



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Tesis de Doctorado

**“Control de la proliferación y diferenciación celular en plantas
por microARNs”**

Presentada por

Lic. Matías Beltramino

Director: Dr. Javier Palatnik

Rosario, Santa Fe, Argentina

2019

“Control de la proliferación y diferenciación celular en plantas por microARNs”

Matías Beltramino

Licenciado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre Abril de 2014 y Febrero de 2019, bajo la dirección del Dr. Javier Palatnik.

Parte del trabajo realizado en esta tesis ha sido publicado en los siguientes artículos y congresos:

Publicaciones científicas

- **Beltramino M**, Ercoli MF, Debernardi JM, Goldy C, Rojas AML, Nota F, Alvarez ME, Vercruyssen L, Inze D, Palatnik JF, Rodriguez RE (2018) Robust increase of leaf size by *Arabidopsis thaliana* GRF3-like transcription factors under different growth conditions. *Scientific reports* 8: 13447. doi: 10.1038/s41598-018-29859-9
- **Beltramino M**, Ferela A, Debernardi JM, Schommer C, Palatnik JF. Diversification of repression mechanisms regulating *GRF* transcription factors in *Brassica* species, en preparación.

Presentaciones a congresos

- **Beltramino M.**, Ferela A., Debernardi J., Palatnik J. F. “Interacción entre los sistemas ARF y miR396/GRFs en la regulación del crecimiento de *Arabidopsis*” Simposio de Genómica Funcional de Plantas”. Rosario, Argentina.2017.
- **Beltramino M.**, Ferela A., Debernardi J., Palatnik J. F. “Interaction between regulatory pathways involved in leaf growth in *Arabidopsis thaliana*” Symposium Frontiers in Bioscience II. Buenos Aires, Argentina.2016.
- **Beltramino M.**, Ferela A., Debernardi J., Palatnik J. F. “Interaction between growth regulating systems in *Arabidopsis thaliana*” LII Annual Meeting of SAIB. Cordoba, Argentina.2016.
- Ferela A., Debernardi J. M., **Beltramino M.**, Palatnik J. F. “Identification of new regulators of plant growth” 5th International Symposium of Forage Breeding (ISFB), Buenos Aires, Argentina, 2015.

Agradecimientos

Esta Tesis y el recorrido de estos cinco años fueron posibles por muchas personas que me brindaron apoyo, colaboración, enseñanza, momentos de dispersión y diversión, contención y locura linda.

A Javier, por darme la posibilidad de sumarme a su Grupo, por todo su tiempo y trabajo dedicado, enseñanza, ideas y motivación. Realmente aprendí muchísimo en este tiempo y claramente lo veo.

A Rama, por el trabajo realizado en conjunto y especialmente porque siempre está disponible o se hace un momento para una mini clase, resolver una duda o dar un consejo.

Al grupo del lab, que ha ido variando por supuesto pero con cada uno compartimos el día a día, el trabajo, los problemas experimentales, los nervios y risas, el almuerzo y lo mates hasta bien lavados. A Juan por orientarme en el primer tiempo en el lab. A Carla, Florchus y Belu que fueron las primeras que estaban ahí y rápidamente se multiplicaron en cantidad y sonoridad, sumando a Anto, Ana, Ara, Cami y Juli! Muchas Gracias chicas por cada mano que recibí y por la energía que cada una le mete al lab. Fue un gusto en serio compartir este tiempo con ustedes. A Uci que siempre estuvo y sigue ahora un poco más de lejos disponible para una consulta bioinformática. A Santi que llego para que los hombres empecemos a sumar número también! Y a Cele, Dani y Nico recientemente integrados al equipo. Un agradecimiento especial a quienes participaron directamente en partes de los resultados presentados en este trabajo.

También a los compañeros del lado Carrillo del lab porque compartimos un montón de tiempo de laboratorio y lo hicieron agradable: Pau, Colo, Ro, Juli, Nico, Martín y Rodri.

Al personal de apoyo, Clau, Sil, Vivi y Lilo de lavado, Diego en la cámara, y Rodri y Quique en Microscopia. Por su trabajo para que tengamos el material o la asistencia disponible y siempre con muy buena onda.

Al grupo de la facu que aunque los veo muy esporádicamente últimamente, cuando nos encontramos es agradable poder compartir en que anda cada uno y hacer un poco de catarsis.

A mis amigos y alumnos del mundillo acrobático con quienes comparto esta actividad, momentos de esparcimiento y momentos de investigación y creación extra-científica. Fundamental para el equilibrio de mi mente.

A mi Familia, porque son un soporte fundamental. Mis hermanos Lucas, Pablo, Gisel, Jazmín y Dani también. Cada uno distribuido por diferentes lugares pero igualmente cerca. Y especialmente a mi mamá y papá porque siempre están disponibles para brindarme un ayuda, contención y cariño.

A Maga, porque proyectamos juntos, compartimos, nos divertimos, nos aguatamos y aguatamos a la sabandija, y por el amor.

INDICE GRNERAL.

1	Resumen.....	5
2	Abreviaturas y términos en inglés.....	7
3	Introducción.	10
3.1.	Desarrollo de las hojas.....	10
3.1.1.	Establecimiento del primordio de hoja.....	11
3.1.2.	Determinación del eje dorso-ventral de la hoja.	12
3.1.3.	Expansión de la lámina de la hoja.....	13
3.1.4.	Senescencia de la hoja.	14
3.2.	Regulación de la expresión génica por ARNs pequeños.	16
3.2.1.	Conservación evolutiva de los miARNs en plantas.	18
3.2.2.	Control del desarrollo de la hoja por miARNs.....	19
3.3.	El sistema miR396/GRFs/GIFs.	20
3.3.1.	Familia de miR396.....	20
3.3.2.	<i>GROWTH REGULATING FACTORS</i>	21
3.3.3.	<i>GRF-INTERACTING FACTORS</i>	24
3.4.	Control del crecimiento y desarrollo de las plantas por el sistema <i>mir396/GRFs/GIFs</i>.....	25
3.4.1	Control del desarrollo de la hoja.....	25
3.4.2.	Control de la senescencia de la hoja por el sistema <i>mir396/GRFs/GIF</i>	28
3.4.3.	Embrión y meristema apical del tallo.....	28
3.4.4.	Desarrollo reproductivo.	29
3.4.5.	Desarrollo de la raíz.....	29
3.5.	<i>AUXIN RESPONSE FACTORS</i>.....	30
3.5.1.	Regulación del desarrollo por <i>ARF2</i>	32
4.	Objetivos.	35
4.1	Objetivo general.....	35
4.2	Objetivos particulares.	35
5.	Materiales y Métodos.....	37
5.1.	Metodología para el clonado de fragmentos de ADN.	37
5.1.1.	Cepas bacterianas empleadas.....	37
5.1.2.	Vectores plasmídicos utilizados.	37

5.1.3. Vectores utilizados en esta tesis.	37
5.1.4. Extracción de ADN genómico de Arabidopsis.	39
5.1.5. Minipreparaciones de ADN plasmídico.	40
5.1.6. Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	40
5.1.7. Mutagénesis por delección.	41
5.1.8. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.	41
5.1.9. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.	41
5.1.10. Ligación de fragmentos de ADN.	41
5.1.11. Transformación bacteriana.	42
5.1.12. Selección y análisis de transformantes.	43
5.2. Material vegetal utilizado y obtención de plantas transgénicas.	43
5.2.1. Ecotipos y mutantes utilizados, y condiciones de crecimiento.	43
5.2.2. Transformación vegetal.	44
5.2.3. Recolección y esterilización de semillas.	44
5.2.4. Selección de transformantes.	45
5.3. Medida del área de las células, y estimación del número de células de las hojas.	45
5.4. Senescencia inducida por oscuridad y medida del rendimiento cuántico máximo del Fotosistema II.	45
5.5. Caracterización del sistema radicular de las plantas.	46
5.5.1. Condiciones de crecimiento.	46
5.5.2. Medidas de elongación de raíz primaria.	46
5.5.3. Caracterización celular del sistema radicular.	46
5.7. Tratamiento de estrés por sequía.	47
5.8. Cuantificación del nivel de expresión génica.	47
5.8.1. Extracción de ARN.	47
5.8.2. Cuantificación y chequeo de la integridad del ARN purificado.	48
5.8.3. Tratamiento del ARN preparado con ADNasa.	48
5.8.4. Retrotranscripción (RT).	48
5.8.5. Retrotranscripción para analizar la expresión de miARNs.	49
5.8.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).	50
5.8.7. Blot de ARN pequeños.	52
5.9. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).	54

5.9.1. Recolección y fijado de las muestras.	54
5.9.2. Extracción de núcleos.....	54
5.9.3. Preincubación con beads.	55
5.9.4. Inmunoprecipitación.	55
5.9.5. Reversión del entrecruzamiento químico ADN-proteína, y purificación del ADN.	56
5.9.6. Cuantificación del enriquecimiento por qPCR.	56
5.10. Recursos Bioinformáticos.	57
6. Resultados Capitulo 1.	59
6.1. Introducción.....	59
6.2. Resultados.	60
6.2.1. Análisis de la estructura génica de los <i>GRFs</i>	60
6.2.2. Actividad diferencial de los <i>GRFs</i> entre los miembros de la familia.	61
6.2.3. La expresión de <i>GRFs</i> tipo <i>AtGRF3</i> de distintas especies producen un incremento del tamaño de hojas en <i>Arabidopsis</i>	65
6.2.4. Rol del nodo <i>miR396/GRFs</i> bajo condiciones de estrés.....	67
6.3. Discusión.....	70
7. Resultados Capitulo 2.	74
7.1. Introducción.....	74
7.2. Resultados.	75
7.2.1. Análisis de la regulación de los <i>GRFs</i> por el miR396 en diferentes especies.	75
7.2.2. El promotor de <i>GRF5</i> cumple un rol primordial en la determinación del patrón de expresión del gen en hoja.	77
7.2.3. Búsqueda de factores de transcripción reguladores de <i>GRF5</i>	80
7.2.4. <i>ARF2</i> regula negativamente la expresión de <i>GRF5</i>	83
7.2.5. Mutaciones en <i>GIF1</i> suprimen el fenotipo de <i>arf2</i>	87
7.2.6. Relación entre <i>ARF2</i> y los <i>GRFs</i> regulados por miR396.	88
7.2.7. <i>ARF2</i> afecta los niveles de miR396 a través de un feedback regulatorio.	90
7.2.8. Interacción entre <i>rGRF3</i> y <i>arf2</i>	91
7.2.9. Relación entre miR396/ <i>GRFs</i> y <i>ARF2</i> en el control de la senescencia.	94
7.3. Discusión.....	95
7.3.1 Evolución de la regulación de los <i>GRFs</i> por miR396.	95
7.3.2. La represión a nivel transcripcional de <i>GRF5</i> compensa por la falta de regulación post-transcripcional por miR396.....	95
7.3.3. <i>ARF2</i> actúa sobre los <i>GRFs</i> en el control de la proliferación celular en hojas.	97

8. Conclusiones.....	100
8.1. Conclusiones I.	100
8.2. Conclusiones II.	100
9. ANEXO.....	103
9.1 Anexo R1.....	103
9.2 Anexo R2.....	105
10. Bibliografía	117

1 Resumen

El tamaño final de los órganos está determinado mayormente por la extensión de una fase inicial de proliferación celular, seguida de una fase de expansión y diferenciación celular. El control de estos procesos involucra la acción concertada de varias vías de señalización hormonal y de redes de factores de transcripción, los cuales pueden, a su vez, ser regulados por miARNs. Los microARNs (miARNs) son ARN pequeños de 20-21 nucleótidos y constituyen un sistema ampliamente distribuido para controlar la expresión génica.

El miARN miR396 regula los factores de transcripción de la familia *GROWTH REGULATING FACTORS* (*GRFs*). Estos factores de transcripción se caracterizan por presentar dos dominios conservados llamados WRC y QLQ, que median la unión al ADN y la interacción con otras proteínas, respectivamente. En *Arabidopsis thaliana*, siete de los nueve *GRFs* son regulados por miR396. A su vez, los *GRFs* forman complejos con los *GRF-INTERACTING FACTORS* (*GIFs*). El sistema *miR396/GRFs* se encuentra conservado en angiospermas y gimnospermas. Los *GRFs* estimulan la proliferación celular, mientras que la represión de los mismos por el miARN miR396 detiene la división celular y dispara la diferenciación. Durante el desarrollo de la hoja este sistema regulatorio tiene un rol fundamental en la determinación el tamaño y forma del órgano, así como también participa en el control de la senescencia.

En este trabajo de tesis, en primer lugar, se analizó el control del balance *miR396/GRFs* como potencial herramienta biotecnológica. Obtuvimos plantas con hojas más grandes a través de la reducción de la actividad de miR396. Demostramos que versiones resistentes a la regulación de miR396 de los genes de *Arabidopsis thaliana* *AtGRF2* (*rGRF2*) y *AtGRF3* (*rGRF3*) aumentan el tamaño de las hojas, pero que *rGRF3* resulta ser más eficiente. La introducción de *At-rGRF3* en *Brassica oleracea* produce aumento de hojas, raíz y semillas. Además, cuando genes homólogos *At-rGRF3* de soja y arroz son introducidos en *Arabidopsis*, también se incrementa el tamaño de la hoja. Esto sugiere que la regulación de miR396 sobre *GRF3* es importante para el control del crecimiento de los órganos en un amplio rango de especies. Las plantas que expresan *rGRF3* presentaron hojas más grandes que las silvestres, incluso en condiciones de estrés por sequía, estado en el cual se estimula la expresión de miR396.

Por otro lado, se analizó la evolución de la regulación de miR396 sobre los *GRFs* y se encontró que la relación se encuentra ampliamente conservada evolutivamente. En la mayoría de las especies de dicotiledóneas todos los genes *GRF* están regulados por miR396. Sin embargo, observamos que dentro de las *Brasicáceas* existe un subgrupo de genes *GRFs* que han perdido dicha regulación. En *Arabidopsis thaliana*, estos genes son *GRF5* y *GRF6*. Posiblemente, el subgrupo de *GRFs* no regulados por miR396 provenga de un único ancestro

común que perdió originalmente la regulación. Estudios sobre *AtGRF5* muestran que presenta funciones redundantes con los *GRFs* involucrados en el control del tamaño de la hoja y regulados por miR396. Análisis del promotor de *GRF5* mostraron secuencias altamente conservadas en las *Brassicáceas*. En particular, la eliminación de uno de estos motivos conservados causa la expresión ectópica de *GRF5*. Estos resultados sugieren que la expresión de *GRF5* se controla por represión transcripcional, en contraste con los otros *GRFs* reprimidos post-transcripcionalmente por miR396.

A partir del análisis de distintos candidatos, identificamos que el represor transcripcional es el factor de transcripción AUXIN RESPONSE FACTOR2 (ARF2). Mutantes por pérdida de función de *arf2* presentan efectos fenotípicos pleiotrópicos, incluyendo hojas más grandes, que se asemejan a los observados en plantas que sobreexpresan *GRF5*. Un análisis de mutantes *arf2* reveló que presentan incremento de los niveles de expresión de *GRF5* y otros *GRFs*. Finalmente, a través de análisis genéticos y moleculares describimos como ARF2 controla la proliferación celular en hojas a través de *GRF5*. En forma más general, describimos una red regulatoria donde se vincula a ARF2 con el sistema de miR396/*GRFs*/*GIFs* en el control de la proliferación celular durante el desarrollo de las hojas.

2 Abreviaturas y términos en inglés

A	Adenosina.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNasa	ADN nucleasa.
ADNc	ADN complementario.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNdh	ARN doble hebra.
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato.
C	Citosina
ChIP-seq	Inmunoprecipitación de la cromatina seguido de secuenciación de alto rendimiento del ADN obtenido.
ChIP-qPCR	Inmunoprecipitación de la cromatina seguido de PCR en tiempo real cuantitativa.
CQ	Centro quiescente.
EE	Error estandar.
G	Guanina.
GFP	Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein).
<i>GUS</i>	Gen de β -glucuronidasa.
IP	Inmunoprecipitación.
IYG	Genes de rendimiento intrínseco (Intrinsic Yield Genes)
LB	Medio de cultivo para bacterias Luria-Bertani.
miARN	MicroARN
MS	Medio de cultivo para plantas Murashige-Skoog.
nt	Nucleótidos.
pb	Pares de base.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
RAM	Meristema apical de la raíz (Root Apical Meristem)
RT	Retrotranscripción.
RT-qPCR	Transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real cuantitativa.
SAM	Meristema apical del tallo (Shoot Apical Meristem).
SC	Célula madre (Stem Cell).
SCN	Nicho de células madre (Stem Cell Niche).
siARN	ARN pequeño de interferencia.

T	Timina.
T1	Línea transgénica seleccionada independiente.
ta-siARN	ARN pequeño de interferencia de acción en trans (trans-acting short-interfering RNA)
T-ADN	Fragmento de ADN plasmídico transferido al genoma nuclear en las transformaciones con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
U	Uracilo.
ZC	Zona central.
ZP	Zona periférica.
ZT	Zona de transición.

INTRODUCCIÓN

3 Introducción.

Las plantas terrestres son organismos fotosintéticos multicelulares adaptados a vivir en tierra firme. En las plantas vasculares encontramos órganos fotosintéticos especializados llamados hojas; estructuras de conducción y de soporte, los tallos; órganos que fijan la planta al suelo y absorben agua y nutrientes esenciales de él, las raíces; y estructuras reproductoras que en el caso de las espermatofitas reciben el nombre de flores.

El ciclo de vida de las plantas comienza con una célula, el cigoto, que a través de divisiones celulares asimétricas desarrolla un embrión y posteriormente los órganos de la planta. En dicotiledóneas, el embrión está formado por el meristema apical de la raíz (RAM), una región central denominada hipocótilo y dos cotiledones que flanquean el meristema apical del tallo (SAM). Estos meristemas son los nichos de las células madre (SC, del inglés "Stem Cells") pluripotentes. El SAM da lugar a los órganos y tejidos del tallo. Por su parte, el RAM da lugar a diferentes tejidos de la raíz formando el cuerpo principal y la caperuzca. Luego de un periodo de crecimiento vegetativo, se induce la floración en respuesta a condiciones ambientales como el largo del día, y esto conduce a cambiar el SAM de meristema vegetativo a meristema reproductivo. A partir de este nuevo meristema, se producen los meristemas florales y la formación de gametos, que luego de la fertilización generan un nuevo cigoto.

