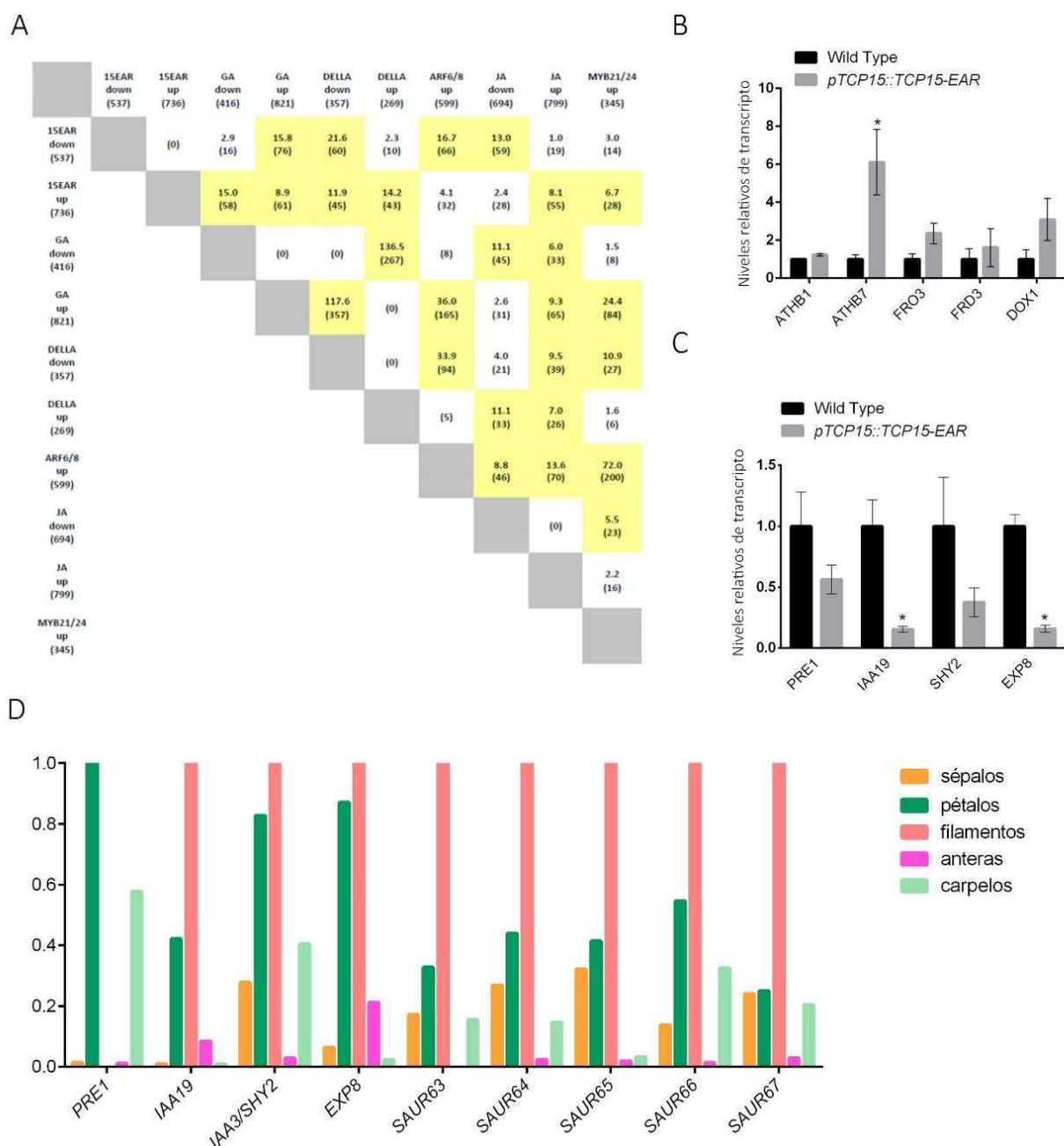
#### 8.1.5. Genes inducidos por GA y ARF6/8, pero no genes inducidos por JA, se encuentran reprimidos en plantas *pTCP15::TCP15-EAR*

Se ha demostrado previamente que las mutantes deficientes en la síntesis o señalización de GA muestran defectos en la elongación del filamento del estambre [198], [200], [382]. Por ello, se analizaron datos de un ensayo de transcriptómica disponible de genes regulados por GA en flores [383] y se compararon con el grupo de genes que mostró modificada su expresión en el transcriptoma de plantas que expresan *pTCP15::TCP15-EAR*. Como se muestra en la figura 31A, existe una significativa superposición entre genes regulados negativamente en plantas *pTCP15::TCP15-EAR* y genes inducidos por GA o reprimidos por las proteínas DELLA, las cuales son reguladores negativos de la respuesta a GA. Esto, sumado a un reporte previo donde se observó que las proteínas TCP de clase I son inhibidas por la interacción con las proteínas DELLA [311], [312], sugiere que las proteínas TCP de clase I podrían estar involucradas en mediar la respuesta a GA en flores. Se ha demostrado, también, que las GA promueven la síntesis de JA durante la elongación del

filamento, pero el fenotipo de estambres cortos de plantas deficientes en GA no ha podido ser rescatado por tratamientos con JA [189]. Esto sugiere que existen vías dependientes de GA pero independientes de JA necesarias para la elongación. De acuerdo con la inducción de la biosíntesis de JA por GA, hay una significativa superposición entre genes inducidos por GA, o reprimidos por las DELLA, y genes regulados positivamente por JA [384] (Fig. 31A). Sin embargo, no se observa una superposición significativa entre genes reprimidos en plantas *pTCP15::TCP15-EAR* y genes inducidos por JA (Fig. 31A), lo que sugiere que TCP15 afecta la elongación del filamento del estambre por una vía independiente de JA.

Se ha demostrado que la elongación del filamento dependiente de JA es mediada por *MYB21*, *MYB24* y *MYB57* [163], [189]. En cuanto a los genes sensibles a JA, la mayoría (331 de 345; la lista se muestra en el Anexo III) de los genes son regulados positivamente por MYB21 y MYB24 (es decir, son genes que tienen reducida su expresión en plantas mutantes *myb21 myb24* [163]). Dichos genes no se encuentran reprimidos en plantas *pTCP15::TCP15-EAR* (Fig. 31A). Esto fue confirmado mediante RT-qPCR, analizando la expresión de cinco genes cuya expresión se encuentra reducida en plantas *myb21 myb24* y usando ARN preparado específicamente de flores de plantas *pTCP15::TCP15-EAR*. Ninguno de estos genes mostró reducida su expresión en flores de plantas *pTCP15::TCP15-EAR* e incluso algunos de ellos presentaron niveles aumentados (Fig. 31B). Así, la función de TCP15 y TCP de clase I relacionadas probablemente no sea dependiente de JA y/o MYB21/24 durante la elongación del filamento del estambre.

También encontramos una superposición significativa entre genes reprimidos en plantas *pTCP15::TCP15-EAR* y genes inducidos por ARF6 y ARF8 (es decir, genes con expresión reducida en flores de plantas *arf6 arf8*; [163]; lista de genes en Anexo IV). Se confirmaron estos resultados midiendo los niveles de expresión de cuatro genes seleccionados de este grupo en flores de plantas *pTCP15::TCP15-EAR* (Fig. 31C). Tres de estos genes, *IAA19*, *IAA3* y *EXP8*, están preferentemente expresados en filamentos de estambres (Fig. 31D), sugiriendo que el cambio en la expresión en flores está relacionado con cambios en este órgano. Además, los niveles de expresión de *IAA19* están relacionados con la elongación del filamento [12], [164], [165]. La mayoría de los genes de la subfamilia *SAUR63* mencionados también pertenecen a este grupo de genes con niveles reducidos de expresión en plantas *pTCP15::TCP15-EAR* y *arf6 arf8* y con una expresión preferencial en filamentos de estambres (Fig. 31D). Estos resultados sugieren la posibilidad de que las proteínas TCP de clase I participen en la respuesta dependiente de auxinas. Por otro lado, ninguno de los genes TCP de clase I muestra un cambio en la expresión en flores *arf6 arf8* [163]. La comparación de datos muestra que muchos de los genes inducidos por ARF6 y ARF8 también son inducidos por GA o reprimidos por DELLAs (Fig. 31A). Basándonos en este análisis, se puede especular que TCP15 y TCP de clase I relacionadas participan en una vía dependiente de GA y/o auxinas durante la elongación del filamento del estambre. La acción de las proteínas TCP de clase I estaría, al menos parcialmente, relacionada con la inducción de los genes de la subfamilia *SAUR63*, los cuales son blancos directos de TCP15 y probablemente de otras TCP. Sin embargo, es probable que incluso otros genes regulados directa o indirectamente por las proteínas TCP estén involucrados.



**Figura 31: Expresión de genes regulados por GA, ARF6/8, MYB21/24 y JA en plantas *pTCP15::TCP15-EAR*.** (A) Comparación de genes regulados por TCP15, GA, ARF6/8, MYB21/24 y JA. Los diagramas muestran los valores de Z como una medida del grado de superposición entre los dos conjuntos de genes comparados. Z es el número de desviaciones estándar que existe entre la superposición observada y la media de las superposiciones obtenidas con 1000 muestras aleatorias; un valor superior a 5 se considera significativo y aparece resaltado en amarillo. Los números de genes de los diferentes conjuntos se muestran entre paréntesis. El análisis se realizó utilizando *GeneSect* en la plataforma *VirtualPlant 1.3* ([www.virtualplant.org/](http://www.virtualplant.org/)). Los datos provienen de análisis transcriptómicos de plantas *pTCP15::TCP15-EAR* (15EAR\_down/15\_EAR\_up; [296]), flores de tipo salvaje versus *ga1-3* (GA\_down/GA\_up; [383]), *ga1-3* versus flores *ga1-3 gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl2-1* (DELLA\_down/DELLA\_up; [383]), flores de plantas salvajes versus *arf6 arf8* (ARF6/8\_up; [163]), flores de tipo salvaje versus *myb21 myb24* (MYB21/24\_up; [163]) y plantas tratadas con metil jasmonato (JA\_up/JA\_down; [384]). (B) y (C) Niveles de transcriptos de genes con expresión reducida en flores *myb21 myb24* (B) o



en flores *arf6 arf8* (C), analizados en flores de plantas *pTCP15::TCP15-EAR* por RT-qPCR. Se usaron flores en estadios 13-15 del desarrollo floral. Los valores son relativos a flores de plantas salvajes. Las barras indican la media±SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con las plantas de tipo salvaje ( $P < 0.05$ ; prueba *t de Student*). **(D)** Expresión relativa de genes reprimidos en plantas *arf6 arf8* y *pTCP15::TCP15-EAR* en diferentes órganos de flores. Los datos se obtuvieron de la base de datos TRAVA (*Transcriptome Variation Analysis*; <http://travadb.org/>).

---

#### 8.1.6. La sobreexpresión de TCP15 revierte el defecto en elongación del filamento del estambre en plantas deficientes en GA

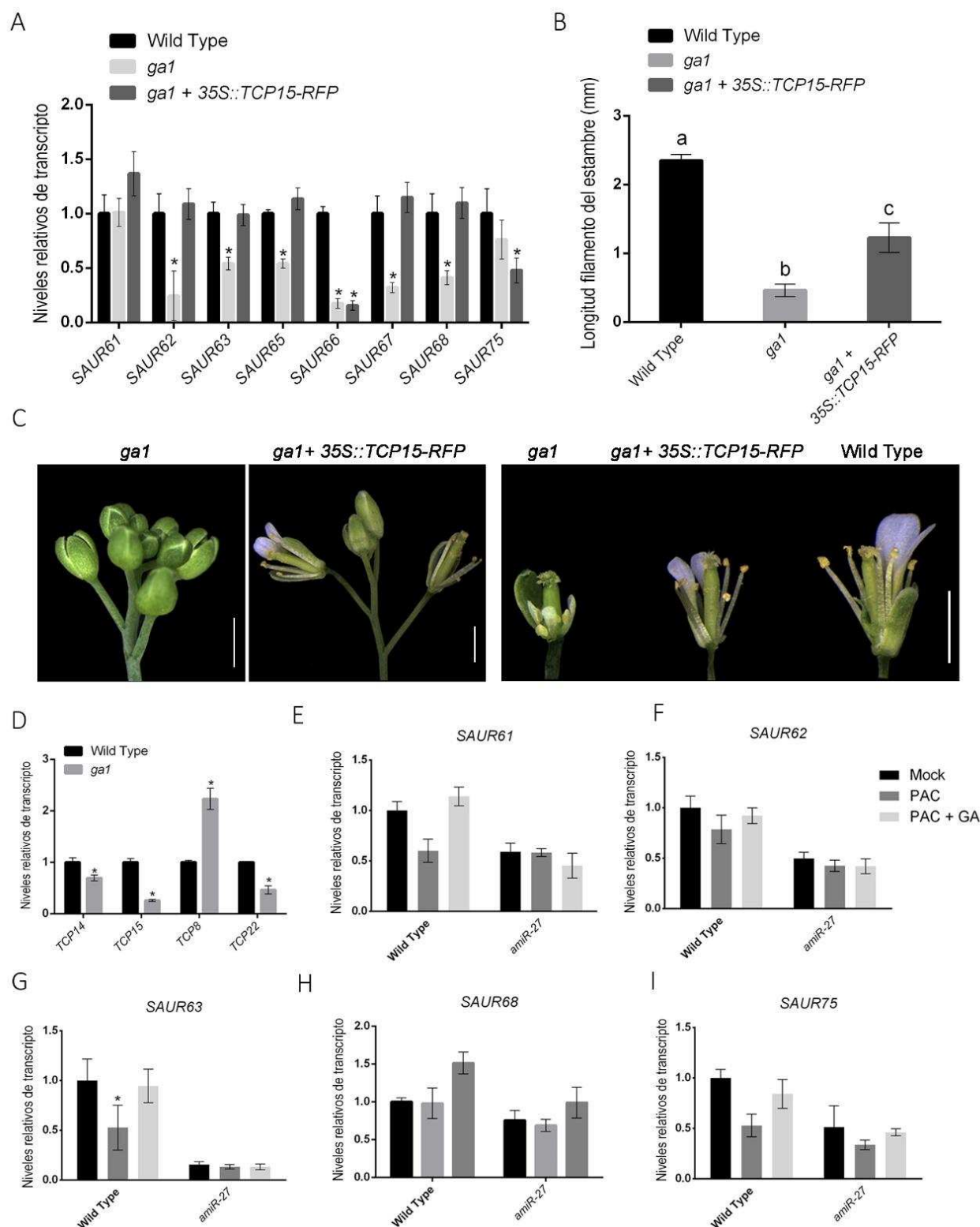
Para analizar un posible rol de las TCP de clase I en la expresión de los genes de la subfamilia *SAUR63* en forma dependiente de GA, se midieron los niveles de transcriptos de estos genes en flores de plantas mutantes *ga1*, deficientes en un paso temprano de la biosíntesis de GA. La mayoría de los genes de la subfamilia *SAUR63*, excepto *SAUR61* y *SAUR75*, mostraron una reducción en la expresión en plantas deficientes en GA (Fig. 32A). Si la reducción de la expresión de estos genes *SAUR* en plantas deficientes en GA está relacionada con una baja en la actividad de las proteínas TCP, sobreexpresando *TCP15* se deberían restaurar los niveles de expresión de estos genes. Como se muestra en la figura 32A, la expresión de *TCP15* bajo el promotor *35SCaMV*, de hecho, restauró la expresión de la mayoría de los genes de la subfamilia *SAUR63*, que se hallaban reprimidos en las plantas deficientes en GA.

Además de los cambios en la expresión, la sobreexpresión de *TCP15* produjo un aumento en la elongación del estambre de las plantas mutantes *ga1* (Fig. 32B y C), lo que indica que la disminución de la actividad de las proteínas TCP es una causa probable de la disminución de la elongación del filamento de los estambres en estas plantas. En particular, las flores de las plantas *ga1* que sobreexpresan *TCP15* presentaron un tamaño reducido con respecto a flores de tipo salvaje, pero sus filamentos de estambres alcanzaron la parte superior del gineceo, a diferencia de lo que ocurre en las plantas *ga1* (Fig. 32C). Esto sugiere que otras vías dependientes de GA, no relacionadas con *TCP15*, también son importantes para determinar el tamaño de los órganos de las flores. A pesar de que los estambres alcanzaron la parte superior del gineceo, no se observó la restauración de la fertilidad en las plantas *ga1* que sobreexpresan *TCP15*. Esto puede deberse al hecho de que las plantas *ga1* muestran infertilidad masculina y femenina [201]. Además de los estambres, la longitud de los pétalos también aumentó con la sobreexpresión de *TCP15* (Fig. 32C), lo que sugiere que *TCP15* también puede estar involucrado en promover la elongación de estos órganos. La medida de los niveles de transcriptos de genes *TCP* indicó que *TCP15* y *TCP22* están reprimidos en la mutante *ga1* (Fig. 32D). Los resultados observados para *TCP15* concuerdan con los resultados de un experimento de transcriptómica de flores *ga1* [383]. También se observó una ligera represión para *TCP14*, mientras que *TCP8* resultó inducido en la mutante (Fig. 32D). Por lo tanto, la disminución de la expresión de las TCP de clase I en el contexto deficiente en GA puede explicar en parte la represión de los genes de la subfamilia *SAUR63* observada en estas plantas. La inhibición previamente reportada de las TCP de clase I por las proteínas DELLA [311], que



sería más pronunciada en el contexto deficiente en GA, es probablemente otro factor que juega un papel clave en esta regulación.

También se analizó la respuesta de *SAUR63* a GA en plantas salvajes. Para este propósito, se trataron inflorescencias con el inhibidor de la síntesis de GA Paclobutrazol (PAC). La expresión de *SAUR63* se redujo significativamente en las plantas salvajes luego de 4 horas de un solo tratamiento con PAC (Fig. 32E), muy probablemente debido a una disminución en los niveles endógenos de GA. De acuerdo con esto, el tratamiento con  $GA_3$ , además de PAC, restableció los niveles normales de transcripto de *SAUR63* (Fig. 32E). Para analizar si las proteínas TCP de clase I son necesarias para la expresión correcta de *SAUR63* en respuesta a GA, tratamos las plantas *amiR-27* con PAC y PAC +  $GA_3$ . Contrariamente a lo que ocurre en plantas salvajes, la expresión de *SAUR63* no se modificó significativamente por los tratamientos en plantas *amiR-27* (Fig. 32E), lo que indica que TCP15 y TCP de clase I relacionadas participan en la modulación dependiente de GA de la expresión del gen *SAUR63*. También se cuantificó la expresión de otros genes de la subfamilia *SAUR63* con expresión reducida en plantas *amiR-27*. Para *SAUR61* y *SAUR75*, se observó un comportamiento similar al de *SAUR63* (Fig. 32E, 32I), a pesar de que estos dos genes no mostraron una expresión reducida en las plantas *ga1* (Fig. 32A). Para *SAUR62* y *SAUR68*, no se observó un efecto significativo del tratamiento con PAC en la expresión, aunque *SAUR68* fue inducido por  $GA_3$  en plantas salvajes y no en plantas *amiR-27* (Fig. 32H). Las diferencias observadas entre las plantas *ga1* y las plantas de tipo salvaje tratadas con PAC pueden reflejar diferencias en la respuesta de los genes *SAUR* a la privación constitutiva *versus* transitoria de GA. De todos modos, los resultados indican que la mayoría de los genes de la subfamilia *SAUR63* están sometidos a regulación por los niveles de GA en flores, y que TCP15 y TCP de clase I relacionadas participan en esta regulación.



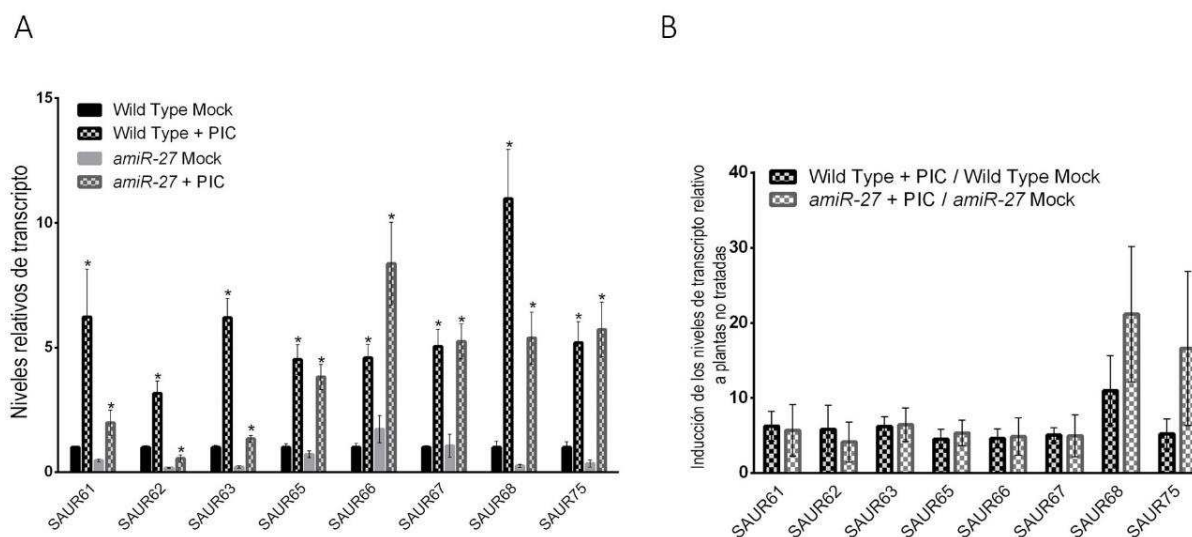
**Figura 32: Rol de proteínas TCP de clase I en la regulación de genes de la subfamilia SAUR63 por GA. (A)** Niveles de transcriptos de genes de la subfamilia SAUR63 en flores de plantas salvajes, plantas *ga1* y plantas *ga1* transformadas con la construcción *35S::TCP15-RFP*. Los resultados se expresan relativizados a los de plantas salvajes. Los valores representan la media $\pm$ SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a plantas salvajes ( $P < 0.05$ ; prueba *t* de Student). **(B)** Longitud del filamento del estambre en flores en estadio 13 del desarrollo floral de plantas salvajes, *ga1* y plantas *ga1* que expresan *TCP15-RFP* bajo el control del promotor *35SCaMV*.

Las barras indican la media $\pm$ SD (n = 11–23 estambres, dependiendo de la línea). Las letras diferentes indican diferencias significativas (P <0.05; ANOVA unidireccional para comparaciones múltiples). **(C)** Fenotipo de plantas *ga1* antes y después de la transformación con la construcción *35S::TCP15-RFP*. Se muestra una imagen representativa de cinco líneas independientes. Se incluye una flor de una planta de tipo salvaje para la comparación. La barra representa 1 mm. **(D)** Niveles de transcritos de genes *TCP* de clase I en flores de plantas de tipo salvaje y *ga1*. Los resultados se expresan en relación con los de plantas salvajes. Los valores representan la media $\pm$ SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a plantas salvajes (P <0.05; prueba *t* de Student). **(E)-(F)** Niveles de transcritos de *SAUR61*, *SAUR62*, *SAUR63*, *SAUR68* y *SAUR75* en plantas de tipo salvaje y *amiR-27* luego de 4 horas de un único tratamiento con 10  $\mu$ M PAC o 10  $\mu$ M PAC más 100  $\mu$ M GA<sub>3</sub> (PAC + GA). Las plantas control (*Mock*) se trataron con solución solvente. Los valores se expresan como relativos a los de plantas salvajes en condición control y se representa la media $\pm$ SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las plantas control y tratadas del mismo fondo genético (P <0.05; prueba *t* de Student).

---

#### 8.1.7. La inducción de genes de la subfamilia *SAUR63* por auxinas no se ve comprometida en plantas deficientes en proteínas *TCP* de clase I

Los genes *SAUR* se descubrieron en función de su rápida respuesta a auxinas [379]. A pesar de los estudios posteriores que muestran que no todos los genes *SAUR* son inducidos por auxinas, los que pertenecen a la subfamilia *SAUR63* lo son, según lo informado [161], [385]. Además, estos genes son blancos de ARF6 [386] y la mayoría de ellos muestra una expresión reducida en flores de plantas mutantes *arf6 arf8* [161], [163]. Por lo tanto, se analizó el efecto que produce el tratamiento con auxinas sobre la expresión de los genes de la subfamilia *SAUR63* en flores de tipo salvaje y *amiR-27*. Se observó una inducción significativa de los transcritos de todos los genes de la subfamilia *SAUR63* analizados luego del tratamiento con la auxina sintética picloram (PIC), tanto en plantas de tipo salvaje como en plantas *amiR-27* (Fig. 33A). Particularmente para *SAUR61-63* y *SAUR68*, los niveles de transcritos después del tratamiento con auxina fueron más bajos en las plantas *amiR-27* que en las plantas de tipo salvaje (Fig. 33A). Sin embargo, la inducción relativa de los genes de la subfamilia *SAUR63* por auxinas fue similar (o incluso mayor en el caso de *SAUR68* y *SAUR75*) en plantas *amiR-27* y en plantas salvajes, en comparación con las plantas del tratamiento control (Fig. 33B).



**Figura 33: Rol de proteínas TCP de clase I en la inducción de genes de la subfamilia SAUR63 por auxinas. (A)** Niveles de transcritos de genes de la subfamilia SAUR63 en plantas de tipo salvaje y *amiR-27* 4 horas después de un tratamiento único con 100  $\mu$ M PIC. Las plantas control (*Mock*) se trataron con solución solvente. Los valores se expresan relativos a los de plantas de tipo salvaje en condiciones control y se representa la media $\pm$ SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las plantas control y las tratadas del mismo fondo genético ( $P < 0.05$ ; prueba *t* de Student). **(B)** Inducción relativa de los genes de la subfamilia SAUR63 por PIC en plantas de tipo salvaje y *amiR-27*. Se indica la inducción de cada gen en relación con las plantas control.

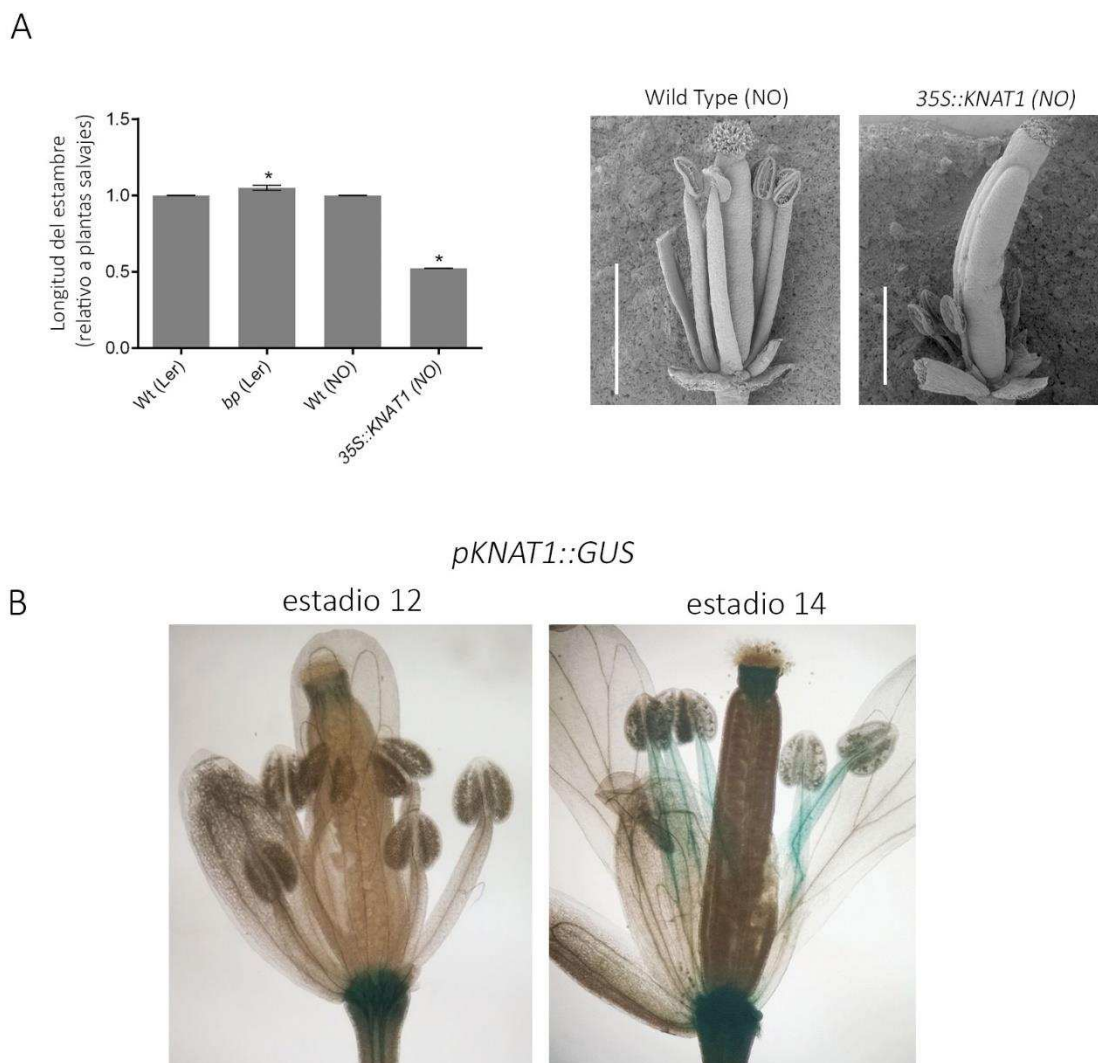
Estos resultados indican que la respuesta de los genes de la subfamilia SAUR63 a auxinas no se ve significativamente afectada por una deficiencia en las TCP de clase I estudiadas aquí, lo que sugiere que estas TCP no participan en la inducción de estos genes mediada por auxinas, al menos en flores. Los resultados también sugieren que, al menos para SAUR61-63 y SAUR68, las auxinas no pueden reemplazar completamente la falta de las TCP de clase I, lo que indica que las TCP son necesarias, además de las auxinas, para la expresión máxima de estos genes. Notoriamente, resultados recientes de nuestro laboratorio sugiere que, durante la elongación del hipocotilo, las proteínas TCP de clase I TCP14 y TCP15 sí son necesarias para la respuesta a auxinas de algunos genes, entre ellos miembros de la subfamilia SAUR63 [387]. Esto podría indicar la existencia de distintos requerimientos de acuerdo al órgano o la condición estudiada.

En conjunto, los resultados sugieren que TCP15 y genes relacionados participan en la elongación del filamento de los estambres. Sumado a esto, se observa que las GA inducen la expresión del gen TCP15 y otros genes TCP de clase I. Por otro lado, observamos que las proteínas TCP de clase I inducen la expresión del gen SAUR63 y genes SAUR relacionados, probablemente por unión directa a los sitios TCP presentes en los promotores de los mismos, y que son requeridas para la regulación de la expresión de estos genes por GA.

## 8.2. Estudios de la función de *KNAT1* en la regulación del crecimiento de los estambres

### 8.2.1. Plantas con niveles alterados de *KNAT1* tienen afectada la elongación del filamento del estambre

Como se mencionó anteriormente, la GA son importantes para la elongación del filamento del estambre. De acuerdo con esto, las mutantes que tienen deficiencias en la síntesis de GA, como por ejemplo la mutante con pérdida de función de *GA20ox1*, presentan filamentos de estambres cortos [64], [200]. Se ha reportado que el factor de transcripción *KNAT1* reprime en forma directa la expresión de *GA20ox1* durante el desarrollo del meristema vegetativo en *Arabidopsis thaliana* y otras especies vegetales [353]. Esto origina la posibilidad de que, de existir una regulación similar en estambres, *KNAT1* podría ser un factor que module el crecimiento de los mismos. Hasta el presente, no se ha estudiado si *KNAT1* (también conocido como *BREVIPEDICELLUS*, *BP*) está involucrado en el desarrollo del filamento, pero un análisis de la bibliografía indica que las flores de plantas que sobreexpresan *KNAT1* presentan filamentos de estambres más cortos [356]. Por lo tanto, se estudió el fenotipo de las flores de plantas *35S::KNAT1* y de la mutante *bp*, de pérdida de función en *KNAT1*, encontrando que estas plantas tienen filamentos más cortos y más largos, respectivamente, con respecto a plantas salvajes (Fig. 34A y B). A su vez, se analizó el patrón de expresión de *KNAT1*, realizando un análisis histoquímico de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa de plantas que expresan *pKNAT1::GUS*. A partir de este análisis, se observó que *KNAT1* se expresa en filamentos de estambres a partir del estadio 13 del desarrollo floral (posterior a la antesis floral), pero no se observa tinción en estadios más tempranos (Fig. 34B). Llamativamente, *KNAT1* no se expresa en los estadios florales donde se produce la elongación del filamento de los estambres, y su expresión es activa en el estadio en que el crecimiento de este órgano se detiene. Los datos obtenidos, en su conjunto, sugieren que *KNAT1* reprime la elongación del filamento del estambre.

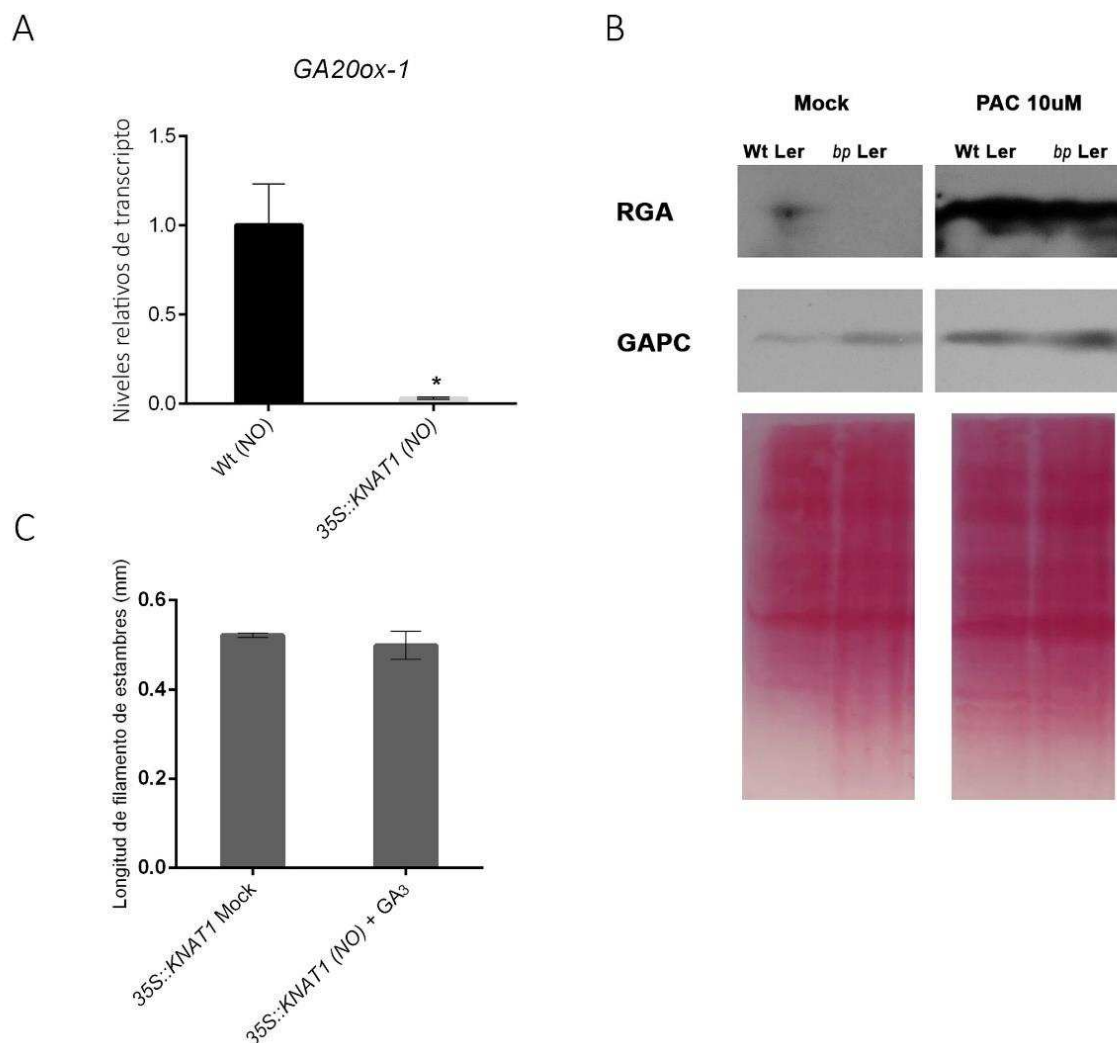


**Figura 34: KNAT1 inhibe la elongación de los estambres.** (A) Longitud del filamento del estambre, relativo a plantas salvajes, en flores en estadio 13 del desarrollo floral de diferentes líneas de plantas con función alterada de *KNAT1*. Las barras indican la media $\pm$ SEM de al menos 20 flores de cada línea. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a las plantas salvajes ( $P < 0.05$ , test *t* de Student). (B) Patrón de expresión del gen reportero *GUS* en flores de plantas que contienen la construcción *pKNAT1::GUS* en diferentes estadios del desarrollo floral (estadio 12, pre antesis, y estadio 14, post antesis floral).

### 8.2.2. *KNAT1* regula la vía de GA durante la elongación del filamento del estambre

Como se comentó previamente, se ha reportado que *KNAT1* reprime en forma directa la expresión del gen *GA20ox1* en meristemas de *A. thaliana* [353] y que mutantes en este gen de biosíntesis de GA presentan filamentos de estambres cortos. Para analizar si esta regulación también está presente en flores, siendo una de las posibles causas del fenotipo de filamentos de estambres cortos de plantas *35S::KNAT1*, se midieron los niveles de expresión del gen *GA20ox1* en flores de estas plantas y se encontró que los mismos están significativamente disminuidos con respecto a los de plantas salvajes (Fig. 35A). Sumado a esto, se encontró

que los niveles de la proteína RGA, una proteína DELLA que es degradada en presencia de GA, están aumentados en plantas mutantes *bp* con respecto a plantas salvajes (Fig. 35B). Estos resultados indican que KNAT1 regularía la vía de síntesis de GA en flores de *A. thaliana*. Para profundizar esta conexión entre KNAT1 y GA, flores de plantas *35S::KNAT1* fueron tratadas con 100  $\mu$ M GA<sub>3</sub> y se observó que la elongación del filamento del estambre no se recuperaba luego del tratamiento con la hormona (Fig. 35C). Esto indica que, más allá del posible efecto en el crecimiento del estambre a través de la regulación de los niveles de GA, posiblemente KNAT1 regule otras vías para reprimir la elongación del filamento.



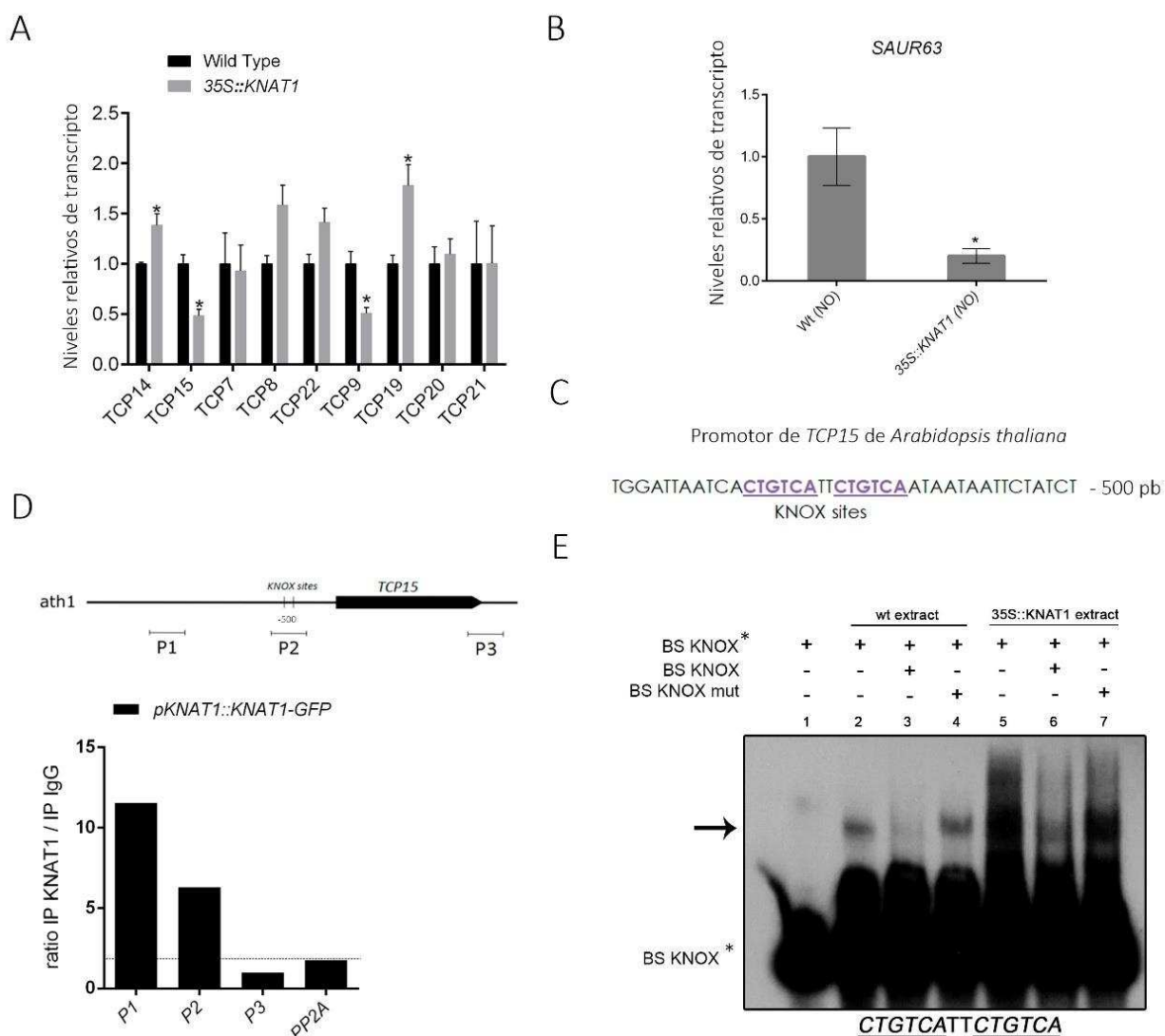
**Figura 35. KNAT1 regula el metabolismo de GA en flores.** (A) Niveles de transcripto del gen *GA20ox1* en plantas *35S::KNAT1*. Los valores están relativizados a los de las plantas salvajes. Las barras indican la media $\pm$ SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a plantas salvajes ( $P < 0.05$ , test *t de Student*). (B) Niveles de la proteína RGA, cuantificados por *western blot*, en muestras extraídas de plantas *bp* y de plantas salvajes, tratadas o no con el inhibidor de biosíntesis de GA, PAC (10  $\mu$ M). Los niveles de GAPC (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa citosólica) y de proteínas totales (observados mediante tinción con rojo Ponceau) se utilizaron como control de carga. (C) Longitud del filamento del estambre en flores en estadio 13 de plantas *35S::KNAT1* tratadas con 100  $\mu$ M GA<sub>3</sub> y su respectivo control. Las barras indican la media $\pm$ SEM de al menos 12 flores en cada condición.

### 8.2.3. *KNAT1* regula de manera negativa y directa la expresión de *TCP15*

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que *KNAT1* y *TCP15* actúan de forma opuesta durante el desarrollo del filamento del estambre, reprimiendo y promoviendo su crecimiento, respectivamente. Además, al cuantificar los niveles de transcritos de genes que codifican proteínas TCP de clase I mediante RT-qPCR se observó que la expresión de *TCP15* y *TCP9* se encuentra disminuida en plantas *35S::KNAT1*. Esto indica que *KNAT1* podría regular la expresión de algunos genes *TCP* de clase I, entre ellos *TCP15* (Fig. 36A). En este mismo sentido, los niveles de transcripto del gen *SAUR63*, que es blanco directo de *TCP15* y es el encargado de promover la elongación del filamento del estambre, también están disminuidos en plantas *35S::KNAT1* en comparación con plantas salvajes (Fig. 36B). Sumado a esto, se observó que el promotor de *TCP15* presenta dos sitios CTGTCA adyacentes, que pueden ser potenciales sitios de unión de proteínas KNOX, ubicados aproximadamente 500 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (Fig. 36C). Esto sugiere que *KNAT1* podría unirse en forma directa al promotor de *TCP15* para reprimir su expresión. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina seguida de qPCR (ChIP-qPCR) y ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA). Para el primero, se utilizaron plantas mutantes en el gen *KNAT1* transformadas con la construcción *pKNAT1::KNAT1-GFP*. Luego de la inmunoprecipitación con anticuerpos anti-GFP, se encontró un enriquecimiento de los fragmentos P1 y P2, ubicados en la región promotora de *TCP15*, con respecto al fragmento P3 (comprendido entre la región codificante y la región 3' no codificante de *TCP15*) y al control *PP2A* (Fig. 36D). El fragmento P2 comprende los sitios KNOX y P1 es una región ubicada 1500 pb corriente arriba en el promotor de *TCP15*. Esto indica que *KNAT1* se une al promotor de *TCP15* en la región que contiene los sitios KNOX. La unión al fragmento P1 podría indicar la existencia de sitios de unión también en esa región o la existencia de interacciones a distancia con otros factores unidos a la misma.

Para el ensayo de EMSA se utilizaron extractos proteicos de plantas salvajes y de plantas *35S::KNAT1*, junto con el fragmento de ADN del promotor de *TCP15* que posee los dos sitios KNOX adyacentes. En ambos casos, se observó una banda de retardo, que aumentó en intensidad al utilizar el extracto de plantas que sobreexpresan *KNAT1* (Fig. 36E), lo que sugiere que *KNAT1* es capaz de unirse a esa región del promotor *in vitro*. Además, la inclusión de un exceso de oligonucleótido doble cadena no marcado, que actúa como competidor, disminuyó la intensidad de la banda de retardo, mientras que esto no se observó al utilizar un oligonucleótido similar con los sitios KNOX mutados (Fig. 36E). Esto indica que la unión es específica y que requiere de los sitios KNOX para producirse. En conjunto, todos estos resultados indican que *TCP15* es un blanco directo de *KNAT1*.

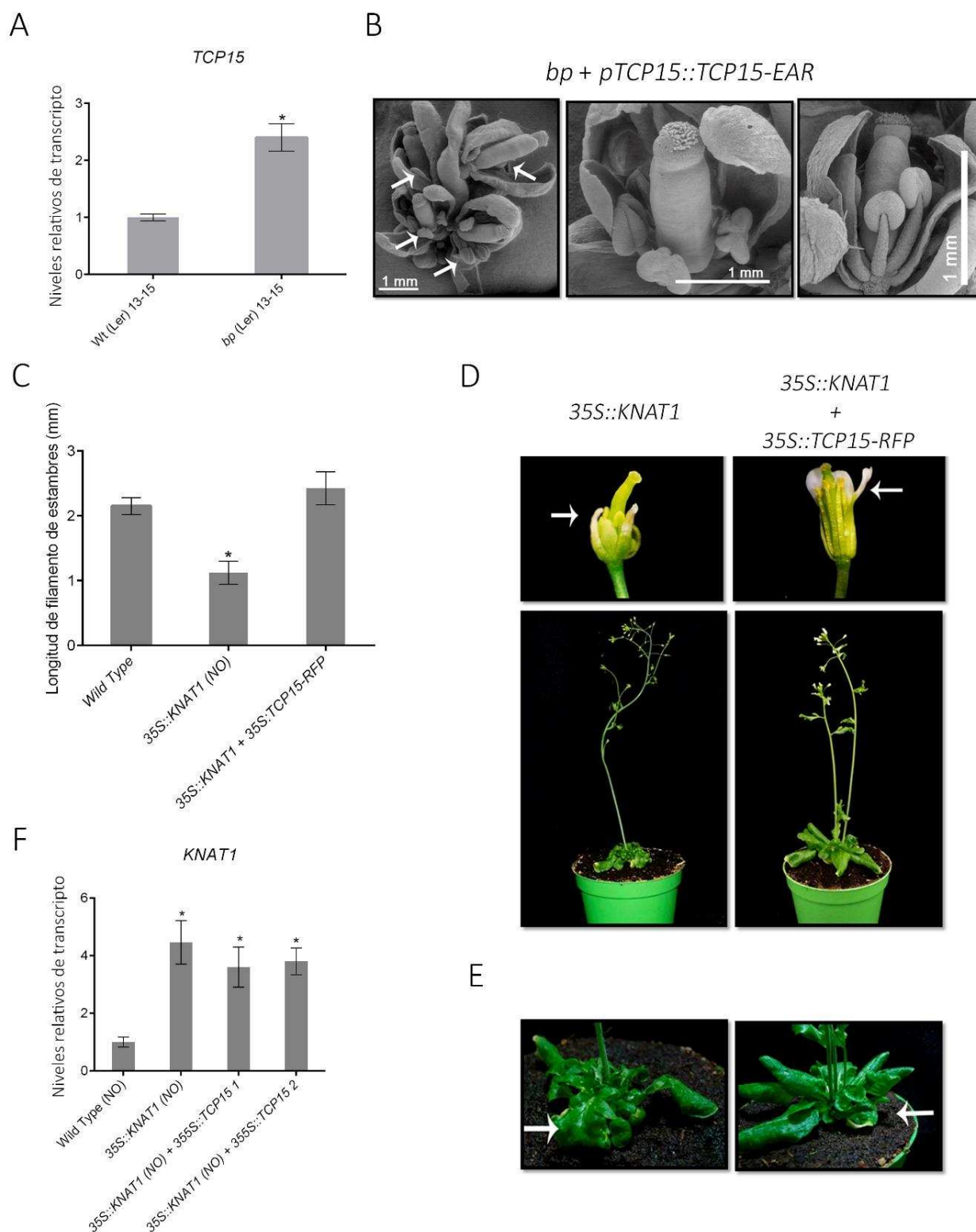




**Figura 36: KNAT1 regula de manera directa la expresión de TCP15. (A)** Niveles de transcritos de genes *TCP* de clase I en plantas *35S::KNAT1*. Los valores son relativos a los de las plantas salvajes. Las barras indican la media $\pm$ SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a plantas salvajes ( $P < 0.05$ , test *t de Student*). **(B)** Niveles de transcritos de *SAUR63* en plantas *35S::KNAT1*. Los valores están relativizados a los de plantas salvajes. Las barras indican la media $\pm$ SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a plantas salvajes ( $P < 0.05$ , test *t de Student*). **(C)** Esquema representativo de los sitios KNOX en el promotor de *TCP15* de *Arabidopsis thaliana*. **(D)** Ensayo de ChIP para analizar la unión de KNAT1 a la región promotora de *TCP15*. Se utilizaron plantas que expresan *KNAT1-GFP* bajo el control del promotor de *KNAT1* en una línea mutante *bp*. Se indican los diferentes pares de cebadores utilizados para la amplificación de diferentes regiones del promotor de *TCP15* (P1 y P2). También se utilizaron cebadores que amplifican la región 3' no codificante del gen *TCP15* y el gen *PP2A* como controles negativos. Los cebadores utilizados son detallados en el Anexo I. **(E)** Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) que indica la unión de KNAT1 al promotor de *TCP15*. Se utilizaron extractos proteicos de plantas salvajes y de plantas *35S::KNAT1*, y un fragmento marcado (\*) del promotor de *TCP15* que presenta los sitios KNOX (BS KNOX). Como competidores se usaron los oligonucleótidos BS KNOX y BS KNOX mut (este último presenta los sitios KNOX mutados).

Para analizar en más detalle la relación de *KNAT1* con *TCP15*, se midieron los niveles de transcripto de *TCP15* en plantas mutantes *bp*, encontrándose que los mismos estaban aumentados en las mutantes con respecto a plantas salvajes (Fig. 37A). A continuación, se transformaron plantas *bp* con una construcción que expresa *TCP15* fusionada al dominio represor *EAR* bajo el control de su propio promotor y que, según se describió en esta Tesis anteriormente, produce un acortamiento de los estambres. Además, las plantas *pTCP15::TCP15-EAR* tienen otros defectos en el desarrollo, tanto en órganos reproductivos como vegetativos [294]. En forma notoria, los defectos observados en las plantas *pTCP15::TCP15-EAR* se acentuaron en fondo genético *bp* (Fig. 37B, panel izquierdo). Las flores de estas plantas, observadas mediante MEB, presentaron filamentos de estambres aún más cortos que los de plantas *pTCP15::TCP15-EAR* (Fig. 37B, paneles medio y derecho), a diferencia de las plantas *bp*, que tienen filamentos más largos que las plantas salvajes. Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que *KNAT1* actúa corriente arriba de *TCP15*, reprimiendo su expresión.

En sintonía con estos resultados, se analizó el efecto de expresar en forma constitutiva *TCP15* en plantas con niveles aumentados de *KNAT1*. Para ello, se transformaron plantas *35S::KNAT1* con una construcción que expresa *TCP15* fusionada a *RFP* bajo el control de un promotor constitutivo. La sobreexpresión de *TCP15* revirtió el fenotipo de estambres cortos de plantas *35S::KNAT1* (Fig. 37C y D). También se observó un mayor crecimiento de los pétalos, cuya elongación está afectada en las plantas *35S::KNAT1* (Fig. 37D). Por otra parte, las alteraciones en el desarrollo de las hojas observadas en plantas *35S::KNAT1* no fueron revertidas por la sobreexpresión de *TCP15* (Fig. 37E). Mediante RT-qPCR se confirmó que los niveles de transcripto de *KNAT1* estaban aumentados con respecto a plantas salvajes, indicando que el transgén no se encontraba silenciado (Fig. 37F).



**Figura 37: TCP15 revierte los fenotipos observados en estambres de plantas con niveles alterados de KNAT1. (A)** Niveles de transcritpo de *TCP15* en plantas salvajes y plantas mutantes *bp*. Los valores están relativizados a los de plantas salvajes. Las barras indican la media $\pm$ SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a plantas salvajes ( $P < 0.05$ , test *t de Student*). **(B)** Análisis fenotípico de flores *bp + pTCP15::TCP15-EAR*. Las flores se visualizaron usando MEB. **(C)** Longitud del filamento del estambre en flores en estadio 13 de plantas salvajes, *35S::KNAT1* y plantas *35S::KNAT1* transformadas con la construcción que sobreexpresa *TCP15* (*35S::TCP15-RFP*). Las

barras indican la media $\pm$ SEM de al menos 13 flores de cada línea. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a las plantas salvajes ( $P < 0.05$ , test *t de Student*). **(D) y (E)** Imágenes representativas de flores (D) y rosetas (E) de plantas *35S::KNAT1* y plantas *35S::KNAT1* transformadas con la construcción *35S::TCP15-RFP*; se analizaron 8 líneas transformantes independientes. **(F)** Niveles de transcripto del gen *KNAT1* en plantas salvajes, *35S::KNAT1*, y dos transformantes independientes que sobreexpresan *TCP15-RFP* en fondo *35S::KNAT1*. Los valores están relativizados a los de las plantas salvajes. Las barras indican la media $\pm$ SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a plantas salvajes ( $P < 0.05$ , test *t de Student*).

---

Los resultados obtenidos indican que *KNAT1* inhibiría la elongación del filamento del estambre actuando sobre la expresión de los genes *GA20ox1* y *TCP15*. Una disminución en los niveles de GA, a su vez, podría producir la inhibición del accionar de proteínas TCP de clase I a través de su interacción con proteínas DELLA. La sobreexpresión de *KNAT1* también produjo una disminución en la expresión del gen *TCP9*. El mecanismo involucrado en este caso deberá ser analizado en más detalle, ya que no se encontraron posibles sitios de unión de *KNAT1* en su región promotora mediante análisis de secuencias.

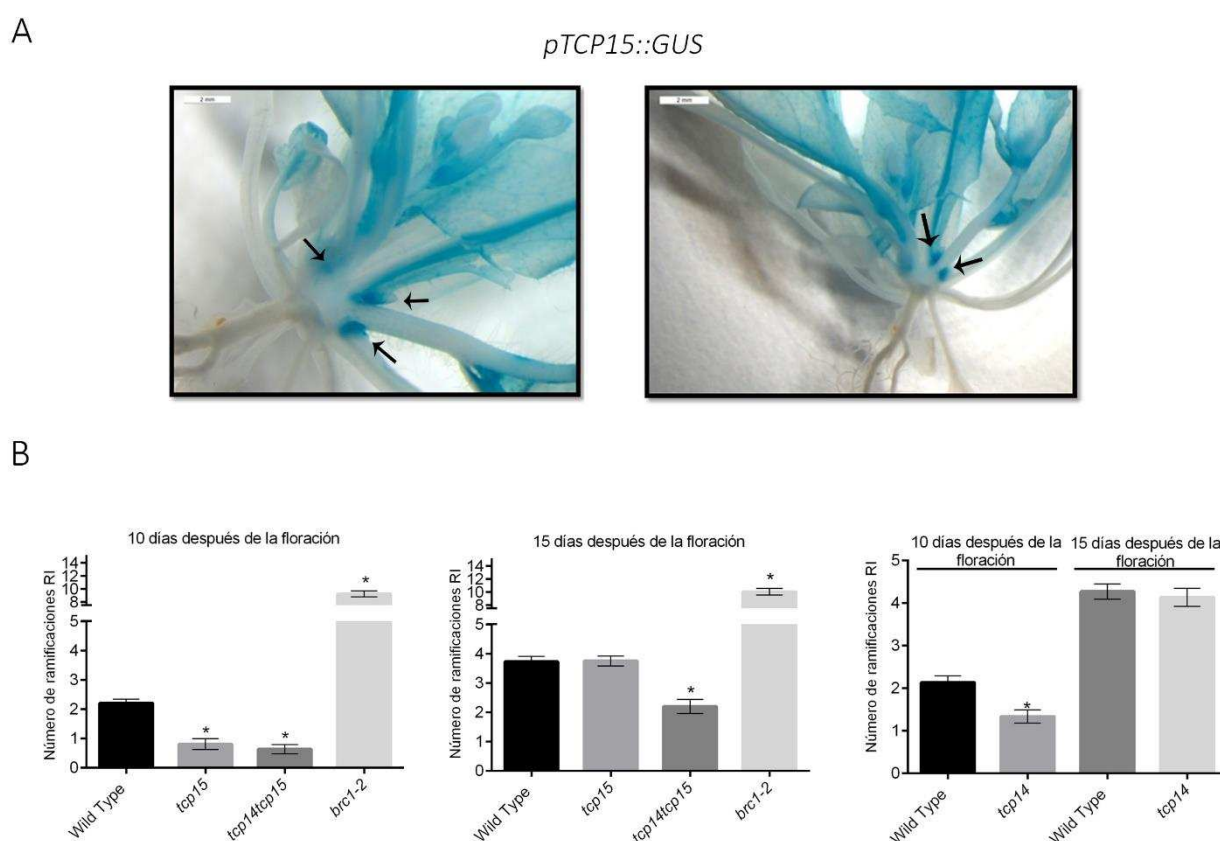
### 8.3. Estudios de la función de *TCP14* y *TCP15* en la regulación del desarrollo de ramas axilares en *Arabidopsis thaliana*

La regulación del desarrollo de ramas laterales es fundamental para determinar la arquitectura de las plantas e influye en procesos relacionados con la producción de semillas y la respuesta a cambios en las condiciones ambientales. Los meristemas axilares se forman en la base de las hojas y dan lugar a las yemas axilares, que pueden diferenciarse para generar nuevas ramas o permanecer desdiferenciadas y por tanto inhibidas. Esta decisión depende de factores endógenos y ambientales. Han sido identificados numerosos genes implicados en este proceso, entre ellos un gen muy importante en la inhibición del desarrollo de ramas axilares, *BRC1* (*AtTCP18*), descrito en el punto 5.8.3 del apartado de la introducción, el cual es un miembro de la familia de factores de transcripción TCP de clase II. En el transcriptoma de plantas *pTCP15::TCP15-EAR*, descrito previamente, se encontraron niveles de expresión aumentados de *BRC1*, lo que sugirió que *TCP15* podría tener un rol en el desarrollo de ramificaciones. Por este motivo, se decidió profundizar el estudio y dilucidar el posible mecanismo por el cual las proteínas TCP de clase I podrían estar relacionadas con este proceso.

#### 8.3.1. Plantas con niveles disminuidos de *TCP14* y *TCP15* presentan un menor número de ramas axilares

Como una primera aproximación para el estudio de la funcionalidad de las proteínas TCP de clase I en el desarrollo de ramas axilares, realizamos un análisis del patrón de expresión de los genes *TCP14* y *TCP15*,

estrechamente relacionados, observándose una fuerte expresión en las yemas axilares (Fig. 38A). Luego, se prosiguió con el análisis fenotípico de las ramificaciones secundarias de plantas de *A. thaliana* salvajes y mutantes de pérdida de función *tcp14*, *tcp15* y *tcp14 tcp15* (estas últimas son mutantes dobles en *TCP15* y *TCP14*, ya mencionado previamente y que posee funciones redundantes con *TCP15* en muchos procesos). Las plantas mutantes simples y dobles presentaron un menor número de ramificaciones de roseta (RI) con respecto a las plantas salvajes al ser analizadas 10 días luego de la floración (Fig. 38B). La diferencia fenotípica de las mutantes simples con respecto a las plantas salvajes se perdió a los 15 días luego de la floración, mientras que en las plantas *tcp14 tcp15* la diferencia se mantuvo, incluso hasta la senescencia. Esto probablemente indica que ambas proteínas TCP participan en el desarrollo de ramas y que tienen funciones redundantes.



**Figura 38: TCP14 y TCP15 son requeridas para el desarrollo de las ramificaciones. (A)** Patrón de expresión del gen reportero *GUS* en yemas axilares de plantas que contienen la construcción *pTCP15::GUS*. Las flechas negras marcan las yemas axilares. **(B)** Número de ramas de roseta (RI) en distintas líneas con funciones alteradas de las proteínas TCP. Las barras indican la media $\pm$ SEM de 16 plantas de cada línea. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a las plantas salvajes ( $P < 0.05$ , test *t* de Student).

8.3.2. *TCP14* y *TCP15* reprimen la expresión de *BRC1* en yemas axilares

Para continuar con el estudio, se analizó el transcriptoma de plantas que expresan *pTCP15::TCP15-EAR*, ya mencionado previamente [296]. En este experimento, se observó un aumento de la expresión de varios genes que inhiben el desarrollo de ramificaciones axilares (Tabla IV), entre ellos los genes *BRC1* y *BRC2* [19], [34], [388], que codifican factores de transcripción TCP de clase II (*TCP18* y *TCP12*, respectivamente). Considerando que las mutantes *tcp14 tcp15* presentan un número menor de ramificaciones axilares, es posible que en estas mutantes se encuentren inducidos los genes *BRC1* y *BRC2* (tal como ocurre en las plantas que expresan la forma represora de *TCP15*) y que esto esté relacionado con el menor desarrollo de ramificaciones axilares.

**Tabla IV.** Niveles de expresión de genes relacionados con el desarrollo de ramas laterales en plantas *pTCP15::TCP15-EAR*.