El desarrollo de la planta es un proceso altamente regulado genéticamente, que permite la formación correcta de cada estructura. A su vez, las plantas son organismos sésiles y su desarrollo está influenciado por factores ambientales, bióticos y abióticos, que pueden afectar la forma y tamaño final de cada órgano. Es por esto que existen múltiples redes regulatorias que involucran factores de transcripción, ARN pequeños, enzimas, hormonas y otros componentes celulares que permiten integrar las múltiples señales que inciden sobre el proceso de desarrollo.

3.1. Desarrollo de las hojas.

Las hojas son el órgano fotosintético por excelencia de las plantas. La forma y tamaño de estas, son factores críticos que inciden en el éxito de la planta. Generalmente, presentan una estructura aplanada para absorber eficientemente energía lumínica, que produce la excitación de electrones en el cloroplasto, y para maximizar el intercambio de los gases, generados o necesarios durante la fijación de carbono. Estas funciones son llevadas a cabo por tejidos especializados dispuestos en capas. La parte superior es la cara adaxial que se especializa en la captación de luz, mientras que la parte inferior es la cara abaxial, especializada en el intercambio gaseoso. Desde una perspectiva anatómica, la hoja está formada por dos capas

epidermales que rodean el mesófilo. Este, consiste de una capa superior de células densamente empaquetadas (parénquima en empalizada) y por debajo una capa de células de forma irregular con extensos espacios intercelulares de aire (parénquima esponjoso).

Para llegar a su forma y tamaño final característico, el crecimiento de la hoja en desarrollo está estrictamente controlado, primero a través de la proliferación celular y luego por la expansión celular (Gonzalez et al, 2012; Piazza et al, 2005; Tsukaya, 2006). Sin embargo, la forma y el tamaño de las hojas también dependen de estímulos externos, y la mayoría de las especies tienen plasticidad en la forma de la hoja en respuesta a cambios en las condiciones ambientales.

3.1.1. Establecimiento del primordio de hoja.

A diferencia de los animales, las plantas producen nuevos órganos a lo largo de todo su ciclo de vida. Todas las partes del sistema aéreo de la planta, como las hojas, tallo y flores provienen del SAM. El SAM contiene regiones con diferentes funciones, incluyendo una zona central (ZC) (Figura I1.A.), que alberga las células pluripotentes que se dividen a baja frecuencia, y una zona periférica (ZP) (Figura I1.A), donde las células se dividen más rápidamente y luego comienzan a diferenciarse para formar los órganos (Barton, 2010). En *Arabidopsis thaliana*, dos clases de factores de transcripción con homeodominios son esenciales para la formación y mantenimiento del meristema. Uno de ellos es *WUSCHEL* (*WUS*), que es expresado en la ZC por un grupo de células que conforman el nicho de células madres (Tucker & Laux, 2007). El otro es *SHOOT MERISTEMELESS* (*STM*), un gen de la familia Homeobox de tipo *KNOTTED1* clase I (*KNOXI*), que se expresa en todo el meristema y previene la diferenciación temprana de las células (Hay & Tsiantis, 2010).

En la fase de crecimiento vegetativo, el SAM produce hojas. La ubicación de las células fundadoras de los primordios de hojas, en la ZP del meristema, sigue un arreglo regular denominado filotaxis (Figura I1.B) y se definen por máximos locales de auxina. Esta acumulación de auxina es generada por el transportador de auxina PIN-FORMED1 (*PIN1*) que produce una polarización del transporte (Heisler et al, 2005; Reinhardt et al, 2003; Stieger et al, 2002).

Los primordios foliares que comienzan a formarse (Figura I1.A y B) se diferencian del resto del meristema, a través de redes regulatorias que involucran factores de transcripción antagónicos a los de tipo *KNOX1*, como *ASYMMETRICS LEAVES1* (*AS1*) una proteína con dominio MYB (Byrne et al, 2000; Byrne et al, 2002). *AS1* actúa en conjunto con *AS2*, una proteína con dominio *LOB*, y reprimen *STM* y otros genes *KNOX1* en el primordio de hoja (Figura I2.A)(Byrne et al, 2002; Guo et al, 2008; Semiarti et al, 2001). Esta represión de los genes de identidad del

meristema es importante para que se ejecute el programa de desarrollo de la hoja y es mediada por diferentes vías además de AS1-AS2.

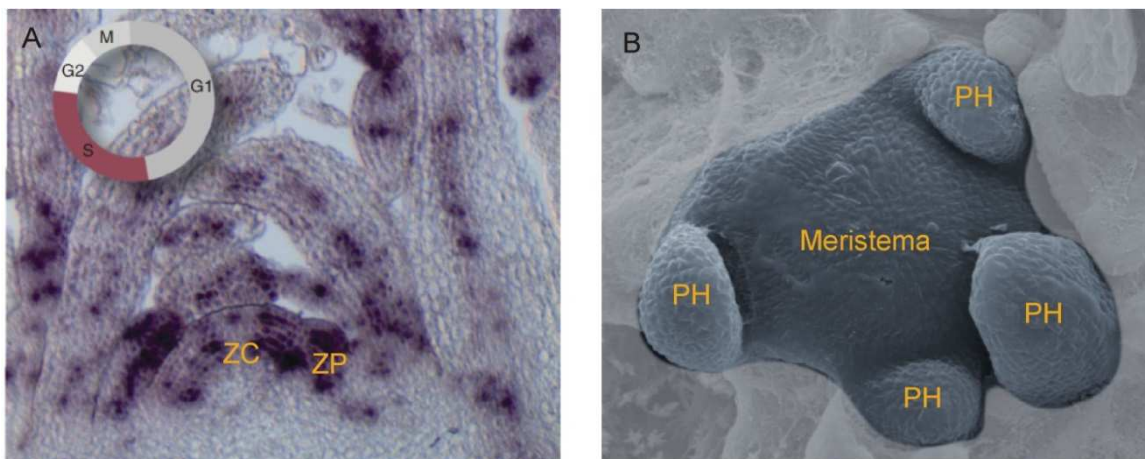


Figura 11. Estructura del meristema apical del tallo. B) Corte transversal del meristema apical del tallo. Las células en fase S del ciclo celular se identifican por la expresión de HISTONE H4, detectada por hibridación *in situ*. Se encuentra indicada la zona central (ZC) del meristema y la zona periférica (ZP), donde está saliendo un nuevo primordio. B) Vista superior del meristema apical del tallo y los primordios de hojas en desarrollo (PH). Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido. Figura adaptada de (Rodríguez et al, 2014).

Los bordes entre el meristema y los primordios de hoja son delimitados por los factores de transcripción de la familia *NAC* denominados *CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1)*, *CUC2* y *CUC3* (Figura 12.A). Estos genes se expresan específicamente en un pequeño conjunto de células que separan el dominio del meristema y el nuevo primordio en desarrollo (Aida et al, 1999; Takada et al, 2001; Vroemen et al, 2003). Las plantas con mutaciones en estos genes presentan fusión de cotiledones y la pérdida del meristema apical (Aida et al, 1997; Hibara et al, 2006).

3.1.2. Determinación del eje dorso-ventral de la hoja.

Inicialmente, el primordio de hoja que comienza a formarse en el margen del meristema presenta una estructura en forma de varilla. Posteriormente se expandirá formando una lámina aplanada que presenta dos superficies anatómicamente diferentes: la cara adaxial, especializada en capturar la luz, y la cara abaxial, especializada en el intercambio de gases (Chitwood et al, 2007; Husbands et al, 2009). Por lo tanto, uno de los primeros estadios del desarrollo de la hoja es el establecimiento del eje dorso ventral, que conducirá a la generación de la estructura organizada de tejidos en capa que componen la hoja. En este proceso participa una red compleja de factores de transcripción que tienen interacciones sinérgicas y exclusiones mutuas. La asimetría inherente de los lados del primordio respecto del meristema dirige el modelado de la hoja.

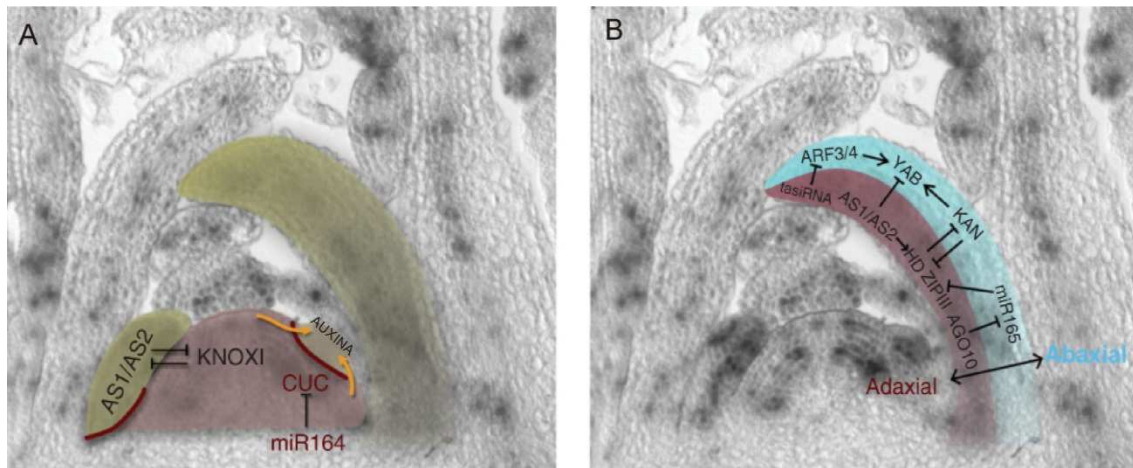


Figura 12. Primeras etapas en el desarrollo de la hoja. A) Genes y hormonas involucrados en el mantenimiento del meristema e iniciación del desarrollo de la hoja. B) Zonas de expresión y actividad de los genes y ARNs pequeños esenciales para el establecimiento de la polaridad de la hoja. Figura adaptada de (Rodríguez et al, 2014).

El lado adaxial se especifica por la actividad de factores de transcripción miembros de la familia *HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER de clase III (HD-ZIP III)*, como *PHABULOSA* (Figura 12.B). La pérdida de función de estos genes causa la pérdida de la identidad de la cara adaxial (Emery et al, 2003; McConnell et al, 2001). Una segunda vía regulatoria que promueve la determinación de la cara adaxial, involucra los factores de transcripción *AS1* y *AS2* (Figura 12.B) (Xu et al, 2003). Por otro lado, el lado abaxial es especificado por la actividad de los factores de transcripción de las clases *KANADI*, *YABBY* y *ARF* (Figura 12.B) (Kerstetter et al, 2001; Pekker et al, 2005; Siegfried et al, 1999). Cabe destacar, que los factores de transcripción que promueven la definición de una cara de la hoja tienden a reprimir a los de la otra cara, de esta manera contribuyen al establecimiento de dominios complementarios definidos.

Además de estas redes de factores de transcripción, dos vías diferentes de ARNs pequeños participan en el establecimiento del patrón de expresión de los genes de polaridad (Figura 12.B). La primera involucra a los miARNs *miR165/166*, que reprimen la expresión de los factores de transcripción *HD-ZIP* (Emery et al, 2003; Juarez et al, 2004; Kidner & Martienssen, 2004; Mallory et al, 2004b). Estos miARNs actúan en el lado abaxial, limitando la expresión de los *HD-ZIP* al lado adaxial (Figura 12.B). La otra vía de ARNs pequeños conduce a la represión de los determinantes de la cara abaxial *ARF3 (ETT)* y *ARF4*, e involucra la formación de ta-siARNs (del inglés, trans-acting short-interfering RNA) (Figura 12.B) (Montgomery et al, 2008a).

3.1.3. Expansión de la lámina de la hoja.

Una vez que los dominios del primordio de la hoja se han establecidos, la lámina de la hoja crece adquiriendo su forma y tamaño final. El crecimiento es el resultado de la división y expansión celular. Estos dos procesos están estrechamente regulados. Inicialmente las células

se encuentran en activa proliferación, que involucra tanto división como expansión (Figura 13). Luego, dejan de dividirse y continúan expandiéndose hasta que alcanzan su tamaño final en la hoja madura (Figura 13).

El primordio de la hoja aparece en la periferia del meristema con una forma de cilindro aplanado. Inicialmente, mediante una breve proliferación celular localizada en los bordes del cilindro, el mismo adquiere forma de una lámina plana (Donnelly et al, 1999). Posteriormente la proliferación se distribuye de manera homogénea en el primordio en crecimiento y esto conduce al crecimiento de la hoja entera (Figura 13). Las divisiones celulares son principalmente anticlinales (perpendiculares a la superficie), generando de esta manera una lámina plana (Donnelly et al, 1999).

A medida que el órgano crece, la zona que contiene las células en proliferación se va restringiendo hacia la base del órgano (Figura 13). Las células localizadas en la parte distal de la hoja en desarrollo abandonan el ciclo celular mitótico y comienzan a expandirse (Andriankaja et al, 2012; Donnelly et al, 1999). Luego, la proliferación se detiene completamente y la lámina continúa creciendo solo por expansión celular (Figura 13). Como la proliferación primero se detiene en la parte distal de la hoja, se ha propuesto que un frente de arresto mitótico se mueve desde la punta hacia la base del órgano (Donnelly et al, 1999). Sin embargo, cabe destacar que aunque el concepto de frente de arresto podría interpretarse como una disminución progresiva en el tamaño de la zona de proliferación celular, la evidencia actual indica que la longitud de esta región es bastante constante durante un cierto período de tiempo hasta que desaparece rápidamente (Powell & Lenhard, 2012). Por otro lado, la dinámica de avance del frente es crítica para determinar el tamaño final del órgano y múltiples factores son integrados para determinar su comienzo y progresión.

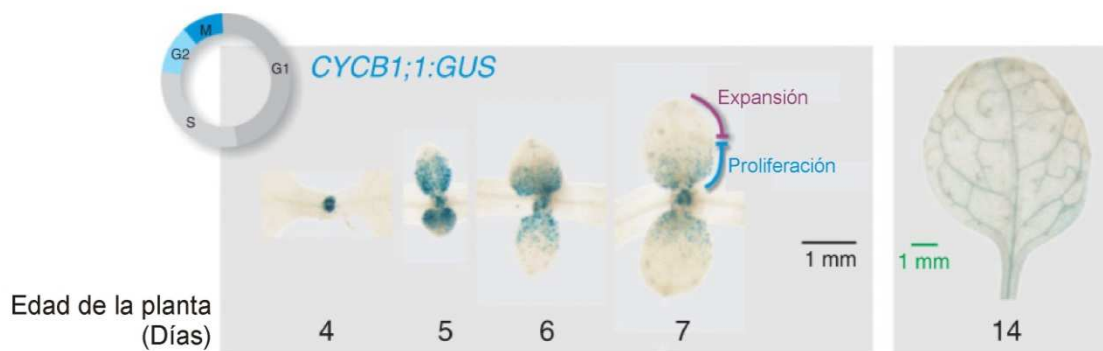


Figura 13 Proliferación y expansión celular durante el desarrollo de la hoja. Distribución de las fases de proliferación y expansión celular en la hoja en desarrollo a lo largo del tiempo. En azul se observa el reportero de CYCLINB1;1 (CYCB1,1:GUS), que se expresa en las fase G2-M del ciclo celular. Adaptado de (Rodríguez et al, 2010)

3.1.4. Senescencia de la hoja.

La senescencia es el proceso de muerte celular programada dependiente de la edad que se produce a nivel celular, tejido, órgano u organismo, y que conduce al final de un ciclo de vida. Este proceso es la última etapa del desarrollo de las hojas. Durante esta etapa, las células de la hoja son sometidas a masivos cambios a nivel de estructura, metabolismo y expresión génica.

El primer y más significativo cambio en la estructura de la célula es la degradación de los cloroplastos. La degradación de cloroplastos produce la pérdida de color verde de las hojas debido a la descomposición de la clorofila (Figura 14). Por el contrario, las mitocondrias y el núcleo, que son esenciales para la expresión génica y producción de energía, permanecen intactos hasta la etapa final de la senescencia. Este proceso ordenado facilita la hidrólisis de nutrientes y el reciclaje hacia las estructuras reproductivas en desarrollo (Buchanan-Wollaston et al, 2003; Buchanan-Wollaston et al, 2005; Lim et al, 2007). En estadios más avanzados aparecen síntomas clásicos de muerte celular programada como el colapso controlado de vacuolas la condensación de la cromatina y la fragmentación el ADN. Finalmente la membrana plasmática se desintegra eliminando la homeostasis celular y finalizando la vida de la célula en la hoja.

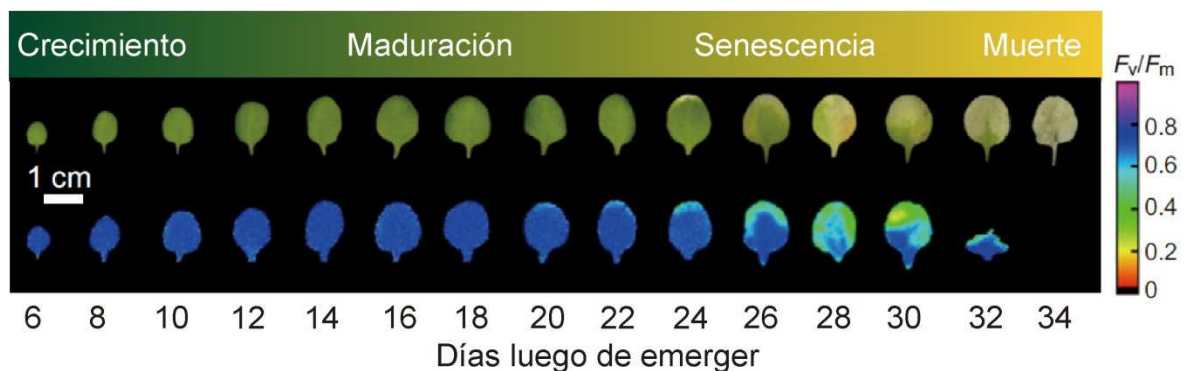


Figura 14. Senescencia de las hojas en Arabidopsis. Hoja #4 de Arabidopsis desde el día 6, después de emerger del meristema, hasta el día 34 presentada cada dos días (Línea superior). En la línea inferior, se representa la eficiencia fotoquímica de la hoja (F_v/F_m). Durante la senescencia las hojas se vuelven amarillas y la eficiencia fotoquímica se reduce gradualmente. Figura adaptada de (Woo et al, 2013).