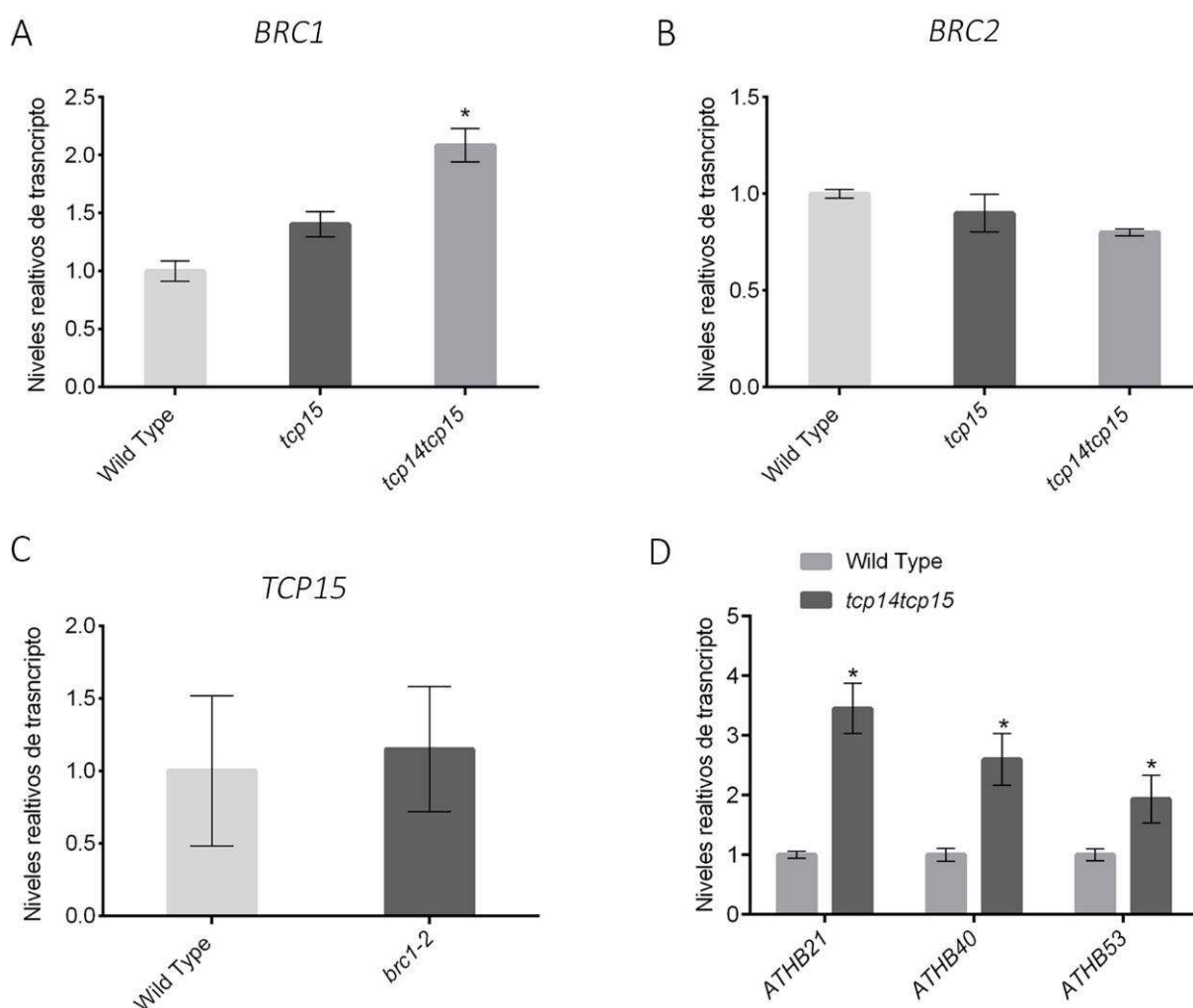
ID de la sonda	AGI	Nombre	Cambio en la expresión <sup>a</sup>	P
<i>Genes de biosíntesis de SL</i>				
A_84_P20125	AT2G26170	<i>MAX1</i>	0.92	0.0408
A_84_P592126	AT4G32810	<i>MAX4</i>	1.87	0.0540
<i>Genes TCP</i>				
A_84_P750390	AT1G68800	<i>BRC2</i>	1.39	0.0345
A_84_P762878	AT3G18550	<i>BRC1</i>	2.86	0.0076
<i>Genes HDZIP</i>				
A_84_P22048	AT2G18550	<i>HB21</i>	3.04	0.0124
A_84_P16754	AT4G36740	<i>HB40</i>	3.63	0.0079
A_84_P20736	AT5G66700	<i>HB53</i>	1.28	0.2497

Los datos de expresión fueron obtenidos de la base de datos Gene Expression Omnibus (*GEO*). Códigos GSE57742, GSE57743 y GSE57744 [296]

<sup>a</sup>  $\log_2$  (*pTCP15::TCP15-EAR*/wild-type)

Para analizar esto, se cuantificó la expresión de *BRC1* y *BRC2* mediante RT-qPCR en la zona central de las rosetas de plantas *tcp15* y *tcp14 tcp15*. También se cuantificaron los niveles de expresión de *TCP14* y *TCP15* en la mutante *brc1-2* para analizar si *BRC1* regula transcripcionalmente a estos genes. Se observó que los niveles de expresión de *BRC1*, pero no los de *BRC2*, se encontraban aumentados en las plantas *tcp14 tcp15* (Fig. 39A,B). En las plantas *tcp15*, se observó una tendencia al aumento en los niveles de transcritos de *BRC1* que no fue estadísticamente significativa (Fig. 39A). Por otra parte, los niveles de transcritos de *TCP15* no se encontraron alterados en la mutante *brc1-2* (Fig. 39C).

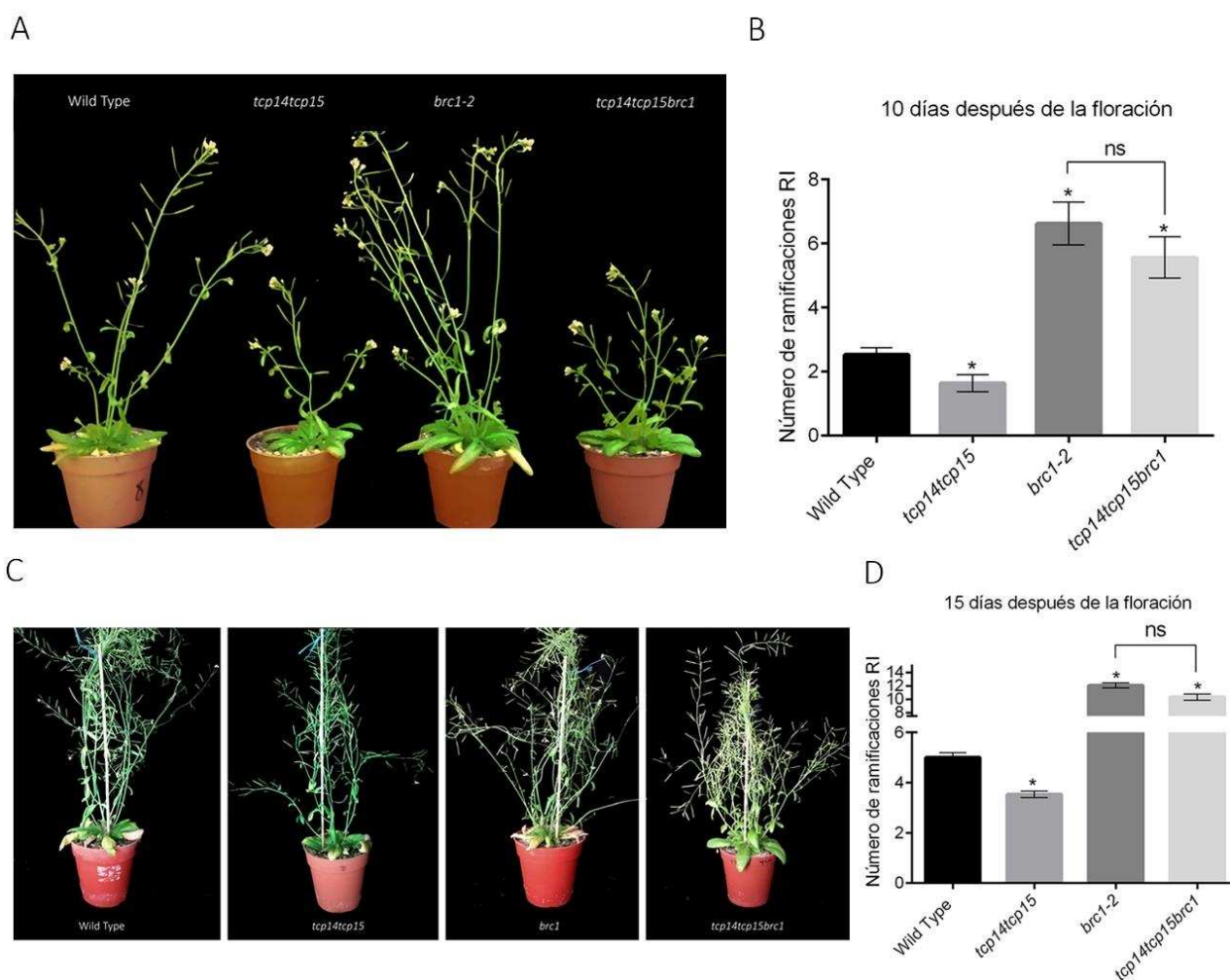
Notoriamente, en el microarreglo de plantas que expresan *pTCP15::TCP15-EAR* también se observó un aumento en la expresión de los genes *HB21* y *HB40* (Tabla IV), que son blancos directos de *BRC1* y participan en la inhibición del desarrollo de ramas laterales [363]. Para el tercer miembro de este grupo, *HB53*, también se observó un aumento en la expresión, pero los resultados no fueron estadísticamente significativos (Tabla IV). De acuerdo a esto, se midieron los niveles de transcritos de *HB21*, *HB40* y *HB53* en muestras enriquecidas en yemas axilares de plantas salvajes y plantas *tcp14 tcp15*. En concordancia con los resultados mencionados anteriormente, se observó que los transcritos de estos genes se encontraban aumentados en las plantas mutantes en *TCP14* y *TCP15* (Fig. 39D).



**Figura 39: La expresión de *BRC1* y de sus genes blancos se encuentra aumentada en las mutantes *tcp14 tcp15*. (A, B)** Niveles de transcritos de *BRC1* (A) y *BRC2* (B) en plantas con funciones alteradas de las proteínas *TCP14* y *TCP15*. (C) Niveles de transcritos de *TCP15* en plantas mutantes en *BRC1*. (D) Niveles de transcritos de genes blancos de *BRC1* en plantas salvajes y plantas mutantes dobles *tcp14 tcp15*. En todos los casos, los valores están relativizados a los de las plantas salvajes. Las barras indican la media $\pm$ SEM de tres réplicas biológicas. El asterisco indica diferencia significativa con respecto a plantas salvajes ( $P < 0.05$ , test *t* de Student).



Para evaluar la posible interacción genética entre *TCP14* y *TCP15* (TCPs de clase I) y *BRC1* (TCP de clase II), y su efecto en la regulación del desarrollo de ramificaciones axilares, se obtuvieron mutantes triples en los genes que codifican estas tres proteínas. En estas plantas, se observaron algunas características fenotípicas previamente registradas en la mutante doble *tcp14 tcp15*, como el retraso en el tiempo de floración [292], hojas más redondeadas, y una disminución general de tamaño respecto a plantas salvajes [323] (Fig. 40A). Por el contrario, al cuantificar el número de ramas axilares se encontró que era similar al de una planta mutante en *BRC1* (Fig. 40). De manera contundente, todos estos resultados indican que *BRC1* actúa corriente abajo de *TCP14* y *TCP15* en la cascada de regulación que determina el desarrollo de las ramificaciones axilares.



**Figura 40: Análisis fenotípico de mutantes triples en *TCP14*, *TCP15* y *BRC1*.** (A) Imagen representativa de plantas salvajes (Wild Type), *tcp14 tcp15*, *brc1*, y *tcp14 tcp15 brc1*, respectivamente, a 10 días luego de la floración. (B) Análisis del número de ramificaciones de plantas salvajes, *tcp14 tcp15*, *brc1* y *tcp14 tcp15 brc1* luego de 10 días de floración y cultivadas en condiciones de día largo. Las barras indican la media $\pm$ SEM de 16 plantas para cada genotipo. El asterisco indica diferencia significativa con respecto a plantas salvajes ( $P < 0.05$ , test *t* de Student). ns, no significativo. (C) Imagen representativa de una planta de cada genotipo a 25 días luego de la floración. (D) Análisis del número de ramificaciones de plantas salvajes, *tcp14 tcp15*, *brc1* y *tcp14 tcp15 brc1* luego de 15 días de la floración y cultivadas en condiciones de



día largo. Las barras indican la media $\pm$ SEM de 16 plantas para cada genotipo. El asterisco indica diferencia significativa con respecto a plantas salvajes ( $P < 0.05$ , test *t* de Student). ns, no significativo

---

### 8.3.3. La decapitación anula el efecto de la falta de *TCP14* y *TCP15* sobre el desarrollo de las ramificaciones

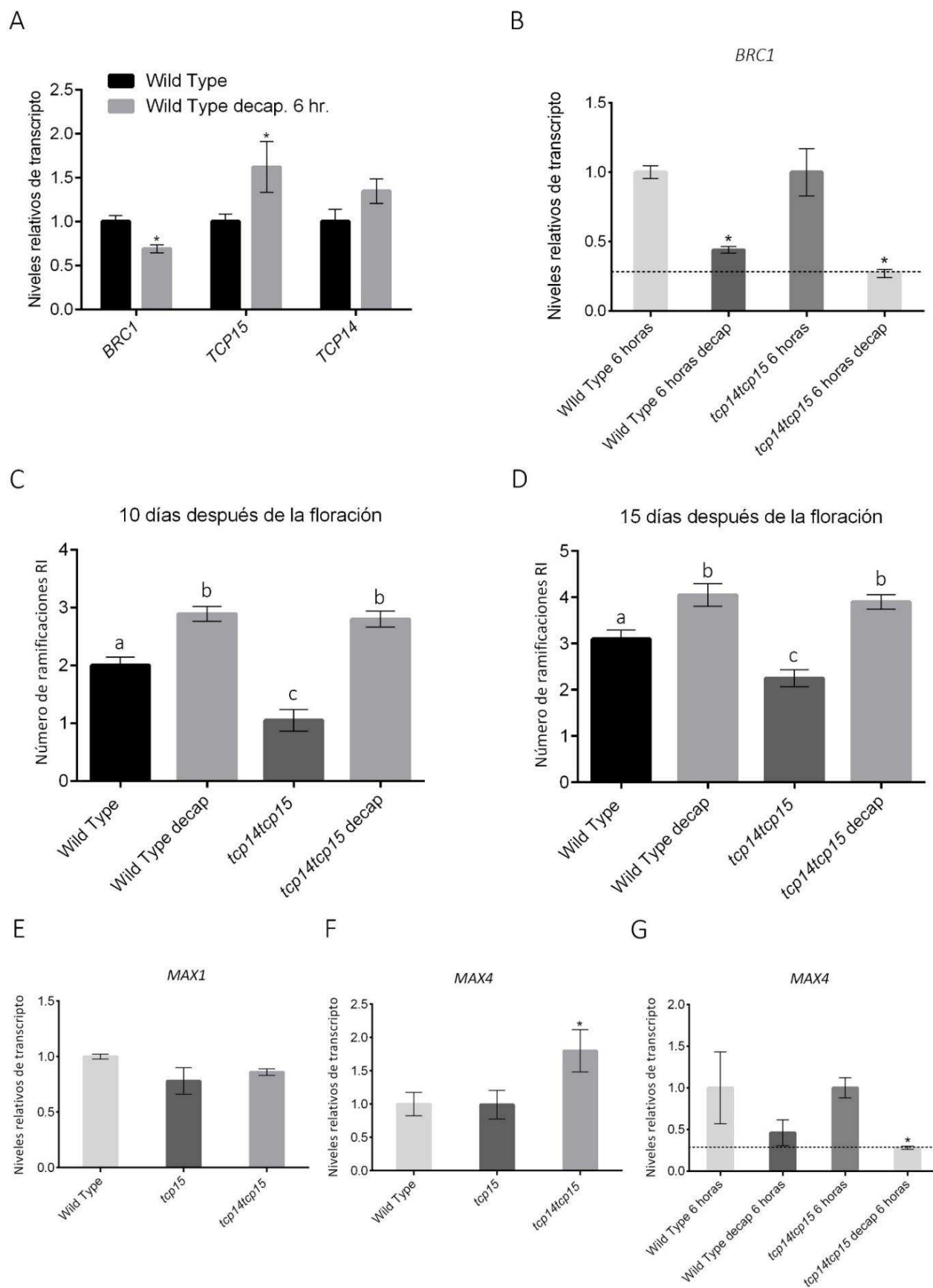
Para analizar en qué vías regulatorias del desarrollo de ramas podrían estar involucradas las proteínas TCP de clase I, se analizó el efecto de la decapitación, la cual consiste en seccionar la porción apical de la inflorescencia para inducir la formación de ramificaciones axilares. Este procedimiento interfiere con el transporte apical-basal de auxinas, hormonas que reprimen la formación de ramas axilares. Se analizó la respuesta de las líneas bajo estudio a este proceso y su posible efecto en la expresión de *TCP15* y *TCP14*. Se encontró que los niveles de transcripto de *TCP15* aumentan luego de 6 horas de la decapitación, mientras que lo contrario ocurre con los niveles de transcripto de *BRC1*, no encontrándose diferencias significativas en los niveles de transcripto de *TCP14* (Fig. 41A).

Para evaluar si *TCP14* y *TCP15* son necesarias para la respuesta de *BRC1* a la decapitación, se cuantificaron los niveles de expresión de *BRC1* en plantas salvajes y en plantas mutantes *tcp14 tcp15* luego de 6 horas de la decapitación, en comparación con plantas sin decapitar. Tanto en plantas mutantes *tcp14 tcp15* como en las plantas salvajes, los niveles de expresión de *BRC1* disminuyeron luego de la decapitación (Fig. 41B), lo que indica que las TCP de clase I no son requeridas para reprimir a *BRC1* en respuesta al tratamiento. Por otro lado, se realizó un análisis fenotípico de la respuesta de las plantas *tcp14 tcp15* a la decapitación. Se encontró que tanto las plantas salvajes como las plantas mutantes *tcp14 tcp15* respondieron a la decapitación, aumentando en ambos casos el número de ramas (Fig. 41C,D). Además, el número de ramas de las mutantes fue similar al de las plantas salvajes luego de la decapitación (Fig. 41C,D). De esta manera, se concluye que *TCP14* y *TCP15* no son requeridas para el aumento del número de ramas axilares en respuesta a la decapitación y que ésta regula los niveles de *BRC1* a través de mecanismos que no dependen de las TCP de clase I. De acuerdo a esto, resulta intrigante el incremento en la expresión de *TCP15* observado luego de la decapitación. Es posible que la inducción de *TCP15* sea el efecto, y no la causa, de la activación del desarrollo de las ramas durante este proceso. En forma alternativa, las TCP de clase I podrían participar en vías relacionadas con el desarrollo de las ramas en respuesta a la decapitación que son redundantes con otras vías independientes de las mismas. Finalmente, otras proteínas TCP, diferentes a *TCP14* y *TCP15*, podrían inducirse en estas condiciones y ser las responsables de la represión de *BRC1* y del aumento en el número de ramificaciones.

En el ensayo de expresión global de plantas *pTCP15::TCP15-EAR* también se encontraron niveles aumentados de transcriptos de los genes *MAX1* y *MAX4*. Estos genes están involucrados en la represión de la formación de ramificaciones axilares operando a través de la biosíntesis de SL [117]. De acuerdo con esto, se analizó la expresión de estos genes en plantas con función alterada de *TCP15* y *TCP14* mediante RT-qPCR.

Los niveles de expresión de *MAX4* se encontraron aumentados en las plantas *tcp14 tcp15*, pero no se observaron diferencias en los niveles de transcritos de *MAX1* (Fig. 41E y F). La mayor expresión de *MAX4* podría indicar que TCP15 y TCP14 promueven la formación de ramificaciones axilares a través de la inhibición de la vía de síntesis de SL. Al mismo tiempo, las SL actúan corriente arriba de *BRC1* para inhibir el desarrollo de ramificaciones axilares [388], por lo que podría establecerse una conexión entre TCP15 y BRC1 a través de las SL.

Se sabe que el gen *MAX4* es regulado negativamente por el proceso de decapitación en plantas salvajes. Por lo tanto, se evaluó cómo se regula este gen en plantas *tcp14 tcp15* decapitadas. Se halló que los niveles de transcritos de *MAX4* disminuyen tanto en plantas salvajes como en plantas *tcp14 tcp15* decapitadas con respecto a plantas sin decapitar (Fig. 41G), indicando que la represión de *MAX4* por decapitación tampoco depende de las TCP.



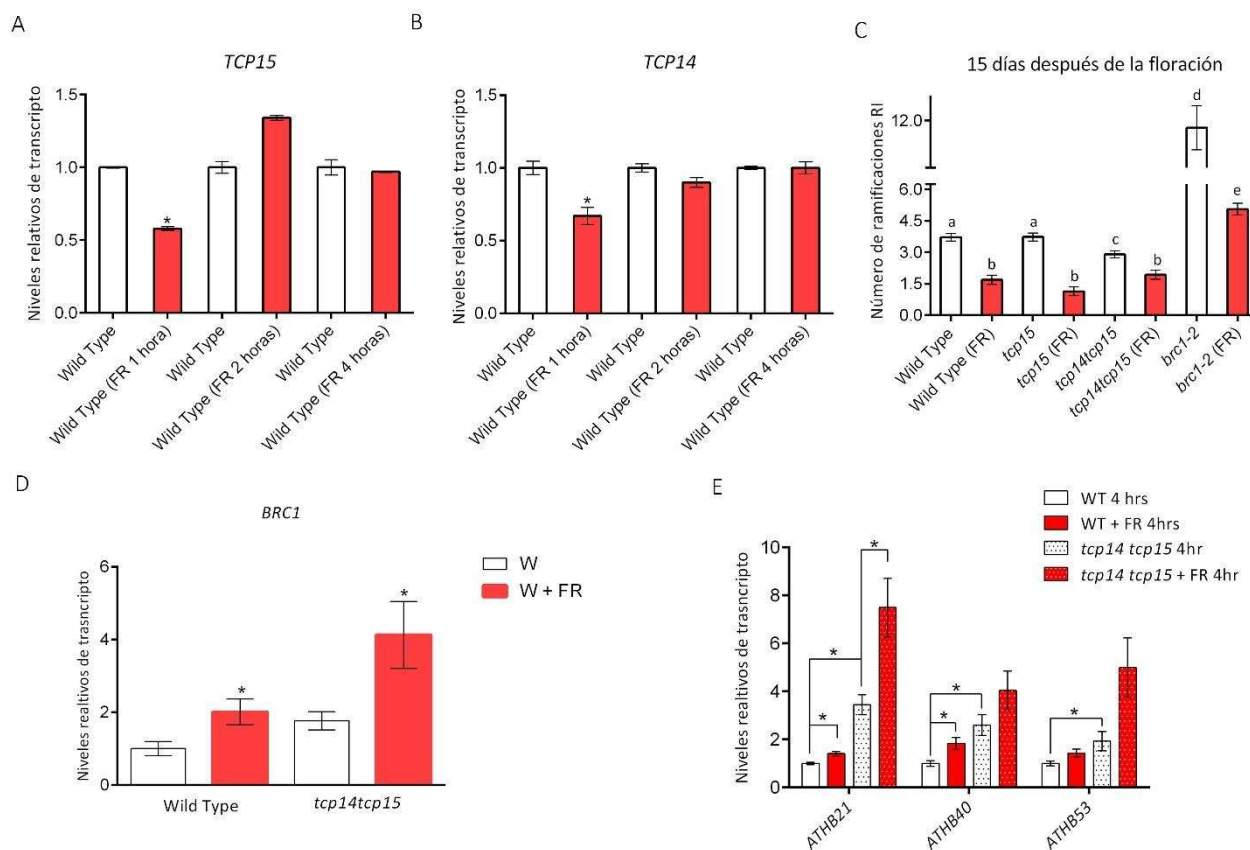
**Figura 41: TCP14 y TCP15 no son requeridas para el desarrollo de ramas luego de la decapitación. (A)** Niveles de transcritos de *BRC1*, *TCP15* y *TCP14* en plantas salvajes control y luego de 6 horas de la decapitación. Los valores están relativizados a los de las plantas sin decapitar (condición control) en cada caso. Las barras indican la media $\pm$ SEM de tres

réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a las plantas en condición control ( $P < 0.05$ , test  $t$  de *Student*). **(B)** Niveles de transcripto de *BRC1* en plantas salvajes y *tcp14 tcp15* luego de 6 horas de la decapitación. Los valores están relativizados a los de las plantas sin decapitar (condición control) para cada genotipo. Las barras indican la media $\pm$ SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a las plantas de cada genotipo en condición control ( $P < 0.05$ , test  $t$  de *Student*). **(C) y (D)** Número de ramas de roseta en plantas salvajes y mutantes *tcp14 tcp15* decapitadas (cuando el tallo tenía aproximadamente 2 cm de longitud) y sin decapitar, medido luego de 10 y 15 días de la floración. Las barras indican la media $\pm$ SEM de 16 plantas de cada línea en cada condición. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ; ANOVA unidireccional para comparaciones múltiples) **(E) y (F)** Niveles de transcriptos de *MAX1* **(E)** y *MAX4* **(F)** en yemas axilares de plantas salvajes y plantas con niveles alterados de *TCP14* y *TCP15*. Los valores están relativizados a los de plantas salvajes. Las barras indican la media $\pm$ SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la planta salvaje ( $P < 0.05$ , test  $t$  de *Student*). **(G)** Niveles de transcripto de *MAX4* en plantas salvajes y plantas *tcp14 tcp15* en condición control y luego de 6 horas de la decapitación. Los valores están relativizados a los de las plantas sin decapitar (condición control) para cada genotipo. Las barras indican la media $\pm$ SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a cada genotipo en condición control ( $P < 0.05$ , test  $t$  de *Student*).

#### 8.3.4. *TCP14 y TCP15 participan en la inhibición del desarrollo de ramas axilares en respuesta a un incremento en la proporción de luz roja lejana*

Otro factor involucrado en regular el número de ramas axilares es el crecimiento de las plantas en condiciones de baja relación de luz roja:roja lejana (R:FR), lo que inhibe la formación de ramas axilares [39], [246]. Para analizar si *TCP14* y *TCP15* están involucradas en esta vía de regulación se realizó, en colaboración con la Dra. Pilar Cubas, del Laboratorio de Genética Molecular de Plantas del Centro Nacional de Biotecnología de Madrid, España, un análisis de la expresión de *TCP14* y *TCP15* en yemas de plantas salvajes en condiciones control y en condiciones de baja R:FR. Para esto, se tomaron muestras enriquecidas en yemas axilares al tiempo cero, a la hora y a las cuatro horas luego de someter las plantas a dicha condición. Se encontró que *TCP14* y *TCP15* disminuyen su expresión luego de una hora de exposición a baja R:FR (Figura 42A,B). En concordancia con estos resultados, se halló que las diferencias fenotípicas en el número de ramas entre plantas salvajes y plantas *tcp14 tcp15* se anulaban luego de la exposición a baja R:FR (Fig. 42C). Debido a que las plantas mutantes responden menos a un aumento en la proporción de luz roja lejana, se sugiere que la disminución en la expresión de *TCP14* y *TCP15* podría estar involucrada en la inhibición del desarrollo de ramas axilares en esta condición. También analizamos la respuesta de la expresión de *BRC1* al aumento en la proporción de luz roja lejana. De acuerdo con resultados ya descriptos, *BRC1* y sus blancos directos conocidos hasta el momento (*HB21*, *HB40* y *HB53*) se indujeron bajo esta condición en plantas salvajes (Fig. 42D y E). La inducción de éstos genes también se observó en plantas *tcp14 tcp15* (Fig. 42D y E), indicando la

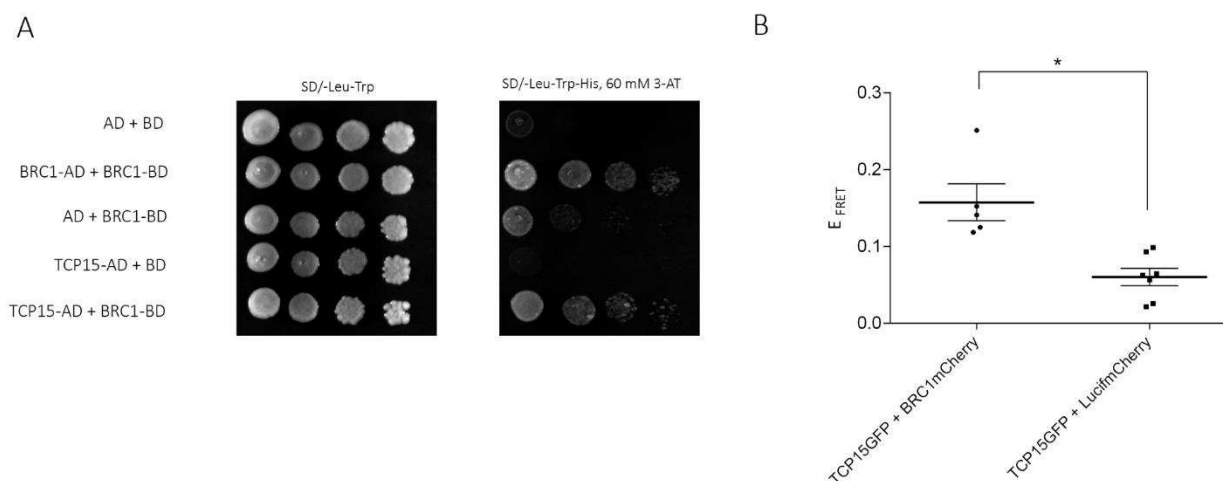
existencia de otros factores reguladores de la expresión de *BRC1* en respuesta a las condiciones de iluminación.



**Figura 42: TCP14 y TCP15 participan en la respuesta a un aumento en la proporción de luz roja lejana.** (A,B) Niveles de transcritos de *TCP15* (A) y *TCP14* (B) en plantas salvajes luego de una, dos y cuatro horas de ser expuestas a baja R:FR. Los valores están relativizados a los de las plantas salvajes mantenidas en condiciones normales de iluminación. Las barras indican la media±SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a plantas en condición de luz normal ( $P < 0.05$ , test *t* de Student). (C) Número de ramas de plantas salvajes, *tcp15* y *tcp14 tcp15* luego de 15 días de floración y de estar expuestas a baja R:FR. Letras diferentes indican diferencia significativa según test *t* de Student ( $P < 0.05$ ). (D) Niveles de transcritos de *BRC1* en plantas salvajes y *tcp14 tcp15* luego de 4 horas de iluminación con baja relación R:FR. Los valores están relativizados a los de las plantas salvajes en condiciones normales de iluminación. Las barras indican la media±SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a las plantas de cada genotipo en condición control ( $P < 0.05$ , test *t* de Student). W: luz blanca; W + FR, luz blanca suplementada con rojo lejano. (E) Niveles de transcritos de *ATHB21*, *ATHB40* y *ATHB53* en plantas salvajes y *tcp14 tcp15* luego de 4 horas de iluminación con luz blanca suplementada con FR. Los valores están relativizados a los de las plantas salvajes en condiciones normales de iluminación. Las barras indican la media±SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ , test *t* de Student).

### 8.3.5. TCP15 interacciona con BRC1

Dado que tanto BRC1 como TCP15 son factores de transcripción de la familia TCP, de clase II y clase I respectivamente, y que las proteínas TCP actúan en forma de dímeros, se evaluó una posible interacción y formación de heterodímeros entre las mismas. Con este fin, se realizó un ensayo de doble híbrido en levaduras, utilizando construcciones que expresan BRC1 y TCP15 fusionadas a los dominios de activación (AD) y unión al ADN (BD) de GAL4, respectivamente. En este ensayo, se observó crecimiento en medio selectivo sin histidina y con 3-AT de las levaduras que fueron transformadas con ambas construcciones mencionadas, mientras que el crecimiento de los controles negativos fue considerablemente menor (Fig. 43A). Esto sugiere que existe una posible interacción entre las dos proteínas TCP. En el caso de BRC1, también se analizó la formación de homodímeros, expresando esta proteína fusionada a uno u otro dominio de GAL4. El crecimiento en medio selectivo, en este caso, fue similar al observado para las levaduras que expresaban BRC1-AD y TCP15-BD (Fig. 43A). Para evaluar la interacción entre estas proteínas en células vegetales, se realizó un análisis de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), en el laboratorio de la Dra. Pilar Cubas, expresando fusiones de BRC1 y TCP15 a las proteínas fluorescentes mCherry y GFP, respectivamente, en hojas de *Nicotiana benthamiana*. FRET puede ocurrir entre dos cromóforos (donante y aceptor) que están cerca o muy próximos entre sí, y cuyo espectro de emisión y absorción, respectivamente, se superponen. En estas condiciones, la energía emitida después de la excitación del donante se puede transferir al aceptor. En este caso, usamos el par GFP/mCherry y se cuantificó la fluorescencia de GFP antes y después del fotoblanqueo de mCherry. Luego, se calculó el porcentaje de eficiencia de FRET ( $E_{\text{FRET}}$ ) (Figura 43B). Los valores de  $E_{\text{FRET}}$  para el par TCP15-GFP/BRC1-mCherry fueron significativamente más altos que los del control negativo, TCP15-GFP/Luciferasa-mCherry, lo cual indicó la existencia de una interacción entre estas proteínas.