Los cambios estructurales son acompañados por cambios bioquímicos. A nivel metabólico, la asimilación de carbono es remplazada por catabolismo. El aumento de la actividad catabólica es responsable de la conversión de los materiales celulares acumulados durante la fase de crecimiento de la hoja en nutrientes que son movilizados hacia las semillas u otros órganos en crecimiento. El contenido total de polisomas y ribosomas disminuye, reflejando una disminución de la síntesis de proteínas. Concomitantemente se reduce la síntesis de ARNr y ARNt. La desintegración de los cloroplastos está acompañada por la degradación de clorofila y la progresiva pérdida de proteínas, tales como Ribulosa Bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa (RuBisCO) y la Proteína de Unión a Clorofila a/b (CAB). La hidrólisis de

las proteínas depende de la acción de varias endo- y exo-peptidasas (Hortensteiner & Feller, 2002; Otegui et al, 2005), mientras que las enzimas que degradan lípidos, incluyendo fosfolipasas, están involucradas en la hidrólisis de la membrana (Thompson et al, 2000; Thompson et al, 1998). Coincidente con esto, muchos de los genes que fueron asociados a la senescencia dado que son inducidos durante este proceso (denominados SAGs, Senescence Associated Gene o SENs, SENESENCE), codifican proteínas que participan en la degradación de macromoléculas (Gepstein et al, 2003; Lim et al, 2007).

La decisión de cuando comenzar la senescencia es crítica para la planta y debe estar controlada por un complejo programa genético que integra información sobre la edad de la hoja, factores ambientales y factores endógenos (Buchanan-Wollaston et al, 2003; Horward Thomas, 1980; Lim et al, 2007). Además, el proceso de senescencia es acelerado debido a estreses ambientales como temperatura, sequia, deficiencia de nutrientes, oscuridad y ataques de patógenos (Buchanan-Wollaston et al, 2003). Se ha estimado que unos 100 factores de transcripción que pertenecen a las familias APETALA2, bZIP, MYB, NAC, WRKY, ZF, y GRAS son regulados diferencialmente durante la senescencia de las hojas (Buchanan-Wollaston et al, 2005).

La senescencia de la hoja es un proceso perjudicial para el órgano en sí, pero es un proceso crítico que garantiza la óptima producción de progenie. Por lo tanto, es un proceso de desarrollo seleccionado evolutivamente y comprende una fase importante en el ciclo de vida de la planta (Lim et al, 2007). Desde el punto de vista tecnológico, es una característica muy importante para plantas agronómicas ya que afecta el rendimiento, biomasa y modifica el valor nutricional (Woo et al, 2018).

3.2. Regulación de la expresión génica por ARNs pequeños.

En los organismos unicelulares, el control de la expresión génica se utiliza principalmente para que las células se ajusten a los cambios en su ambiente de manera de optimizar su crecimiento y división. En las plantas, al igual que otros organismos multicelulares, la regulación génica se utiliza mayoritariamente para la ejecución del programa genético que subyace al desarrollo del individuo. La generación de los numerosos tipos celulares diferentes que forman en conjunto un organismo multicelular depende de que los genes se activen en las células adecuadas y en los momentos precisos del desarrollo. Diferentes mecanismos regulan los tipos y las cantidades de diversas proteínas y ARNs producidas por cada tipo celular particular en un organismo multicelular. Estos mecanismos funcionan en múltiples niveles como el inicio y la velocidad de transcripción, la estabilidad de los ARN mensajeros, la eficiencia de la traducción, la estabilidad de las proteínas entre otros.

Los ARNs pequeños, moléculas de ARN de 20 a 25 nucleótidos (nt), son reguladores claves de la expresión génica en animales y plantas. Dependiendo de su vía de biogénesis, se pueden clasificar en diferentes grupos como ARN pequeños de interferencia (siARNs), siARNs derivados de transcriptos naturales antisentido (nat-siARNs), ARNs pequeños de acción en trans (ta-siARNs), y microARNs (miARNs) (Axtell, 2013; Bologna & Voinnet, 2014). A pesar de sus diferencias, los mecanismos de silenciamiento génico mediado por ARNs pequeños comparten cuatro pasos comunes y necesarios (i) el procesamiento de un ARN doble hebra (ARNdh) largo para liberar un dúplex de ARN, de un tamaño de 18-25 pares de bases (pb) de longitud, (ii) la metilación de ambos extremos 3' del dúplex, (iii) la selección de una de las hebras del dúplex de ARN y su incorporación en el complejo efector que contiene una proteína de la familia ARGONAUTA (AGO) y, por último, (iv) el reconocimiento del ácido nucleico blanco por complementariedad de bases y su silenciamiento (Bologna & Voinnet, 2014; Chapman & Carrington, 2007). El silenciamiento génico puede ser a nivel post transcripcional (PTGS) o transcripcional (TGS). En el PTGS se produce un corte endonucleolítico sobre ARNm blanco, la desestabilización del ARNm o la supresión traduccional. Mientras que el TGS requiere de la metilación de citosinas (C) en el ADN o de las histonas (Bologna & Voinnet, 2014).

El desarrollo de las plantas notoriamente se basa en varias redes evolutivamente conservadas de miARNs, así como también en vías que involucran ta-siARNs. Los miARNs, son generalmente codificados por su propia unidad transcripcional y, como los genes que codifican proteínas, tienen promotores que son reconocidos por la ARN polimerasa II (Bologna & Voinnet, 2014). Por lo tanto, pueden ser regulados espacio-temporalmente para ser expresados en las células correspondientes y en el momento indicado. La biogénesis de los miARNs requiere el procesamiento del transcripto primario que tienen complementariedad sobre sí mismo y se pliega dando como resultado un ARNdh imperfecto, que es el precursor del miARN o pri-miARN. El precursor es procesado por un complejo que contiene una ribonucleasa de tipo III llamada DCL1 (del inglés, DICERL-LIKE1) (Bologna & Voinnet, 2014). El miARN liberado tiene 21 nucleótidos y funciona en el contexto de un complejo que contiene una proteína AGO que generalmente es AGO1 en plantas (Mallory et al, 2008). De esta forma, el miARN guía al complejo hacia ARNs que tengan un sitio de complementariedad de bases, y se produce la inhibición de la traducción o corte del ARN mensajero (ARNm) (Bologna & Voinnet, 2014; Rogers & Chen, 2013).

Los ta-siARNs se generan a partir de un ARN no codificante denominados *TAS*. Este transcripto es reconocido y cortado por acción de un miARN que posee una secuencia complementaria al mismo (Allen et al, 2005). Los fragmentos de corte del ARN *TAS* son estabilizados por la proteína SGS3 (del inglés, SUPRESOR OF GENE SILENCING3) y son

convertidos en ARNdh por la acción de una polimerasa dependiente de ARN, en particular RDR6. Este ARNdh de complementariedad perfecta, es procesado por DCL4, generando ARNs pequeños de 21nt, cuya secuencia está especificada por la fase generada a partir del corte del miARN inicial. Algunos de estos ta-siARNs se incorporan a un complejo RISC (por sus siglas en inglés *RNA induced silencing complex*) y guían el corte de los transcritos de otros genes de manera similar a la acción de un miARN (Allen et al, 2005; Gascioli et al, 2005; Xie et al, 2005). En *Arabidopsis* se han descrito ocho loci que codifican para ARNs *TAS*. *TAS1a*, *TAS1b*, *TAS1c* y *TAS2* son cortados por miR173 cargado en AGO1. *TAS3a*, *TAS3b* y *TAS3c* son cortados por miR390 cargado en AGO7 y *TAS4* es cortado por miR828 (Allen & Howell, 2010; Cuperus et al, 2010; Montgomery et al, 2008a; Montgomery et al, 2008b; Peragine et al, 2004).

3.2.1. Conservación evolutiva de los miARNs en plantas.

Actualmente existen más de ~8500 *MIARNs* del reino *Plantae* anotados y en *Arabidopsis* se han identificado más de 300 *MIARNs* (miRBASE <http://www.mirbase.org/>)(Kozomara & Griffiths-Jones, 2014). Los genes de miARNs se agrupan en familias, las cuales incluyen los diferentes loci que codifican para miARNs con secuencia madura similar o idéntica, y que se diferencian en el resto de las secuencias del precursor (Meyers et al, 2008).

En base a la conservación y diversificación de los miARNs en la evolución de las plantas, las familias de miARNs se pueden agrupar en dos clases. Los miARNs antiguos, generalmente presentan altos niveles de expresión y están conservados evolutivamente; los miARNs jóvenes comparativamente se expresan en bajos niveles o son inducidos bajo condiciones específicas y generalmente existen en pocas especies, como resultado no son conservados evolutivamente (Qin et al, 2014). Muchos de los miARNs conservados sufrieron duplicaciones a partir del locus original, por lo que las familias de miARNs conservados poseen múltiples *loci*. Se han reportado evidencias de que en *Arabidopsis* existe una alta frecuencia de aparición y desaparición de genes de miARNs, mientras que algunos se estabilizarían integrándose a redes regulatorias (Fahlgren et al, 2007)

Hay 21 familias de miARNs conservadas en las angiospermas y muchas de estas también están conservadas en linajes más divergentes como gimnospermas y briofitas (Figura 15) (Cuperus et al, 2011). Las briofitas son las plantas terrestres más primitivas, indicando que estas familias de miARNs estuvieron presentes en el ancestro común de las plantas terrestres. El resto de las familias tienen una distribución taxonómica más restrictiva a determinados géneros.

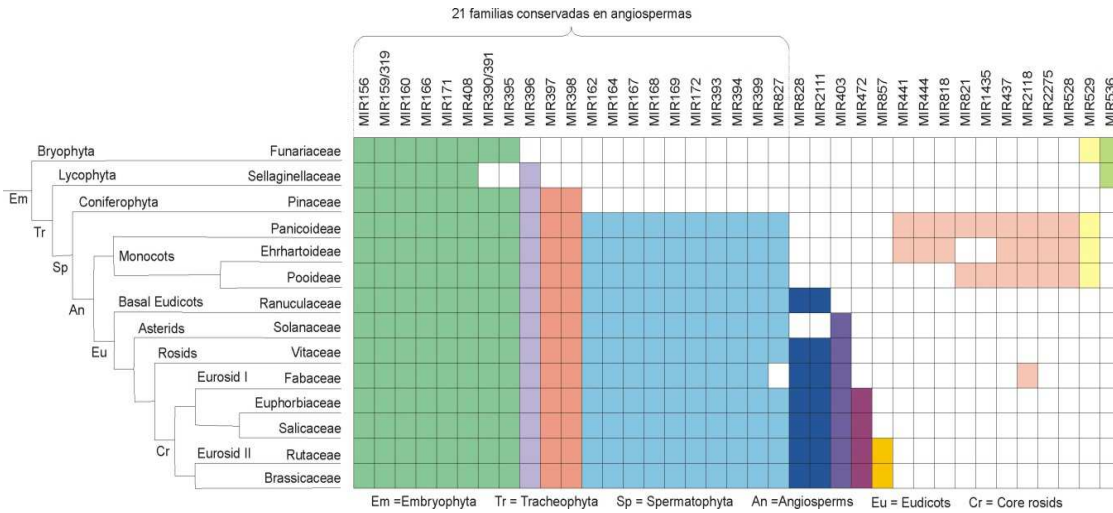


Figura I5. Familias de MIARNs conservadas en plantas. Familias de MIARNs (columnas) que están conservadas en diferentes familias de plantas (filas). Los grupos de familias MIRNA se resaltan en diferentes colores según el rango taxonómico en el que fueron identificados. Adaptado de (Cuperus et al, 2011)

3.2.2. Control del desarrollo de la hoja por miARNs.

Muchos de los miARNs conservados regulan factores de transcripción involucrados en el desarrollo de la planta y más específicamente el desarrollo de la hoja. El establecimiento y mantenimiento del SAM, desde donde se originan las hojas como todos los órganos de la parte aérea de la planta, requiere la acción de varias redes que involucran miARNs, tales como: miR394, que reprime indirectamente la expresión de *WUS*, y miR165/166 que regula directamente a los genes *HD-ZIPIII* (Holt et al, 2014; Zhou et al, 2015).

En las primeras etapas del desarrollo del primordio de hoja, se produce la separación del meristema y el establecimiento del eje dorso ventral de la hoja. En relación a estos procesos, el miARN miR164, regula la expresión de los genes *CUC1* y *CUC2* acotando su expresión a los límites entre el meristema y el primordio (Figura I2.A) (Mallory et al, 2004a). Por otro lado, dos vías de ARNs pequeños están implicadas en el preciso modelo de expresión de los genes de polaridad. La primera, involucra a miR165/166 que regulan a los genes *HD-ZIPIII*, como *PHABULOSA* y *PHAVOLUTA* limitando su expresión al lado adaxial (Figura I2.B). La segunda, corresponde a miR390 que conduce a la generación de ta-siARNs, al direccionar el corte de *TAS3*. Los ta-siARNs derivados de *TAS3* se producen en el lado adaxial y generan un gradiente que inhibe la expresión de *ARF3/4* (Figura I2.B) (Montgomery et al, 2008a; Nogueira et al, 2007).

A continuación, el primordio entra en la etapa de desarrollo de la lámina foliar, que se caracteriza por la activa proliferación celular. Adquiere forma aplanada y finalmente su tamaño y forma final, tras una etapa de expansión. Las redes de miARNs controlan y coordinan

la proliferación celular. En esta etapa tienen un rol principal miR319 y miR396 que regulan los factores de transcripción *TCP* (*TEOSINE BRANCHED1*, *CYCLOIDEA*, *PCFs*) y *GRF* (*GROWTH REGULATING FACTORS*), respectivamente. Los *GRFs* activan la proliferación celular, mientras que los *TCPs* la reprimen y desencadenan la diferenciación celular (Debernardi et al, 2014; Efroni et al, 2008; Efroni et al, 2013; Rodriguez et al, 2010; Sarvepalli & Nath, 2011; Schommer et al, 2014). El miARN miR159 de secuencia semejante a miR319 pero que regula los factores de transcripción *GAMYB*, también incide sobre la proliferación (Palatnik et al, 2007). A su vez miR319 y miR164 tienen una importante actividad en los márgenes de la hoja, y afectan la forma de la lámina en los bordes (Efroni et al, 2008; Hasson et al, 2011; Koyama et al, 2007; Nikovics et al, 2006; Schommer et al, 2008). Cabe mencionar que estas redes de miARNs se encuentran interconectadas de varias maneras, incluyendo a la regulación de la transcripción de *MIR164* por *TCPs* y la interacción entre las proteínas *TCP* y *CUC* (Koyama et al, 2010; Schommer et al, 2014).

El tamaño y la forma final de la hoja, también se modifican de acuerdo al tiempo de desarrollo de la planta. Una decisión crítica en el desarrollo es la transición de la fase juvenil a la fase adulta de la planta. Este proceso es regulado por miR156 que controla la expresión de los factores de transcripción *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (*SPL*) (Wu et al, 2009; Wu & Poethig, 2006). En *Arabidopsis*, este cambio de la fase vegetativa está asociado con diferencias en el desarrollo del órgano, que incluye la generación de hojas más grandes con más células, aumento de la cantidad de serraciones y cambios en la relación largo ancho de la hoja (Wu et al, 2009; Wu & Poethig, 2006).

También se ha identificado la participación de miARNs en la regulación de la última etapa de desarrollo de la planta que es la senescencia. miR164, regula al factor de transcripción de tipo *NAC2*, *ORE1*, que es un activador de los genes tipo *SAG12* (Kim et al, 2009). Por otro lado, también se ha observado cierto rol en el control de la senescencia de las redes miR319/*TCPs* y miR396/*GRFs* (Debernardi et al, 2014; Kim et al, 2018; Schommer et al, 2008).

3.3. El sistema miR396/GRFs/GIFs.

3.3.1. Familia de miR396.

El microARN miR396 fue identificado por Jones-Rhoades y col. en un trabajo en el que realizaron una búsqueda de miARNs conservados entre *Arabidopsis* y arroz (Jones-Rhoades & Bartel, 2004). El miR396 es un miARN altamente conservado en plantas. Hasta el momento se han identificado 134 genes en 48 especies distintas (<http://www.mirbase.org/cgi->

bin/mirna_summary.pl?fam=MIPF0000047). Está presente desde plantas menos complejas como *Selaginella moellendorffii*, una planta vascular de la división *Lycophyta*, hasta en angiospermas como *Arabidopsis* y arroz (*Oryza sativa*) (Figura 15). Puede encontrarse como gen único, por ejemplo en *Selaginella*, o en familias de múltiples miembros, como es el caso de arroz donde hay 9 locus. En *Arabidopsis* esta familia está constituida por dos genes (*MIR396A* y *MIR396B*) que producen moléculas de 21 nt que solo difieren en el último nucleótido 3´.

Predicciones bioinformáticas y posterior confirmación experimental mostraron que este miARN reprime la expresión de los miembros de la familia de factores de transcripción *GRFs*, a través de la unión a un sitio complementario, localizado en la región codificante (Figura 16). Esta interacción se encuentra altamente conservada en plantas, identificándose factores de transcripción *GRFs* con sitios complementarios a miR396 tanto en angiospermas como en gimnospermas (Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Zhang et al, 2006). En *Arabidopsis* la familia de los *GRFs* está formada por 9 miembros (Kim et al, 2003), de los cuales siete tienen sitio de reconocimiento del miR396 (Jones-Rhoades & Bartel, 2004). La interacción entre el miR396 y los *GRFs* es de algún modo inusual entre los 21 miARNs conservados de plantas ya que contiene una base adicional desapareada en la región 5´ del miARN (Figura 16.) (Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Rodriguez et al, 2010) generando una protuberancia en la interacción.

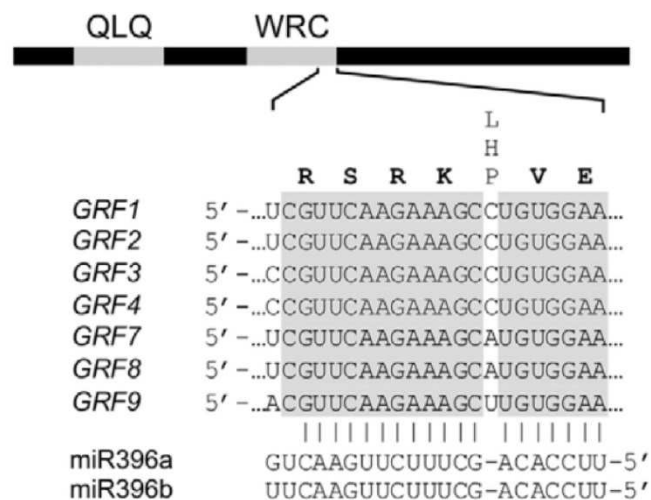


Figura 16. Esquema de la interacción de miR396 con los *GRFs* de *Arabidopsis* que presentan sitio blanco. En el sitio de interacción de los *GRFs* donde se une miR396, hay una base que queda desapareada. Esta base varía en distintos *GRFs*.