**Figura 43: TCP15 interacciona con BRC1.** (A) Análisis de la interacción de TCP15 con BRC1 mediante ensayo de doble híbrido en levaduras. Se sembraron distintas diluciones de cultivos de levaduras que contenían las construcciones indicadas en medio no selectivo (-Leu -Trp, medio sin leucina ni triptofano para seleccionar la presencia de las construcciones) o selectivo (-Leu -Trp -His, 60 mM 3-AT, medio sin leucina, triptofano ni histidina y con el agregado de 3-aminotriazole, que permite el crecimiento al activarse la expresión del gen *HIS3*, colocado bajo el control de un promotor reconocido por GAL4). (B) Gráfico de la eficiencia de FRET promedio entre TCP15-GFP y BRC1-mCherry con respecto a TCP15-GFP y Lucif-mCherry (control negativo).  $E_{FRET}$  se calcula como el aumento relativo en la intensidad de fluorescencia de GFP después del fotoblanqueo del aceptor mCherry. Los puntos indican los diferentes valores de las réplicas biológicas y las barras indican la media  $\pm$  SEM. El asterisco indica diferencia significativa ( $P < 0.05$ , test *t* de Student).

Los resultados descritos en esta sección sugieren, entonces, que TCP15 y TCP14 regulan positivamente el desarrollo de ramas axilares, posiblemente a través de la regulación transcripcional indirecta de *BRC1*. Se postula una regulación indirecta, ya que en todos los procesos analizados hasta el momento TCP14 y TCP15 parecen actuar como activadores transcripcionales, mientras que los niveles de expresión de *BRC1* están aumentados en las mutantes *tcp14 tcp15* y en plantas que expresan una forma represora de TCP15. Además, la región promotora de *BRC1* no presenta sitios TCP evidentes. El aumento de expresión del gen *MAX4* observado en plantas mutantes *tcp14 tcp15* podría indicar que la regulación de la expresión de *BRC1* ocurre a través de cambios en la vía de SL. Sin embargo, aplicando el mismo razonamiento *MAX4* tampoco sería un blanco directo de las TCP de clase I. Por otra parte, las proteínas TCP de clase I no serían requeridas para la represión de *BRC1* en respuesta a la decapitación, a pesar de observarse un aumento en la expresión de *TCP15* en estas condiciones. La inducción de *BRC1* en condiciones en las cuales la proporción de luz roja lejana aumenta tampoco requeriría en forma absoluta de TCP14 y TCP15, aunque la expresión de los genes que las codifican está regulada por esta condición. Sin embargo, en presencia de una alta proporción de luz roja lejana se pierden las diferencias observadas en el número de ramas de plantas salvajes y mutantes *tcp14 tcp15*. Esto sugiere la existencia de un rol de las proteínas TCP de clase I durante la respuesta a las condiciones de iluminación. Además de la regulación transcripcional, se plantea una posible interacción entre TCP15 y

BRC1. Esta interacción también podría explicar el efecto antagónico de TCP15 y BRC1 sobre la formación de ramas, a través de la formación de complejos heterodiméricos con propiedades diferentes a las de los respectivos homodímeros. Esto abre una línea de investigación que vale la pena seguir estudiando y profundizando para poder establecer la relación entre estas proteínas TCP de clases I y II, que se regularían mutuamente para generar efectos opuestos en este proceso del desarrollo.



# **DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

### 9.1. Estudio del papel de los factores de transcripción TCP de clase I durante la elongación del filamento del estambre de *Arabidopsis*

En este trabajo de tesis, reportamos que plantas que tienen afectadas la función de proteínas TCP de clase I muestran defectos en la elongación del filamento del estambre. Esto se observó para plantas que expresan una fusión de TCP15 al dominio represor de la transcripción EAR bajo el control del promotor *TCP15* (*pTCP15::TCP15-EAR*), pero no en mutantes con pérdida de función en *TCP15* y el gen de clase I relacionado *TCP14*. Dado que TCP15-EAR probablemente reprime la expresión de genes que están bajo el control directo de TCP15, los resultados sugieren que TCP15 está involucrado en la regulación de genes que afectan la elongación del filamento del estambre. Esto también está respaldado por el hecho de que la sobreexpresión de *TCP15* produjo plantas con filamentos más largos. Los efectos opuestos sobre la longitud del filamento observados después de expresar las formas nativa y represora de TCP15 indican que TCP15 actúa como un activador en este proceso. La falta de cambios apreciables en la longitud del filamento en plantas con pérdida de función de *TCP15* se debe probablemente a la redundancia de TCP15 con otras TCP de clase I, como fuera observado previamente entre los miembros de esta clase en diferentes contextos de desarrollo [294], [323], [376]. En concordancia con estos resultados, las plantas afectadas en TCP8 y TCP22, además de TCP14 y TCP15 (plantas *amiR-27*), muestran filamentos más cortos.

Los miembros de la subfamilia de genes *SAUR63* son necesarios para la elongación correcta del filamento del estambre [380], un proceso gobernado principalmente por la expansión celular [12]. El hecho de que varios miembros de la subfamilia *SAUR63* muestren una expresión reducida en las plantas *pTCP15::TCP15-EAR* y *amiR-27* y que la sobreexpresión de *SAUR63* restaure la elongación de los estambres y la fertilidad de las plantas *pTCP15::TCP15-EAR* sugiere que la expresión reducida de los genes de la subfamilia *SAUR63* explica la elongación defectuosa del estambre en estas plantas. Curiosamente, la sobreexpresión de *SAUR63* también promueve la elongación de los pétalos, que son más cortos en las plantas *pTCP15::TCP15-EAR* con respecto a los de plantas salvajes. Esto es consistente con el hecho de que los genes de la subfamilia *SAUR63* también son necesarios para el crecimiento de los pétalos [380] y sugiere que la regulación de los genes de la subfamilia *SAUR63* a través de las TCP de clase I también puede ser importante para este proceso. De hecho, se observó una expresión reducida de *SAUR63* tanto en los pétalos como en los estambres de plantas *pTCP15::TCP15-EAR* y *amiR-27*. En particular, los ensayos con genes reporteros indicaron que *TCP15* se expresa principalmente en la vasculatura de los filamentos de estambre, mientras que se cree que la elongación de los órganos está limitada principalmente por la expansión de las células epidérmicas [389]. Chae y col. [380] observaron que *SAUR63* también se expresa de manera más prominente en los tejidos vasculares de filamentos y plantearon la hipótesis de que las proteínas SAUR podrían tener un papel en la

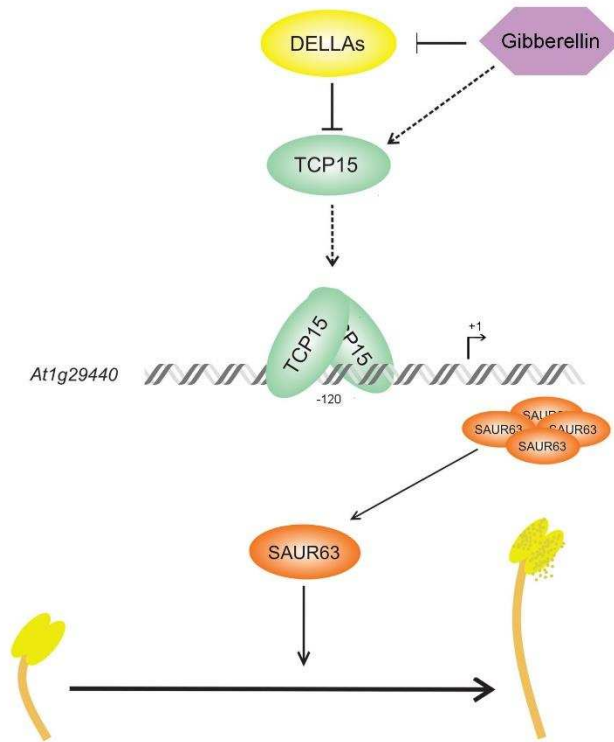
redirección del flujo de auxinas a los tejidos periféricos. Las características de expresión similares de *TCP15* y *SAUR63* dentro de los filamentos de estambre refuerzan el rol de *TCP15* en la regulación de la expresión del gen *SAUR63* y otros genes *SAUR* relacionados.

El análisis de las regiones promotoras proximales de diferentes miembros de la subfamilia *SAUR63* reveló la existencia de posibles motivos de unión reconocidos por las proteínas TCP. Al menos para *SAUR63*, la mutación de este motivo conduce a una expresión considerablemente reducida en flores, y particularmente en filamentos de estambre, como se deduce de los ensayos histoquímicos de GUS. Esto, junto con la unión observada de *TCP15* a la región promotora que contiene este motivo, indica fuertemente que los genes de la subfamilia *SAUR63* son blancos directos de *TCP15*, y posiblemente también de otras TCP de clase I relacionadas. Es de destacar que varios miembros de la subfamilia *SAUR63* también son genes blancos de otros factores de transcripción, como *BZR1* [390], *PIF4* [391] y *ARF6* [386]. Por lo tanto, las TCP de clase I se pueden agregar a este conjunto de factores de transcripción que inciden directamente en la expresión de genes de la subfamilia *SAUR63* para regular el crecimiento celular. En esta tesis se encontró que la respuesta de los miembros de la subfamilia *SAUR63* al tratamiento de flores con auxinas no se ve significativamente comprometida en las plantas defectuosas en *TCP15* y proteínas TCP de clase I relacionadas, lo que sugiere que las TCP no son esenciales para la respuesta a auxinas, la cual probablemente esté mediada por las proteínas ARF. Reportes previos indicaron que las plantas *35S::TCP15* y *pTCP15::TCP15-EAR* muestran una expresión más baja y más alta, respectivamente, del reportero de auxinas *DR5::GUS* [294], [296], [358], lo que indica que *TCP15* tiene un impacto negativo en la expresión a partir de los elementos de respuesta a auxinas, a los que se unen los factores de transcripción ARF. De hecho, se pudo observar una mayor respuesta al agregado exógeno de auxinas para algunos miembros de la subfamilia *SAUR63*, considerando que los niveles de expresión basal fueron más bajos en las plantas con deficiencia de TCP. Por lo tanto, la expresión dependiente de auxinas de los genes de la subfamilia *SAUR63* en estambres no estaría mediada por las TCP de clase I. Sin embargo, las TCP, así como los ARF, parecen ser necesarios para la correcta expresión de los genes de la subfamilia *SAUR63* durante la elongación del filamento del estambre. Lo más probable es que ambos factores actúen directamente a través de sus respectivos sitios blancos en los promotores de estos genes.

Reportes previos mostraron que las GA promueven la síntesis de JA durante las últimas etapas del desarrollo del estambre [189]. El JA, a su vez, induce la expresión de tres genes *MYB* necesarios para el crecimiento del filamento del estambre y la maduración de las anteras [187]. Un análisis posterior indicó que la inducción de estos genes *MYB* después del tratamiento con JA no rescataba el crecimiento normal del estambre en un contexto deficiente en GA [189], lo que llevó a la conclusión de que existen vías alternativas dependientes de GA necesarias para la elongación. De acuerdo con esto, el fenotipo de estambres cortos de plantas deficientes en el transportador de GA, *GTR1*, puede rescatarse mediante tratamiento con GA, pero no por JA, mientras que los defectos de maduración de anteras de plantas con deficiencia de JA pueden rescatarse por JA, pero no por GA [392]. En base a esto, Saito y col. [392] propusieron que las vías de GA y JA

actúan en paralelo y se coordinan entre sí para modular el desarrollo del estambre y que la maduración de las anteras está controlada principalmente por JA, mientras que la elongación del filamento está bajo el control de las GA. El hecho de que la sobreexpresión de *TCP15* restaure el crecimiento del estambre en las plantas con deficiencia de GA sugiere que *TCP15* y las proteínas relacionadas de clase I son actores principales en una vía dependiente de GA que controla la elongación del filamento. Además, aquí se demostró que la expresión de *TCP15* se reduce en plantas con deficiencia de GA. Sin embargo, la represión observada de *TCP15* no sería suficiente para explicar el fenotipo de estambres cortos de las plantas con deficiencia de GA, ya que la mutante simple *tcp15* muestra estambres normales. La inhibición reportada de las proteínas TCP de clase I por las proteínas DELLA [311], [312] proporciona un mecanismo adicional para la regulación del accionar de las TCP por GA. Además, muchos de los genes inducidos por GA en flores muestran una expresión reducida en plantas *pTCP15::TCP15-EAR*, lo que sugiere que pueden estar bajo el control de *TCP15* y proteínas TCP de clase I relacionadas. Específicamente, aquí se muestra que los cambios observados después del tratamiento con PAC y/o GA en la expresión de *SAUR63* y genes relacionados se atenúan en las plantas con deficiencia de proteínas TCP, lo cual indica que las TCP son necesarias para la inducción de estos genes por GA. Además, el rescate del crecimiento de filamentos de plantas con deficiencia de GA provocado por la sobreexpresión de *TCP15* estuvo acompañado por un aumento en la expresión de la mayoría de los genes de la subfamilia *SAUR63*. Por lo tanto, uno de los mecanismos involucrados en la elongación del filamento de estambres en respuesta a GA probablemente implica la activación de las TCP de clase I para inducir el crecimiento a través de cambios en la expresión de los genes de la subfamilia *SAUR63*.

Como conclusión de la primera parte de esta tesis doctoral, se plantea el siguiente modelo de trabajo, en el cual *TCP15* y otras TCP de clase I relacionadas vinculan la acción de las GA con la elongación del filamento del estambre mediante la activación transcripcional directa de los genes de la subfamilia *SAUR63* a través de la unión a sitios blancos presentes en sus promotores (Fig. 44). Los resultados presentados aquí contribuyen a una comprensión más completa de la vía de elongación del filamento de estambres en respuesta a GA.



**Figura 44: Modelo propuesto para la participación de TCP15 y otras TCP de clase I en la elongación del filamento del estambre mediada por GA.** Las GA inducen la expresión de *TCP15* y activan las proteínas TCP de clase I a través de la degradación de proteínas DELLA. Las proteínas TCP de clase I inducen la transcripción de *SAUR63* y genes relacionados, mediante la interacción directa con los sitios TCP presentes en sus promotores. Finalmente, *SAUR63* estimula la elongación del filamento del estambre para promover la correcta fecundación del gineceo.

## 9.2. Estudios de la función de *KNAT1* en la regulación de la expresión de los factores de transcripción TCP y su función en el desarrollo de los estambres

El factor de transcripción *KNAT1*, al igual que los demás representantes de la familia *KNOX*, ha sido extensamente caracterizado en cuanto a su función biológica en *A. thaliana* y otras especies de dicotiledóneas, así también como en monocotiledóneas. Específicamente en *Arabidopsis*, *KNAT1* ha sido vinculado con el desarrollo del meristema apical, el crecimiento de los entrenudos del tallo y de los pedúnculos florales, y el desarrollo del gineceo [338], [393], [394]. En este trabajo de tesis se propone una nueva función para *KNAT1*, aún no reportada en la literatura. A partir de los fenotipos observados en plantas *35S::KNAT1* y *bp*, podemos decir que *KNAT1* actúa como un represor de la elongación del filamento del estambre, debido a que la sobreexpresión de éste produce filamentos de estambres cortos mientras que en la mutante se aprecia el fenotipo opuesto. Por otro lado, estudiando el patrón de expresión de *KNAT1* encontramos que este gen se expresa en el filamento a partir del estadio 13 del desarrollo floral. En dicho estadio, el estambre alcanza su máximo desarrollo y deja de crecer [9], lo cual sería otro indicio a favor del

posible rol de KNAT1 como represor del crecimiento de este órgano floral. Análisis de resultados de RT-qPCR permitieron demostrar que KNAT1 reprime la expresión de *TCP15*, dado que plantas *bp* presentan niveles de transcripto de *TCP15* aumentados y plantas *35S::KNAT1* tienen niveles disminuidos. A su vez, mediante ensayos de ChIP-qPCR y EMSA se encontró que esta represión ocurriría de manera directa, a través de la interacción con sitios de reconocimiento de proteínas KNOX presentes en el promotor de *TCP15*. En la primera parte de la tesis, se reportó que las plantas *pTCP15::TCP15-EAR* presentan estambres más cortos, y que además las plantas *bp* presentan el fenotipo contrario, sugiriendo que en el último caso esto se debía a la desregulación de *TCP15*. Por lo tanto, si realmente KNAT1 reprime la elongación del filamento a través de *TCP15*, los estambres de plantas *bp* que expresen la construcción *pTCP15::TCP15-EAR* deberían ser más cortos. Concretamente, estos fueron los resultados obtenidos en plantas *bp + pTCP15::TCP15-EAR*. De la evaluación adicional de plantas *35S::KNAT1 + 35S::TCP15-RFP*, en las cuales se encontró una reversión del fenotipo de estambres cortos que presentan las plantas *35S::KNAT1*, se puede concluir que *TCP15* actuaría corriente abajo en la cascada de señalización de KNAT1 durante el desarrollo del estambre.

Desde un punto de vista biológico, KNAT1 se presenta como un factor importante para modular la elongación del filamento del estambre de *A. thaliana*. Es importante mencionar que *Arabidopsis* presenta un sistema de reproducción cleistógamo (la autofecundación es previa a la antesis floral), que es muy poco frecuente en las Angiospermas, e incluso en la familia Brassicaceae. Un análisis de las regiones promotoras del gen *TCP15* en *A. thaliana* y otras Brasicáceas relacionadas, como son *Arabidopsis lyrata*, *Capsella rubella* y *Brassica rapa*, se ilustra en la figura 45, donde se observa que los genes de las otras Brasicáceas presentan un solo sitio KNOX. Se sabe que estas especies presentan una reproducción alógama, diferente a la de *A. thaliana*, que es cleistógama. La existencia de dos sitios KNOX en el promotor de *TCP15* de *A. thaliana* podría resultar en una represión más potente en esta especie, y esto podría estar relacionado con la regulación de la elongación del filamento de acuerdo al sistema de reproducción. En maíz, se ha probado que la presencia de dos sitios KNOX adyacentes tiene gran influencia sobre la capacidad de unión de estos factores de transcripción [354]. La incorporación de un segundo sitio KNOX puede haber contribuido en gran medida a la adquisición de la cleistogamia en *Arabidopsis* durante la evolución de la familia. Es importante destacar que, hasta el momento, no se han reportado proteínas de la familia KNOX que regulen la expresión de genes *TCP* en *A. thaliana*. Por otro lado, sí se identificaron más de 5000 blancos directos de las proteínas KNOX en meristemas de inflorescencia de maíz y de arroz, mediante experimentos de ChIP-seq [340], [341], entre los cuales se detectaron factores de transcripción de la familia TCP.

```

>Arabidopsis_thaliana    TGGATTAATCACTGTCATTCTGTCAAATAATAATTCTATCT  -714 pb
>Arabidopsis_lyrata     TGGATTAATCACTGTCA ----- ATAATAATTCCATCT
>Capsella_rubella      AGGATTAATCACTGTCA ----- ATAATAATTCTATCT
>Brassica_rapa          TGGATTAATCACTGTCA ----- ATAATAATTCTATCT
  
```

---

**Figura 45: Alineamiento múltiple de secuencias de una porción de las regiones promotoras de los genes *TCP15* de especies de Brassicáceas.** Se indica la presencia de sitios KNOX (en negrita). -714 indica la distancia de los sitios KNOX corriente arriba del inicio de la traducción.

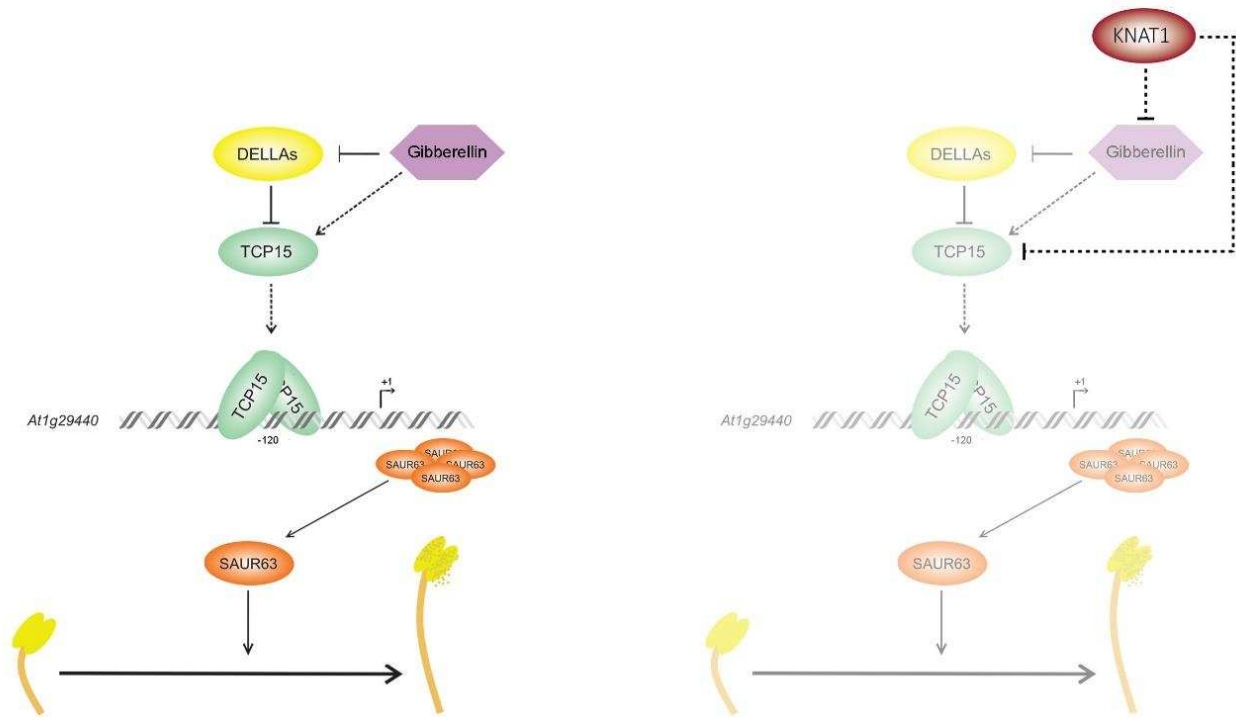
---

Por otro lado, se sabe que KNAT1 regula la biosíntesis de GA en meristemas a través de la represión directa de *GA20ox1* [395]. Dado que encontramos que KNAT1 reprime la biosíntesis de GA en flores, y que esta hormona cumple un rol fundamental en el crecimiento del filamento del estambre, la información obtenida sería consistente con la hipótesis que aquí se plantea en la cual KNAT1 sería un represor del desarrollo de esta estructura. Es importante mencionar que hasta el momento solo se ha reportado a las proteínas DELLA como represores de la elongación del filamento del estambre, por contrarrestar el accionar de las GA. El reporte de un factor de transcripción, como KNAT1, que regule negativamente el crecimiento de este órgano constituye una novedad para *Arabidopsis thaliana*. Por otro lado, el hecho de que el tratamiento con GA exógena no revierta el fenotipo de estambres cortos de plantas *35S::KNAT1* indica que KNAT1 no sólo inhibiría la síntesis de las GA, sino que también regularía otra vía paralela o ubicada corriente abajo de las GA y que es necesaria para la elongación del filamento. Esto refuerza, aún más, la hipótesis de que KNAT1 regula la expresión de las *TCP* de clase I para llevar a cabo su función. Sin embargo, cabe aclarar que, ya que la mutante simple *tcp15* no presenta un acortamiento del estambre, la sola represión de *TCP15* por KNAT1 no explicaría el fenotipo observado en las plantas *35S::KNAT1*. De modo que, probablemente, existen otras vías mediante las cuáles KNAT1 regula la elongación del filamento.

Finalmente, a partir del análisis de los resultados obtenidos en esta sección y datos reportados en la literatura científica podemos plantear el siguiente modelo (Fig. 46), que completa el ya mostrado en la Fig. 44:

Estadio 11-12 del desarrollo floral

Estadio 13-15 del desarrollo floral



**Figura 46: Modelo propuesto para la participación de TCP de clase I y KNAT1 en la elongación del filamento del estambre mediado por GA.** Antes de la antesis, las GA inducen la expresión de *TCP15* y activan a TCP15 y otras proteínas TCP de clase I a través de la degradación de las proteínas DELLA. Las proteínas TCP de clase I inducen la expresión de *SAUR63* y otros genes *SAUR* relacionados por unión directa a los sitios TCP presentes en los promotores de los mismos. Las proteínas de la subfamilia SAUR63, finalmente, estimulan la elongación del filamento del estambre (Modelo presentado en la Fig. 44). Luego de la antesis floral, cuando los estambres alcanzaron la altura del gineceo y se produjo la fecundación, *KNAT1* se comienza a expresar y reprime de manera directa la expresión de *TCP15* y posiblemente al gen *GA20ox1*. Esto genera una baja en los niveles de GA y promueve la disminución de los niveles y la actividad de las proteínas TCP. Esto lleva a una disminución de la expresión de *SAUR63* y genes *SAUR* relacionados, promoviendo entonces la detención de la elongación del filamento del estambre.

### 9.3. Estudios de la función de *TCP14* y *TCP15* en la regulación del desarrollo de ramas axilares en *Arabidopsis thaliana*

Las proteínas TCP de clase II *BRC1* (*TCP18*) y *BRC2* (*TCP12*) están relacionadas con la inhibición del desarrollo de ramas axilares [19], [34], [388]. Resultados aquí obtenidos indican que las proteínas TCP de clase I *TCP14* y *TCP15* también afectan el desarrollo de las ramificaciones, pero en este caso actuando como promotores del crecimiento de las ramas axilares. Estos resultados coinciden con los reportados recientemente en un estudio fenotípico global de plantas con función alterada de proteínas TCP de clase I [396]. Sin embargo, no existe un mecanismo molecular que explique cómo las TCP de clase I regulan el



desarrollo de ramificaciones y si existe algún vínculo molecular con las proteínas TCP de clase II en este proceso. Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis comenzamos con el estudio fenotípico de plantas mutantes, simples y dobles, en los genes que codifican los factores de transcripción TCP de clase I TCP14 y TCP15. Demostramos que las mutantes simples y dobles presentan un menor número de ramas laterales a los 10 días luego de la floración en comparación con plantas salvajes. En las mutantes dobles este fenotipo se mantiene luego de 15 días de la floración e incluso perdura hasta la senescencia. En las mutantes simples, en cambio, el fenotipo se pierde luego de los 10 días de floración probablemente debido a la existencia de redundancia funcional.

En el experimento de transcriptoma realizado en el laboratorio con plantas que expresan una versión represora de TCP15 observamos un aumento de la expresión de *BRC1* y *BRC2*. Considerando que se observó un número menor de ramificaciones en las mutantes *tcp14* y *tcp15*, se analizaron los niveles de expresión de *BRC1* y *BRC2* en muestras enriquecidas en yemas axilares de mutantes simples *tcp15* y dobles *tcp14 tcp15*. Se encontraron niveles de expresión aumentados de *BRC1*, pero no de *BRC2*, en las mutantes dobles, lo cual podría explicar el fenotipo observado, ya que las mutantes simples en *BRC2* presentan un fenotipo significativamente más débil en comparación con las mutantes *brc1* (incluso las mutantes dobles *brc1 brc2* presentan el mismo fenotipo que las mutantes simples en *BRC1* [19]). Esto indicaría que no existe redundancia funcional entre ambos genes *BRC* y que el causante del fenotipo sería principalmente *BRC1*. Por otra parte, la ausencia de cambios detectables en la expresión de *BRC1* en la mutante simple *tcp15* refuerza la idea de que existiría redundancia funcional con otras TCP, entre ellas TCP14.

Por otro lado, se sabe que las yemas axilares son brotes parcialmente desarrollados, cuyo crecimiento es inhibido por el ápice principal del tallo, fenómeno conocido como dominancia apical [232], [397], [398]. La decapitación del tallo, es decir el corte de la porción apical de la inflorescencia, induce la diferenciación de las yemas en dormancia y promueve la formación de nuevas ramas. La principal hormona involucrada en este proceso es la auxina, la cual se sintetiza en el ápice del tallo y se transporta de manera basípeta, inhibiendo el desarrollo de las yemas axilares. Las auxinas actúan de manera antagónica a las CK, que se sintetizan en la raíz y se transportan hacia las yemas axilares, donde promueven el crecimiento de las mismas [397]–[399]. Existen reportes previos que indican que los niveles de transcripto de *BRC1* disminuyen en yemas de plantas decapitadas y, de esta manera, se promueve el desarrollo de ramas axilares [253]. Resultados aquí obtenidos indican que *TCP14* y *TCP15* no serían requeridas para el desarrollo de ramas axilares inducido por decapitación. Si bien se encontró que los niveles de transcripto de *TCP15* se regulan de manera positiva luego de la decapitación, en forma opuesta a lo observado para *BRC1*, la respuesta a la decapitación de plantas mutantes en *TCP15* y *TCP14* no se encuentra alterada. Esto último coincide con el hecho de que los niveles de transcripto de *BRC1* en plantas *tcp14 tcp15*, luego de la decapitación, disminuyen de la misma manera que en plantas salvajes. Esto indicaría que la falta de *TCP15* y *TCP14* no afecta la regulación transcripcional de *BRC1* durante la decapitación.

Estudios de mutantes en diversas especies vegetales, entre ellas las mutantes *max* en *Arabidopsis thaliana*, llevaron a identificar a las SL como un nuevo grupo de fitohormonas importantes para la regulación del desarrollo de las ramificaciones axilares [41], [42], [46], [48], [49], [117], [118], [232], [248], [254]. Las SL y las CK regulan de forma antagónica la expresión del factor de transcripción *BRC1*, que es necesario para inhibir la ramificación [19], [254]. En el ensayo de transcriptoma de plantas *pTCP15::TCP15-EAR* se observaron niveles aumentados de transcritos de los genes *MAX1* y *MAX4*. Los niveles de transcritos de *MAX4* también se vieron aumentados en plantas *tcp14 tcp15*. Esto es coherente con el fenotipo de la mutante doble *tcp14 tcp15*, que posee un menor número de ramas laterales, ya que *MAX4* es un regulador negativo de la ramificación. Los niveles de transcritos de *MAX4* disminuyeron tanto en plantas salvajes como en plantas *tcp14 tcp15* luego de la decapitación. Esto indica que TCP14 y TCP15 no son requeridas para la regulación de la expresión de *MAX4* en respuesta a dicha condición, al igual que sucede con *BRC1*. Nuevamente, estos cambios de expresión son coherentes con la observación de que la mutante *tcp14 tcp15* desarrolla normalmente sus ramificaciones luego de la decapitación. En conjunto, estos resultados indican que la regulación de la expresión de genes de la vía de SL y de *BRC1* por auxinas, y/u otro factor involucrado en la respuesta a la decapitación, ocurre en forma independiente de las proteínas TCP de clase I.

La luz es uno de los factores ambientales que más influye sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Señales del ambiente que indiquen la existencia de un entorno competitivo de crecimiento o un ambiente sombreado inhiben el proceso de ramificación [32], [33], [263], [400]–[404]. Los fitocromos (PHY) son los fotorreceptores encargados de percibir la relación de luz roja:rojo lejano (R:RL) del ambiente. Una relación R:RL baja se asocia con la presencia de plantas vecinas y puede promover el SAS, el cual involucra, entre otros procesos, la inhibición del desarrollo de ramas laterales [405]–[408]. Ha sido demostrado que una baja relación R:RL y una deficiencia en el PHYB inhiben el desarrollo de ramificaciones en *Arabidopsis* alterando la expresión de una variedad de genes [32], [34], [264]. En particular, se reportó que los niveles de transcritos de *BRC1* son inducidos en yemas axilares cuando las plantas son expuestas durante 4 horas a luz roja lejano [34], [363] y que esta regulación se pierde en la mutante *phyb*, en donde los niveles de transcritos de *BRC1* se encuentran aumentados aún en condiciones control [34]. Esto nos llevó a plantear una posible regulación de la luz roja lejano sobre las TCP de clase I. Los niveles de transcritos de *TCP14* y *TCP15* se encuentran disminuidos en condiciones de enriquecimiento de luz roja lejano. En sintonía con esto, se encontró que, en plantas deficientes en *TCP14* y *TCP15*, la respuesta a rojo lejano está afectada. Si bien plantas mutantes *tcp14 tcp15* responden a la luz roja lejano, produciendo un menor número de ramas que en condiciones control, la disminución observada es menor que en plantas salvajes. Esto indicaría que las TCP de clase I participan en la respuesta a estas condiciones lumínicas. Sin embargo, la inducción de *BRC1* en condiciones de baja proporción R:RL también se observa en la mutante doble *tcp14 tcp15*. De todas maneras, es importante continuar con estos estudios para profundizar y dilucidar con precisión los mecanismos de acción de las proteínas TCP de clase I en este contexto.

Por último, dado que los genes estudiados pertenecen a la familia de factores de transcripción TCP, se decidió explorar la existencia de una posible interacción entre BRC1 y TCP15. Esto resulta aún más interesante considerando que, si bien se observó que las proteínas TCP son capaces de heterodimerizar entre sí [280], [285], [289], [300], hasta el momento no se han planteado interacciones entre proteínas TCP de las clases I y II. Para analizar la posible interacción, se realizó un ensayo de FRET y un doble híbrido en levaduras, en donde obtuvimos resultados positivos para la interacción entre BRC1 y TCP15. Esto plantea un modo adicional de regulación posible entre estas dos proteínas. Por un lado, TCP14 y TCP15 podrían regular la expresión de *BRC1* de manera negativa a nivel transcripcional. Por otro lado, podría existir una regulación mediante interacción proteína-proteína que impida la expresión de sus genes blanco, mediante la formación de heterodímeros inactivos, o que provoque la regulación de un nuevo grupo de genes, mediante cambios en la especificidad y/o afinidad de unión a diferentes secuencias de ADN. Esto abre un panorama interesante y nuevas vías de regulación posibles para ser estudiadas en el laboratorio.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

## 10. CONCLUSIONES GENERALES

Como conclusión general de este trabajo de Tesis, podemos remarcar que, en primer lugar, hemos logrado dilucidar el rol de las proteínas TCP de clase I en la elongación del filamento de los estambres, vinculando esta vía regulatoria a la vía de las giberelinas. Por otro lado, hallamos un nuevo gen blanco de TCP15, *SAUR63*, perteneciente a una familia de genes de respuesta rápida a auxinas. Sin embargo, en esta Tesis, demostramos que la regulación de las TCP sobre este gen se lleva a cabo por una vía independiente de esta hormona, al menos en flores.

En segundo lugar, incorporamos a *KNAT1*, factor de transcripción de la familia KNOX, en esta vía de regulación. Hasta el momento, no se había descrito el rol de esta proteína en el crecimiento tardío del filamento del estambre. Aquí, no sólo demostramos que inhibe la elongación del órgano en estudio, sino que también dilucidamos parcialmente su mecanismo de acción, ya que encontramos que actúa corriente arriba de *TCP15* y de *GA20ox1*, reprimiendo su expresión (en el caso de *TCP15* de manera directa).

Por último, hallamos una nueva función de las proteínas TCP de clase I en el desarrollo de las ramificaciones laterales. Encontramos que éstas promueven el crecimiento y desarrollo de las yemas axilares afectando, por tanto, la arquitectura de la planta. De manera interesante, ya se ha demostrado que *BRC1*, miembro de la subfamilia TCP de clase II, inhibe el crecimiento de las ramas laterales. En este trabajo, hallamos que las proteínas TCP de clase I promueven el crecimiento de las ramas laterales reprimiendo, de manera indirecta, la expresión de *BRC1*. Por otro lado, encontramos que *TCP15* y *BRC1* son capaces de interactuar, lo cual incorpora un dato novedoso dado que no se ha reportado, hasta el momento, interacción entre proteínas TCP de diferentes clases. Esta interacción se propone como un posible punto de regulación que deberá ser investigado en más detalle.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- [1] GC Ingram, R Waites (2006) Keeping it together: co-ordinating plant growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9 (1):12–20.
- [2] T LAZAR (2003) Taiz, L. and Zeiger, E. Plant physiology. 3rd edn. *Ann. Bot.* 91 (6):750–751.
- [3] DW Meinke, JM Cherry, C Dean, SD Rounsley, M Koornneef (1998) Arabidopsis thaliana: A model plant for genome analysis. *Science* 282 (5389):662–682.
- [4] F Laibach (1943) Arabidopsis thaliana (L.) Heyhn. als Object für Genetische und Entwicklungs-Physiologische Untersuchungen. *Bot. Arch.* 44:439–455.
- [5] M Koornneef, B Scheres (2001) *Arabidopsis thaliana* as an Experimental Organism, En: *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- [6] T Araki (2001) Transition from vegetative to reproductive phase, *Current Opinion in Plant Biology*, 4 (1). Elsevier Ltd, :63–68, 2001.
- [7] M Blümel, N Dally, C Jung (2015) Flowering time regulation in crops-what did we learn from Arabidopsis?, *Current Opinion in Biotechnology*, 32. Elsevier Ltd, :121–129, Apr-2015.
- [8] U Krämer (2015) Planting molecular functions in an ecological context with arabidopsis thaliana. *Elife* 2015 (4).
- [9] DR Smyth, JL Bowman, EM Meyerowitz (1990) Early Flower Development in Arabidopsis, American Society of Plant Physiologists, 1990.
- [10] AS Rijpkema, M Vandenbussche, R Koes, K Heijmans, T Gerats (2010) Variations on a theme: Changes in the floral ABCs in angiosperms, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21 (1). Elsevier Ltd, :100–107, Feb-2010.
- [11] C Smaczniak, RGH Immink, JM Muiño, R Blanvillain, M Busscher, J Busscher-Lange, QD Dinh, S Liu, AH Westphal, S Boeren, F Parcy, L Xu, CC Carles, GC Angenent, K Kaufmann (2012) Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in Arabidopsis flower development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (5):1560–1565.
- [12] S Tashiro, CE Tian, MK Watahiki, KT Yamamoto (2009) Changes in growth kinetics of stamen filaments cause inefficient pollination in massugu2, an auxin insensitive, dominant mutant of Arabidopsis thaliana. *Physiol. Plant.* 137 (2):175–187.
- [13] M Cardarelli, V Cecchetti (2014) Auxin polar transport in stamen formation and development: How many actors? *Front. Plant Sci.* 5 (JUL):1–13.
- [14] ER Alvarez-Buylla, M Benítez, A Corvera-Poiré, Á Chaos Cador, S de Folter, A Gamboa de Buen, A Garay-Arroyo, B García-Ponce, F Jaimes-Miranda, R V. Pérez-Ruiz, A Piñeyro-Nelson, YE Sánchez-Corrales (2010) Flower Development. *Arab. B.* 8 (8):e0127.
- [15] JP Stafstrom, IM Sussex (1988) Patterns of protein synthesis in dormant and growing vegetative buds of pea. *Planta* 176 (4):497–505.

- [16] S Shimizu-Sato, H Mori (2001) Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiol.* 127 (4):1405–1413.
- [17] CA Beveridge, JL Weller, SR Singer, JMI Hofer (2003) Axillary meristem development. Budding relationships between networks controlling flowering, branching, and photoperiod responsiveness, *Plant Physiology*, 131 (3). *Plant Physiol.* :927–934, Mar-2003.
- [18] P McSteen, O Leyser (2005) SHOOT BRANCHING. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56 (1):353–374.
- [19] JA Aguilar-Martínez, C Poza-Carrión, P Cubas (2007) Arabidopsis Branched1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *Plant Cell* 19 (2):458–472.
- [20] E Khayat, N Zieslin (1982) Environmental Factors involved in the Regulation of Sprouting of Basal Buds in Rose Plants. *J. Exp. Bot.* 33 (6):1286–1292.
- [21] B Moulia, C Loup, M Chartier, JM Allirand, C Edelin (1999) Dynamics of architectural development of isolated plants of maize (*Zea mays* L.), in a non-limiting environment: The branching potential of modern maize. *Ann. Bot.* 84 (5):645–656.
- [22] NH Battey (2000) Aspects of seasonality. *J. Exp. Bot.* 51 (352):1769–1780.
- [23] RWF Cameron, RS Harrison-Murray, CJ Atkinson, HL Judd (2006) Regulated deficit irrigation - A means to control growth in woody ornamentals. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 81 (3):435–443.
- [24] L Huché-Théliér, R Boumaza, S Demotes-Mainard, A Canet, R Symoneaux, O Douillet, V Guérin (2011) Nitrogen deficiency increases basal branching and modifies visual quality of the rose bushes. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 130 (1):325–334.
- [25] S Demotes-Mainard, L Huché-Théliér, P Morel, R Boumaza, V Guérin, S Sakr (2013) Temporary water restriction or light intensity limitation promotes branching in rose bush. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 150:432–440.
- [26] S Djennane, L Hibrand-Saint Oyant, K Kawamura, D Lalanne, M Laffaire, T Thouroude, S Chalain, S Sakr, R Boumaza, F Foucher, N Leduc (2014) Impacts of light and temperature on shoot branching gradient and expression of strigolactone synthesis and signalling genes in rose. *Plant, Cell Environ.* 37 (3):742–757.
- [27] R Pierik, C Testerink (2014) The art of being flexible: How to escape from shade, Salt, And drought1. *Plant Physiol.* 166 (1):5–22.
- [28] N Leduc, H Roman, F Barbier, T Péron, L Huché-Théliér, J Lothier, S Demotes-Mainard, S Sakr (2014) Light signaling in bud outgrowth and branching in plants. *Plants* 3 (2):223–250.
- [29] JJ Casal, RA Sanchez, VA Deregibus (1986) The effect of plant density on tillering: The involvement of R/FR ratio and the proportion of radiation intercepted per plant. *Environ. Exp. Bot.* 26 (4):365–371.
- [30] CL Ballaré, JJ Casal (2000) Light signals perceived by crop and weed plants. *F. Crop. Res.* 67 (2):149–160.
- [31] KA Franklin (2008) Shade avoidance, *New Phytologist*, 179 (4). :930–944, Sep-2008.
- [32] SA Finlayson, SR Krishnareddy, TH Kebrom, JJ Casal (2010) Phytochrome regulation of branching in



- arabidopsis. *Plant Physiol.* 152 (4):1914–1927.
- [33] TH Kebrom, TP Brutnell, SA Finlayson (2010) Suppression of sorghum axillary bud outgrowth by shade, phyB and defoliation signalling pathways. *Plant, Cell Environ.* 33 (1):48–58.
- [34] E González-Grandío, C Poza-Carrión, COS Sorzano, P Cubas (2013) Branched1 promotes axillary bud dormancy in response to shade in Arabidopsis. *Plant Cell* 25 (3):834–850.
- [35] SD Jackson (2009) Plant responses to photoperiod, *New Phytologist*, 181 (3). John Wiley & Sons, Ltd, :517–531, Feb-2009.
- [36] K V. Thimann, F Skoog (1933) Studies on the Growth Hormone of Plants: III. The Inhibiting Action of the Growth Substance on Bud Development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 19 (7):714–716.
- [37] R SNOW (1937) ON THE NATURE OF CORRELATIVE INHIBITION. *New Phytol.* 36 (4):283–300.
- [38] DA Morris (1977) Transport of exogenous auxin in two-branched dwarf pea seedlings (*Pisum sativum* L.) - Some implications for polarity and apical dominance. *Planta* 136 (1):91–96.
- [39] M Wickson, K V. Thimann (1958) The Antagonism of Auxin and Kinetin in Apical Dominance. *Physiol. Plant.* 11 (1):62–74.
- [40] T Sachs, K V. Thimann (1967) The Role of Auxins and Cytokinins in the Release of Buds From Dominance. *Am. J. Bot.* 54 (1):136.
- [41] CA Beveridge, JJ Ross, IC Murfet (1996) Branching in pea: Action of genes Rms3 and Rms4. *Plant Physiol.* 110 (3):859–865.
- [42] CA Beveridge, CM Symons, LC Murfet, JJ Ross, C Rameau (1997) The rms7 Mutant of Pea Has Elevated Indole-3-Acetic Acid Levels and Reduced Root-Sap Zeatin Riboside Content but Increased Branching, American Society of Plant Biologists, 1997.
- [43] T Arite, H Iwata, K Ohshima, M Maekawa, M Nakajima, M Kojima, H Sakakibara, J Kyojuka (2007) DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J.* 51 (6):1019–1029.
- [44] A T, U M, I S, H A, M M, Y S, K J (2009) d14, a Strigolactone-Insensitive Mutant of Rice, Shows an Accelerated Outgrowth of Tillers. *Plant Cell Physiol.* 50 (8).
- [45] CA Beveridge, EA Dun, C Rameau (2009) Pea has its tendrils in branching discoveries spanning a century from auxin to strigolactones. *Plant Physiol.* 151 (3):985–990.
- [46] C Napoli (1996) Highly branched phenotype of the petunia dad1-1 mutant is reversed by grafting. *Plant Physiol.* 111 (1):27–37.
- [47] P Stirnberg, K van de Sande, HM O Leyser (2002) MAX1 and MAX2 control shoot branching, 2002.
- [48] K Sorefan, J Booker, K Haurogné, M Goussot, K Bainbridge, E Foo, S Chatfield, S Ward, C Beveridge, C Rameau, O Leyser (2003) MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. *Genes Dev.* 17 (12):1469–1474.
- [49] J Booker, M Auldridge, S Wills, D McCarty, H Klee, O Leyser (2004) MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr. Biol.* 14

- (14):1232–1238.
- [50] J Booker, T Sieberer, W Wright, L Williamson, B Willett, P Stirnberg, C Turnbull, M Srinivasan, P Goddard, O Leyser (2005) MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev. Cell* 8 (3):443–449.
- [51] KC Snowden, AJ Simkin, BJ Janssen, KR Templeton, HM Loucas, JL Simons, S Karunairetnam, AP Gleave, DG Clark, HJ Klee (2005) The Decreased apical dominance1/Petunia hybrida Carotenoid Cleavage Dioxygenase8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell* 17 (3):746–759.
- [52] J Zou, S Zhang, W Zhang, G Li, Z Chen, W Zhai, X Zhao, X Pan, Q Xie, L Zhu (2006) The rice HIGH-TILLERING DWARF1 encoding an ortholog of Arabidopsis MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *Plant J.* 48 (5):687–698.
- [53] JJ Ross, IC Murfet, JB Reid (1993) Distribution of gibberellins in *Lathyrus odoratus* L. and their role in leaf growth. *Plant Physiol.* 102 (2):603–608.
- [54] AL Silverstone, PYA Mak, EC Martínez, TP Sun (1997) The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 146 (3):1087–1099.
- [55] SF Lo, SY Yang, KT Chen, YI Hsing, JAD Zeevaart, LJ Chen, SM Yu (2008) A novel class of gibberellin 2-oxidases control semidwarfism, tillering, and root development in rice. *Plant Cell* 20 (10):2603–2618.
- [56] MG Mason, JJ Ross, BA Babst, BN Wienclaw, CA Beveridge (2014) Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (16):6092–6097.
- [57] T Sun, F Gubler (2004) MOLECULAR MECHANISM OF GIBBERELLIN SIGNALING IN PLANTS. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55 (1):197–223.
- [58] LM Hartweck (2008) Gibberellin signaling, *Planta*, 229 (1). *Planta*, :1–13, Dec-2008.
- [59] K Hirano, M Ueguchi-Tanaka, M Matsuoka (2008) GID1-mediated gibberellin signaling in plants, *Trends in Plant Science*, 13 (4). *Trends Plant Sci.* :192–199, Apr-2008.
- [60] H Itoh, M Ueguchi-Tanaka, M Matsuoka (2008) Chapter 6 Molecular Biology of Gibberellins Signaling in Higher Plants, *International Review of Cell and Molecular Biology*, 268. *Int Rev Cell Mol Biol.* :191–221, 2008.
- [61] S Yamaguchi (2008) Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 (1):225–251.
- [62] NP Harberd, E Belfield, Y Yasumura The Angiosperm Gibberellin-GID1-DELLA Growth Regulatory Mechanism: How an “Inhibitor of an Inhibitor” Enables Flexible Response to Fluctuating Environments. .
- [63] C Schwechheimer, BC Willige (2009) Shedding light on gibberellic acid signalling, *Current Opinion in Plant Biology*, 12 (1). *Curr Opin Plant Biol.* :57–62, Feb-2009.
- [64] ARG Plackett, SG Thomas, ZA Wilson, P Hedden (2011) Gibberellin control of stamen development: A fertile field. *Trends Plant Sci.* 16 (10):568–578.
- [65] T Sun (2008) Gibberellin Metabolism, Perception and Signaling Pathways in *Arabidopsis*. *Arab. B.*

6:e0103.

- [66] P Hedden, AL Phillips (2000) Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes, *Trends in Plant Science*, 5 (12). Elsevier Ltd, :523–530, 2000.
- [67] P Hedden, SG Thomas (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation, *Biochemical Journal*, 444 (1). Biochem J, :11–25, May-2012.
- [68] S Salazar-Cerezo, N Martínez-Montiel, J García-Sánchez, R Pérez-y-Terrón, RD Martínez-Contreras (2018) Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria, *Microbiological Research*, 208. Elsevier GmbH, :85–98, Mar-2018.
- [69] M Ueguchi-Tanaka, M Ashikari, M Nakajima, H Itoh, E Katoh, M Kobayashi, TY Chow, YIC Hsing, H Kitano, I Yamaguchi, M Matsuoka (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437 (7059):693–698.
- [70] J Griffiths, K Murase, I Rieu, R Zentella, ZL Zhang, SJ Powers, F Gong, AL Phillips, P Hedden, TP Sun, SG Thomas (2006) Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18 (12):3399–3414.
- [71] M Ueguchi-Tanaka, M Nakajima, E Katoh, H Ohmiya, K Asano, S Saji, X Hongyu, M Ashikari, H Kitano, I Yamaguchi, M Matsuoka (2007) Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *Plant Cell* 19 (7):2140–2155.
- [72] K Murase, Y Hirano, TP Sun, T Hakoshima (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* 456 (7221):459–463.
- [73] TP Sun (2011) The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants, *Current Biology*, 21 (9). Curr Biol, May-2011.
- [74] KE King, T Moritz, NP Harberd Gibberellins Are Not Required for Normal Stem Growth in *Arabidopsis thaliana* in the Absence of GAI and RGA.
- [75] A Dill, TP Sun (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 159 (2):777–785.
- [76] S Lee, H Cheng, KE King, W Wang, Y He, A Hussain, J Lo, NP Harberd, J Peng (2002) Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev.* 16 (5):646–658.
- [77] CK Wen, C Chang (2002) *Arabidopsis* RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* 14 (1):87–100.
- [78] Y Zhao (2010) Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61 (1):49–64.
- [79] S Philosoph-Hadas, H Friedman, S Meir (2005) Gravitropic Bending and Plant Hormones, *Vitamins and Hormones*, 72. Academic Press, :31–78, Jan-2005.
- [80] M Quint, WM Gray (2006) Auxin signaling, *Current Opinion in Plant Biology*, 9 (5). Elsevier Current Trends, :448–453, Oct-2006.

- [81] WD Teale, IA Paponov, K Palme (2006) Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7 (11). Nature Publishing Group, :847–859, Nov-2006.
- [82] EJ Chapman, M Estelle (2009) Mechanism of Auxin-Regulated Gene Expression in Plants. *Annu. Rev. Genet.* 43 (1):265–285.
- [83] S Vanneste, J Friml (2009) Auxin: A Trigger for Change in Plant Development, *Cell*, 136 (6). Cell Press, :1005–1016, Mar-2009.
- [84] J Normanly (2010) Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism., *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2 (1). Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010.
- [85] J Ludwig-Müller (2011) Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. *J. Exp. Bot.* 62 (6):1757–1773.
- [86] Y Mano, K Nemoto (2012) The pathway of auxin biosynthesis in plants, *Journal of Experimental Botany*, 63 (8). J Exp Bot, :2853–2872, May-2012.
- [87] J Brumos, JM Alonso, AN Stepanova (2014) Genetic aspects of auxin biosynthesis and its regulation, *Physiologia Plantarum*, 151 (1). Blackwell Publishing Ltd, :3–12, 2014.
- [88] K Ljung (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Dev.* 140 (5):943–950.
- [89] ND Tivendale, JJ Ross, JD Cohen (2014) The shifting paradigms of auxin biosynthesis, *Trends in Plant Science*, 19 (1). Trends Plant Sci, :44–51, Jan-2014.
- [90] AW Woodward, B Bartel (2005) Auxin: Regulation, action, and interaction, *Annals of Botany*, 95 (5). Ann Bot, :707–735, 2005.
- [91] DA Korasick, TA Enders, LC Strader (2013) Auxin biosynthesis and storage forms, *Journal of Experimental Botany*, 64 (9). :2541–2555, Jun-2013.
- [92] RT Davies, DH Goetz, J Lasswell, MN Anderson, B Bartel (1999) IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from Arabidopsis. *Plant Cell* 11 (3):365–376.
- [93] RA Rampey, S LeClere, M Kowalczyk, K Ljung, G Sandberg, B Bartel (2004) A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during arabidopsis germination. *Plant Physiol.* 135 (2):978–988.
- [94] BK Zolman, A Yoder, B Bartel (2000) Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in arabidopsis thaliana reveals four mutant classes. *Genetics* 156 (3):1323–1337.
- [95] BK Zolman, N Martinez, A Millius, AR Adham, B Bartel (2008) Identification and characterization of Arabidopsis indole-3-butyric acid response mutants defective in novel peroxisomal enzymes. *Genetics* 180 (1):237–251.
- [96] AD Wright, MB Sampson, MG Neuffer, L Michalczuk, JP Slovin, JD Cohen (1991) Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize orange pericarp, a tryptophan auxotroph. *Science* 254 (5034):998–1000.
- [97] J Normanly, JD Cohen, GR Fink (1993) Arabidopsis thaliana auxotrophs reveal a tryptophan-

- independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 (21):10355–10359.
- [98] Y Zhao (2014) Auxin Biosynthesis. *Arab. B.* 12:e0173.
- [99] M Salehin, R Bagchi, M Estelle (2015) ScfTIR1/AFB-based auxin perception: Mechanism and role in plant growth and development. *Plant Cell* 27 (1):9–19.
- [100] H Szemenyei, M Hannon, JA Long (2008) TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science* 319 (5868):1384–1386.
- [101] L Luo, J Zeng, H Wu, Z Tian, Z Zhao (2018) A Molecular Framework for Auxin-Controlled Homeostasis of Shoot Stem Cells in Arabidopsis. *Mol. Plant* 11 (7):899–913.
- [102] J Kim, K Harter, A Theologis (1997) Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (22):11786–11791.
- [103] TJ Guilfoyle, G Hagen (2012) Getting a grasp on domain III/IV responsible for Auxin Response Factor-IAA protein interactions, *Plant Science*, 190. Elsevier, :82–88, Jul-2012.
- [104] DR Boer, A Freire-Rios, WAM Van Den Berg, T Saaki, IW Manfield, S Kepinski, I López-Vidriero, JM Franco-Zorrilla, SC De Vries, R Solano, D Weijers, M Coll (2014) Structural basis for DNA binding specificity by the auxin-dependent ARF transcription factors. *Cell* 156 (3):577–589.
- [105] O Leyser (2018) Auxin signaling, *Plant Physiology*, 176 (1). American Society of Plant Biologists, :465–479, Jan-2018.
- [106] G Hagen, T Guilfoyle (2002) Auxin-responsive gene expression: Genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol. Biol.* 49 (3–4):373–385.
- [107] PE Staswick, B Serban, M Rowe, I Tiryaki, MT Maldonado, MC Maldonado, W Suza (2005) Characterization of an arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* 17 (2):616–627.
- [108] N Stortenbeker, M Bemer (2019) The SAUR gene family: The plant’s toolbox for adaptation of growth and development, *Journal of Experimental Botany*, 70 (1). Oxford University Press, :17–27, Jan-2019.
- [109] NC Avanci, DD Luche, GH Goldman, MH Goldman (2010) Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genet. Mol. Res.* 9 (1):484–505.
- [110] C Delker, I Stenzel, B Hause, O Miersch, I Feussner, C Wasternack (2006) Jasmonate Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* - Enzymes, Products, Regulation. *Plant Biol* 8 (03):297–306.
- [111] IF Acosta, EE Farmer (2010) Jasmonates. *Arab. B.* 8:e0129.
- [112] C Wasternack (2007) Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Ann. Bot.* 100 (4):681.
- [113] Y Yan, E Borrego, M V. (2013) Jasmonate Biosynthesis, Perception and Function in Plant Development and Stress Responses, En: *Lipid Metabolism*, InTech,.
- [114] A Chini, S Fonseca, G Fernández, B Adie, JM Chico, O Lorenzo, G García-Casado, I López-Vidriero, FM Lozano, MR Ponce, JL Micol, R Solano (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in

- jasmonate signalling. *Nature* 448 (7154):666–671.
- [115] L Katsir, HS Chung, AJ Koo, GA Howe (2008) Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11 (4):428–435.
- [116] CE Cook, LP Whichard, B Turner, ME Wall, GH Egley (1966) Germination of witchweed (*striga lutea* Lour.): Isolation and properties of a potent stimulant. *Science* 154 (3753):1189–1190.
- [117] V Gomez-Roldan, S Fermas, PB Brewer, V Puech-Pagès, EA Dun, JP Pillot, F Letisse, R Matusova, S Danoun, JC Portais, H Bouwmeester, G Bécard, CA Beveridge, C Rameau, SF Rochange (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455 (7210):189–194.
- [118] M Umehara, A Hanada, S Yoshida, K Akiyama, T Arite, N Takeda-Kamiya, H Magome, Y Kamiya, K Shirasu, K Yoneyama, J Kyojuka, S Yamaguchi (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455 (7210):195–200.
- [119] J Agusti, S Herold, M Schwarz, P Sanchez, K Ljung, EA Dun, PB Brewer, CA Beveridge, T Sieberer, EM Sehr, T Greb (2011) Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (50):20242–20247.
- [120] A Rasmussen, MG Mason, C de Cuyper, PB Brewer, S Herold, J Agusti, D Geelen, T Greb, S Goormachtig, T Beeckman, CA Beveridge (2012) Strigolactones suppress adventitious rooting in *Arabidopsis* and pea. *Plant Physiol.* 158 (4):1976–1987.
- [121] Y Kapulnik, PM Delaux, N Resnick, E Mayzlish-Gati, S Wininger, C Bhattacharya, N Séjalon-Delmas, JP Combier, G Bécard, E Belausov, T Beeckman, E Dor, J Hershshorn, H Koltai (2011) Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta* 233 (1):209–216.
- [122] C Ruyter-Spira, W Kohlen, T Charnikhova, A van Zeijl, L van Bezouwen, N de Ruijter, C Cardoso, JA Lopez-Raez, R Matusova, R Bours, F Verstappen, H Bouwmeester (2011) Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in *Arabidopsis*: Another belowground role for strigolactones? *Plant Physiol.* 155 (2):721–734.
- [123] H Koltai (2013) Strigolactones activate different hormonal pathways for regulation of root development in response to phosphate growth conditions, *Annals of Botany*, 112 (2). Oxford Academic, :409–415, Jul-2013.
- [124] H Proust, B Hoffmann, X Xie, K Yoneyama, DG Schaefer, K Yoneyama, F Nogué, C Rameau (2011) Strigolactones regulate protonema branching and act as a quorum sensing-like signal in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* 138 (8):1531–1539.
- [125] PM Delaux, X Xie, RE Timme, V Puech-Pages, C Dunand, E Lecompte, CF Delwiche, K Yoneyama, G Bécard, N Séjalon-Delmas (2012) Origin of strigolactones in the green lineage. *New Phytol.* 195 (4):857–871.
- [126] B Zwanenburg, T Pospíšil (2013) Structure and activity of strigolactones: New plant hormones with a rich future, *Molecular Plant*, 6 (1). Oxford University Press, :38–62, Jan-2013.
- [127] X Xie, K Yoneyama, K Yoneyama (2010) The strigolactone story. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:93–117.