3.3.2. GROWTH REGULATING FACTORS.

El primer miembro de la familia de los *GRFs* identificado fue *OsGRF1* de arroz (van der Knaap et al, 2000). Se observó que este gen se inducía en respuesta a giberelinas en los meristemas de los entrenudos. La giberelina activa la proliferación celular en los meristemas intercalares y

promueve el crecimiento de los tallos de arroz (Kende et al, 1998). De acuerdo a la función identificada, se asignó el nombre de la familia de estos genes.

Actualmente, los factores de transcripción de la familia *GRFs* se han identificado en todos los genomas de plantas terrestres disponibles, tanto angiospermas como gimnospermas. También en musgos como *Physcomitrella patens* y en la licofita *Selaginella moellendorffii*. Sin embargo, no se han identificado genes *GRFs* en los genomas de clorófitas y careófitas, ni en especies de otros reinos (R. E. Rodríguez, 2016).

La familia de los *GRFs* se define por la presencia de dos regiones conservadas en el extremo N-terminal: los dominios QLQ y WRC (Figura 17.A). El dominio QLQ es llamado así por la conservación del motivo Gln-Leu-Gln (Figura 17.B). Este dominio presenta similitud con la región N-terminal de la proteína de levadura SWI/SNF2, una ATPasa que participa en procesos de remodelación de la cromatina (Treich et al, 1995; van der Knaap et al, 2000). La región N-terminal de dicha proteína media la interacción con otros componentes del complejo de remodelado de la cromatina en levaduras y, de la misma manera, el dominio QLQ de los *GRFs* está implicado en interacciones proteína-proteína (Horiguchi et al, 2005; Kim & Kende, 2004).

El dominio WRC recibe su nombre por el motivo Trp-Arg-Cys. Tiene dos características distintivas, una señal de localización nuclear y un supuesto motivo de unión a ADN de tipo dedos de Zinc (Zn), que consiste de tres cisteínas conservadas espaciadas y de un residuo de histidina (CX₉CX₁₀CX₂H) (Figura 17.B). La secuencia aminoacídica del dominio WRC y el espaciado entre las Cys e His no coinciden con los de las clases más comunes de dominios de dedos de Zn (Kim & Kende, 2004; van der Knaap et al, 2000). Sin embargo, en cebada ha sido descrito un represor, denominado HRT, que se une a un elemento de respuesta a giberelinas a través de un motivo de dedos de zinc (CX₉CX₁₀CX₂H) similar (Figura 17.B.) (Raventos et al, 1998). Estas características sugirieron que los *GRFs* actuarían como factores de transcripción. Esta idea estaba soportada además por experimentos realizados en levadura donde se demostró que los mismos tenían actividad de transactivación transcripcional (Kim & Kende, 2004).

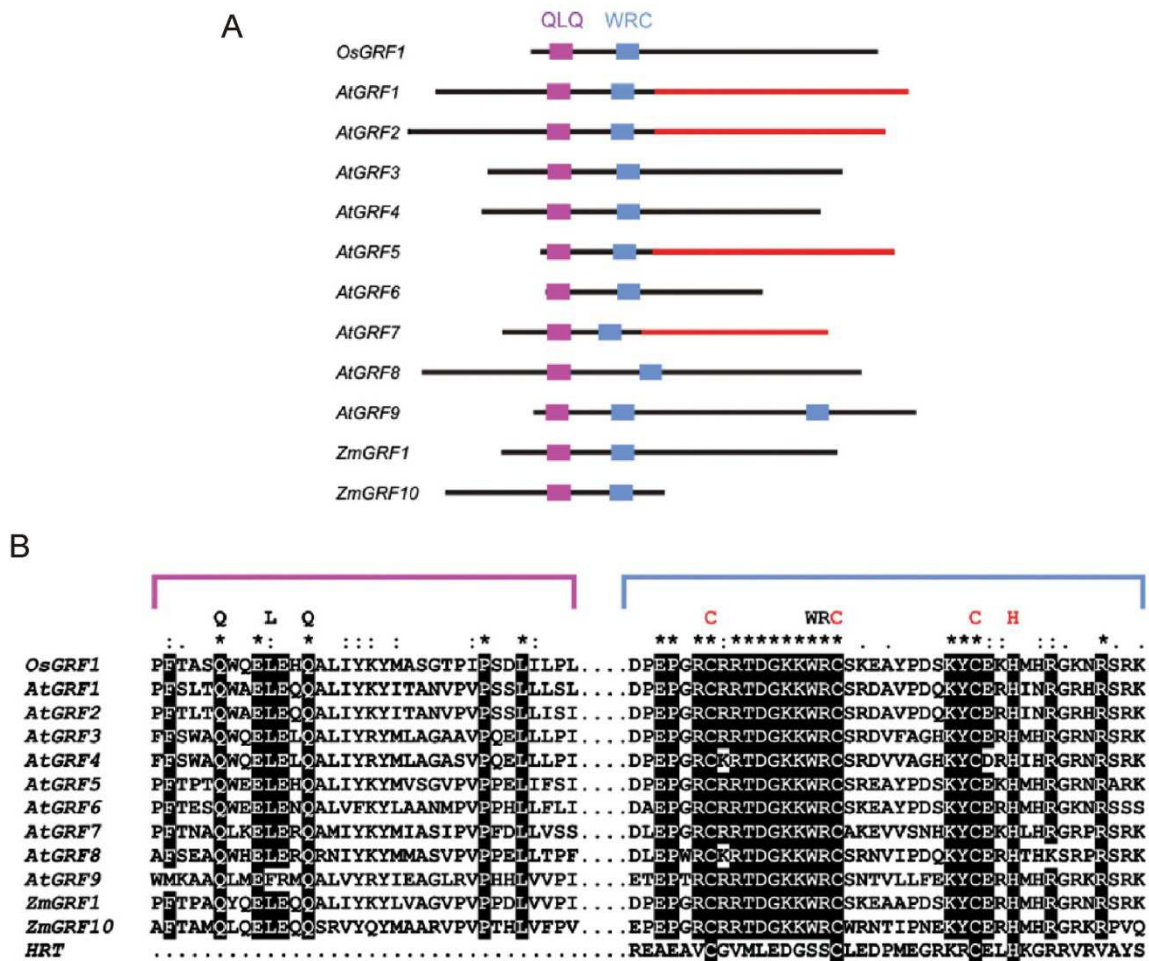


Figura 17. La familia de factores de transcripción GRFs. A) Organización de los dominios QLQ y WRC en GRFs representativos de *A. thaliana* (*AtGRFs*), *O. sativa* (*OsGRFs*), y *Zea mays* (*ZmGRFs*). En rojo se indica las regiones C-terminal de *AtGRF1*, *AtGRF2*, *AtGRF5* y *AtGRF7* que presentan actividad de transactivación transcripcional en levaduras (Kim et al, 2003; Kim et al, 2012). B) Alineamiento múltiple de las secuencias de los dominios QLQ y WRC. En rojo se indican los residuos conservados del motivo de dedo de ZV C3H, presente en el dominio WRC del represor transcripcional *HRT* de cebada. Adaptado de (R. E. Rodríguez, 2016).

La región C-terminal de los GRFs es más divergente en secuencia y tamaño entre los miembros de la familia. Esta región es rica en los aminoácidos Pro, Gln, His, Ala/Gly y Ser/Thr, los cuales son frecuentemente encontrados en los dominios de activación transcripcional de otros factores de transcripción (Triezenberg, 1995). Además, estudios de delección de la región carboxilo terminal de varios GRFs de Arabidopsis y arroz, indicaron que es responsable de la actividad de transactivación transcripcional en levaduras y protoplastos de Arabidopsis (Choi et al, 2004; Kim & Kende, 2004; Liu et al, 2014).

El análisis de expresión de los GRFs en varias especies ha demostrado que los mayores niveles ocurren en tejidos en desarrollo con activa proliferación celular (Bazin et al, 2013; Choi et al, 2004; Debernardi et al, 2014; Debernardi et al, 2012; Horiguchi et al, 2005; Kim et al, 2003; van der Knaap et al, 2000; Zhang et al, 2008). De manera consistente, el análisis del

patrón de expresión de estos genes en el atlas de expresión génica de varias especies de plantas, como *Arabidopsis* (Schmid et al, 2005) y arroz (Wang et al, 2010), también muestran que los niveles más elevados de expresión de los *GRFs* son detectados en los tejidos que presentan los mayores niveles de expresión de genes específicos de mitosis (Figura 18). Esto, se correlaciona con su función como promotores de la proliferación celular.

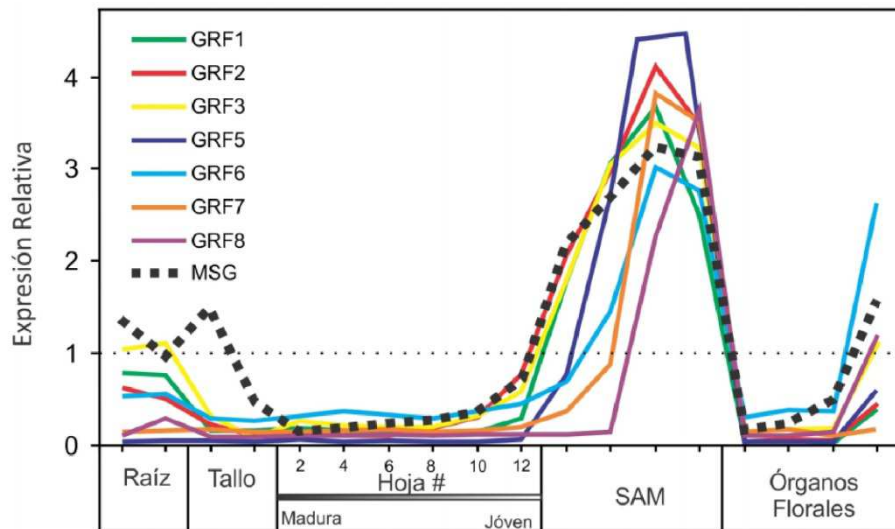


Figura 18. Patrones de expresión de los *GRFs* en el atlas de expresión génica. El perfil de expresión de los *GRFs* se correlaciona el de los genes específicos de mitosis (MSG). Adaptado de (R. E. Rodríguez, 2016)

La caracterización de la familia *GRF* en *Arabidopsis* indicó que estos genes son importantes reguladores del tamaño de diferentes órganos de las plantas y que actúan de modo redundante. Se observó que las plantas transgénicas que sobreexpresan *GRF1*, *GRF2* o *GRF5* desarrollan hojas más grandes (Horiguchi et al, 2005; Kim et al, 2003), mientras que las triples mutantes nulas de *GRF1*, 2, 3 tienen hojas y pétalos más angostos (Kim et al, 2003; Kim & Kende, 2004). Generalmente los *GRFs* son considerados activadores transcripcionales aunque se han descrito varios casos en los que los *GRFs* actúan como represores (Kim et al, 2012; Kuijt et al, 2014; Osnato et al, 2010; Wu et al, 2014).

3.3.3. *GRF-INTERACTING FACTORS*.

Los factores de transcripción con dominio de unión a ADN generalmente cooperan con co-activadores que estimulan el ensamblado del aparato de transcripción basal o reclutan remodeladores de la cromatina (Lemon & Tjian, 2000).

Mediante una búsqueda de proteínas que se asociaran a *AtGRF1*, se identificó una pequeña familia de co-activadores transcripcionales, denominados *GRF-INTERACTING FACTORS* (*GIFs*) (Kim & Kende, 2004). Los genes de esta familia codifican proteínas pequeñas que carecen de un dominio de unión a ADN. La región N-terminal de estas proteínas presentan

homología al dominio SNH del co-activador humano *SYNOVIAL TRANSLOCATION (SYT)* (Horiguchi et al, 2005; Kim et al, 2003), el cual se ha demostrado que interacciona con los complejos remodeladores de la cromatina SWI/SNF de humanos. La región C-terminal es rica en Gln y Gly.

En *Arabidopsis*, la familia *GIF* está compuesta por tres miembros. *GIF1*, *GIF2* y *GIF3* que tienen importantes roles en el desarrollo de *Arabidopsis* (Ferjani et al, 2007; Kim & Kende, 2004; Kozuka et al, 2005; Lee et al, 2009; Lee et al, 2014). Se ha demostrado que *AtGIF1* interacciona físicamente con *AtGRF1*, *AtGRF2*, *AtGRF4*, *AtGRF5*, *AtGRF7* y *AtGRF9* *in vitro* y por estudios de doble híbrido en levaduras (Y2H) (Kim & Kende, 2004; Kim et al, 2012). A su vez, se confirmó la interacción de *AtGIF1* con *AtGRF5* y *AtGRF3* *in vivo* por experimentos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) seguida de espectrometría de masa, en inflorescencias de *Arabidopsis* (Debernardi et al, 2014). El análisis bioquímico utilizando versiones truncadas indicó que los complejos GRF-GIF se producen a través de los dominios QLQ y SNH (Kim & Kende, 2004). Complejos similares GRF-GIF han sido descritos en maíz (Wu et al, 2014) y en arroz (Liu et al, 2014).

Las proteínas GIF están involucradas en la actividad de transactivación transcripcional en levaduras (Kim & Kende, 2004; Liu et al, 2014), pero lo que es más interesante es que son capaces de aumentar las capacidades moduladoras de la transcripción de los *GRFs* en *Arabidopsis* y en arroz (Debernardi et al, 2014; Kim et al, 2012; Liu et al, 2014). Por experimentos de Co-IP se encontró a *AtGIF1* asociado a complejos remodeladores de la cromatina SWI/SNF (Debernardi et al, 2014; Vercruyssen et al, 2015). De acuerdo a esto, el posible mecanismo por el cual el cofactor *GIF1* podría ejercer su acción, sería reclutando complejos SWI/SNF hacia determinadas regiones del genoma de manera de dejarlas expuestas a los factores de transcripción *GRFs*, u otros factores de transcripción, para estimular o reprimir la transcripción de los genes blanco de regulación directa (Debernardi et al, 2014; Ercoli et al, 2018; R. E. Rodriguez, 2016).

3.4. Control del crecimiento y desarrollo de las plantas por el sistema

mir396/GRFs/GIFs.

3.4.1 Control del desarrollo de la hoja.

La progresión a través de las fases del ciclo celular (G1, S, G2, M) constituye la fuerza que conduce al incremento del número de células (Beemster et al, 2003). La maquinaria que controla el ciclo celular depende de la actividad de quinasas dependientes de ciclinas (Inze & De Veylder, 2006). Muchos aspectos y componentes de esta maquinaria se encuentran conservados entre eucariotas. Sin embargo la integración de estos mecanismos básicos del

ciclo celular con los programas de desarrollo de cada organismo conduce a una enorme diversidad de fenotipos. En las plantas, el tamaño y forma final de las hojas está relacionado con la extensión de la fase de proliferación celular, la localización de las células que se dividen en el órgano en crecimiento, y la orientación de los planos de división.

Se han identificado muchos genes y vías que participan en el control del desarrollo de la hoja, incluyendo varias redes de factores de transcripción. Sin embargo, los mecanismos moleculares que conectan las diferentes vías entre sí o con la maquinaria del ciclo celular son todavía poco conocidos. El sistema *miR396/GRFs/GIFs* tiene un rol fundamental en el control de la proliferación celular.

La sobreexpresión de *miR396* en *Arabidopsis* causa una significativa reducción de los niveles de expresión de los *GRFs* y esto resulta en hojas más pequeñas con reducción del número de células (Figura 19.A y C) (Liu et al, 2009; Rodriguez et al, 2010; Wang et al, 2011a). Fenotipos semejantes se observan en las plantas mutantes en *AtGRFs* (Kim et al, 2003; Kim & Kende, 2004; Kim et al, 2012) o en *AtGIF1* (Figura 19.C). La combinación de la mutación en *GIF1* con co mutantes *gif2* o *gif3* reduce aún más el tamaño de las hojas (Lee et al, 2009). Los análisis detallados de estas mutantes y plantas que sobreexpresan *miR396* indican que la proliferación celular termina de manera prematura (Ferjani et al, 2007; Rodriguez et al, 2010).

Por otro lado, el aumento de los niveles de expresión de los *GRFs* por sobreexpresión de *GRF1*, *GRF2* o *GRF5* utilizando promotores fuertes (Gonzalez et al, 2010; Horiguchi et al, 2005; Kim et al, 2003), o introduciendo alelos resistentes a la regulación por *miR396* de *GRF2* o *GRF3* (*rGRF2* o *rGRF3*) (Figura 19. B) (Rodriguez et al, 2010) (Debernardi et al, 2014) produce hojas más grandes con más células (Figura 19. C). La sobreexpresión de *GIF1* también incrementa el tamaño de las hojas (Kim & Kende, 2004), además de acuerdo a su función como co-activador, aumenta sinérgicamente el efecto de *rGRF3* y *GRF5* en el tamaño de las hojas (Debernardi et al, 2014).

En las hojas jóvenes en desarrollo, los genes *MIR396* y *GRFs* presentan gradientes opuestos de expresión (Figura 19. D). El *miR396* comienza a acumularse en la parte distal de la hoja y se genera un gradiente de expresión, a lo largo del eje longitudinal, que decrece hacia la base del órgano. El miARN reprime la expresión de los *GRFs*, generando un gradiente opuesto que presenta su máximo en la zona proximal (Debernardi et al, 2012; Rodriguez et al, 2010). La expresión de *AtGIFs* también se restringe a la parte proximal del primordio de hoja, como es esperado de acuerdo a su función como co-activadores de los *GRFs* (Lee & Kim, 2014). En un estadio más tardío del desarrollo de la hoja, que coincide con el momento en que la proliferación celular finaliza, *miR396* se expresa a lo largo del todo el órgano y la expresión de los *GRFs* se apaga (Debernardi et al, 2014; Debernardi et al, 2012; Rodriguez et al, 2010).