- [128] J Liang, L Zhao, R Challis, O Leyser (2010) Strigolactone regulation of shoot branching in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*). *J. Exp. Bot.* 61 (11):3069–3078.
- [129] H Koltai, E Dor, J Hershenhorn, DM Joel, S Weininger, S Lekalla, H Shealtiel, C Bhattacharya, E Eliahu, N Resnick, R Barg, Y Kapulnik (2010) Strigolactones' effect on root growth and root-hair elongation may be mediated by auxin-efflux carriers. *J. Plant Growth Regul.* 29 (2):129–136.
- [130] R Matusova, K Rani, FWA Verstappen, MCR Franssen, MH Beale, HJ Bouwmeester (2005) The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobancha* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol.* 139 (2):920–934.
- [131] L Hao, W Renxiao, Q Qian, Y Meixian, M Xiangbing, F Zhiming, Y Cunyu, J Biao, S Zhen, L Jiayang, W Yonghong (2009) DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *Plant Cell* 21 (5):1512–1525.
- [132] MT Waters, DC Nelson, A Scaffidi, GR Flematti, YK Sun, KW Dixon, SM Smith (2012) Specialisation within the DWARF14 protein family confers distinct responses to karrikins and strigolactones in *Arabidopsis*. *Development* 139 (7):1285–1295.
- [133] MT Waters, PB Brewer, JD Bussell, SM Smith, CA Beveridge (2012) The *Arabidopsis* ortholog of rice DWARF27 acts upstream of MAX1 in the control of plant development by Strigolactones. *Plant Physiol.* 159 (3):1073–1085.
- [134] A Alder, M Jamil, M Marzorati, M Bruno, M Vermathen, P Bigler, S Ghisla, H Bouwmeester, P Beyer, S Al-Babili (2012) The path from  $\beta$ -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science* 335 (6074):1348–1351.
- [135] W Kohlen, T Charnikhova, M Lammers, T Pollina, P Tóth, I Haider, MJ Pozo, RA de Maagd, C Ruyter-Spira, HJ Bouwmeester, JA López-Ráez (2012) The tomato carotenoid cleavage dioxygenase8 (SICCD8) regulates rhizosphere signaling, plant architecture and affects reproductive development through strigolactone biosynthesis. *New Phytol.* 196 (2):535–547.
- [136] Y Zhang, ADJ van Dijk, A Scaffidi, GR Flematti, M Hofmann, T Charnikhova, F Verstappen, J Hepworth, S van der Krol, O Leyser, SM Smith, B Zwanenburg, S Al-Babili, C Ruyter-Spira, HJ Bouwmeester (2014) Rice cytochrome P450 MAX1 homologs catalyze distinct steps in strigolactone biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* 10 (12):1028–1033.
- [137] Y Seto, S Yamaguchi (2014) Strigolactone biosynthesis and perception. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21:1–6.
- [138] S Abe, A Sado, K Tanaka, T Kisugi, K Asami, S Ota, H Il Kim, K Yoneyama, X Xie, T Ohnishi, Y Seto, S Yamaguchi, K Akiyama, K Yoneyama, T Nomura (2014) Carlactone is converted to carlactonoic acid by MAX1 in *Arabidopsis* and its methyl ester can directly interact with AtD14 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (50):18084–18089.
- [139] PB Brewer, K Yoneyama, F Filardo, E Meyers, A Scaffidi, T Frickey, K Akiyama, Y Seto, EA Dun, JE Cremer, SC Kerr, MT Waters, GR Flematti, MG Mason, G Weiller, S Yamaguchi, T Nomura, SM Smith, K Yoneyama, CA Beveridge (2016) Lateral branching oxidoreductase acts in the final stages of

- strigolactone biosynthesis in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (22):6301–6306.
- [140] T Arite, M Umehara, S Ishikawa, A Hanada, M Maekawa, S Yamaguchi, J Kyojuka (2009) D14, a strigolactone-Insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. *Plant Cell Physiol.* 50 (8):1416–1424.
- [141] C Hamiaux, RSM Drummond, BJ Janssen, SE Ledger, JM Cooney, RD Newcomb, KC Snowden (2012) DAD2 is an  $\alpha/\beta$  hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactone. *Curr. Biol.* 22 (21):2032–2036.
- [142] M Kagiya, Y Hirano, T Mori, SY Kim, J Kyojuka, Y Seto, S Yamaguchi, T Hakoshima (2013) Structures of D14 and D14L in the strigolactone and karrikin signaling pathways. *Genes to Cells* 18 (2):147–160.
- [143] H Nakamura, YL Xue, T Miyakawa, F Hou, HM Qin, K Fukui, X Shi, E Ito, S Ito, SH Park, Y Miyauchi, A Asano, N Totsuka, T Ueda, M Tanokura, T Asami (2013) Molecular mechanism of strigolactone perception by DWARF14. *Nat. Commun.* 4.
- [144] A Scaffidi, MT Waters, CS Bond, KW Dixon, SM Smith, EL Ghisalberti, GR Flematti (2012) Exploring the molecular mechanism of karrikins and strigolactones. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 22 (11):3743–3746.
- [145] S Ishikawa, M Maekawa, T Arite, K Onishi, I Takamura, J Kyojuka (2005) Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol.* 46 (1):79–86.
- [146] X Johnson, T Brcich, EA Dun, M Goussot, K Haurogné, CA Beveridge, C Rameau (2006) Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiol.* 142 (3):1014–1026.
- [147] N Braun, A de Saint Germain, JP Pillot, S Boutet-Mercey, M Dalmais, I Antoniadi, X Li, A Maia-Grondard, C le Signor, N Bouteiller, D Luo, A Bendahmane, C Turnbull, C Rameau (2012) The pea TCP transcription factor PsBRC1 acts downstream of strigolactones to control shoot branching. *Plant Physiol.* 158 (1):225–238.
- [148] K Minakuchi, H Kameoka, N Yasuno, M Umehara, L Luo, K Kobayashi, A Hanada, K Ueno, T Asami, S Yamaguchi, J Kyojuka (2010) FINE CULM1 (FC1) works downstream of strigolactones to inhibit the outgrowth of axillary buds in rice. *Plant Cell Physiol.* 51 (7):1127–1135.
- [149] M Marzec (2016) Perception and signaling of strigolactones. *Front. Plant Sci.* 7 (AUG2016):1260.
- [150] S Song, T Qi, H Huang, D Xie (2013) Regulation of stamen development by coordinated actions of jasmonate, auxin, and gibberellin in arabidopsis. *Mol. Plant* 6 (4):1065–1073.
- [151] TJ Guilfoyle, G Hagen (2007) Auxin response factors, *Current Opinion in Plant Biology*, 10 (5). Elsevier Current Trends, :453–460, Oct-2007.
- [152] X Gao, S Nagawa, G Wang, Z Yang (2008) Cell polarity signaling: Focus on polar auxin transport, *Molecular Plant*, 1 (6). Oxford University Press, :899–909, Nov-2008.
- [153] K Mockaitis, M Estelle (2008) Auxin Receptors and Plant Development: A New Signaling Paradigm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24 (1):55–80.
- [154] Y Zhao (2012) Auxin biosynthesis: A simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-Acetic



- acid in plants, in *Molecular Plant*, 2012, 5 (2), :334–338.
- [155] M Geisler, JJ Blakeslee, R Bouchard, OR Lee, V Vincenzetti, A Bandyopadhyay, B Titapiwatanakun, WA Peer, A Bailly, EL Richards, KFK Ejendal, AP Smith, C Baroux, U Grossniklaus, A Müller, CA Hrycyna, R Dudler, AS Murphy, E Martinoia (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J.* 44 (2):179–194.
- [156] Y Cheng, X Dai, Y Zhao (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes Dev.* 20 (13):1790–1799.
- [157] V Cecchetti, MM Altamura, G Falasca, P Costantino, M Cardarelli (2008) Auxin regulates Arabidopsis anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* 20 (7):1760–1774.
- [158] V Cecchetti, MM Altamura, P Brunetti, V Petrocelli, G Falasca, K Ljung, P Costantino, M Cardarelli (2013) Auxin controls Arabidopsis anther dehiscence by regulating endothecium lignification and jasmonic acid biosynthesis. *Plant J.* 74 (3):411–422.
- [159] T Uehara, Y Okushima, T Mimura, M Tasaka, H Fukaki (2008) Domain II mutations in CRANE/IAA18 suppress lateral root formation and affect shoot development in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 49 (7):1025–1038.
- [160] MA Rinaldi, J Liu, TA Enders, B Bartel, LC Strader (2012) A gain-of-function mutation in IAA16 confers reduced responses to auxin and abscisic acid and impedes plant growth and fertility. *Plant Mol. Biol.* 79 (4–5):359–373.
- [161] P Nagpal, CM Ellis, H Weber, SE Ploense, LS Barkawi, TJ Guilfoyle, G Hagen, JM Alonso, JD Cohen, EE Farmer, JR Ecker, JW Reed (2005) Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* 132 (18):4107–4118.
- [162] R Tabata, M Ikezaki, T Fujibe, M Aida, CE Tian, Y Ueno, KT Yamamoto, Y Machida, K Nakamura, S Ishiguro (2010) Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 KNOX genes. *Plant Cell Physiol.* 51 (1):164–175.
- [163] PH Reeves, CM Ellis, SE Ploense, M-F Wu, V Yadav, D Tholl, A Chételat, I Haupt, BJ Kennerley, C Hodgens, EE Farmer, P Nagpal, JW Reed (2012) A Regulatory Network for Coordinated Flower Maturation. *PLoS Genet.* 8 (2):e1002506.
- [164] R Ghelli, P Brunetti, N Napoli, A De Paolis, V Cecchetti, T Tsuge, G Serino, M Matsui, G Mele, G Rinaldi, GA Palumbo, F Barozzi, P Costantino, M Cardarelli (2018) A newly identified flower-specific splice variant of AUXIN RESPONSE FACTOR8 regulates stamen elongation and endothecium lignification in Arabidopsis. *Plant Cell* 30 (3):620–637.
- [165] V Cecchetti, D Celebrin, N Napoli, R Ghelli, P Brunetti, P Costantino, M Cardarelli (2017) An auxin maximum in the middle layer controls stamen development and pollen maturation in Arabidopsis. *New Phytol.* 213 (3):1194–1207.
- [166] S Song, T Qi, H Huang, Q Ren, D Wu, C Chang, W Peng, Y Liu, J Peng, D Xie (2011) The jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect

- jasmonate-regulated stamen development in Arabidopsis. *Plant Cell* 23 (3):1000–1013.
- [167] HY Lee, J-S Seo, JH Cho, H Jung, J-K Kim, JS Lee, S Rhee, Y Do Choi (2013) *Oryza sativa* COI Homologues Restore Jasmonate Signal Transduction in Arabidopsis coi1-1 Mutants. *PLoS One* 8 (1):e52802.
- [168] J Browse (2009) Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:183–205.
- [169] S Fonseca, JM Chico, R Solano (2009) The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module, *Current Opinion in Plant Biology*, 12 (5). Elsevier Current Trends, :539–547, Oct-2009.
- [170] X Shan, Y Zhang, W Peng, Z Wang, D Xie (2009) Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 60 (13):3849–3860.
- [171] Z Cheng, L Sun, T Qi, B Zhang, W Peng, Y Liu, D Xie (2011) The bHLH transcription factor MYC3 interacts with the jasmonate ZIM-domain proteins to mediate jasmonate response in arabidopsis. *Mol. Plant* 4 (2):279–288.
- [172] P Fernández-Calvo, A Chini, G Fernández-Barbero, JM Chico, S Gimenez-Ibanez, J Geerinck, D Eeckhout, F Schweizer, M Godoy, JM Franco-Zorrilla, L Pauwels, E Witters, MI Puga, J Paz-Ares, A Goossens, P Reymond, G de Jaeger, R Solano (2011) The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* 23 (2):701–715.
- [173] Y Niu, P Figueroa, J Browse (2011) Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 62 (6):2143–2154.
- [174] T Qi, S Song, Q Ren, D Wu, H Huang, Y Chen, M Fan, W Peng, C Ren, D Xie (2011) The jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-repeat/bHLH/MYB complexes to regulate jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 23 (5):1795–1814.
- [175] X Shan, J Wang, L Chua, D Jiang, W Peng, D Xie (2011) The role of arabidopsis rubisco activase in jasmonate-induced leaf senescence. *Plant Physiol.* 155 (2):751–764.
- [176] M McConn, J Browse (1996) The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an Arabidopsis Mutant. *Plant Cell* 8 (3):403–416.
- [177] PM Sanders, PY Lee, C Biesgen, JD Boone, TP Beals, EW Weiler, RB Goldberg (2000) The Arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell* 12 (7):1041–1061.
- [178] A Stintzi, J Browse (2000) The Arabidopsis male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (19):10625–10630.
- [179] S Ishiguro, A Kawai-Oda, J Ueda, I Nishida, K Okada (2001) The DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1 Gene Encodes a Novel Phospholipase A1 Catalyzing the Initial Step of Jasmonic Acid Biosynthesis, Which Synchronizes Pollen Maturation, Anther Dehiscence, and Flower Opening in Arabidopsis. *Plant*

*Cell* 13 (10):2191–2209.

- [180] JH Park, R Halitschke, HB Kim, IT Baldwin, KA Feldmann, R Feyereisen (2002) A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J.* 31 (1):1–12.
- [181] PE Staswick, I Tiryaki, ML Rowe (2002) Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* 14 (6):1405–1415.
- [182] PE Staswick, I Tiryaki (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugate it to isoleucine in *Arabidopsis* W inside box sign. *Plant Cell* 16 (8):2117–2127.
- [183] AL Schillmiller, AJK Koo, GA Howe (2007) Functional diversification of acyl-coenzyme A oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action. *Plant Physiol.* 143 (2):812–824.
- [184] D Caldelari, G Wang, EE Farmer, X Dong (2011) *Arabidopsis* lox3 lox4 double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest. *Plant Mol. Biol.* 75 (1):25–33.
- [185] AJK Koo, TF Cooke, GA Howe (2011) Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (22):9298–9303.
- [186] B Shin, G Choi, H Yi, S Yang, I Cho, J Kim, S Lee, N-C Paek, J-H Kim, P-S Song, G Choi (2002) AtMYB21, a gene encoding a flower-specific transcription factor, is regulated by COP1. *Plant J.* 30 (1):23–32.
- [187] A Mandaokar, B Thines, B Shin, B Markus Lange, G Choi, YJ Koo, YJ Yoo, YD Choi, G Choi, J Browse (2006) Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *Plant J.* 46 (6):984–1008.
- [188] XY Yang, JG Li, M Pei, H Gu, ZL Chen, LJ Qu (2007) Over-expression of a flower-specific transcription factor gene AtMYB24 causes aberrant anther development. *Plant Cell Rep.* 26 (2):219–228.
- [189] H Cheng, S Song, L Xiao, HM Soo, Z Cheng, D Xie, J Peng (2009) Gibberellin acts through jasmonate to control the expression of MYB21, MYB24, and MYB57 to promote stamen filament growth in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 5 (3):20–22.
- [190] A Mandaokar, J Browse (2009) MYB108 acts together with MYB24 to regulate jasmonate-mediated stamen maturation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149 (2):851–862.
- [191] J Peng (2009) Gibberellin and Jasmonate Crosstalk during Stamen Development. *J. Integr. Plant Biol.* 51 (12):1064–1070.
- [192] BJF Feys, CE Benedetti, CN Penfold, JG Turner (1994) *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* 6 (5):751–759.
- [193] B Thines, L Katsir, M Melotto, Y Niu, A Mandaokar, G Liu, K Nomura, SY He, GA Howe, J Browse (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCFCOI1 complex during jasmonate signalling. *Nature* 448 (7154):661–665.
- [194] SC Hoo, GA Howe (2009) A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a

- stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in Arabidopsis. *Plant Cell* 21 (1):131–145.
- [195] L Chua, X Shan, J Wang, W Peng, G Zhang, D Xie (2010) Proteomics Study of COI1-regulated Proteins in Arabidopsis Flower. *J. Integr. Plant Biol.* 52 (4):410–419.
- [196] DX Xie, BF Feys, S James, M Nieto-Rostro, JG Turner (1998) COI1: An Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280 (5366):1091–1094.
- [197] Sun Tai ping, Y Kamiya (1994) The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* 6 (10):1509–1518.
- [198] H Cheng, L Qin, S Lee, X Fu, DE Richards, D Cao, D Luo, NP Harberd, J Peng (2004) Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* 131 (5):1055–1064.
- [199] J Hu, MG Mitchum, N Barnaby, BT Ayele, M Ogawa, E Nam, WC Lai, A Hanada, JM Alonso, JR Ecker, SM Swain, S Yamaguchi, Y Kamiya, TP Suna (2008) Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in Arabidopsis. *Plant Cell* 20 (2):320–336.
- [200] I Rieu, O Ruiz-Rivero, N Fernandez-Garcia, J Griffiths, SJ Powers, F Gong, T Linhartova, S Eriksson, O Nilsson, SG Thomas, AL Phillips, P Hedden (2008) The gibberellin biosynthetic genes AtGA20ox1 and AtGA20ox2 act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle. *Plant J.* 53 (3):488–504.
- [201] ARG Plackett, SJ Powers, N Fernandez-Garcia, T Urbanova, Y Takebayashi, M Seo, Y Jikumaru, R Benlloch, O Nilsson, O Ruiz-Rivero, AL Phillips, ZA Wilson, SG Thomas, P Hedden (2012) Analysis of the developmental roles of the arabidopsis gibberellin 20-oxidases demonstrates that GA20ox1, -2, and -3 are the dominant paralogs. *Plant Cell* 24 (3):941–960.
- [202] J Peng, P Carol, DE Richards, KE King, RJ Cowling, GP Murphy, NP Harberd (1997) The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* 11 (23):3194–3205.
- [203] LD Pysch, JW Wysocka-Diller, C Camilleri, D Bouchez, PN Benfey (1999) The GRAS gene family in Arabidopsis: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J.* 18 (1):111–119.
- [204] P Achard, A Herr, DC Baulcombe, NP Harberd (2004) Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* 131 (14):3357–3365.
- [205] AA Millar, F Gubler (2005) The Arabidopsis GAMBYB-like Genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *Plant Cell* 17 (3):705–721.
- [206] RS Allen, J Li, MI Stahle, A Dubroué, F Gubler, AA Millar (2007) Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the Arabidopsis miR159 family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (41):16371–16376.
- [207] IDJ Phillips (1975) Apical Dominance. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 26 (1):341–367.

- [208] Z HOSOKAWA, L SHI, TK PRASAD, MG CLINE (1990) Apical Dominance Control in *Ipomoea nil*: The Influence of the Shoot Apex, Leaves and Stem. *Ann. Bot.* 65 (5):547–556.
- [209] MG Cline (1991) Apical dominance. *Bot. Rev.* 57 (4):318–358.
- [210] T Girault, F Abidi, M Sigogne, S Pelleschi-Travier, R Boumaza, S Sakr, N Leduc (2010) Sugars are under light control during bud burst in *Rosa* sp. *Plant, Cell Environ.* 33 (8):1339–1350.
- [211] C Henry, A Rabot, M Laloi, E Mortreau, M Sigogne, N Leduc, R Lemoine, S Sakr, A Vian, S Pelleschi-Travier (2011) Regulation of RhSUC2, a sucrose transporter, is correlated with the light control of bud burst in *Rosa* sp. *Plant, Cell Environ.* 34 (10):1776–1789.
- [212] A Rabot, C Henry, K Ben Baaziz, E Mortreau, W Azri, J Lothier, L Hamama, R Boummaza, N Leduc, S Pelleschi-Travier, J Le Gourrierec, S Sakr (2012) Insight into the role of sugars in bud burst under light in the rose. *Plant Cell Physiol.* 53 (6):1068–1082.
- [213] FF Barbier, JE Lunn, CA Beveridge (2015) Ready, steady, go! A sugar hit starts the race to shoot branching, *Current Opinion in Plant Biology*, 25. Elsevier Ltd, :39–45, Jun-2015.
- [214] K Ljung, RP Bhalerao, G Sandberg (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* 28 (4):465–474.
- [215] N Shinohara, C Taylor, O Leyser (2013) Strigolactone Can Promote or Inhibit Shoot Branching by Triggering Rapid Depletion of the Auxin Efflux Protein PIN1 from the Plasma Membrane. *PLoS Biol.* 11 (1).
- [216] MG Cline (1996) Exogenous auxin effects on lateral bud outgrowth in decapitated shoots. *Ann. Bot.* 78 (2):255–266.
- [217] MG Cline, SP Chatfield, O Leyser (2001) NAA restores apical dominance in the *axr3-1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 87 (1):61–65.
- [218] SE Morris, MCH Cox, JJ Ross, S Krisantini, CA Beveridge (2005) Auxin dynamics after decapitation are not correlated with the initial growth of axillary buds. *Plant Physiol.* 138 (3):1665–1672.
- [219] J Balla, P Kalousek, V Reinöhl, J Friml, S Procházka (2011) Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from axillary buds controls pea bud outgrowth. *Plant J.* 65 (4):571–577.
- [220] T Bennett, G Hines, M van Rongen, T Waldie, MG Sawchuk, E Scarpella, K Ljung, O Leyser (2016) Connective Auxin Transport in the Shoot Facilitates Communication between Shoot Apices. *PLoS Biol.* 14 (4).
- [221] P Prusinkiewicz, S Crawford, RS Smith, K Ljung, T Bennett, V Ongaro, O Leyser (2009) Control of bud activation by an auxin transport switch. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (41):17431–17436.
- [222] T SACHS (1968) On the Determination of the Pattern of Vascular Tissue in Peas. *Ann. Bot.* 32 (4):781–790.
- [223] C-J Li, F Bangerth (1999) Autoinhibition of indoleacetic acid transport in the shoots of two-branched pea (*Pisum sativum*) plants and its relationship to correlative dominance. *Physiol. Plant.* 106 (4):415–420.

- [224] MA Domagalska, O Leyser (2011) Signal integration in the control of shoot branching. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (4):211–221.
- [225] M De Jong, V Ongaro, K Ljung (2014) Auxin and Strigolactone Signaling are Required for Modulation of Arabidopsis Shoot Branching by Nitrogen Supply. *Plant Physiol.* 166 (1):384–395.
- [226] PH Rubery, AR Sheldrake (1974) Carrier-mediated auxin transport. *Planta* 118 (2):101–121.
- [227] M Adamowski, J Friml (2015) PIN-dependent auxin transport: Action, regulation, and evolution. *Plant Cell* 27 (1):20–32.
- [228] B Péret, K Swarup, A Ferguson, M Seth, Y Yang, S Dhondt, N James, I Casimiro, P Perry, A Syed, H Yang, J Reemmer, E Venison, C Howells, MA Perez-Amador, J Yun, J Alonso, GTS Beemster, L Laplaze, A Murphy, MJ Bennett, E Nielsen, R Swarup (2012) AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during arabidopsis development. *Plant Cell* 24 (7):2874–2885.
- [229] R Swarup, B Péret (2012) AUX/LAX family of auxin influx carriers-An overview, *Frontiers in Plant Science*, 3 (OCT). Frontiers Research Foundation, Oct-2012.
- [230] M Cho, HT Cho (2013) The function of ABCB transporters in auxin transport. *Plant Signal. Behav.* 8 (2).
- [231] S Crawford, N Shinohara, T Sieberer, L Williamson, G George, J Hepworth, D Müller, MA Domagalska, O Leyser (2010) Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development* 137 (17):2905–2913.
- [232] BJ Ferguson, CA Beveridge (2009) Roles for auxin, cytokinin, and strigolactone in regulating shoot branching1[C][W][OA]. *Plant Physiol.* 149 (4):1929–1944.
- [233] M Renton, J Hanan, BJ Ferguson, CA Beveridge (2012) Models of long-distance transport: how is carrier-dependent auxin transport regulated in the stem? *New Phytol.* 194 (3):704–715.
- [234] F Fichtner, FF Barbier, R Feil, M Watanabe, MG Annunziata, TG Chabikwa, R Höfgen, M Stitt, CA Beveridge, JE Lunn (2017) Trehalose 6-phosphate is involved in triggering axillary bud outgrowth in garden pea (*Pisum sativum* L.). *Plant J.* 92 (4):611–623.
- [235] HK Kim, E Van Oosterom, M Dingkuhn, D Luquet, G Hammer (2010) Regulation of tillering in sorghum: Environmental effects. *Ann. Bot.* 106 (1):57–67.
- [236] MM Alam, GL Hammer, EJ Van Oosterom, AW Cruickshank, CH Hunt, DR Jordan (2014) A physiological framework to explain genetic and environmental regulation of tillering in sorghum. *New Phytol.* 203 (1):155–167.
- [237] F Barbier, T Péron, M Lecerf, MD Perez-Garcia, Q Barrière, J Rolčík, S Boutet-Mercey, S Citerne, R Lemoine, B Porcheron, H Roman, N Leduc, J Le Gourrierc, J Bertheloot, S Sakr (2015) Sucrose is an early modulator of the key hormonal mechanisms controlling bud outgrowth in *Rosa hybrida*. *J. Exp. Bot.* 66 (9):2569–2582.
- [238] TH Kebrom, JE Mullet (2015) Photosynthetic leaf area modulates tiller bud outgrowth in sorghum. *Plant, Cell Environ.* 38 (8):1471–1478.

- [239] J Loeb, 1859-1924 (1924) Regeneration from a physico-chemical viewpoint. McGraw-Hill, 1924.
- [240] FG GREGORY, JA VEALE (1957) A reassessment of the problem of apical dominance. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11:1–20.
- [241] PB Brewer, EA Dun, BJ Ferguson, C Rameau, CA Beveridge (2009) Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and arabidopsis. *Plant Physiol.* 150 (1):482–493.
- [242] E Foo, E Bullier, M Goussot, F Foucher, C Rameau, CA Beveridge (2005) The branching gene RAMOSUS1 mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *Plant Cell* 17 (2):464–474.
- [243] A Hayward, P Stirnberg, C Beveridge, O Leyser (2009) Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. *Plant Physiol.* 151 (1):400–412.
- [244] A Nordström, P Tarkowski, D Tarkowska, R Norbaek, C Åstot, K Dolezal, G Sandberg (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (21):8039–8044.
- [245] M Tanaka, K Takei, M Kojima, H Sakakibara, H Mori (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J.* 45 (6):1028–1036.
- [246] S Shimizu-Sato, M Tanaka, H Mori (2009) Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Mol. Biol.* 69 (4):429–435.
- [247] CA Beveridge (2006) Axillary bud outgrowth: Sending a message, *Current Opinion in Plant Biology*, 9 (1). *Curr Opin Plant Biol.* :35–40, Feb-2006.
- [248] P Stirnberg, K van de Sande, HMO Leyser (2002) MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* 129 (5):1131–1141.
- [249] ME Auldridge, A Block, JT Vogel, C Dabney-Smith, I Mila, M Bouzayen, M Magallanes-Lundback, D DellaPenna, DR McCarty, HJ Klee (2006) Characterization of three members of the *Arabidopsis* carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *Plant J.* 45 (6):982–993.
- [250] HJ Bouwmeester, C Roux, J Antonio Lopez-Raez, GB Card (2007) Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Rev. TRENDS Plant Sci.* 12 (5).
- [251] T Bennett, T Sieberer, B Willett, J Booker, C Luschnig, O Leyser (2006) The *Arabidopsis* MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Curr. Biol.* 16 (6):553–563.
- [252] G Lazar, HM Goodman (2006) MAX1, a regulator of the flavonoid pathway, controls vegetative axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2):472–476.
- [253] M Seale, T Bennett, O Leyser (2017) BRC1 expression regulates bud activation potential but is not necessary or sufficient for bud growth inhibition in *arabidopsis*. *Dev.* 144 (9):1661–1673.
- [254] EA Dun, A de Saint Germain, C Rameau, CA Beveridge (2012) Antagonistic action of strigolactone and cytokinin in bud outgrowth control. *Plant Physiol.* 158 (1):487–498.
- [255] P Facella, L Lopez, F Carbone, DW Galbraith, G Giuliano, G Perrotta (2008) Diurnal and circadian

- rhythms in the tomato transcriptome and their modulation by cryptochrome photoreceptors. *PLoS One* 3 (7).
- [256] S Kidokoro, K Maruyama, K Nakashima, Y Imura, Y Narusaka, ZK Shinwari, Y Osakabe, Y Fujita, J Mizoi, K Shinozaki, K Yamaguchi-Shinozaki (2009) The phytochrome-interacting factor PIF7 negatively regulates *dreb1* expression under circadian control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 151 (4):2046–2057.
- [257] N Nakamichi (2011) Molecular mechanisms underlying the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell Physiol.* 52 (10):1709–1718.
- [258] D Staiger, R Green (2011) RNA-based regulation in the plant circadian clock, *Trends in Plant Science*, 16 (10). *Trends Plant Sci*, :517–523, Oct-2011.
- [259] J Li, G Li, H Wang, X Wang Deng (2011) Phytochrome Signaling Mechanisms. *Arab. B.* 9:e0148.
- [260] H Liu, B Liu, C Zhao, M Pepper, C Lin (2011) The action mechanisms of plant cryptochromes, *Trends in Plant Science*, 16 (12). *Trends Plant Sci*, :684–691, Dec-2011.
- [261] H Smith (1982) Light Quality, Photoperception, and Plant Strategy. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33 (1):481–518.
- [262] F Abidi, T Girault, O Douillet, G Guillemain, G Sintès, M Laffaire, H Ben Ahmed, S Smiti, L Huché-Thélier, N Leduc (2013) Blue light effects on rose photosynthesis and photomorphogenesis. *Plant Biol.* 15 (1):67–74.
- [263] TH Kebrom, BL Burson, SA Finlayson (2006) Phytochrome B represses *Teosinte Branched1* expression and induces sorghum axillary bud outgrowth in response to light signals. *Plant Physiol.* 140 (3):1109–1117.
- [264] SK Reddy, SA Finlayson (2014) Phytochrome B promotes branching in *Arabidopsis* by suppressing auxin signaling. *Plant Physiol.* 164 (3):1542–1550.
- [265] H Shen, L Zhu, QY Bu, E Huq (2012) MAX2 affects multiple hormones to promote photomorphogenesis. *Mol. Plant* 5 (3):750–762.
- [266] P Stirnberg, IJ Furner, HM Ottoline Leyser (2007) MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. *Plant J.* 50 (1):80–94.
- [267] T Waldie, H McCulloch, O Leyser (2014) Strigolactones and the control of plant development: Lessons from shoot branching. *Plant J.* 79 (4):607–622.
- [268] GA Bartlett, WR Remphrey (1998) The effect of reduced quantities of photosynthetically active radiation on *Fraxinus pennsylvanica* growth and architecture. *Can. J. Bot.* 76 (8):1359–1365.
- [269] JB Evers, J Vos, B Andrieu, PC Struik (2006) Cessation of tillering in spring wheat in relation to light interception and red:far-red ratio. *Ann. Bot.* 97 (4):649–658.
- [270] A Maaïke Wubs, E Heuvelink, LFM Marcelis, RCO Okello, A Shlyuykova, GH Buck-Sorlin, J Vos (2013) Four hypotheses to explain axillary budbreak after removal of flower shoots in a cut-rose crop. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 138 (4):243–252.
- [271] H Su, SD Abernathy, RH White, SA Finlayson (2011) Photosynthetic photon flux density and



- phytochrome B interact to regulate branching in Arabidopsis. *Plant, Cell Environ.* 34 (11):1986–1998.
- [272] H Wang (2015) Phytochrome signaling: Time to tighten up the loose ends. *Mol. Plant* 8 (4):540–551.
- [273] S Li (2015) The Arabidopsis thaliana TCP transcription factors: A broadening horizon beyond development. *Plant Signal. Behav.* 10 (7).
- [274] NG Uberti Manassero, IL Viola, E Welchen, DH Gonzalez (2013) TCP transcription factors: Architectures of plant form, *Biomolecular Concepts*, 4 (2). *Biomol Concepts*, :111–127, Apr-2013.
- [275] P Cubas, N Lauter, J Doebley, E Coen (1999) The TCP domain: A motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J.* 18 (2):215–222.
- [276] P Aggarwal, M Das Gupta, AP Joseph, N Chatterjee, N Sinivasan, U Nath (2010) Identification of specific DNA binding residues in the TCP family of transcription factors in arabidopsis. *Plant Cell* 22 (4):1174–1189.
- [277] L Sun, X Zou, M Jiang, X Wu, Y Chen, QQ Wang, QQ Wang, L Chen, Y Wu (2020) The crystal structure of the TCP domain of PCF6 in *Oryza sativa* L. reveals an RHH-like fold. *FEBS Lett.* 594 (8):1296–1306.
- [278] O Navaud, P Dabos, E Carnus, D Tremousaygue, C Hervé (2007) TCP transcription factors predate the emergence of land plants. *J. Mol. Evol.* 65 (1):23–33.
- [279] DG Howarth, MJ Donoghue (2006) Phylogenetic analysis of the “ECE” (CYC/TB1) clade reveals duplications predating the core eudicots. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (24):9101–9106.
- [280] S Kosugi, Y Ohashi (2002) DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family. *Plant J.* 30 (3):337–348.
- [281] IL Viola, R Reinheimers, R Ripoll, NG Uberti Manassero, DH Gonzalez (2012) Determinants of the DNA binding specificity of class I and class II TCP transcription factors. *J. Biol. Chem.* 287 (1):347–356.
- [282] MMR Costa, S Fox, AI Hanna, C Baxter, E Coen (2005) Evolution of regulatory interactions controlling floral asymmetry. *Development* 132 (22):5093–5101.
- [283] M Martín-Trillo, P Cubas (2010) TCP genes: a family snapshot ten years later, *Trends in Plant Science*, 15 (1). *Trends Plant Sci.* :31–39, Jan-2010.
- [284] JF Palatnik, E Allen, X Wu, C Schommer, R Schwab, JC Carrington, D Weigel (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425 (6955):257–263.
- [285] S Danisman, ADJ Van Dijk, A Bimbo, F Van Der Wal, L Hennig, S De Folter, GC Angenent, RGH Immink (2013) Analysis of functional redundancies within the Arabidopsis TCP transcription factor family. *J. Exp. Bot.* 64 (18):5673–5685.
- [286] E González-Grandío, P Cubas (2016) TCP Transcription Factors: Evolution, Structure, and Biochemical Function, En: *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects*, Elsevier Inc., p. :139–151.
- [287] S Kosugi, Y Ohashi (1997) PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *Plant Cell* 9 (9):1607–1619.
- [288] C Schommer, JF Palatnik, P Aggarwal, A Chételat, P Cubas, EE Farmer, U Nath, D Weigel (2008) Control

- of Jasmonate Biosynthesis and Senescence by miR319 Targets. *PLoS Biol.* 6 (9):e230.
- [289] IL Viola, NG Uberti Manassero, R Ripoll, DH Gonzalez (2011) The Arabidopsis class I TCP transcription factor AtTCP11 is a developmental regulator with distinct DNA-binding properties due to the presence of a threonine residue at position 15 of the TCP domain. *Biochem. J.* 435 (1):143–155.
- [290] C Li, T Potuschak, A Colón-Carmona, RA Gutiérrez, P Doerner (2005) Arabidopsis TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (36):12978–12983.
- [291] S Danisman, F van der Wal, S Dhondt, R Waites, S de Folter, A Bimbo, AJ van Dijk, JM Muino, L Cutri, MC Dornelas, GC Angenent, RGH Immink (2012) Arabidopsis class I and class II TCP transcription factors regulate jasmonic acid metabolism and leaf development antagonistically. *Plant Physiol.* 159 (4):1511–1523.
- [292] LE Lucero, PA Manavella, DE Gras, FD Ariel, DH Gonzalez (2017) Class I and Class II TCP Transcription Factors Modulate SOC1-Dependent Flowering at Multiple Levels, *Molecular Plant*, 10 (12). Cell Press, :1571–1574, Dec-2017.
- [293] T Koyama, N Mitsuda, M Seki, K Shinozaki, M Ohme-Takagi (2010) TCP transcription factors regulate the activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in Arabidopsis. *Plant Cell* 22 (11):3574–3588.
- [294] NG Uberti-Manassero, LE Lucero, IL Viola, AC Vegetti, DH Gonzalez (2012) The class I protein AtTCP15 modulates plant development through a pathway that overlaps with the one affected by CIN-like TCP proteins. *J. Exp. Bot.* 63 (2):809–823.
- [295] M Das Gupta, P Aggarwal, U Nath (2014) CINCINNATA in *Antirrhinum majus* directly modulates genes involved in cytokinin and auxin signaling. *New Phytol.* 204 (4):901–912.
- [296] LE Lucero, NG Uberti-Manassero, AL Arce, F Colombatti, SG Alemanno, DH Gonzalez (2015) TCP15 modulates cytokinin and auxin responses during gynoecium development in Arabidopsis. *Plant J.* 84 (2):267–282.
- [297] X Adenot, T Elmayan, D Laressergues, S Boutet, N Bouché, V Gascioli, H Vaucheret (2006) DRB4-Dependent TAS3 trans-Acting siRNAs Control Leaf Morphology through AGO7. *Curr. Biol.* 16 (9):927–932.
- [298] N Fahlgren, TA Montgomery, MD Howell, E Allen, SK Dvorak, AL Alexander, JC Carrington (2006) Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA Affects Developmental Timing and Patterning in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 16 (9):939–944.
- [299] I Efroni, SK Han, HJ Kim, MF Wu, E Steiner, KD Birnbaum, JC Hong, Y Eshed, D Wagner (2013) Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses. *Dev. Cell* 24 (4):438–445.
- [300] X Yang, HB Pang, BL Liu, ZJ Qiu, Q Gao, L Wei, Y Dong, YZ Wang (2012) Evolution of double positive autoregulatory feedback loops in CYCLOIDEA2 clade genes is associated with the origin of floral zygomorphy. *Plant Cell* 24 (5):1834–1847.

- [301] SH Kim, GH Son, S Bhattacharjee, HJ Kim, JC Nam, PDT Nguyen, JC Hong, W Gassmann (2014) The Arabidopsis immune adaptor SRFR1 interacts with TCP transcription factors that redundantly contribute to effector-triggered immunity. *Plant J.* 78 (6):978–989.
- [302] Y Pan, G Bradley, K Pyke, G Ball, C Lu, R Fray, A Marshall, S Jayasuta, C Baxter, R van Wijk, L Boyden, R Cade, NH Chapman, PD Fraser, C Hodgman, GB Seymour (2013) Network inference analysis identifies an APRR2-like gene linked to pigment accumulation in tomato and pepper fruits. *Plant Physiol.* 161 (3):1476–1485.
- [303] C Cheval, M Perez, LJ Leba, B Ranty, A Perochon, M Reichelt, A Mithöfer, E Robe, C Mazars, JP Galaud, D Aldon (2017) PRR2, a pseudo-response regulator, promotes salicylic acid and camalexin accumulation during plant immunity. *Sci. Rep.* 7 (1):1–13.
- [304] E Giraud, S Ng, C Carrie, O Duncan, J Low, CP Lee, O van Aken, A Harvey Millar, M Murcha, J Whelan (2010) TCP transcription factors link the regulation of genes encoding mitochondrial proteins with the circadian clock in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 22 (12):3921–3934.
- [305] Y Peng, L Chen, Y Lu, Y Wu, J Dumenil, Z Zhu, MW Bevan, Y Lia (2015) The Ubiquitin receptors DA1, DAR1, and DAR2 redundantly regulate endoreduplication by modulating the stability of TCP14/15 in arabidopsis. *Plant Cell* 27 (3):649–662.
- [306] K Tatematsu, K Nakabayashi, Y Kamiya, E Nambara (2008) Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 53 (1):42–52.
- [307] P Rueda-Romero, C Barrero-Sicilia, A Gómez-Cadenas, P Carbonero, L Oñate-Sánchez (2012) Arabidopsis thaliana DOF6 negatively affects germination in non-after-ripened seeds and interacts with TCP14. *J. Exp. Bot.* 63 (5):1937–1949.
- [308] W Zhang, F Cochet, M Ponnaiah, S Lebreton, L Matheron, C Pionneau, M Boudsocq, F Resentini, S Huguet, MÁ Blázquez, C Bailly, J Puyaubert, E Baudouin (2019) The <sc>MPK</sc> 8- <sc>TCP</sc> 14 pathway promotes seed germination in Arabidopsis. *Plant J.* 100 (4):677–692.
- [309] E Steiner, I Efroni, M Gopalraj, K Saathoff, TS Tseng, M Kieffer, Y Eshed, N Olszewski, D Weiss (2012) The Arabidopsis O-linked N-acetylglucosamine transferase SPINDLY interacts with class I TCPs to facilitate cytokinin responses in leaves and flowers. *Plant Cell* 24 (1):96–108.
- [310] MJ Mazur, BJ Spears, A Djajasaputra, M Van Der Gragt, G Vlachakis, B Beerens, W Gassmann, HA Van Den Burg (2017) Arabidopsis TCP transcription factors interact with the SUMO conjugating machinery in nuclear foci. *Front. Plant Sci.* 8:2043.
- [311] JM Davière, M Wild, T Regnault, N Baumberger, H Eisler, P Genschik, P Achard (2014) Class I TCP-DELLA interactions in inflorescence shoot apex determine plant height. *Curr. Biol.* 24 (16):1923–1928.
- [312] F Resentini, A Felipe-Benavent, L Colombo, MA Blázquez, D Alabadí, S Masiero (2015) TCP14 and TCP15 mediate the promotion of seed germination by gibberellins in arabidopsis thaliana, *Molecular Plant*, 8 (3). Cell Press, :482–485, Mar-2015.
- [313] L V. Ferrero, IL Viola, FD Ariel, DH Gonzalez (2019) Class I TCP Transcription Factors Target the

- Gibberellin Biosynthesis Gene GA20ox1 and the Growth-Promoting Genes HBI1 and PRE6 during Thermomorphogenic Growth in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 60 (8):1633–1645.
- [314] O Yanai, E Shani, D Russ, N Ori (2011) Gibberellin partly mediates LANCEOLATE activity in tomato. *Plant J.* 68 (4):571–582.
- [315] B Ren, Y Liang, Y Deng, Q Chen, J Zhang, X Yang, J Zuo (2009) Genome-wide comparative analysis of type-A Arabidopsis response regulator genes by overexpression studies reveals their diverse roles and regulatory mechanisms in cytokinin signaling. *Cell Res.* 19 (10):1178–1190.
- [316] Z Guo, S Fujioka, EB Blancaflor, S Miao, X Gou, J Li (2010) TCP1 modulates brassinosteroid biosynthesis by regulating the expression of the key biosynthetic gene DWARF4 in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 22 (4):1161–1173.
- [317] S Guo, Y Xu, H Liu, Z Mao, C Zhang, Y Ma, Q Zhang, Z Meng, K Chong (2013) The interaction between OsMADS57 and OsTB1 modulates rice tillering via DWARF14. *Nat. Commun.* 4 (1):1–12.
- [318] KR Challa, P Aggarwal, U Nath (2016) Activation of YUCCA5 by the transcription factor TCP4 integrates developmental and environmental signals to promote hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Plant Cell* 28 (9):2117–2130.
- [319] Y Zhou, D Zhang, J An, H Yin, S Fang, J Chu, Y Zhao, J Li (2018) TCP transcription factors regulate shade avoidance via directly mediating the expression of both PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS and auxin biosynthetic genes. *Plant Physiol.* 176 (2):1850–1861.
- [320] J Dong, N Sun, J Yang, Z Deng, J Lan, G Qin, H He, XW Deng, VF Irish, H Chen, N Wei (2019) The transcription factors tcp4 and pif3 antagonistically regulate organ-specific light induction of saur genes to modulate cotyledon opening during de-etiolation in Arabidopsis. *Plant Cell* 31 (5):1155–1170.
- [321] D Trémousaygue, L Garnier, C Bardet, P Dabos, C Hervé, B Lescure (2003) Internal telomeric repeats and “TCP domain” protein-binding sites co-operate to regulate gene expression in Arabidopsis thaliana cycling cells. *Plant J.* 33 (6):957–966.
- [322] ZY Li, B Li, AW Dong (2012) The Arabidopsis transcription factor AtTCP15 regulates endoreduplication by modulating expression of key cell-cycle genes. *Mol. Plant* 5 (1):270–280.
- [323] M Kieffer, V Master, R Waites, B Davies (2011) TCP14 and TCP15 affect internode length and leaf shape in Arabidopsis. *Plant J.* 68 (1):147–158.
- [324] J Doebley, A Stec, L Hubbard (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 386 (6624):485–488.
- [325] J Doebley, A Stec, C Gustus (1995) teosinte branched1 and the origin of maize: Evidence for epistasis and the evolution of dominance. *Genetics* 141 (1):333–346.
- [326] L Hubbard, P McSteen, J Doebley, S Hake (2002) Expression patterns and mutant phenotype of teosinte branched1 correlate with growth suppression in maize and teosinte. *Genetics* 162 (4):1927–1935.
- [327] T Takeda, Y Suwa, M Suzuki, H Kitano, M Ueguchi-Tanaka, M Ashikari, M Matsuoka, C Ueguchi (2003)

- The *OstTB1* gene negatively regulates lateral branching in rice. *Plant J.* 33 (3):513–520.
- [328] TR Bürglin (1997) Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res.* 25 (21):4173–4180.
- [329] G Bharathan, BJ Janssen, EA Kellogg, N Sinha (1997) Did homeodomain proteins duplicate before the origin of angiosperms, fungi, and metazoa? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (25):13749–13753.
- [330] E Vollbrecht, B Veit, N Sinha, S Hake (1991) The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* 350 (6315):241–243.
- [331] R Kerstetter, E Vollbrecht, B Lowe, B Veit, J Yamaguchi, S Hake (1994) Sequence analysis and expression patterns divide the maize *knotted1*-like homeobox genes into two classes. *Plant Cell* 6 (12):1877–1887.
- [332] L Krusell, I Rasmussen, K Gausing (1997) DNA binding sites recognised in vitro by a knotted class 1 homeodomain protein encoded by the hooded gene, *k*, in barley (*Hordeum vulgare*). *FEBS Lett.* 408 (1):25–29.
- [333] HMS Smith, I Boschke, S Hake (2002) Selective interaction of plant homeodomain proteins mediates high DNA-binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (14):9579–9584.
- [334] MF Tioni, IL Viola, RL Chan, DH Gonzalez (2005) Site-directed mutagenesis and footprinting analysis of the interaction of the sunflower KNOX protein HAKN1 with DNA. *FEBS J.* 272 (1):190–202.
- [335] HMS Smith, BC Campbell, S Hake (2004) Competence to respond to floral inductive signals requires the homeobox genes *PENNYWISE* and *POUND-FOOLISH*. *Curr. Biol.* 14 (9):812–817.
- [336] JA Long, EI Moan, JI Medford, MK Barton (1996) A member of the *KNOTTED* class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379 (6560):66–69.
- [337] K Endrizzi, B Moussian, A Haecker, JZ Levin, T Laux (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 (6):967–979.
- [338] SJ Douglas, G Chuck, RE Dengler, L Pelecanda, CD Riggs (2002) *KNAT1* and *ERECTA* regulate inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14 (3):547–558.
- [339] SP Venglat, T Dumonceaux, K Rozwadowski, L Parnell, V Babic, W Keller, R Martienssen, G Selvaraj, R Datla (2002) The homeobox gene *brevipedicellus* is a key regulator of inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (7):4730–4735.
- [340] N Bolduc, A Yilmaz, MK Mejia-Guerra, K Morohashi, D O'Connor, E Grotewold, S Hake (2012) Unraveling the *KNOTTED1* regulatory network in maize meristems. *Genes Dev.* 26 (15):1685–1690.
- [341] K Tsuda, N Kurata, H Ohyanagi, S Hake (2014) Genome-wide study of KNOX regulatory network reveals brassinosteroid catabolic genes important for shoot meristem function in rice. *Plant Cell* 26 (9):3488–3500.
- [342] K Tsuda, Y Ito, Y Sato, N Kurata (2011) Positive autoregulation of a KNOX gene is essential for shoot apical meristem maintenance in rice. *Plant Cell* 23 (12):4368–4381.

- [343] S V. Spinelli, AP Martin, IL Viola, DH Gonzalez, JF Palatnik (2011) A mechanistic link between STM and CUC1 during Arabidopsis development. *Plant Physiol.* 156 (4):1894–1904.
- [344] RA Kerstetter, S Hake (1997) Shoot meristem formation in vegetative development. *Plant Cell* 9 (7):1001–1010.
- [345] SE Clark, SE Jacobsen, JZ Levin, EM Meyerowitz (1996) The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate meristem activity in Arabidopsis. *Development* 122 (5).
- [346] JJ Estruch, E Prinsen, H Van Onckelen, J Schell, A Spena (1991) Viviparous leaves produced by somatic activation of an inactive cytokinin-synthesizing gene. *Science* 254 (5036):1364–1367.
- [347] Y Li, G Hagen, TJ Guilfoyle (1992) Altered morphology in transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins in specific tissues and organs. *Dev. Biol.* 153 (2):386–395.
- [348] NR Sinha, RE Williams, S Hake (1993) Overexpression of the maize homeo box gene, KNOTTED-1, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes Dev.* 7 (5):787–795.
- [349] M Tamaoki, S Kusaba, Y Kano-Murakami, M Matsuoka (1997) Ectopic Expression of a Tobacco Homeobox Gene, NTH15, Dramatically Alters Leaf Morphology and Hormone Levels in Transgenic Tobacco. *Plant Cell Physiol.* 38 (8):917–927.
- [350] S Kusaba, Y Kano-Murakami, M Matsuoka, M Tamaoki, T Sakamoto, I Yamaguchi, M Fukumoto (1998) Alteration of Hormone Levels in Transgenic Tobacco Plants Overexpressing the Rice Homeobox Gene OSH1. *Plant Physiol.* 116 (2):471–476.
- [351] M Tanaka-Ueguchib, H Itoh, N Oyama, M Koshioka, M Matsuoka (1998) Over-expression of a tobacco homeobox gene, NTH15, decreases the expression of a gibberellin biosynthetic gene encoding GA 20-oxidase. *Plant J.* 15 (3):391–400.
- [352] T Sakamoto, N Kamiya, M Ueguchi-Tanaka, S Iwahori, M Matsuoka (2001) KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes Dev.* 15 (5):581–590.
- [353] A Hay, H Kaur, A Phillips, P Hedden, S Hake, M Tsiantis (2002) The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr. Biol.* 12 (18):1557–1565.
- [354] N Bolduc, S Hake (2009) The maize transcription factor KNOTTED1 directly regulates the gibberellin catabolism gene *ga2ox1*. *Plant Cell* 21 (6):1647–1658.
- [355] K Tsuda, S Hake (2015) Diverse functions of KNOX transcription factors in the diploid body plan of plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27:91–96.
- [356] N Ori, Y Eshed, G Chuck, JL Bowman, S Hake (2000) Mechanisms that control knox gene expression in the Arabidopsis shoot. *Development* 127 (24).
- [357] IL Viola, LN Güttlein, DH Gonzalez (2013) Redox modulation of plant developmental regulators from the class I TCP transcription factor family. *Plant Physiol.* 162 (3):1434–1447.
- [358] IL Viola, A Camoirano, DH Gonzalez (2016) Redox-dependent modulation of anthocyanin biosynthesis by the TCP transcription factor TCP15 during exposure to high light intensity conditions in

- arabidopsis1[OPEN]. *Plant Physiol.* 170 (1):74–85.
- [359] D Hanahan (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 (4):557–580.
- [360] G Ooms, TJG Regensburg-Tuink, MH Hofker, A Hoekema, PJJ Hooykaas, RA Schilperoort (1982) Studies on the structure of cointegrates between octopine and nopaline Ti-plasmids and their tumour-inducing properties. *Plant Mol. Biol.* 1 (4):265–276.
- [361] M Vidal, RK Brachmann, A Fattaey, E Harlow, JD Boeke (1996) Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (19):10315–10320.
- [362] RA Jefferson, TA Kavanagh, MW Bevan (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6 (13):3901–3907.
- [363] E Gonzalez-Grandio, A Pajoro, JM Franco-Zorrilla, C Tarancon, RGH Immink, P Cubas (2017) Abscisic acid signaling is controlled by a BRANCHED1/HD-ZIP i cascade in *Arabidopsis* axillary buds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114 (2):E245–E254.
- [364] RP Hellens, E Anne Edwards, NR Leyland, S Bean, PM Mullineaux (2000) pGreen: A versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42 (6):819–832.
- [365] SJ Clough, AF Bent (1998) Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16 (6):735–743.
- [366] Y Xia, W Chu, Q Qi, L Xun (2015) New insights into the QuikChange™ process guide the use of Phusion DNA polymerase for site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 43 (2):e12.
- [367] J Schindelin, I Arganda-Carreras, E Frise, V Kaynig, M Longair, T Pietzsch, S Preibisch, C Rueden, S Saalfeld, B Schmid, JY Tinevez, DJ White, V Hartenstein, K Eliceiri, P Tomancak, A Cardona (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9 (7):676–682.
- [368] B Charrier, A Champion, Y Henry, M Kreis (2002) Expression profiling of the whole *Arabidopsis* Shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiol.* 130 (2):577–590.
- [369] M Bradford (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72 (1–2):248–254.
- [370] UK Laemmli (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680–685.
- [371] F Ariel, T Jegu, D Latrasse, N Romero-Barrios, A Christ, M Benhamed, M Crespi (2014) Noncoding transcription by alternative rna polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. *Mol. Cell* 55 (3):383–396.
- [372] D Gietz, AS Jean, RA Woods, RH Schiestl (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells, *Nucleic Acids Research*, 20 (6). Oxford University Press, :1425, Mar-1992.

- [373] FM Ausubel (1987) *Current protocols in molecular biology*. Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience.
- [374] S Fields (1993) The Two-Hybrid System to Detect Protein-Protein Interactions. *Methods* 5 (2):116–124.
- [375] M Nicolas, ML Rodríguez-Buey, JM Franco-Zorrilla, P Cubas (2015) A Recently Evolved Alternative Splice Site in the BRANCHED1a Gene Controls Potato Plant Architecture. *Curr. Biol.* 25 (14):1799–1809.
- [376] JA Aguilar-Martínez, N Sinha (2013) Analysis of the role of arabidopsis class I TCP genes AtTCP7, AtTCP8, AtTCP22, and AtTCP23 in leaf development. *Front. Plant Sci.* 4 (OCT).
- [377] A V. Klepikova, AS Kasianov, ES Gerasimov, MD Logacheva, AA Penin (2016) A high resolution map of the Arabidopsis thaliana developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant J.* 88 (6):1058–1070.
- [378] H Ren, WM Gray (2015) SAUR Proteins as Effectors of Hormonal and Environmental Signals in Plant Growth, *Molecular Plant*, 8 (8). Cell Press, :1153–1164, Aug-2015.
- [379] BA McClure, T Guilfoyle (1987) Characterization of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs. *Plant Mol. Biol.* 9 (6):611–623.
- [380] K Chae, CG Isaacs, PH Reeves, GS Maloney, GK Muday, P Nagpal, JW Reed (2012) Arabidopsis SMALL AUXIN UP RNA63 promotes hypocotyl and stamen filament elongation. *Plant J.* 71 (4):684–697.
- [381] AK Spartz, SH Lee, JP Wenger, N Gonzalez, H Itoh, D Inzé, WA Peer, AS Murphy, PJ Overvoorde, WM Gray (2012) The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion. *Plant J.* 70 (6):978–990.
- [382] L Tyler, SG Thomas, J Hu, A Dill, JM Alonso, JR Ecker, TP Sun (2004) DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 135 (2):1008–1019.
- [383] D Cao, H Cheng, W Wu, HM Soo, J Peng (2006) Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 142 (2):509–525.
- [384] JL Nemhauser, F Hong, J Chory (2006) Different Plant Hormones Regulate Similar Processes through Largely Nonoverlapping Transcriptional Responses, *Cell*, 126 (3). Cell, :467–475, Aug-2006.
- [385] EJ Chapman, K Greenham, C Castillejo, R Sartor, A Bialy, T ping Sun, M Estelle (2012) Hypocotyl transcriptome reveals auxin regulation of growth-promoting genes through GA-dependent and -independent pathways. *PLoS One* 7 (5).
- [386] E Oh, JY Zhu, MY Bai, RA Arenhart, Y Sun, ZY Wang (2014) Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the Arabidopsis hypocotyl. *Elife* 2014 (3):3031.
- [387] L V. Ferrero, V Gastaldi, FD Ariel, IL Viola, DH Gonzalez (2020) Class I TCP proteins TCP14 and TCP15 are required for elongation and gene expression responses to auxin. *Plant Mol. Biol.* .
- [388] F Chevalier, K Nieminen, JC Sánchez-Ferrero, ML Rodríguez, M Chagoyen, CS Hardtke, P Cubas (2014)



- Strigolactone promotes degradation of DWARF14, an  $\alpha/\beta$  hydrolase essential for strigolactone signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 26 (3):1134–1150.
- [389] S Savaldi-Goldstein, J Chory (2008) Growth coordination and the shoot epidermis, *Current Opinion in Plant Biology*, 11 (1). *Curr Opin Plant Biol*, :42–48, Feb-2008.
- [390] Y Sun, XY Fan, DM Cao, W Tang, K He, JY Zhu, JX He, MY Bai, S Zhu, E Oh, S Patil, TW Kim, H Ji, WH Wong, SY Rhee, ZY Wang (2010) Integration of Brassinosteroid Signal Transduction with the Transcription Network for Plant Growth Regulation in Arabidopsis. *Dev. Cell* 19 (5):765–777.
- [391] E Oh, JY Zhu, ZY Wang (2012) Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat. Cell Biol.* 14 (8):802–809.
- [392] H Saito, T Oikawa, S Hamamoto, Y Ishimaru, M Kanamori-Sato, Y Sasaki-Sekimoto, T Utsumi, J Chen, Y Kanno, S Masuda, Y Kamiya, M Seo, N Uozumi, M Ueda, H Ohta (2015) The jasmonate-responsive GTR1 transporter is required for gibberellin-mediated stamen development in Arabidopsis. *Nat. Commun.* 6:1–11.
- [393] S Scofield, W Dewitte, JAH Murray (2007) The KNOX gene SHOOT MERISTEMLESS is required for the development of reproductive meristematic tissues in Arabidopsis. *Plant J.* 50 (5):767–781.
- [394] S Scofield, W Dewitte, JAH Murray (2008) A model for Arabidopsis class-1 KNOX gene function. *Plant Signal. Behav.* 3 (4):257–259.
- [395] R Barley, R Waites (2002) Plant meristems: The interplay of KNOX and gibberellins, *Current Biology*, 12 (20). *Curr Biol*, :R696–R698, Oct-2002.
- [396] SW van Es, EB van der Auweraert, SR Silveira, GC Angenent, ADJ van Dijk, RGH Immink (2019) Comprehensive phenotyping reveals interactions and functions of Arabidopsis thaliana TCP genes in yield determination. *Plant J.* 99 (2):316–328.
- [397] EA Dun, PB Brewer, CA Beveridge (2009) Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone, *Trends in Plant Science*, 14 (7). Elsevier Current Trends, :364–372, Jul-2009.
- [398] D Mller, O Leyser (2011) Auxin, cytokinin and the control of shoot branching, *Annals of Botany*, 107 (7). *Ann Bot*, :1203–1212, May-2011.
- [399] PB Brewer, H Koltai, CA Beveridge (2013) Diverse roles of strigolactones in plant development, *Molecular Plant*, 6 (1). Oxford University Press, :18–28, 2013.
- [400] VA Deregibus, RA Sanchez, JJ Casal (1983) Effects of light quality on tiller production in lolium spp. *Plant Physiol.* 72 (3):900–902.
- [401] MH Davis, SR Simmons (1994) Tillering Response of Barley to Shifts in Light Quality Caused by Neighboring Plants. *Crop Sci.* 34 (6):1604–1610.
- [402] C Robin, MJM Hay, PCD Newton, DH Greer (1994) Effect of Light Quality (Red:Far-red Ratio) at the Apical Bud of the Main Stolon on Morphogenesis of Trifolium repens L. *Ann. Bot.* 74 (2):119–123.
- [403] K Donohue, J Schmitt (1999) The genetic architecture of plasticity to density in Impatiens capensis. *Evolution (N. Y.)*. 53 (5):1377–1386.

- [404] C Wan, RE Sosebee (1998) Tillering responses to red:far-red light ratio during different phenological stages in *Eragrostis curvula*. *Environ. Exp. Bot.* 40 (3):247–254.
- [405] Y Tao, JL Ferrer, K Ljung, F Pojer, F Hong, JA Long, L Li, JE Moreno, ME Bowman, LJ Ivans, Y Cheng, J Lim, Y Zhao, CL Ballaré, G Sandberg, JP Noel, J Chory (2008) Rapid Synthesis of Auxin via a New Tryptophan-Dependent Pathway Is Required for Shade Avoidance in Plants. *Cell* 133 (1):164–176.
- [406] P Hornitschek, M V. Kohnen, S Lorrain, J Rougemont, K Ljung, I López-Vidriero, JM Franco-Zorrilla, R Solano, M Trevisan, S Pradervand, I Xenarios, C Fankhauser (2012) Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. *Plant J.* 71 (5):699–711.
- [407] M Pacín, M Semmoloni, M Legris, SA Finlayson, JJ Casal (2016) Convergence of CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 and PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR signalling during shade avoidance. *New Phytol.* 211 (3):967–979.
- [408] JJ Casal (2012) Shade Avoidance. *Arab. B.* 10:e0157.

**ANEXOS**

## 12. ANEXOS

## 12.1. Anexo I: Lista de oligonucleótidos utilizados

PRIMER	SECUENCIA (5'-3')	USO
<b>Primers Clonado y Mutagénesis</b>		
SAUR63 F	<u>GGATCC</u> ATGATAAACGCAAAGAAGC	Clonado de <i>AtSAUR63</i> en el vector pENTR 3C
SAUR63 R	<u>CTCGAG</u> AAATACAAGCAACTGTTGCG	Clonado de <i>AtSAUR63</i> en el vector pENTR 3C
pSAUR63 F	GG <u>CGT</u> CGACCTACTTTATTAGATTAGAC	Clonado de <i>pSAUR63::SAUR63</i> en el vector pBluescript SK-
SAUR63 R	GG <u>CGATCC</u> CAAATACAAGCAACTGTTGCGTAGT	Clonado de <i>pSAUR63::SAUR63</i> en el vector pBluescript SK-
pSAUR63 mut F	ATTACCAACTTAAGAACTTACAGAGTAGAA	Mutagénesis de <i>pSAUR63::SAUR63</i>
pSAUR63 mut R	TTCTACTCTGTAAGTTTCTTAAGTTGGAAT	Mutagénesis de <i>pSAUR63::SAUR63</i>
<b>Primers qPCR</b>		
TCP7 qPCR F	TGAAATCGAACCGGATGATGGA	RT-qPCR
TCP7 qPCR R	AAGACGCGAAACGCCAAAAA	RT-qPCR
TCP8 qPCR F	CGGTTGCGCCGCGAGTAGG	RT-qPCR
TCP8 qPCR R	TGCTCCGCTCCACCTCCCG	RT-qPCR
TCP9 qPCR F	GGTTAGAGCTACGTGGTCCG	RT-qPCR
TCP9 qPCR R	AAGACAAAGTGGTGAGCCCC	RT-qPCR
TCP14 qPCR F	GCAAGTTTCCGGCGACTCT	RT-qPCR
TCP14 qPCR R	CGGCAGAAAATCCCACCGTT	RT-qPCR
TCP15 qPCR F	CAGAGTCCTGCAACGGCACC	RT-qPCR
TCP15 qPCR R	CGCCGCCACTACCACCACTG	RT-qPCR
TCP19 qPCR F	GAGGCGGAGATGGAAACGAG	RT-qPCR
TCP19 qPCR R	CGGAGATGAGTTCCTGAGC	RT-qPCR
TCP20 qPCR F	CCTCTGCAAAAACACAAGGTGG	RT-qPCR
TCP20 qPCR R	AAACAAGCCTCTCTGCAACTT	RT-qPCR
TCP21 qPCR F	GGTCTCGTTAATTTGTTTCGGAGA	RT-qPCR
TCP21 qPCR R	TGTTTCGCTAGTAAAAACAGAGC	RT-qPCR
TCP22 qPCR F	AACTGCACCAATGGGGTCAA	RT-qPCR
TCP22 qPCR R	AAACCATCGCCTCTACTGCC	RT-qPCR
SAUR61 qPCR F	TGGAGACACAGAAAAGGCTCT	RT-qPCR
SAUR61 qPCR R	AGCCGAGTACTACTATGTTCTTGA	RT-qPCR
SAUR62 qPCR F	TGGTCTCTCATTTAAGTTGTCTCA	RT-qPCR
SAUR62 qPCR R	ACAAGTGATTTTTGAAGTTGGGA	RT-qPCR

SAUR63 qPCR F	GCAACAAAGAGCAGCCCTCCAC	RT-qPCR
SAUR63 qPCR R	GGTCCTTCGTTGGGAGACCGAAA	RT-qPCR
SAUR65 qPCR F	CCTCAGGGCGGGTGGACCAA	RT-qPCR
SAUR65 qPCR R	ACCACTCTGTTGTTCTTGTGGTTGC	RT-qPCR
SAUR66 qPCR F	TGCCTCATCAAAACCAACTTCA	RT-qPCR
SAUR66 qPCR R	CACTTCCAAAAGATTCATAAGGACA	RT-qPCR
SAUR67 qPCR F	TGGATGGAGATACAGAAAAGGCT	RT-qPCR
SAUR67 qPCR R	TGTTGAGTACTCTGTTCTTGCTGT	RT-qPCR
SAUR68 qPCR F	AGGACCAATCACGTTGCCAT	RT-qPCR
SAUR68 qPCR R	AGAGATTGCCGTTATAAGAGCGT	RT-qPCR
SAUR75 qPCR F	TCTCAAGTGCTAGATGCTCTTTGC	RT-qPCR
SAUR75 qPCR R	ACACAAGCAACTGTTGAGTAGCAC	RT-qPCR
GUS qPCR F	TGTAGAAACCCCAACCCGTG	RT-qPCR
GUS qPCR R	CCCGGCTTTCTTGTAACGC	RT-qPCR
ARF8 qPCR F	GCAGTGGTGGGTTATTCCCG	RT-qPCR
ARF8 qPCR R	AAATGGGAAACAAAGGGCTCC	RT-qPCR
ARF6 qPCR F	CCTTGCCGGAGTTTGTGAG	RT-qPCR
ARF6 qPCR R	AGTCGTCACAGTTCCCGTTG	RT-qPCR
PRE1 qPCR F	TTCCATAGTCAAAAGTCTCCGACAT	RT-qPCR
PRE1 qPCR R	AATAATGCACCTGCTAAGGCAATG	RT-qPCR
EXP8 qPCR F	GGCAGTTCGGACAAACCTACCAA	RT-qPCR
EXP8 qPCR R	TATGCAGCCACGTCAGCACC	RT-qPCR
IAA19 qPCR F	AAAGATCGGATGCTACCGGG	RT-qPCR
IAA19 qPCR R	ACCAGTCTCTTGCTTCTTGTT	RT-qPCR
SHY2 qPCR F	CCAAAGGTTTAGGCTGTGGTGT	RT-qPCR
SHY2 qPCR R	CGACAACCCAAGCACAGACA	RT-qPCR
FRO3 qPCR F	AGAGCTCGCCAGATCAGTTGCTACC	RT-qPCR
FRO3 qPCR R	ACGCTCGAACCCCTTTAAACCAACTAGG	RT-qPCR
FRD3 qPCR F	TGGTGGGAGTGGCGGCCATA	RT-qPCR
FRD3 qPCR R	ACGGTCCAGTTCCTGTCGCCA	RT-qPCR
DOX1 qPCR F	TGCGAGCAAATTGGTACGGACT	RT-qPCR
DOX1 qPCR R	TTCCCACGACACCTCCAAGA	RT-qPCR
ATHB1 qPCR F	TGCCAAGAAGCTGGTCTAC	RT-qPCR
ATHB1 qPCR R	CATGACGATGGAGTCGTAGTTA	RT-qPCR
ATHB7 qPCR F	CAACTTGGCTTCTCAGTTCCG	RT-qPCR
ATHB7 qPCR R	TAGAGCAACCACCGCTTG	RT-qPCR
Actinas qPCR F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	RT-qPCR
Actinas qPCR R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	RT-qPCR
PP2A qPCR F	CCTGCGGTAATAACTGCATCT	RT-qPCR