Defectos similares en el desarrollo de las hojas y patrones de expresión comparables de *GRF*, *GIF* y *miR396* se obtuvieron en plantas monocotiledóneas (Candaele et al, 2014; Liu et al, 2014), indicando una función conservada para este sistema en el desarrollo de hojas en diferentes especies.

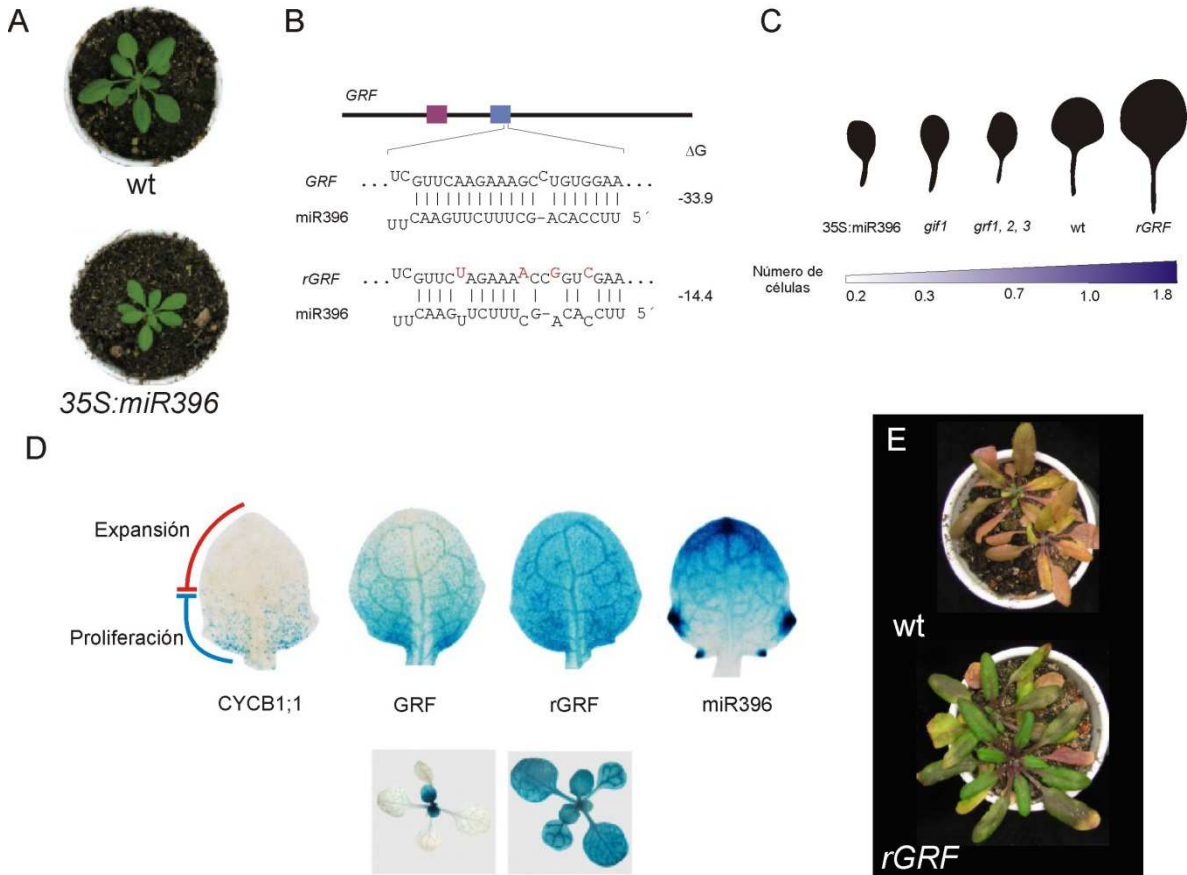


Figura 19. Control del desarrollo de la hoja por el sistema *miR396/GRFs/GIFs*. A) Fenotipo de la roseta de plantas de 18 días que sobreexpresan *miR396* y silvestre (*wt*). Las plantas *35S:miR396* tienen reducidos los niveles de expresión de *GRFs*. B) Esquema del gen *GRF* con un sitio blanco de *miR396* y un alelo de *GRF* resistente a *miR396*. Las mutaciones silenciosas que previenen la interacción con el miARN están marcadas en rojo. C) Siluetas de la primera hoja de plantas que sobreexpresan *miR396* (*35S:miR396*) o *GRF2* (*rGRF2*) y mutantes *grfs* o *gif*. Debajo se indica el número de células del parénquima en empalizada normalizado a la planta silvestre. D) Patrones de expresión de una ciclina mitótica (*CYCB1;1*), *GRF2* resistente (*rGRF*) y *miR396* en hojas en desarrollo. La proliferación celular y la expresión de *GRF2* están restringidas a la zona proximal de la hoja, mientras que la expansión celular y la expresión de *miR396* ocurre en la zona distal. E) Retardo en la senescencia observado en plantas *rGRF*. Adaptado de (Rodríguez et al, 2014).

Considerando estos resultados en conjunto, se ha propuesto que el sistema *miR396/GRFs/GIFs* puede funcionar como un vínculo entre los programas de desarrollo y los mecanismos más básicos de control del ciclo celular (Rodríguez et al, 2010). De esta forma, controla el crecimiento de los órganos foliares luego de la iniciación del primordio. Los complejos proteicos GRF-GIF promueven la proliferación celular en la zona proximal de la hoja, mientras que *miR396* restringe la actividad de estos complejos reprimiendo post-

transcripcionalmente a los *GRFs* en la parte distal, donde se produce la expansión y diferenciación.

3.4.2. Control de la senescencia de la hoja por el sistema *miR396/GRFs/GIF*.

La última etapa del desarrollo de la hoja es la senescencia. Se ha demostrado que el sistema *miR396/GRFs/GIFs* regula la longevidad de la hoja. Los análisis de plantas de *Arabidopsis* que expresan altos niveles de *GRF3* o *GRF5* presentan un retardo en la senescencia (Figura I9.E) y en la expresión de marcadores específicos de senescencia de la hoja, como *SEN1*, *SEN4* y *SAG12* (Debernardi et al, 2014). Semejante a los efectos en el tamaño de la hoja, la sobreexpresión de *GIF1* aumenta el efecto de retardo de la senescencia. De acuerdo con estos resultados, las plantas que sobreexpresan *miR396* o mutantes *grf3*, *grf5* y *gif1* senescen más rápido que las plantas silvestres. Por lo tanto los *GRFs*, no solo estimulan la proliferación celular durante los estadios tempranos de desarrollo de la hoja, sino que también impiden el comienzo del programa de senescencia prematuramente.

3.4.3. Embrión y meristema apical del tallo.

Existen evidencias que indican que los *GRFs* no solo son requeridos para el crecimiento del primordio de hoja, sino también para el desarrollo y mantenimiento del SAM desde donde se originan.

Tanto el *miR396* como *GRF2*, son detectados en el SAM vegetativo de plantas de *Arabidopsis*. La sobreexpresión de *miR396* causa una disminución en el tamaño del SAM, mientras que se observa el efecto opuesto en plantas que expresan un alelo de *GRF2* insensible al miARN (Rodríguez et al, 2010). Estos cambios se correlacionan con la actividad de proliferación celular del SAM, lo que sugiere que los *GRFs* promueven la proliferación celular en el meristema además de en los primordios de órganos. Las plantas con disminución de la actividad *GRF*, a través de la sobreexpresión de *miR396* en mutantes *gif1* (Rodríguez et al, 2010) o en las cuádruple mutantes *grf1-grf2-grf3-grf4* (Kim, 2006) no presentan un meristema funcional y tienen fusionados los cotiledones como resultado de defectos en el desarrollo del embrión. Finalmente, el tamaño del SAM se correlaciona también con los niveles de *GIFs* (Lee et al, 2009).

En conjunto, estos resultados indican que el sistema *miR396/GRFs/GIFs* regula el desarrollo del embrión, el establecimiento y mantenimiento del SAM, y determina el tamaño del SAM a través del control de la proliferación celular.

3.4.4. Desarrollo reproductivo.

Los órganos reproductivos en la familia de *Poaceae* (gramíneas) son la unidad básica que determina el rendimiento de granos en los cultivos de cereales. Las espiguillas son las unidades básicas de la inflorescencia en arroz y consiste de una flor formada por una cubierta generada por el entrelazado de la lema y la palea, dos lodículos, seis estambres y un pistilo. Tanto la sobreexpresión de miR396, y la consecuente reducción de la expresión de sus genes blanco, como la doble mutación *osgrf6-osgrf10* conducen a la generación de espiguillas anormales con la cubierta abierta, con la lema estéril alargada y número anormales de estambres y pistilos (Liu et al, 2014). En particular, se atribuye la apertura de la cubierta al crecimiento anormal de la lema y la palea que no llega a ser suficiente como para que se alcancen la una a la otra.

Por otro lado, se identificaron mutaciones naturales de los genes *OsGRF4* y *OsGRF6* en el sitio de reconocimiento de miR396, que conducen a la producción de granos más grandes (Che et al, 2015; Duan et al, 2015) o mayor ramificación de la inflorescencia (Gao et al, 2015). Las plantas que tienen el gen resistente *OsGRF4* presentan un aumento de la expansión y proliferación celular en los órganos exteriores del fruto que cubren el grano y también un aumento del tamaño del embrión y endospermo (Che et al, 2015; Duan et al, 2015). Por su parte la acumulación de *OsGRF6* conduce a la activación de factores involucrados en la ramificación como *OsTAWAWA1* y *OsMADS34*, posiblemente a través de la interacción de *OsGRF6* con sus promotores (Gao et al, 2015). También observaron que la reducción de la expresión de miR396, a través de la utilización de un “mimic”, promueve la ramificación de la inflorescencia aunque en este caso no se observó cambios en el tamaño del grano (Gao et al, 2015). Estos cambios inciden directamente en el rendimiento de granos de la planta.

3.4.5. Desarrollo de la raíz.

En las plantas, el crecimiento de la raíz es sostenido a través de la coordinación de la división y expansión celular en la punta de la raíz. El crecimiento indeterminado en la raíz es mantenido por el SCN (de inglés, *Stem cell niche*) en donde las células madre propiamente dichas se organizan alrededor de células mitóticamente inactivas que constituyen el centro quiescente (CQ) (Dolan et al, 1993). El CQ es esencial para la especificación del SCN y el mantenimiento del estado indiferenciado de las SC (van den Berg et al, 1997). Las nuevas células producidas por las SC en el RAM progresan a través de diferentes zonas de desarrollo en su camino hacia la madurez. Estas zonas se encuentran dispuestas de manera consecutiva a lo largo del eje longitudinal de la raíz. En primer lugar se encuentra la zona meristemática (ZM), en donde las células se dividen activamente para determinar el tamaño final del órgano. Este tipo de

divisiones de amplificación son características de las células llamadas TACs (del inglés, “transit-amplifying cells”) (Galinha et al, 2007). La capacidad que presentan las células meristemáticas de dividirse disminuye con el incremento de la distancia desde el SCN. Las células finalmente salen del ciclo celular mitótico en la zona de transición (TZ), ubicada entre la ZM y la zona de elongación (ZE). La posición de la zona de transición determina el tamaño del meristema. En la ZE, las células pierden su capacidad de dividirse y aumentan su tamaño expandiéndose de manera unidireccional.

Se ha observado que tanto la represión de los *GRFs* debido a la sobreexpresión de miR396, como la sobreexpresión de *AtGRF1* o *AtGRF3* producen raíces más cortas. Esto se debe a que el sistema *miR396/GRFs/GIFs* forma parte de una compleja red regulatoria que determina las zonas de desarrollo de la raíz. El miR396 regula la transición de las SC a las TAC (Rodríguez et al, 2015). Los *GRFs* se expresan en las TACs, pero son excluidos de las SC gracias a la regulación por el miR396 (Rodríguez et al, 2015). A su vez, los factores de transcripción *GRF* reprimen genes normalmente expresados SC en las TACs, siendo esto esencial para la rápida progresión del ciclo celular, característica distintiva de esta zona que posibilita la amplificación del número de células del órgano en crecimiento (Ercoli et al, 2016; R. E. Rodríguez, 2016). La sobreexpresión de miR396, produce una expansión de las características de SC en el meristema de la raíz y esto conduce a una disminución de la velocidad del ciclo celular y aumento del tamaño del meristema (Ercoli et al, 2016; R. E. Rodríguez, 2016). Por otro lado, al suprimir la regulación de la expresión de miR396 sobre los *GRFs*, estos expanden su zona de expresión al SCN lo que conduce a una distorsión de la organización del CQ. Estos resultados demuestran que las interacciones entre el miR396, los *GRFs* y los genes específicos de SC son necesarias para establecer el límite entre el SCN y la región de activa proliferación celular (Rodríguez et al, 2015).

3.5. AUXIN RESPONSE FACTORS.

La genes *ARF* (*AUXIN RESPONSE FACTORS*) integran una familia de factores de transcripción que presenta tres dominios que se han conservado a lo largo de cientos de millones de años de evolución (Finet et al, 2013). La mayoría de las proteínas ARF consisten de un dominio de unión a ADN de tipo B3 (DBD) en el lado N-terminal, una región media que es variable y que funciona como dominio de activación (AD) o dominio represor (RD), y un dominio de dimerización en el extremo C-terminal (CTD: dominio III/IV), el cual está involucrado en interacciones proteína-proteína por dimerización con proteínas codificadas por los genes de la familia *auxin/indole-3-acetic acid* (*Aux/IAA*) así como también entre ARFs (Guilfoyle & Hagen, 2007; Piya et al, 2014).

Los factores de transcripción ARF actúan por unión a elementos de respuesta a auxina (AuxRE) en los promotores de los genes de respuesta a auxina, activándolos o reprimiéndolos (Guilfoyle et al, 1998). Se ha identificado que el motivo de ADN al que se une el dominio DBD presenta la secuencia TGTCTC (Boer et al, 2014; Ulmasov et al, 1997). Sin embargo en los últimos años, se ha ampliado el espectro de los AuxRE conocidos. A través de microarrays de unión de proteínas (PBMs) se encontró que el AuxRE original no era el que presentaba mayor afinidad por ARF, y se identificó el elemento TGTCGG de alta afinidad (Boer et al, 2014; Franco-Zorrilla et al, 2014). Esta secuencia, también apareció como motivo representativo de unión a ADN de ARF2 y ARF5 en un análisis de “cistroma” que mide la unión a fragmentos de genoma *in vitro* (O'Malley et al, 2016). Junto con esto, los análisis de PBM de ARF1 y ARF5 evaluando todos los posibles TGTCNN han demostrado que los ARFs pueden unirse a distintas variantes de este motivo. Se han reportado también, pruebas indirectas de que otras variantes TGTCNN pueden estar involucradas en la respuesta a auxina a través de meta-análisis de transcriptomas de auxina previamente publicados (Zemlyanskaya et al, 2016), y de transcriptomas específicos de raíz (Bargmann et al, 2013).

En *Arabidopsis*, la familia de los factores de transcripción *ARF*, está integrada por 22 genes y un pseudogen (*ARF23*), que presenta un codón de stop en el dominio DBD. En general los genes *ARF* se pueden agrupar de a pares relacionados como *ARF1* y *2*, *3* y *4*, *6* y *8*, *7* y *19*, *11* y *18*, o tripletes como *ARF10*, *16* y *17*. Mutantes dobles en estos pares generan fenotipos más fuertes que las mutaciones simple, lo que sugiere que presentan roles redundantes (Guilfoyle & Hagen, 2007).

En base a estudios de los genes de respuesta auxina en protoplastos transfectados, se determinó que cinco proteínas ARF actúan como activadores (*ARF5*, *ARF6*, *ARF7*, *ARF8* y *ARF19*) (Tiwari et al, 2003). El resto de los ARFs de *Arabidopsis* de acuerdo a los estudios actúan como represores transcripcionales. Sin embargo es posible que un *ARF* clasificado como represor pueda actuar como activador o viceversa en ciertas células o entorno.

La actividad de los factores ARF activadores es regulada por las proteínas Aux/IAA. En la ausencia de auxina estas proteínas forman heterodímeros con los activadores ARF (Ulmasov et al, 1999; Vernoux et al, 2011) y reclutan co-represores de la familia *TOPLLESS* (Szemenyei et al, 2008). En presencia de auxina, las proteínas Aux/IAA son marcadas por el complejo E3 ubiquitin ligasa SCF y dirigidas al proteosoma (Chapman & Estelle, 2009). De manera contraria a los activadores, los represores ARF tienen una interacción limitada con las proteínas Aux/IAA (Vernoux et al, 2011). Por lo tanto, los represores están desconectados de la regulación de auxina, pero podrían actuar compitiendo con los activadores o bloqueándolos por heterodimerización (Boer et al, 2014; Richter et al, 2013).

Relacionado con la regulación de estos factores de transcripción, se ha reportado que pueden interactuar y ser regulados por otras proteínas (Wang & Estelle, 2014). También, información reciente sugiere que las modificaciones post-traduccionales constituyen otra capa regulatoria de los factores ARF, se encontró que la fosforilación de ARF puede suprimir la interacción con Aux/IAAs o con el ADN (Hill, 2015; Wang & Estelle, 2014). Además, son regulados post-transcripcionalmente por miARNs y ta-siARNs. *ARF6* y *ARF8* son regulados por miR167; *ARF10*, *ARF16* y *ARF17* son blancos de miR160; y *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* son regulados por los ta-siARNs *TAS3* (Guilfoyle & Hagen, 2007; Lin et al, 2015; Rhoades et al, 2002; Williams et al, 2005).

3.5.1. Regulación del desarrollo por *ARF2*.

El factor de transcripción *ARF2* fue originalmente identificado como una proteína de unión a *ARF1*. Se ha encontrado que mutantes KO de *arf2*, presentan efectos fenotípicos pleiotrópicos, incluyendo incremento en el crecimiento de los órganos aéreos debido a aumento de la división celular, inhibición de la apertura de la flor, retraso en el tiempo de floración, senescencia, abscisión del órgano floral, y maduración de la silicua (Ellis et al, 2005; Okushima et al, 2005b; Schruff et al, 2006). Se piensa que *ARF2* actúa como un represor transcripcional, por lo tanto el efecto pleiotrópico de la mutante se debe a la desregulación de genes downstream involucrados en vías relacionadas al crecimiento celular y senescencia (Okushima et al, 2005b). *ARF1* también actúa como un represor de genes inducidos por auxina, y mutantes KO de *arf1* y *arf2*, presentan algunos efectos sinérgicos y otros independientes indicando redundancia y especialización de las funciones de *ARF1* y *ARF2* (Ellis et al, 2005).

Se ha identificado que *ARF2* está involucrado en varias vías de señalización de fitohormonas. Funciona como regulador negativo del crecimiento de la raíz primaria y germinación en respuesta a ABA, a través de la regulación del gen *HB33* (Wang et al, 2011b). A su vez, coordina junto con las proteínas PINs y PLETHORA la actividad del meristema de la raíz en respuesta a ABA (Promchuea et al, 2017). Es regulado por la quinasa BIN2 (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2) y participa en la señalización de brasinoesteroides (BR) (Vert et al, 2008). Participa también, en las vías de señalización de luz y etileno que controlan el doblado del hipocótilo (Li et al, 2004). Y se ha encontrado que participa en la regulación de la absorción de potasio a través de un mecanismo que requiere la fosforilación de *ARF2* para detener su actividad represora (Zhao et al, 2016). En conjunto estos resultados indican que *ARF2* tiene diversos roles y podría funcionar como un nodo conector en respuesta a diferentes estímulos.

Recientemente, se ha identificado también que *ARF2* actúa en conjunto con *ARF3* y *ARF4*, y en contraposición con *ARF5*, durante el desarrollo de la hoja en dos niveles. En primer

lugar, los tres represores promueven el desarrollo del lado abaxial. En segundo lugar, de manera colectiva determinan el establecimiento de los meristemas de hoja en la zona marginal (Guan et al, 2017). Los meristemas de hoja son meristemas transientes que permiten la expansión de la lámina foliar.

OBJETIVOS.

4. Objetivos.

4.1 Objetivo general.

El objetivo general de este trabajo de Tesis es contribuir al conocimiento sobre los mecanismos moleculares que controlan el crecimiento de las plantas, y en especial, a la participación de redes de factores de transcripción y ARNs pequeños, y evaluar las posibilidades biotecnológicas que surgen de su modificación.

4.2 Objetivos particulares.

- Analizar a nivel molecular y fenotípico plantas con cambios en el balance *miR396/GRF*.
- Comparar la actividad promotora del crecimiento de distintos genes de la familia *GRF*.
- Evaluar el efecto de *GRFs* en plantas crecidas en condiciones de estrés y en otras especies además de *Arabidopsis thaliana*.
- Evaluar a nivel evolutivo la relación regulatoria entre el miARN *miR396* y los *GRFs*.
- Identificar mecanismos regulatorios de los *GRFs* que carecen del sitio blanco de *miR396*.
- Integrar el sistema *miR396/GRF* con otros reguladores del desarrollo de la hoja.

MATERIALES Y METODOS

5. Materiales y Métodos.

5.1. Metodología para el clonado de fragmentos de ADN.

5.1.1. Cepas bacterianas empleadas.

- *Escherichia coli* DH5 α (Hanahan, 1983).
- *Agrobacterium tumefaciens* ASE. Esta cepa es resistente a los antibióticos cloranfenicol y kanamicina. Se la utilizó para transformar *Arabidopsis thaliana*.

5.1.2. Vectores plasmídicos utilizados.

- Plásmido **pBluescript II SK(-)** (Stratagene).
- Plásmido **pCHF3**. Vector binario que permite la transformación de *Arabidopsis* por *A. tumefaciens*. Posee orígenes de replicación para *E. coli* y *A. tumefaciens*, y un gen de resistencia a espectinomicina para la selección bacteriana. El T-ADN es la porción de ADN transferida al genoma de la planta durante la transformación. Esta región contiene el gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina en plantas bajo el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor. Además presenta un sitio de múltiple clonado (SMC) flanqueado por el promotor 35S y el terminador de la transcripción de la subunidad pequeña de RuBisCo de arveja (Jarvis et al, 1998).
- Plásmido **pMX202**. Vector binario que permite la transformación de *Arabidopsis* por *A. tumefaciens*. Posee orígenes de replicación para *E. coli* y *A. tumefaciens*, y un gen de resistencia a espectinomicina para la selección bacteriana. En el T-ADN contiene un gen que confiere resistencia a kanamicina en plantas, bajo el promotor 35S. Este vector no posee un promotor 35S corriente arriba del sitio de múltiple clonado.

5.1.3. Vectores utilizados en esta tesis.

Vector	Construcción	Cromosoma: Inicio-Final ^a	Binario
pRER32	<i>rGRF3</i>	<i>GRF3:rGRF3</i> (2: 15274101 – 15270085) CGC AAC CGT TCT AGA AAA CCA GTA GAG ACT CCA R N R S R K P V E T P	pCHF3
pRER35	<i>rGRF2</i>	<i>GRF2:rGRF2</i> (4:17729683–17725302) CGT CAT CGT TCT AGA AAA CCG GTC GAA GTC CAA R H R S R K P V E V Q	pCHF3
pRER55	<i>GRF2-GUS</i>	<i>GRF2:GRF2</i> (4:17729683–17725702) - <i>GUS CDS</i> CGT CAT CGT TCA AGA AAG CCT GTG GAA GTC CAA R H R S R K P V E V Q	pCHF3

pRER56	<i>rGRF2-GUS</i>	GRF2:rGRF(2 4:17729683–17725702) - GUS CDS CGT CAT CGT TCT AGA AAA CCG GTC GAA GTC CAA R H R S R K P V E V Q	pCHF3
RER149	<i>pGRF3-rGRF2</i>	<i>pGRF3</i> (2: 15273644 - 15272819) – <i>rGRF2</i> (4: 17727612 - 17725536)	pCHF3
RER160	<i>At-rGRF3</i>	<i>pGRF3</i> (2: 15273644 - 15272819) – <i>At-rGRF3</i> CDS ^c	pCHF3
RER159	<i>Gm-rGRF</i>	<i>pGRF3</i> (2: 15273644 - 15272819) – <i>Gm-rGRF</i> CDS ^d	pCHF3
RER158	<i>Os-rGRF4</i>	<i>pGRF3</i> (2: 15273644 - 15272819) – <i>Os-rGRF4</i> CDS ^e	pCHF3
pJD189	<i>pmiR396b:</i> <i>GUS</i>	<i>pmiR396</i> (5: 13609793 – 13611798) – <i>GUS</i> CDS	pMX202
pJD207	<i>pGRF5:GUS</i>	<i>pGRF5</i> (3: 4606514 - 4608524) – <i>GUS</i> CDS	pMX202
pMB45	<i>MutpGRF5:</i> <i>GUS</i>	<i>pGRF5</i> (3: 4606514 – 4607810)Δ(4607881 - 4608524) – <i>GUS</i> CDS	pMX202

Vector	Construcción	Secuencia expresada ^b	Binario
pRER38	<i>35S:miR396b</i>	GTACCATGAAGATCCTGGTCATACTT <u>TTCCACAGCTTTCTTGA</u> <u>ACTTTCTTTTTCAATTTCCATTTGTTTTTTCTTAAACAAAAGTA</u> AGAAGAAAAAACTTTAAGATTAAGCATTTTGGAAAGCTCAAG AAAGCTGTGGGAAAACATGACAATTCAGGGTTTTgGATC	pBART
pMB11	<i>35S:</i> <i>9X-MIM396</i>	GATCCGCCGTAGCCGGCAGGTCTTCTCCCTCTAGAAATTGTTT <u>AAGAGCTCAGCTGTGGAAAGCTTCGGTTTTTCTCTTTGGAATG</u> <u>TTCAAGAGCGCAGCTGTGGAAATTTTTCAATTTTTTTGGTTGGA</u> <u>ATGTTCAAGAGCTTAGCTGTGGAAATTTTGTGGAAGATCCGCC</u> <u>GTAGCCGGCAGGTCTTCTCCCTCTAGAAATTGTTCAAGAGCTC</u> <u>AGCTGTGGAAAGCTTCGGTTTTTCTCTTTGGAATGTTCAAGAG</u> <u>CGCAGCTGTGGAAATTTTTCAATTTTTTTGGTTGGAATGTTCAA</u> <u>GAGCTTAGCTGTGGAAATTTTGTGGAAGATCCGCCGTAGCCGG</u> <u>CAGGTCTTCTCCCTCTAGAAATTGTTCAAGAGCTCAGCTGTGG</u> <u>AAAGCTTCGGTTTTTCTCTTTGGAATGTTCAAGAGCGCAGCTG</u> <u>TGGAAATTTTTCAATTTTTTTGGTTGGAATGTTCAAGAGCTTAG</u> <u>CTGTGGAAATTTTGTGGAAGATC</u>	pCHF3

a Sombreado, los nucleótidos que se aparean con el miR396. Subrayado, los residuos mutagenizados.

b Sombreado, la secuencia del microARN maduro expresado. Subrayado, la secuencia a la que se une el miR396 en el “mimic”.

c *At-rGRF3* : ATGGATTTGCAACTGAAACAATGGAGAAGCCAGCAGCAGCAACAACATCAGACAGAGTCAGAAGAACAACCTT
CTGCAGCTAAGATACAAAACATGCTTTGACCAGATTCATTCTCACACTGCAACTCTACTGCTCTTCTCTTTACCCCTGAGC
CTACTTCTTAACTCTCTCTTTGTCTCTGATTCTTCTCCAGGTTCCCAAGATGGGGAGCTTCTTAGCTGGGCACAGTGG
CAAGAAGTTGAACTACAAGCTCTGATCTACAGGTACATGTTGGCTGGTGTCTGTTCTCAGGAGCTCTTTACCAATCAAGA
AAAGCTTCTCCATCTATCTCTTCTACTTTCTTCCATCCTCTTCAACACCTACCTACCAACCTGCTTGGTATTTGGGAAG
GGCAGCGATGGATCCTGAGCCAGGCAGATGCAGGAGAACGGATGGTAAAGAAGTGGAGATGTTCAAGAGACGCTTTCGCTGGC
CACAAGTATTGCGAGCGCCACATGCACCGTGGCCGCAACCGTTTcAGAAAaCCaGTaGAgACTCCAACCACCGTCAATGCAACTG
CCACGTCCATGGCTTCATCAGTAGCAGCCGAGCCACCACTACAACAGCAACAACAACATCTACGTTTGGCTTTTGGTGGTGGT
GTGGTAGTGAGGAAGTGGTGGTCAAGGAGGATCTTCTTCTTCTGGCTCTTCAACTCTTCACTCTGAACTTCTCCACCTTAGT
CAAAGTTGTTCCGGAGATGAAGCAAGAAGCAACAACATGAACAACAAGAGGCCATACGAGTCCACATCGGATTCAGTAACAA

CAGATCAGATGGAGGACACATCCTGAGGCCCTTCTTTGACGATTGGCCTCGTTCTTCGCTCCAAGAAGCTGACAATAGTTCAAG
 CCCCATGAGCTCAGCCACTTGTCTCTCCATCTCCATGCCCGGAACTCTTCCTCAGACGTCTCTCTGAAGCTGTCACAGGCAACG
 AAGAGGGAGCCCGGAGCAACAACATGGGAGAGATCAGCAAAACATGAGCTGGTGGAGCGGTGGAGGTTCCAAACCACATCA
 TCACAACATGGGCGGACCATTGGCCGAAGCCCTGAGATCTTCTCCTCATCTTCCCAACCAGTGTCTCCATCAGCTTGGTGTCT
 CGACACAAGCCTTTTATTGA

d *Gm-rGRF*: ATGGACTTCCATCTGAAGCAATGGAGAAACCAGCACGAGTCAGAGGAACAACATTCTACAAAGATGCCAAAAC
 TCTCCCTGAATCCCATCAACAACAACAGCCATCAGCCTCTGCACTCCCTTTGTTTGTACCTGAACCAACAGCAGCAAAGTCAGCA
 CCCTATTATTTCCAGGATGGGGAGCTACTTCAGCTTGTCTCAGTGGCAGGAGCTTGGATTGCAGGCTTTGATATTCAGGTACAT
 GTTGGCTGGTGTCTGTTCTCCTGAACTCCTTCAACCAATCAAGAAAAGCCTTCTTATTCTCCACTATTACCTCCATCACCC
 TCTCCAACATTACCAACCTTCTGTTGGTATTGGGGTAGAGGAGCGATGGATCCGGAGCCAGGGCGGTGCCGGAGAACCCGACG
 GCAAGAAGTGGCGCTGTTTCGAGGGACGTGGTGGCTGGGCAAAAGTACTGTGAGCGCCACATGCACCGTGAAGAACAACCGTTC
 tAGAAAaCCaGTaGAgCTACCCACACCAACTAGTGTATTAACAATTGGTGTAACTGGAGTTGGATCCCTAGGACCAGGTGCT
 TCATCATCTTCCATTTGTTACCACCTTAGCTTCTGCTTCAATCTCCTTTTGTATCTTATCTTGTGAACTGACGTTCTCTGGGA
 CCAAGAATGAAGACGAAGATCATGTGGGTGGGGATGGCAGATCAGTGGAGGTGGTGGCCATATGCTGAGGCATTTCTCGA
 TGATTGGCCACGATCACTCCAAGACTCTGACAACGTTGAAAACAATGCTGCTGCTGGCCGTAGCCTCTTATTTCAATGCCCGGT
 GCTTCTCGGATGTGTCATTGAAATTGTCACCGGCTATGGAGAGGACTCGGCCAGGAAATGAGAATGTAAGCTCGAGCC
 AGAGCAGCTGAGTTGAATTGGGCCGGAGGATGGGCCTCGTCTAATCAAGTGGCTTCGATGGGAGGTCCACTTGCTGAGGCAC
 TCAGATCATCTACTTCAACCTCATCTCCACTAGTGTTTGCATCGTCACTTGCTCGTGGATCTGAGACCAGCTTATTAGCACCT
 GA

e *Os-rGRF4*: ATGCCTCCCTGTCTCCGGCGGTGGCCGACCACCGCTCGTCCCCGGCAGCCGCGACCGCTCCCTCCTCCCTTCT
 GCCGCTCCACCCGCTCTCCGCGTAAGCAACGCAACCCGCGGTACAACCCATTTCTTGGCTCCAGTGGTGCATGTGACAAC
 ACGGTGAGACGTTGTGTGGGTGGGTGGGTGAGGGCGGTGGTGGCGTCCGATGGGGGAGGACGCGCCGATGACCCG
 GAGGTGGCCGCGCGGCGGCGAGGCTGCCCGCTTACCGCGGCGCAGTACGAGGAGCTGGAGCAGCAGGCGCTCAT
 ATACAAGTACCTGTTGGCAGGCGTGCCTGCCGCGATCTCGTCTCCCATCCGCGCGGACTCGACTCCCTCGCCGCCG
 CTTCTACAACCATCCCGCCTTGGATATGGTCCGTACTTCGGCAAGAAGCTGGACCCAGAGCCAGGGCGGTGCCGGCGTACGG
 ACGGCAAGAAATGGCGGTGCTCGAAGGAGGCCGCGCGGATTCCAAGTACTGCGAGCGCCACATGCACCGCGGCCGCAACCG
 TTCtAGAAAaCCaGTaGAgACGCAGCTGGTCCAGTCCCAACCGCCTCATCTGTTGTCGGTTCTGCGGCGGCGCCCTTGTCT
 GCTGCCTCCAATGGCAGCAGCTTCAAAAACCACTCTTTACCCTGCTATTGCCGCGCAATGGCGGGGCGGGGGAGGAA
 CATGCCAGCTATTTGGCTCGCGTGGGTTCTCAGCTGCACATGGATAATGCTGCCCTTATGACGCTGTTGGTGGTGGAAAC
 AGGCAAAGATCTCAGGTATACTGCTTATGGCACAAGATCTTGGCGGATGAGCAGAGTCAACTATTACTGAAGCTATCAACAC
 ATCTATTGAAAATCCATGGCGGTGCTGCCATCTCAGAACTCGCCATTTCCCTTTCAAGCTATTCTCAGCTGGGGGCACTAAGT
 GACCTTGGTCAGAACACCCAGCTCACTTTCAAAGGTTGAGAGGCAGCCACTTTCGTTCTTTGGGAACGACTATGCGGTGTC
 GATTCTGTGAAGCAAGAGAACCAGACGCTGCGTCCCTTCTTGTGAGTGGCCAAAGGGAAGGATTGATGGTTCAGACCTCGC
 TGATGAGAATGTAATCTTTCGTCATTCTCAGGCACCAACTGTCGATCTCCATACCAATGGCATCTCTGACTTCTCGGCGGCC
 AGTTCTCGATCAACTAATGGTACTGA

5.1.4. Extracción de ADN genómico de Arabidopsis.

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de hojas jóvenes de Arabidopsis, según el siguiente protocolo:

Se calentó a 65 °C un volumen de 600 µL de una solución (Buffer CTAB) conteniendo 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, 20mM EDTA pH 8 y 0,2% (v/v) CTAB, al cual se le adicionó β- mercaptoetanol hasta concentración final 0,2% (v/v), y RNAsa A a concentración final 3,3 ng/µL . Esta solución se denominó buffer CTAB modificado.

Las hojas contenidas en tubos de microcentrífuga se sumergieron en N₂ líquido y se redujeron a un polvo fino utilizando un pilón. Posteriormente la muestra se resuspendió en 600 µL de buffer CTAB modificado precalentado, y la suspensión resultante se incubó a 65 °C por una hora. Luego se adicionó 600 µL de una mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se agitó durante 5 min. A continuación, se realizó una centrifugación a máxima velocidad a 4°C durante 10 min. Finalizada la centrifugación se transfirió la fase acuosa superior a un tubo de microcentrífuga nuevo. Se realizó la precipitación del ADN en la fase acuosa mediante la

adición de 0,7 volúmenes de isopropanol, mezclando por inversión e incubando a 4 °C por al menos una hora. Luego se centrifugó a máxima velocidad durante 20min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 µL de 70% (v/v) etanol y agitación. Se centrifugó la muestra durante 5 min a 8000 g a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado resultante se secó completamente y finalmente se resuspendió en 40µL de agua Milli-Q (Milipore). La muestra de ADN resultante fue conservada a -20°C.

5.1.5. Minipreparaciones de ADN plasmídico.

Los plásmidos se obtuvieron utilizando el “kit” comercial “Wizard® Plus SV Minipreps” (Promega), según las indicaciones del fabricante.