PP2A qPCR R	CTTCACTTAGCTCCACCAAGCA	RT-qPCR
GA20ox-1 qPCR F	CCCAAGGCCTTTGTGGTCAA	RT-qPCR
GA20ox-1 qPCR R	ATTTCTCTCGCTCTCGCTG	RT-qPCR
KNAT1 qPCR F	AGCGTCACTGGAAACCATCTGAA	RT-qPCR
KNAT1 qPCR R	GTACAGAGCTGCGTGGTGCG	RT-qPCR
BRC1 qPCR F	GATTAACCACCATCGCAGCC	RT-qPCR
BRC1 qPCR R	TTTCGCGCCGAAGGAGTAAT	RT-qPCR
BRC2 qPCR F	AGAGCCTCAGGATAGCCAAATAGC	RT-qPCR
BRC2 qPCR R	GGCAGACCAAACCTGTCTGT	RT-qPCR
MAX1 qPCR F	CTCCAAAGGGGACATGGGT	RT-qPCR
MAX1 qPCR R	CCGGCTGAACTTCTCCGGTT	RT-qPCR
MAX4 qPCR F	AGTGAAGAACTGGCACGAGCA	RT-qPCR
MAX4 qPCR R	CTCATGGGTTGCACCGGGTC	RT-qPCR
ATHB21 qPCR F	AAAGAGAGATCCAACGGCTT	RT-qPCR
ATHB21 qPCR R	TCCGATGTCGTAATCTCCA	RT-qPCR
ATHB40 qPCR F	GGAGGAGGAAGAAGACCAAAGG	RT-qPCR
ATHB40 qPCR R	ACAAACCGTTGCCTCCATCT	RT-qPCR
ATHB53 qPCR F	GGAGTCAGGGAGGAAGGAGAA	RT-qPCR
ATHB53 qPCR R	CCACCTGTCTCGGGTCAAGA	RT-qPCR
dTV	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV (V=A, C, G)	RT-qPCR
SAUR63 ChIP F1	TTCTTGACATGTTGTGAAGTTTCT	RT-qPCR ChIP
SAUR63 ChIP R1	GATTAAGCTTGGATCATAAAAAACATC	RT-qPCR ChIP
SAUR63 ChIP F2	GAAATGTGAAAGTTTAGCAGGAA	RT-qPCR ChIP
SAUR63 ChIP R2	GGGACAACAAATCTGGTTGAA	RT-qPCR ChIP
SAUR63 ChIP F3	GTCCACAAGTTGATTAGCTGACAT	RT-qPCR ChIP
SAUR63 ChIP R3	GCTCCTGAGCAATCTAACCCG	RT-qPCR ChIP
TCP15 ChIP F1	TGTCAAATATGCACAACACCTTT	RT-qPCR ChIP
TCP15 ChIP R1	AGTATCGCCTGCTTGTAGT	RT-qPCR ChIP
TCP15 ChIP F2	TCTCGTGAACCATAGAGCCA	RT-qPCR ChIP
TCP15 ChIP R2	TCAGCGATTGAGACAGAACTGAGA	RT-qPCR ChIP

### Primers chequeo mutantes

T15EN R	GGCCTCGAGCTAGGAATGATGACTGGT	Chequeo T-DNA en el gen TCP15
T15EAR F	GGCTCTAGATCATCATCATCATGGATC	Chequeo gen endógeno TCP15
TCPD15 R	GGCAAGCTTCTAAGTCCCTGTAGCGGCTAT	Chequeo gen endógeno TCP15
13F1	GACGACAACCATCAACAACAACCTTC	Chequeo gen endógeno TCP14
13R1	GTTGATGATGATGATGTCTCTGTG	Chequeo gen endógeno TCP14 y chequeo T-DNA en TCP14
BRC1 LP	CCGGTGTTAGGATCCATGGACACA	Chequeo gen endógeno BRC1
BRC1 RP	ATCGATGGTGGTGCATTAGTG	Chequeo endógeno BRC1 y chequeo T-DNA en BRC1
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	Chequeo inserción T-DNA en mutante en TCP15 y BRC1

LB4

TGATCCATGTAGATTTCCCGGACATGAAG

Chequeo inserción T-DNA en mutante en TCP14

## 12.2. Anexo II: Análisis de enriquecimiento de motivos de las regiones promotoras de los genes de la subfamilia del SAUR63

```

; Citation: van Helden et al. (1998). J Mol Biol 281(5), 827-42.
; Program version          1.169
; Quick counting mode
; Detection of over-represented words (right-tail test)
; Oligomer length          7
; Discard overlapping matches
; Counted on both strands
;
; grouped by pairs of reverse complements
; Background model        upstream-noorf
; Organism                Arabidopsis_thaliana.TAIR10.42
; Background estimation method  Frequency file
; Expected frequency file  $RSAT/public_html/data/genomes/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.42/oligo-frequencies/7nt_upstream-noorf_Arabidopsis_thaliana.TAIR10.42-noov-2str.freq
; Pseudo-frequency        0.01
; Pseudo-frequency per oligo  1.22E+03
; Sequence type           DNA
; Nb of sequences         9
; Sum of sequence lengths  5971
; discarded residues      NA (quick mode)      (other letters than ACGT)
; discarded occurrences  NA (quick mode)      (contain discarded residues)
; nb possible positions  NA (quick mode)
; total oligo occurrences  5485
; total overlapping occurrences  72
; total non overlapping occ  5413
; alphabet size          4
; nb possible oligomers  8192
; oligomers tested for significance  8192
; Sequences:
; AT1G29420              485

```



```
; SAUR62 471
; SAUR63 444
; SAUR64 756
; AT1G29460 273
; SAUR68 1020
; SAUR66 608
; SAUR67 444
; AT5G27780 1470
```

; column headers

```
; 1 seq oligomer sequence
; 2 id oligomer identifier
; 3 exp_freq expected relative frequency
; 4 occ observed occurrences
; 5 exp_occ expected occurrences
; 6 occ_P occurrence probability (binomial)
; 7 occ_E E-value for occurrences (binomial)
; 8 occ_sig occurrence significance (binomial)
; 9 rank rank
; 10 ovl_occ number of overlapping occurrences (discarded from the count)
; 11 forbocc forbidden positions (to avoid self-overlap)
```

#seq	id	exp_freq	occ	exp_occ	occ_P	occ_E	occ_sig	rank	ovl_occ	forbocc
catgtgg	catgtgg ccacatg	0.0001044766631	8	0.57	1.7e-07	1.4e-03	2.85	1	0	48
<b>ggtccca</b>	<b>ggtccca tgggacc</b>	<b>0.0000532890875</b>	<b>6</b>	<b>0.29</b>	<b>6.7e-07</b>	<b>5.5e-03</b>	<b>2.26</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>36</b>
cccctga	cccctga tcagggg	0.0000202210078	4	0.11	5.8e-06	4.7e-02	1.33	3	0	24
cagggga	cagggga tcccctg	0.0000210263187	4	0.12	6.7e-06	5.5e-02	1.26	4	0	24
aagggtc	aagggtc gaccctt	0.0000484320561	5	0.27	8.8e-06	7.2e-02	1.14	5	0	30
aggggac	aggggac gtcccct	0.0000232157578	4	0.13	9.9e-06	8.1e-02	1.09	6	0	24
ctaacca	ctaacca tggttag	0.0001342228354	7	0.74	1.2e-05	1.0e-01	1.00	7	0	42
gggacct	gggacct gggtccc	0.0000287271044	4	0.16	2.3e-05	1.9e-01	0.73	8	0	24
ctaaatc	ctaaatc gatttag	0.0002112055265	8	1.16	2.9e-05	2.4e-01	0.63	9	0	48

**Sitio TCP**

ggggaca	ggggaca tgtccc	0.0000336596338	4	0.18	4.2e-05	3.4e-01	0.47	10	0	24
ctcttgc	ctcttgc gcaagag	0.0000699741232	5	0.38	5.00E-05	4.1e-01	0.38	11	0	30
atgtctg	atgtctg cagacat	0.0000719119027	5	0.39	5.7e-05	4.7e-01	0.33	12	0	30
cttcac	cttcac gatgaag	0.0001727519299	7	0.95	6.00E-05	4.9e-01	0.31	13	0	42
accctta	accctta taagggt	0.0000805941610	5	0.44	9.7e-05	8.0e-01	0.10	14	0	30
acatggt	acatggt accatgt	0.0001302214467	6	0.71	0.00010	8.2e-01	0.09	15	0	36
atgtggg	atgtggg cccacat	0.0000822551148	5	0.45	0.00011	8.8e-01	0.06	16	0	30
ccctgaa	ccctgaa ttcaggg	0.0000431220371	4	0.24	0.00011	8.8e-01	0.05	17	0	24

12.3. Anexo III: Lista de genes con expresión reducida en plantas *myb21 myb24*, pero no en plantas *pTCP15::TCP15-EAR*.

Los genes que fueron validados por RT-qPCR se muestran en la tabla escritos con letras blancas. Los genes con expresión reducida en flores de plantas mutantes *arf6 arf8* están resaltados en azul.

AGI	Descripción
At1g01310	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
At1g01460	ATPIP11, PIP11, Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, core
At1g01630	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein
At1g01750	ADF11, actin depolymerizing factor 11
At1g01980	ATSEC1A, SEC1A, FAD-binding Berberine family protein
At1g02070	unknown protein
At1g02470	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
At1g03050	ENTH/ANTH/VHS superfamily protein
At1g03770	ATRING1B, RING1B, RING 1B
At1g04470	Protein of unknown function (DUF810)
At1g04540	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein
At1g05450	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
At1g06520	ATGPAT1, GPAT1, glycerol-3-phosphate acyltransferase 1
At1g09155	AtPP2-B15, PP2-B15, phloem protein 2-B15
At1g11770	FAD-binding Berberine family protein
At1g12080	Vacuolar calcium-binding protein-related
At1g13070	CYP71B27, putative cytochrome P450
At1g14420	AT59, Pectate lyase family protein
At1g15380	Lactoylglutathione lyase / glyoxalase I family protein
At1g15670	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
At1g18990	Protein of unknown function, DUF593
At1g19500	unknown protein
At1g20180	Protein of unknown function (DUF677)
At1g20440	AtCOR47, COR47, RD17, cold-regulated 47
At1g20450	ERD10, LTI29, LTI45, Dehydrin family protein
At1g21010	unknown protein
At1g21140	Vacuolar iron transporter (VIT) family protein
At1g22380	AtUGT85A3, UGT85A3, UDP-glucosyl transferase 85A3
At1g22400	ATUGT85A1, UGT85A1, UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
At1g22640	ATMYB3, MYB3, myb domain protein 3
At1g22990	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
At1g23010	LPR1, Cupredoxin superfamily protein
At1g23020	ATFRO3, FRO3, ferric reduction oxidase 3
At1g23060	BEST Arabidopsis thaliana protein match is: TPX2 (targeting protein for Xklp2) protein family

At1g23090	AST91, SULTR3;3, sulfate transporter 91
At1g23200	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
At1g23350	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
At1g23540	AtPERK12, IGI1, Protein kinase superfamily protein
At1g24520	BCP1, homolog of Brassica campestris pollen protein 1
At1g24540	CYP86C1, cytochrome P450, family 86, subfamily C, polypeptide 1
At1g25240	ENTH/VHS/GAT family protein
At1g28130	GH3.17, Auxin-responsive GH3 family protein
At1g29230	ATCIPK18, ATWL1, CIPK18, SnRK3.20, WL1, CBL-interacting protein kinase 18
At1g29490	SAUR-like auxin-responsive protein family
At1g30080	Glycosyl hydrolase superfamily protein
At1g32170	XTH30, XTR4, xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 30
At1g32450	NRT1.5, nitrate transporter 1.5
At1g32540	LOL1, lsd one like 1
At1g35140	EXL7, PHI-1, Phosphate-responsive 1 family protein
At1g35190	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
At1g35310	MLP168, MLP-like protein 168
At1g43590	transposable element gene
At1g44100	AAP5, amino acid permease 5
At1g47400	unknown protein
At1g49270	Protein kinase superfamily protein
At1g49490	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
At1g50610	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
At1g51210	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
At1g51915	cryptdin protein-related
At1g52580	ATRBL5, RBL5, RHOMBOID-like protein 5
At1g54070	Dormancy/auxin associated family protein
At1g55560	sks14, SKU5 similar 14
At1g58120	BEST Arabidopsis thaliana protein match is: methyltransferases (TAIR:AT5G01710.1)
At1g60240	NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein
At1g61560	ATMLO6, MLO6, Seven transmembrane MLO family protein
At1g61680	ATTPS14, TPS14, terpene synthase 14
At1g61860	Protein kinase superfamily protein
At1g62770	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
At1g64405	unknown protein
At1g66120	AMP-dependent synthetase and ligase family protein
At1g66400	CML23, calmodulin like 23
At1g66540	Cytochrome P450 superfamily protein
At1g67290	glyoxal oxidase-related protein
At1g67810	SUFE2, sulfur E2
At1g68110	ENTH/ANTH/VHS superfamily protein
At1g68610	PCR11, PLANT CADMIUM RESISTANCE 11
At1g68690	Protein kinase superfamily protein
At1g69040	ACR4, ACT domain repeat 4
At1g69530	AT-EXP1, ATEXP1, ATEXPA1, ATHEXP ALPHA 1.2, EXP1, EXPA1, expansin A1
At1g70720	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein

At1g70940	ATPIN3, PIN3, Auxin efflux carrier family protein
At1g71710	DNase I-like superfamily protein
At1g73540	atnudt21, NUDT21, nudix hydrolase homolog 21
At1g74020	SS2, strictosidine synthase 2
At1g74820	RmlC-like cupins superfamily protein
At1g75160	Protein of unknown function (DUF620)
At1g75290	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
At1g76370	Protein kinase superfamily protein
At1g76410	ATL8, RING/U-box superfamily protein
At1g77590	LACS9, long chain acyl-CoA synthetase 9
At1g78000	SEL1, SULTR1;2, sulfate transporter 1;2
At1g78090	ATTPPB, TPPB, trehalose-6-phosphate phosphatase
At1g78460	SOUL heme-binding family protein
At1g78780	pathogenesis-related family protein
At1g79860	ATROPGEF12, MEE64, ROPGEF12, RHO guanyl-nucleotide exchange factor 12
At2g02720	Pectate lyase family protein
At2g06850	EXGT-A1, EXT, XTH4, xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 4
At2g15880	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
At2g16730	BGAL13, glycosyl hydrolase family 35 protein
At2g17000	Mechanosensitive ion channel family protein
At2g17470	Aluminium activated malate transporter family protein
At2g17845	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
At2g18180	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein
At2g19000	unknown protein
At2g19010	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
At2g21430	Papain family cysteine protease
At2g21940	ATSK1, SK1, shikimate kinase 1
At2g21990	Protein of unknown function, DUF617
At2g23170	GH3.3, Auxin-responsive GH3 family protein
At2g23900	Pectin lyase-like superfamily protein
At2g24210	TPS10, terpene synthase 10
At2g24450	FLA3, FASCICLIN-like arabinogalactan protein 3 precursor
At2g24580	FAD-dependent oxidoreductase family protein
At2g26450	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
At2g26580	YAB5, plant-specific transcription factor YABBY family protein
At2g26850	F-box family protein
At2g27180	unknown protein
At2g27830	unknown protein
At2g29340	NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein
At2g30650	ATP-dependent caseinolytic (Clp) protease/crotonase family protein
At2g31500	CPK24, calcium-dependent protein kinase 24
At2g33100	ATCSLD1, CSLD1, CSLD1, cellulose synthase-like D1
At2g33420	Protein of unknown function (DUF810)
At2g36190	AtcwINV4, cwINV4, cell wall invertase 4
At2g37980	O-fucosyltransferase family protein
At2g38240	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein

At2g38400	AGT3, alanine:glyoxylate aminotransferase 3
At2g39060	Nodulin MtN3 family protein
At2g39210	Major facilitator superfamily protein
At2g39350	ABC-2 type transporter family protein
At2g41370	BOP2, Ankyrin repeat family protein / BTB/POZ domain-containing protein
At2g41860	CPK14, calcium-dependent protein kinase 14
At2g42300	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
At2g45560	CYP76C1, cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 1
At2g45580	CYP76C3, cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 3
At2g45800	GATA type zinc finger transcription factor family protein
At2g46210	Fatty acid/sphingolipid desaturase
At2g46360	unknown protein
At2g46640	unknown protein
At2g46680	ATHB-7, ATHB7, HB-7, homeobox 7
At2g47340	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
At3g01420	ALPHA-DOX1, DIOX1, DOX1, PADOX-1, Peroxidase superfamily protein
At3g01470	ATHB-1, ATHB1, HAT5, HB-1, HD-ZIP-1, homeobox 1
At3g01530	ATMYB57, MYB57, myb domain protein 57
At3g01620	beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase family protein
At3g01630	Major facilitator superfamily protein
At3g01750	Ankyrin repeat family protein
At3g01840	Protein kinase superfamily protein
At3g01980	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
At3g02810	Protein kinase superfamily protein
At3g02970	EXL6, EXORDIUM like 6
At3g03800	ATSYP131, SYP131, syntaxin of plants 131
At3g04010	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein
At3g04360	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein
At3g04700	Protein of unknown function (DUF1685)
At3g05150	Major facilitator superfamily protein
At3g05610	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
At3g05820	At-A/N-InvH, INVH, invertase H
At3g05930	GLP8, germin-like protein 8
At3g06260	GATL4, galacturonosyltransferase-like 4
At3g06490	AtMYB108, BOS1, MYB108, myb domain protein 108
At3g06830	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
At3g08040	ATFRD3, FRD3, MAN1, MATE efflux family protein
At3g09530	ATEXO70H3, EXO70H3, exocyst subunit exo70 family protein H3
At3g10320	Glycosyltransferase family 61 protein
At3g10525	LGO, LOSS OF GIANT CELLS FROM ORGANS
At3g10985	ATWI-12, SAG20, WI12, senescence associated gene 20
At3g11430	ATGPAT5, GPAT5, glycerol-3-phosphate acyltransferase 5
At3g11690	unknown protein
At3g13790	ATBFRUCT1, ATCWINV1, Glycosyl hydrolases family 32 protein
At3g14280	unknown protein
At3g14380	Uncharacterised protein family (UPF0497)

At3g14560	unknown protein
At3g16040	Translation machinery associated TMA7
At3g17060	Pectin lyase-like superfamily protein
At3g17980	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein
At3g18810	Protein kinase superfamily protein
At3g19020	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
At3g19310	PLC-like phosphodiesterases superfamily protein
At3g19580	AZF2, ZF2, zinc-finger protein 2
At3g20190	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
At3g20530	Protein kinase superfamily protein
At3g20580	COBL10, COBRA-like protein 10 precursor
At3g20960	CYP705A33, cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 33
At3g21180	ACA9, ATACA9, autoinhibited Ca(2+)-ATPase 9
At3g21570	unknown protein
At3g22420	ATWINK2, WNK2, ZIK3, with no lysine (K) kinase 2
At3g22910	ATPase E1-E2 type family protein / haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein
At3g23410	ATFAO3, FAO3, fatty alcohol oxidase 3
At3g23460	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
At3g25620	ABC-2 type transporter family protein
At3g25810	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
At3g26110	Anther-specific protein agp1-like
At3g26880	Plant self-incompatibility protein S1 family
At3g27810	ATMYB21, ATMYB3, MYB21, myb domain protein 21
At3g28770	Protein of unknown function (DUF1216)
At3g43430	RING/U-box superfamily protein
At3g43860	AtGH9A4, GH9A4, glycosyl hydrolase 9A4
At3g43960	Cysteine proteinases superfamily protein
At3g44250	CYP71B38, cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 38
At3g45940	Glycosyl hydrolases family 31 protein
At3g47340	ASN1, AT-ASN1, DIN6, glutamine-dependent asparagine synthase 1
At3g47960	Major facilitator superfamily protein
At3g50310	MAPKKK20, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 20
At3g50530	CRK, CDPK-related kinase
At3g52600	AtcwINV2, CWINV2, cell wall invertase 2
At3g52740	unknown protein
At3g53300	CYP71B31, cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 31
At3g53510	ABC-2 type transporter family protein
At3g54240	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
At3g54800	Pleckstrin homology (PH) and lipid-binding START domains-containing protein
At3g55730	AtMYB109, MYB109, myb domain protein 109
At3g55870	ADC synthase superfamily protein
At3g56060	Glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase family protein
At3g57950	unknown protein
At3g59850	Pectin lyase-like superfamily protein
At3g60290	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein

At3g60780	Protein of unknown function (DUF1442)
At3g61160	Protein kinase superfamily protein
At3g61900	SAUR-like auxin-responsive protein family
At3g62550	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein
At3g62650	unknown protein
At3g62710	Glycosyl hydrolase family protein
At3g63470	scpl40, serine carboxypeptidase-like 40
At4g00950	MEE47, Protein of unknown function (DUF688)
At4g02050	STP7, sugar transporter protein 7
At4g03290	EF hand calcium-binding protein family
At4g04980	unknown protein
At4g08290	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
At4g09460	AtMYB6, MYB6, myb domain protein 6
At4g10310	ATHKT1, HKT1, high-affinity K <sup>+</sup> transporter 1
At4g12410	SAUR-like auxin-responsive protein family
At4g12530	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
At4g13790	SAUR-like auxin-responsive protein family
At4g15650	unknown proteinViruses - 111; Other Eukaryotes - 1512 (source: NCBI BLink).
At4g15980	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
At4g16146	cAMP-regulated phosphoprotein 19-related protein
At4g16640	Matrixin family protein
At4g17690	Peroxidase superfamily protein
At4g18280	glycine-rich cell wall protein-related
At4g18700	ATWL4, CIPK12, SnRK3.9, WL4, CBL-interacting protein kinase 12
At4g19430	unknown protein
At4g23690	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein
At4g24380	INVOLVED IN: 10-formyltetrahydrofolate biosynthetic process
At4g24640	APPB1, Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
At4g25010	Nodulin MtN3 family protein
At4g25390	Protein kinase superfamily protein
At4g25780	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
At4g27110	COBL11, COBRA-like protein 11 precursor
At4g27580	unknown protein
At4g28000	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
At4g30140	CDEF1, GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
At4g30290	ATXTH19, XTH19, xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 19
At4g33230	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
At4g33970	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
At4g34510	KCS17, 3-ketoacyl-CoA synthase 17
At4g34590	ATB2, AtbZIP11, BZIP11, GBF6, G-box binding factor 6
At4g34970	ADF9, actin depolymerizing factor 9
At4g35060	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
At4g35190	Putative lysine decarboxylase family protein
At4g36110	SAUR-like auxin-responsive protein family
At4g36490	ATSFH12, SFH12, SEC14-like 12



At4g38950	ATP binding microtubule motor family protein
At4g39110	Malectin/receptor-like protein kinase family protein
At4g39480	CYP96A9, cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 9
At4g39610	Protein of unknown function, DUF617
At5g04180	ACA3, ATACA3, alpha carbonic anhydrase 3
At5g04340	C2H2, CZF2, ZAT6, zinc finger of Arabidopsis thaliana 6
At5g08250	Cytochrome P450 superfamily protein
At5g09520	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
At5g09970	CYP78A7, cytochrome P450, family 78, subfamily A, polypeptide 7
At5g10500	Kinase interacting (KIP1-like) family protein
At5g12000	Protein kinase protein with adenine nucleotide alpha hydrolases-like domain
At5g12180	CPK17, calcium-dependent protein kinase 17
At5g13580	ABC-2 type transporter family protein
At5g15110	Pectate lyase family protein
At5g15140	Galactose mutarotase-like superfamily protein
At5g16440	IPP1, isopentenyl diphosphate isomerase 1
At5g16500	Protein kinase superfamily protein
At5g17310	AtUGP2, UGP2, UDP-glucose pyrophosphorylase 2
At5g19880	Peroxidase superfamily protein
At5g20110	Dynein light chain type 1 family protein
At5g20830	ASUS1, atsus1, SUS1, sucrose synthase 1
At5g22420	FAR7, fatty acid reductase 7
At5g23020	IMS2, MAM-L, MAM3, 2-isopropylmalate synthase 2
At5g23960	ATTPS21, TPS21, terpene synthase 21
At5g24860	ATFPF1, FPF1, flowering promoting factor 1
At5g25110	CIPK25, SnRK3.25, CBL-interacting protein kinase 25
At5g26310	UGT72E3, UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
At5g27000	ATK4, KATD, kinesin 4
At5g27870	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
At5g27980	Seed maturation protein
At5g28680	ANX2, Malectin/receptor-like protein kinase family protein
At5g37060	ATCHX24, CHX24, cation/H <sup>+</sup> exchanger 24
At5g37170	O-methyltransferase family protein
At5g37740	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein
At5g38320	unknown protein
At5g39310	ATEXP24, ATEXPA24, ATHEXP ALPHA 1.19, EXP24, EXPA24, expansin A24
At5g39400	ATPTEN1, PTEN1, Calcium/lipid-binding (CaLB) phosphatase
At5g39420	cdc2cAt, CDC2C
At5g39870	Protein of unknown function (DUF1216)
At5g40155	Defensin-like (DEFL) family protein
At5g40170	AtRLP54, RLP54, receptor like protein 54
At5g43870	Plant protein of unknown function (DUF828) with plant pleckstrin homology-like region
At5g44630	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
At5g45840	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
At5g46050	ATPTR3, PTR3, peptide transporter 3
At5g48140	Pectin lyase-like superfamily protein

At5g49130	MATE efflux family protein
At5g49800	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
At5g50010	sequence-specific DNA binding transcription factors;transcription regulators
At5g50800	Nodulin MtN3 family protein
At5g50830	unknown protein
At5g52810	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
At5g53810	O-methyltransferase family protein
At5g54840	ATSGP1, SGP1, Ras-related small GTP-binding family protein
At5g55010	unknown protein
At5g56540	AGP14, ATAGP14, arabinogalactan protein 14
At5g56640	MIOX5, myo-inositol oxygenase 5
At5g56870	BGAL4, beta-galactosidase 4
At5g57660	ATCOL5, COL5, CONSTANS-like 5
At5g58170	SVL5, SHV3-like 5
At5g61520	Major facilitator superfamily protein
At5g61590	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
At5g61710	unknown protein
At5g61850	LFY, LFY3, floral meristem identity control protein LEAFY (LFY)
At5g64510	unknown protein
At5g65110	ACX2, ATACX2, acyl-CoA oxidase 2
At5g65380	MATE efflux family protein
At5g65530	Protein kinase superfamily protein
At5g65870	ATPSK5, PSK5, PSK5, phytosulfokine 5 precursor

#### 12.4. Anexo IV: Lista de genes con niveles de expresión reducidos en plantas *arf6* *arf8* y *pTCP15::TCP15-EAR*.

Los genes cuya expresión fue validada por RT-qPCR en muestras de flores de plantas *pTCP15::TCP15-EAR* se muestran resaltados en verde.

AGI	Descripción
At1g67865	unknown protein
At5g11420	Protein of unknown function, DUF642
At1g52830	IAA6, SHY1, indole-3-acetic acid 6
At1g11545	XTH8, xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 8
At5g24580	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
At1g29500	SAUR-like auxin-responsive protein family
At4g01080	TBL26, TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 26
At1g06830	Glutaredoxin family protein
At1g64390	AtGH9C2, GH9C2, glycosyl hydrolase 9C2
At1g29510	SAUR68, SAUR-like auxin-responsive protein family
At1g29460	SAUR-like auxin-responsive protein family
At2g33850	unknown protein
At3g29370	unknown protein
At5g11540	D-arabinono-1,4-lactone oxidase family protein
At4g11290	Peroxidase superfamily protein
At3g48970	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
At1g29450	SAUR-like auxin-responsive protein family
At1g65450	HXXXD-type acyl-transferase family protein
At2g19460	Protein of unknown function (DUF3511)
At4g37890	EDA40, Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
At5g48900	Pectin lyase-like superfamily protein
At5g25460	Protein of unknown function, DUF642
At3g29030	ATEXP5, ATEXPA5, ATHEXP ALPHA 1.4, EXP5, EXPA5, expansin A5
At1g76240	Arabidopsis protein of unknown function (DUF241)
At2g39850	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein
At5g66590	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
At1g76160	sks5, SKU5 similar 5
At4g23496	SP1L5, SPIRAL1-like5
At3g28200	Peroxidase superfamily protein
At2g21650	ATRL2, MEE3, RSM1, Homeodomain-like superfamily protein
At4g25260	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
At1g26730	EXS (ERD1/XPR1/SYG1) family protein
At4g12730	FLA2, FASCICLIN-like arabinogalactan 2
At5g45950	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
At4g32000	Protein kinase superfamily protein

At3g01860	unknown protein
At1g14280	PKS2, phytochrome kinase substrate 2
At3g23050	AXR2, IAA7, indole-3-acetic acid 7
At1g17700	PRA1.F1, prenylated RAB acceptor 1.F1
At4g19380	Long-chain fatty alcohol dehydrogenase family protein
At1g04250	AXR3, IAA17, AUX/IAA transcriptional regulator family protein
At2g38110	ATGPAT6, GPAT6, glycerol-3-phosphate acyltransferase 6
At3g06070	unknown protein
At1g29440	SAUR-like auxin-responsive protein family
At5g39860	BHLH136, BNQ1, PRE1, basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding family protein
At5g03120	unknown protein
At2g42900	Plant basic secretory protein (BSP) family protein
At3g15540	IAA19, MSG2, indole-3-acetic acid inducible 19
At1g73830	BEE3, BR enhanced expression 3
At2g41820	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
At3g28180	ATCSLC04, ATCSLC4, CSLC04, CSLC04, CSLC4, Cellulose-synthase-like C4
At5g42860	unknown protein
At1g11850	unknown protein
At2g18480	Major facilitator superfamily protein
At1g66940	protein kinase-related
At3g58120	ATBZIP61, BZIP61, Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein
At4g16515	RGF6, Encodes a root meristem growth factor (RGF).
At3g07010	Pectin lyase-like superfamily protein
At1g20190	ATEXP11, ATEXPA11, ATHEXP ALPHA 1.14, EXP11, EXPA11, expansin 11
At4g23820	Pectin lyase-like superfamily protein
At5g12940	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
At5g07110	PRA1.B6, prenylated RAB acceptor 1.B6
At2g40610	ATEXP8, ATEXPA8, ATHEXP ALPHA 1.11, EXP8, EXPA8, expansin A8
At1g04240	IAA3, SHY2, AUX/IAA transcriptional regulator family protein
At1g29670	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
At5g10430	AGP4, ATAGP4, arabinogalactan protein 4