5.1.6. Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: en un volumen final de reacción de 25 µL se adicionó 2,5 µL de buffer Pfu ADN polimerasa con MgSO4 10x (Promega), 7,5 pmol de cada oligonucleótido y 2 U de Pfu ADN polimerasa (Promega). La concentración en la mezcla de reacción de cada uno de los dNTPs (dCTP, dATP, dGTP, dTTP) fue de 0,2 mM. Se completó el volumen restante con agua Milli-Q. La cantidad de ADN molde varió dependiendo del ADN utilizado: 1 ng de ADN plasmídico; 100 ng de ADN genómico. El termociclado de las mezclas de reacción se llevó a cabo en un equipo PCR SPRINT Thermal Cycler (Termo Electron Corporation) según el siguiente programa:

Etapas	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	30 seg.
2	30	95°C	30 seg.
		55°C	30 seg.
		68°C	X min.
3	1	68°C	10 min.

X: 1min de tiempo de elongación por cada 1000 nucleótidos.

La separación de moléculas de ADN por electroforesis en geles de agarosa se realizó mediante el sistema tipo submarino (J. Sambrook, 2001) en cubas de acrílico. Se utilizaron concentraciones de agarosa de 1 a 1,5% (p/v) según el tamaño de las moléculas de ADN a resolver. Los geles se prepararon con solución buffer 1X TAE y se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 0,3 µg/ml. Las muestras de ADN, previo a la siembra, se mezclaron con 1/5 volúmenes de solución de siembra. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo en

solución buffer 1X TAE, empleando voltaje constante. Se utilizaron marcadores de tamaño molecular adecuados.

5.1.7. Mutagénesis por deleción.

Para realizar la mutagénesis por deleción se utilizó la técnica “Extensión por Superposición” (del inglés, Overlap Extension; (Pogulis et al, 1996). Este método permite introducir inserciones o deleciones sobre la región de interés mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando cuatro o más oligonucleótidos que se solapan entre sí.

5.1.8. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

Luego de la separación electroforética, el fragmento de ADN deseado se identificó mediante la visualización del gel con un transiluminador UV y se escindió la banda correspondiente con bisturí. La purificación de los fragmentos de ADN del gel se llevó a cabo utilizando el “kit” de purificación de ADN Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

5.1.9. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.

Las digestiones de ADN con endonucleasas de restricción se realizaron utilizando enzimas y buffers comerciales (Promega). Las condiciones de reacción fueron las especificadas por el fabricante.

5.1.10. Ligación de fragmentos de ADN.

Para la ligación de fragmentos de ADN en los vectores plasmídicos deseados se siguieron dos estrategias según el origen del fragmento.

a) Clonado de productos de PCR en pBlueScript por el método de “restricción-ligación”. Teniendo en cuenta que la amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR se llevó a cabo utilizando ADN polimerasas que dejan extremos romos, el clonado de dichos fragmentos se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

En un primer paso se digirió el vector de clonado pBluescript II SK(-) con la enzima de restricción SmaI, la cual deja extremos romos.

En el siguiente paso se procedió a la ligación del fragmento de ADN en la siguiente mezcla de reacción: en un volumen final de 21 µL se adicionó 20 ng de pBluescript II SK(-) cortado previamente con SmaI, 2 µL de Buffer Tango (Fermentas), 2 U de T4 ADN ligasa, 3 U de SmaI (Fermentas), ATP a una concentración final de 0,09 mM y aproximadamente 20 ng de inserto. La mezcla de ligación se incubó toda la noche a 16 °C, y se utilizaron 5 µL de la misma para transformar *E. coli* DH5α.

b) La ligación de fragmentos de ADN generados por corte con enzimas de restricción en los vectores plasmídicos correspondientes se llevó a cabo con la enzima T4 ADN ligasa (Fermentas). Las condiciones de la reacción fueron las especificadas por el fabricante. En todos los casos el volumen de reacción de ligación fue de 10 μL y se utilizaron 5 μL de la misma para transformar *E. coli* DH5 α .

5.1.11. Transformación bacteriana.

a) Transformación de *E. coli*. Para la preparación de electrocompetentes se partió de un cultivo saturado de *E. coli* DH5 α , crecido toda una noche a 37° C en medio Luria-Bertani (LB; 10 g/l peptona de caseína, 5g/l extracto de levadura y 5 g/l NaCl), se realizó una dilución 1:100 en el mismo medio y se incubó 2 horas a 37 °C. Una vez que este cultivo alcanzó una DO 600nm de entre 0.5 y 1, se centrifugó durante 7 min a 4000 g a 4°C. Luego, se removió el sobrenadante y se lavó el sedimento de células sucesivamente con agua Milli-Q y una solución de glicerol al 10% (v/v). Finalmente el sedimento de células libre de iones se resuspendió suavemente en 125 μL de glicerol al 10% (v/v) y se redistribuyó en tubos de microcentrifuga. Por cada transformación se tomó un tubo de electrocompetentes, se adicionó el volumen correspondiente de solución plasmídica. Esta mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación (BIO-RAD), y utilizando un electroporador MicroPulser (BIO-RAD) se sometió a la mezcla a cortos pulsos de corriente eléctrica de alto voltaje (pulso de 2,5 kV con capacitancia de 25 μF y una resistencia de 400 Ω). A continuación, se adicionó 900 μL de medio LB y se incubó durante una hora a 37 °C. Transcurrida la incubación se realizó una centrifugación de 2 min a 3500 g a temperatura ambiente, el sedimento de células se resuspendió en 100 μL de medio LB y finalmente se sembró en placas de medio LB que contenían el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C.

b) Transformación de *A. tumefaciens*. Un cultivo de *A. tumefaciens* (cepa ASE), crecido toda la noche a 28 °C en medio LB, se diluyó 1:100 en el mismo medio y se cultivó hasta una DO 600 entre 0,5 y 1. La suspensión de células se fraccionó en alícuotas de 1,5 mL, cada una de las cuales sirve para realizar una transformación. Se centrifugó a 3500 g por 2 min a 4 °C, y se resuspendió el sedimento de células en 0,5 mL de agua destilada estéril a 4 °C. Se repitió estos lavados 3 veces. Luego se resuspendió las células en 0,5 mL de 10% (v/v) glicerol estéril a 4 °C. Se centrifugó nuevamente a 3500 g por 2 min a 4 °C y se resuspendió las células en 20 μL de 10% (v/v) glicerol estéril. Se agregó el plásmido a transformar, se transfirió a una cubeta de electroporación (Biorad) y se aplicó un pulso de 2,5 kV con capacitancia de 25 μF y una resistencia de 400 Ω . A continuación se adicionó 1mL de medio LB y se incubó durante dos horas a 28° C. Transcurrida la incubación se realizó una centrifugación de 2 min a 3500 g a

temperatura ambiente, el sedimento de células se resuspendió en 100µL de medio LB y finalmente se sembró en placas de medio LB que contenían el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron durante dos noches a 28 °C.

5.1.12. Selección y análisis de transformantes.

La selección de las colonias *E. coli* DH5α transformadas se realizó suplementando las placas con medio LB agar con el antibiótico adecuado según el vector usado. Cuando el vector fue pBluescript II SK(-) las placas se suplementaron 100 µg/mL de ampicilina. Además, se adicionó a las placas 100µM IPTG y 20 µg/mL X-Gal. Esto permitió identificar potenciales colonias que transformadas con el vector que contenía el inserto clonado por su ausencia de coloración azul. Para bacterias (*E. coli* DH5α) transformadas por el vector pCHF3, la selección se llevó adelante con 50 µg/mL de espectinomicina. Para la selección de las colonias ASE transformadas con el vector binario pCHF3 las placas con medio LB se suplementaron con 50 µg/mL de espectinomicina, 50 µg/mL de kanamicina y 25 µg/mL de cloranfenicol.

5.2. Material vegetal utilizado y obtención de plantas transgénicas.

5.2.1. Ecotipos y mutantes utilizados, y condiciones de crecimiento.

Las plantas de Arabidopsis utilizadas en esta Tesis corresponden al ecotipo Columbia-0 (Col-0). Las plantas se cultivaron en una cámara de crecimiento con un régimen de 16 h de luz (100 µE.m-2.s-1) y 8 h de oscuridad (condición día largo). La temperatura de crecimiento fue de 23 °C durante el ciclo luz/oscuridad, mientras que la humedad fue mantenida en 65% de humedad relativa. Las plantas se regaron una vez por semana con agua. Para el crecimiento directo en tierra, las semillas se estratificaron a 4 °C por 2 días en tubos de microcentrífuga con 1mL de 0,1% (p/v) agarosa, y luego se sembraron en tierra.

En este tesis se utilizaron plantas mutantes y líneas transgénicas (Tabla MM1).

Mutantes/Línea Transgénica	Descripción de la línea	Cita
<i>grf3</i>	Mutante insercional Salk_026786 en ecotipo Col-0.	Debernardi et al., (2014) Plant J.
<i>grf5</i>	Mutante insercional Salk_086597 en ecotipo Col-0.	Debernardi et al., (2014) Plant J.
<i>gif1</i>	Mutante insercional Salk_150407 en Ecotipo Col-0.	Lee et al., (2009) Plant Physiol.
<i>arf2-8</i>	Mutante insercional Salk_108995 en ecotipo Col-0	Okushima et al., (2005) Plant J.
<i>35S:GRF5</i>	Línea sobreexpresante del cADN de GRF5 en ecotipo Col-0.	Horiguchi et al., (2005) Plant J.
<i>pARF2:ARF2-GFP</i>	Reportero traduccional de ARF2.	Rademacher et al., (2011) Plant J.

Tabla MM1. Mutantes y líneas transgénicas utilizadas en esta Tesis.

Las cruces entre líneas de plantas requirieron del genotipo de las líneas *gif1*, *grf5*, *arf2-8*. Una vez que se realizó la extracción de ADN de las plantas de interés (Materiales y métodos 5.1.4) se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando la siguiente combinación de oligos:

Inserción	Oligo directo	Oligo reverso	Producto
<i>grf5</i> Salk_086597	GCCAGGTCGACTTAATTAGCTACCAG	ACGTTCTCTCCCAACTCCTC	Amplificación Gen Silvestre
	GCCAGGTCGACTTAATTAGCTACCAG	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	Amplificación de la Inserción T ADN
<i>gif1</i> Salk_150407	TTGGACGAAAACAAATCGTTGA	CTGTTGCTGTTGAGTCGCTTGT	Amplificación Gen Silvestre
	TTGGACGAAAACAAATCGTTGA	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	Amplificación de la Inserción T ADN
<i>arf2-8</i> Salk_108995	CTGAGAGTGTAGAGTGTGATGC	CATCTTCTCACTTCTCTTTC	Amplificación Gen Silvestre
	CTGAGAGTGTAGAGTGTGATGC	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	Amplificación de la Inserción T ADN

5.2.2. Transformación vegetal.

La transformación de plantas de *Arabidopsis* se realizó mediante la técnica de “floral-dip” (D. Weigel, 2002). Se cultivaron las cepas de *A. tumefaciens* (ASE) transformadas con los distintos plásmidos binarios en 100 mL de LB conteniendo 50 µg/mL de espectinomicina, 50 µg/mL de kanamicina y 25 µg/mL de cloranfenicol a 28 °C hasta llegar a una DO 600 cercana a 2. Se cosechó las células por centrifugación a 3500 g durante 10 min a temperatura ambiente y se resuspendió en un medio con 5% (p/v) sacarosa y 200 µL /l de Silwet L-77. Las inflorescencias de plantas de *Arabidopsis* regadas el día anterior se sumergieron en la suspensión de células durante 30 segundos. Luego de escurrir el exceso de medio de cultivo, se colocaron las plantas en posición horizontal dentro de bolsas plásticas para conservar la humedad. Luego de 24 hs se sacaron de las bolsas y se prosiguió con el cultivo de las plantas en la cámara de crecimiento hasta la maduración de las semillas.

Las plantas transgénicas de *Brassica Oleracea* fueron generadas por un servicio del John Innes Centre.

5.2.3. Recolección y esterilización de semillas.

La recolección de semillas se realizó a partir de plantas que finalizaron su ciclo de vida y que presentaban semillas maduras. Se retiraron las plantas del pote de tierra y frotando las mismas con las manos se dejó caer las semillas sobre una hoja de papel. Se eliminaron los restos de silicua y hojas por tamizado. Las semillas se almacenaron en bolsas de papel en un recipiente seco hasta su posterior utilización. Para la esterilización de las semillas, las mismas se

incubaron con una solución de 70% (v/v) etanol, 0,1% (v/v) tritón-X-100, durante 8 min. Luego se realizó un enjuague con 96% (v/v) etanol y finalmente se las dejó secar en el flujo laminar. La manipulación del material vegetal en condiciones de esterilidad se realizó en una cabina de flujo laminar.

5.2.4. Selección de transformantes.

Para la selección de plantas transformadas, las semillas esterilizadas se sembraron en placas de Petri con medio MS-agar (T. Murashige, 1962) suplementado con 25 µg/mL de kanamicina. Las placas se mantuvieron en oscuridad a 4 °C por 48 hs. Transcurrido este período, se transfirieron las placas a la cámara de cultivo y en estas condiciones las plantas se dejaron crecer 5-10 días. Luego se analizaron las placas y aquellas plantas que presentaban un fenotipo de resistencia al agente de selección, evidenciado por el desarrollo de la raíz primaria y del primer par de hojas verdaderas, se transfirieron a potes con tierra. Los potes se ubicaron en bandejas con agua las cuales se cubrieron con papel de nylon transparente, de modo de evitar la pérdida de humedad. En estas condiciones se cultivaron en la cámara durante 2 días, momento en el que se retiró el nylon y se continuó con su cultivo.

5.3. Medida del área de las células, y estimación del número de células de las hojas.

El tejido vegetal a estudiar se fijó y clarificó sumergiéndolo en solución etanol 70% durante 24hs y posteriormente en ácido láctico 70%, el cual fue utilizado también para montar las muestras. Posteriormente, las muestras se observaron en una lupa binocular bajo campo oscuro y se tomó una fotografía de las células del mesófilo en empalizada en una posición de la hoja que corresponde a la mitad en el eje distal-proximal. Para determinar el área celular por línea, se midió el área de 20 células por hoja de 10 hojas independientes utilizando el programa Image-pro Plus 6.0. El número de células por hojas se estimó haciendo la relación entre el área de la hoja y el área de las células.

5.4. Senescencia inducida por oscuridad y medida del rendimiento cuántico máximo del Fotosistema II.

Para los experimentos de senescencia de las hojas inducida por oscuridad, se colectaron las hojas #5 una vez que las mismas alcanzaron el tamaño final e incubaron en una placa con un papel absorbente humedecido de manera que conserven la humedad, en oscuridad. La eficiencia del Fotosistema se midió utilizando el equipo MultispeQ. La información fue visualizada y analizada en el portal web de Photosynq (www.photosynq.org). Los parámetros que se midieron fueron los valores F_0 (fluorescencia mínima en hojas adaptadas a oscuridad) y

F_m (fluorescencia máxima en hojas adaptadas a oscuridad). A través de estos parámetros se obtuvo el rendimiento cuántico máximo del Fotosistema II (FSII), $(F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m)$, de acuerdo a Maxwell y Johnson, 2000 (Maxwell & Johnson, 2000). Este parámetro representa la eficiencia fotoquímica máxima del FSII.

5.5. Caracterización del sistema radicular de las plantas

5.5.1. Condiciones de crecimiento.

Para los experimentos abocados a la caracterización fenotípica del sistema radicular las plantas fueron crecidas verticalmente en medio MS-Agar 1X (T. Murashige, 1962) suplementado con 1% P/V sacarosa, y 2.3 mM ácido 2-(N-morpholino) etanesulfónico (MES) (pH 5.8).

5.5.2. Medidas de elongación de raíz primaria.

Para los análisis del crecimiento de la raíz primaria en *Brassica oleracea*, las semillas esterilizadas se dispusieron sobre la superficie del agar en una línea recta. A continuación, las placas fueron estratificadas en oscuridad a 4°C por 48 horas. Transcurrido este periodo las placas fueron transferidas a la cámara de cultivo. Se realizaron marcas en la cara posterior de la placa en las puntas de las raíces, de manera de registrar el crecimiento en forma de segmentos secuenciales diarios durante al menos 5 días. Una vez finalizado el marcado de las placas, se procedió a tomar una imagen digital de las mismas y haciendo uso del software Image-Pro Plus se midió el largo de cada segmento marcado. La evaluación de la longitud de estos segmentos en función del tiempo derivó en el gráfico de largo de la raíz primaria (cm) en función del tiempo.

5.5.3. Caracterización celular del sistema radicular.

Para determinar los parámetros celulares en raíces de Arabidopsis, se utilizó Microscopía Confocal de Barrido Laser (LSCM, del inglés Laser Scanning Confocal Microscopy). Imágenes de secciones longitudinales medias fueron obtenidas utilizando raíces teñidas con 10 µg/mL de Ioduro de Propidio (IP) (Sigma) para visualizar las paredes celulares.

Las imágenes de LSCM fueron obtenidas en un microscopio ZEISS LSM880. El IP fue excitado utilizando la línea de 488nm del láser multilínea de ión de argón, y su fluorescencia fue detectada en un rango 590nm-700nm.

La determinación del largo de la zona meristemática se realizó midiendo la distancia entre el CQ y la primer célula de la corteza que muestra signos claros de expansión (Perilli & Sabatini, 2010).

5.6. Tinción GUS.

Para analizar la expresión de los distintos reporteros generados como fusiones al gen de la β -glucuronidasa, se hicieron reacciones de tinción del material vegetal con X-Gluc. Para ello se colectó el tejido vegetal a teñir en 90% (v/v) acetona en hielo y se incubó durante 20 minutos. Se lavó con solución de tinción sin X-Gluc para eliminar la acetona, y por último se cambió la solución por solución de tinción con 750 μ g/mL de X-Gluc. Se infiltró durante 20 minutos, rompiendo el vacío cada 7 minutos. Se incubó una noche a 37 °C en oscuridad. Por último se lavó con 70% (v/v) etanol dos o tres veces hasta la eliminación total de la clorofila.

Solución de tinción sin X-Gluc: 100 mM de buffer fosfato pH 7,2, 3 mM de Ferricianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$), 10 mM de EDTA y 0,1% (v/v) Tritón (Donnelly et al, 1999).

5.7. Tratamiento de estrés por sequía.

Las plantas se germinaron en placa luego de estratificar a 4 °C en oscuridad. A los 4 días post-siembra (DPS), las plantas se transfirieron a potes con tierra. Previo al trasplante, se seteo la cantidad relativa de agua a: 1.19 g de agua por gramo de tierra seca para el estrés por sequía moderada y para la condición control 2.19 g de agua por gramo de tierra seca. Una vez que las plántulas fueron transferidas a estos potes se ubicaron en la plataforma de fenotipo automático WIWAM (Skiryecz et al, 2011). El contenido de agua se mantuvo constante hasta 8 DAS y luego se redujo a 1.02 g de agua por gramo de tierra. Esta plataforma de fenotipo está diseñada para monitorear el desarrollo vegetativo hasta 19 DAS, durante este tiempo toma imágenes de la roseta día a día. Para evaluar el crecimiento del órgano durante el experimento, se realizaron mediciones del área de hoja 1 a partir de las imágenes obtenidas. También, las medidas del plastocrono se estimaron registrando el tiempo en el que cada hoja consecutiva alcanzaba 1 mm de longitud.

5.8. Cuantificación del nivel de expresión génica.

5.8.1. Extracción de ARN.

La extracción de ARN de tejido vegetal de Arabidopsis se realizó utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen). La recolección de las muestras de tejido se realizó en tubos de microcentrifuga que inmediatamente fueron sumergidos en N_2 líquido. El material fue reducido a un polvo fino utilizando un pilón.

A continuación, sobre este polvo se adicionó TRIzol (1 mL de reactivo para un máximo de 100 mg de tejido) y se agitó de modo de resuspender el tejido mortereado. El homogenado se centrifugó a 12000 g a 4 °C durante 10 min y finalmente se transfirió el sobrenadante a un

tubo de microcentrífuga nuevo. A continuación se agregó 0,2 volúmenes de cloroformo por cada volumen de TRIzol original. Esta mezcla se invirtió vigorosamente por 15 segundos y se centrifugó a 12000 g a 4 °C durante 15 min. Se transfirió la fase superior a un nuevo tubo de microcentrífuga y se precipitó el ARN mediante el agregado de un volumen de isopropanol. Esta mezcla se incubó por al menos 2 hs a 20 °C. Luego se centrifugó a 12000 g a 4 °C durante 10 min. Finalizada la centrifugación se descartó el sobrenadante.

Se lavó el precipitado de ARN mediante el agregado de 1 mL de 70 % (v/v) etanol frío y agitación con vortex. Luego se centrifugó a 7500 g a 4 °C durante 5 min, descartando el sobrenadante una vez finalizada la centrifugación. Este paso de lavado se repitió una vez más. El precipitado de ARN obtenido se secó en estufa 37 °C por 10 min y luego se resuspendió en 50 µL de agua Milli-Q esteril.

5.8.2. Cuantificación y chequeo de la integridad del ARN purificado.

Se determinó la absorbancia a 230, 260 y 280 nm. Se estimó la pureza de la preparación a partir de la relación de las medidas de absorbancia a Abs_{260}/Abs_{230} y Abs_{260}/Abs_{280} . La integridad del ARN purificado se determinó mediante la electroforesis en geles de 1,5% (p/v) agarosa de 5 µL del ARN preparado. Las bandas de ARN ribosomal se visualizaron por tinción de los geles con bromuro de etidio.

5.8.3. Tratamiento del ARN preparado con ADNasa.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción: En un volumen final de reacción de 20 µL se adicionó: 0,25 a 0.5 µg de ARN total, 2 µL de buffer "RQ1 RNase-Free DNase" (Promega), 1 U "RQ1 RNase-Free DNase" (Promega) y agua Milli-Q para completar el volumen de reacción.

La mezcla de reacción se incubó 30 min a 37 °C. Luego se inactivó la ADNasa mediante la adición al tubo de reacción de 1 µL de "DNase Stop Solution" (Promega) e incubación por 10 min a 65 °C. De los 21 µL de reacción final, 10 µL se utilizaron para sintetizar ADN complementario (ADNc). Los 11 µL restantes se utilizaron como control negativo en la PCR en tiempo real.

5.8.4. Retrotranscripción (RT).

La síntesis del ADNc a partir del ARN preparado se llevó cabo según el siguiente protocolo. En una primera etapa se preparó la siguiente mezcla: en un volumen final de 12 µL se adicionó 0,25 µg de oligo dTv (0.5 µg/ µL), 10 µL de ARN tratado con ADNasa, dNTPs a una concentración final de 0,4 mM cada uno.

La mezcla de reacción se incubó durante 5 min a 65 °C y a continuación en hielo durante al menos un minuto. Luego se realizó una centrifugación rápida y se adicionó a cada

tubo de reacción 4 μL de "5X First Strand Buffer", 2 μL de 0,1 M DTT, 1 μL "RnaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor" (Invitrogen) y 100 U de "Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase" (M-MLV) (Invitrogen).

Se mezcló por inversión y se incubó 50 minutos a 37 °C. Luego se realizó una centrifugación rápida y se inactivó la reacción mediante la incubación a 70 °C durante 15 min. Finalmente el ADNc a usar como molde en la reacciones de amplificación se diluyó al menos 40 veces en agua Milli-Q.

5.8.5. Retrotranscripción para analizar la expresión de miARNs.

Debido a que los miARNs maduros no poseen una cola de poliA en el extremo 3', se utilizó un protocolo alternativo para realizar la retrotranscripción. En la etapa de desnaturalización, se realizó la siguiente mezcla: en un volumen final de 12 μL se adicionó: 0,25 μg de oligo dTv, 8 μL de ARN tratado con ADNasa, dNTPs a una concentración final de 0,4 mM cada uno y 1 μM de oligo específico para la retrotranscripción del miARN a analizar, denominado stem-loop oligo (Chen et al, 2005) (Figura MM1). La mezcla de reacción se incubó durante 5 min a 65 °C y a continuación en hielo durante al menos un minuto. Luego se realizó una centrifugación rápida y se adicionó a cada tubo de reacción 4 μL de "5X FirstStrand Buffer", 2 μL de 0,1 M DTT, 1 μL "Rnase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor" (Invitrogen) y 100 U de "Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase" (M-MLV) (Invitrogen). Se mezcló por inversión y se incubó 30 min a 16 °C y luego 50 min a 37 °C. Por último, se realizó una centrifugación rápida y se inactivó la reacción mediante la incubación a 70 °C durante 15 min. El ADNc a usar como molde en la reacciones de amplificación se diluyó al menos 40 veces en agua Milli-Q.

ARN: minúscula
ADN: mayúscula
M: A o C

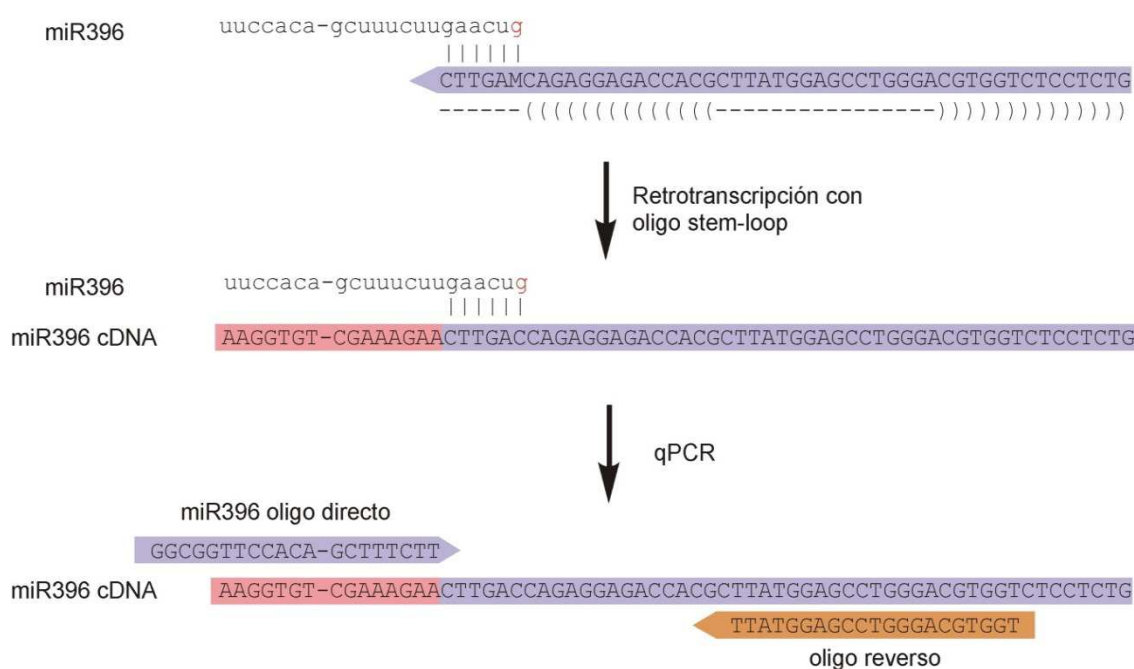


Figura MM1. Descripción del método utilizado para cuantificar el miR396 maduro. La reacción de retrotranscripción se realizó utilizando un oligo stem-loop que hibrida con el miR396 de *Arabidopsis*.

5.8.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).

La cuantificación relativa de los niveles de expresión génica se llevó a cabo mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (Real-Time qPCR) según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001). Como calibrador se utilizó un gen de expresión constitutiva que codifica por la *Ser/Thr proteína fosfatasa 2 (PP2A; At1g13320)* (Czechowski et al, 2005), para el caso de las medidas de *Brassica oleracea* se utilizó el gen *UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME (UBC)*. Un aspecto importante que se tuvo en cuenta para la aplicación del método de cuantificación $2^{-\Delta\Delta Ct}$ es que las eficiencias de amplificación de los fragmentos del gen de interés y del gen de referencia sean similares y próximas a 2 (Pfaffl, 2001). Para el diseño de los oligonucleótidos para la cuantificación de blancos de miARNs se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones. Los miARNs en plantas regulan la expresión de sus blancos principalmente mediante el corte del ARNm. De esta manera para cuantificar el nivel de expresión de un gen que es blanco de un miARN es fundamental distinguir el ARNm completo del cortado. Dado que en la retrotranscripción se sintetizan las hebras de ADNc a partir del oligo dTV que hibrida en el extremo 3' de los ARN mensajeros, la secuencia que se ubica 5' del sitio complementario al miARN solamente será retrotranscripta en aquellos ARNm que no hayan sido cortados por el

miARN. De esta manera si los oligonucleótidos utilizados en la PCR en tiempo real hibridan en esta región se amplificará específicamente un fragmento presente en el ADNc generado de ARNm intactos.

Gen	Locus ID	Oligo Directo	Oligo reverso
<i>GRF1</i>	At2g22840	ATGGAAAGAAATGGCGGTGCTC	CGGCGGCAGCATTAGTATTGT
<i>GRF2</i>	At4g37740	CACATCAACAGAGGCCGTCATCG	AACCGGAGATTCCTTGGGTTGTAAG
<i>GRF3</i>	At2g36400	GTCTTCGCTGGCCACAAGTATT	TGTTGCTGTTGTAGTGGTGGCT
<i>GRF4</i>	At3g52910	GCCACATTCACCGTGAAGAAA	CCACTGTTAGCTTCATATGGCCTC
<i>GRF5</i>	At3g13960	TCAGTTCAATGTCTTAGCCTCTGC	CCCAACTCCTCCAACCTCTCTCC
<i>ARF2</i>	At5g62000	GCTCCTAAGAAAGATTGGTTGA	CATCTTCCTCACTTCCTCTTTC
<i>MIR396</i>	At5g35407	GGCGGTTCCACAGCTTTCTT	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT
<i>DERB2A</i>	At5g05410	CAGCAACAACAGCAGGATTTCGCTA	ACTTTGTTGACTCTCGGCCTGTA
<i>PP2A</i>	At1g13320	CCTGCGGTAATAACTGCATCT	CTGGAGGGAAGTGAATGGTAAC
<i>Br-UBC</i>		GATCCACCCACCTCGTGTAG	CTGGAGGGAAGTGAATGGTAA

Tabla MM2. Oligos utilizados en las reacciones de RT-qPCR.

Las reacciones se realizaron en un equipo de qPCR “Mastercycler® ep realplex” (Eppendorf) en microtubos apropiados para esta técnica. Para determinar el perfil de amplificación durante la PCR se utilizó el colorante fluorescente “SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain” (Roche). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones. Para un volumen final de reacción de 20 µL se adicionó a cada tubo: 2 µL de “10X PCR Buffer” (Invitrogen), 3mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 5 µL de ADNc, 0,5 U de “Platinum Taq DNA Polymerase” (Invitrogen), 20 pmol de cada cebador, y 0,8 µL de una dilución 1000X en agua del “SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Roche)” original. El volumen se completó con agua Milli-Q. Como control negativo se preparó un tubo de reacción para cada muestra en el cual se agregaron los mismos componentes en las mismas condiciones, pero en lugar de utilizar ADNc como molde se colocó 5 µL del ARN sobrante luego del tratamiento con ADNasa, diluido en la misma proporción. El termociclado de las mezclas de reacción se llevó a cabo según el siguiente programa:

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos
Desnaturalización	95	1 min	1.
Ciclos	95	15 seg	40
	55	30 seg	
	72	40 seg	

	Lectura de fluorescencia
--	--------------------------

Se incluyó una etapa final de determinación de la temperatura de fusión de los productos amplificados, lo que permite conocer la especificidad de la reacción. Además, la primera vez que se utilizaron los oligonucleótidos, el producto de la reacción de amplificación se analizó en un gel de agarosa para confirmar la especificidad de la reacción.

5.8.7. Blot de ARN pequeños.

5.8.7.1. Armado del gel y corrida electroforética.

Se armaron geles de poliacrilamida al 17% en condiciones desnaturalizantes según las siguientes instrucciones:

37% Acryamida/ 1% Bis-acrylamida (Sigma: A6050)	10,6 mL
Urea	10,5g
H2O (autoclavada dos veces)	1,75 mL
TBE 5X	12,5mL
Temed	12,5mL
APS 10% (peso/peso)	50mL

La polimerización se llevó a cabo por aproximadamente 1 hora después de la cual se procedió a pre-correr el gel por 1 hora a 180 V (E844 – CONSORT) en TBE 1X. Posteriormente, se prepararon las muestras a sembrar. Para ello, se mezcló 1 volumen de colorante de siembra y 2 volúmenes de formamida. 1,5 volúmenes de esta preparación se mezclaron con 1 volumen de la muestra de ARN (2 – 6 µg). Se incubó durante 4 min a 95 °C y luego se enfrió en hielo. Se sembraron las muestras en el gel y se realizó la corrida electroforética del mismo a 180 V y durante dos horas. Una vez finalizada la corrida, se tiñó el gel con 1X TBE y Bromuro de Etidio por 5 min. Se tomó una foto y el gel se destiñó con 1X TBE. Se transfirió el gel a una membrana “Nytran Super Charge” (NYLON, Schleicher & Schuell BioScience). Para ello, se empapó la misma junto con dos papeles “Whatman” (Axygen®) con 1X TBE.

Luego, se realizó la transferencia en 1X TBE a 300 mA durante 1 hora (Trans-Blot® SD Semi Dry Transfer Cell – Biorad). Terminado esto, se realizó el crosslinking de la membrana durante 5 min. Con UV (UV Transilluminator® UVP).

5.8.7.2. Marcado radioactivo de la sonda

El LNA (del inglés, locked nucleic acid) es un nucleótido de ARN modificado en cual se genera un enlace que une al oxígeno del C2 con el C4. Esta modificación en la estructura, produce un aumento en las propiedades de hibridación del oligo LNA. Entre ellas, un incremento en la estabilidad térmica del dúplex y capacidad de discernir entre secuencias similares. Mediante síntesis química se pueden generar oligos que poseen bases intercaladas de LNA y ADN o ARN. Se utilizó una sonda LNA diseñada contra miR396 (5'-MAGTTCAAGAAAGCCTGTGGAA) y una sonda contra U6 snARN (5'-CTCGATTTATGCGTGTCATCCTTGC) como control.

Para llevar adelante el marcado radioactivo de la sonda, se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Oligonucleótido DNA/LNA (10µM)	2 µL
Buffer polinucleótido quinasa 10X	1 µL
H2O	3 µL
[32P]γ-ATP (6000ci/mmol; 10 mCi/mL)	3 µL
Polinucleótido quinasa T4	1 µL

Se incubó a 37°C durante 1 h, luego se agregó 40 µL dH₂O. El oligo marcado se purificó por cromatografía de exclusión molecular (BioRad columns, MICROBIO-SPIN 6, Cat. No. 7326200).

5.8.7.3. Hibridación.

Se pre-hibridó la membrana a 38 °C durante 1 hora utilizando PerfectHybTM (Sigma). Se agregó la sonda (5 pmol) a 100 uL de PerfectHybTM y se calentó la mezcla a 65 °C durante 10 min. tras lo cual se enfrió en hielo y centrifugó. Se agregaron 10 mL de PerfectHybTM y se dejó hibridando la membrana con esta mezcla a 38 °C durante toda la noche.

Terminada la hibridación, se procedió a enjuagar la membrana con 4X SSC. Luego se realizaron dos lavados durante 20 min. con 4X SSC seguidos de un tercer lavado con 2X SSC y 0,1 % SDS durante 15 min.

5.8.7.4. Detección y cuantificación.

La detección se realizó utilizando el equipo Typhoon (GE) y la intensidad de la señal se determinó a través del software GelQuant. NET (biochemLabsolutions.com). Los valores detectados para las bandas correspondientes a la sonda de miR396 primero fueron normalizados de acuerdo a los valores obtenidos con la sonda U6 snARN, y luego relativizados al genotipo o condición control seleccionado.

| 5.9. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

5.9.1. Recolección y fijado de las muestras.

La recolección de las muestras de tejido (ápices de plantas de 12 días) se realizó en tubos Falcon de 50 mL en hielo (la recolección no debe demorar más de 30 min). El material colectado se fijó en 25 mL de buffer MC suplementado con formaldehído (1% (v/v) concentración final) en vacío y hielo. Luego de 15 min de incubación se liberó el vacío, y a continuación se aplicó vacío por otros 14 min (tiempo total del tratamiento 30 min). Se detuvo el fijado por la adición de 2.5 mL de una solución 1.25 M glicina. Se mezcló bien y se incubó en vacío por 2 min. El tejido fijado se lavó 3 veces con 25 mL de buffer MC. Finalizado esto, se secó el tejido con papel y se transfirió a un tubo falcón de 50 mL nuevo. Luego se sumergió los tubos en N₂ líquido, y se guardó en freezer a -80 °C hasta su utilización. Se utilizaron plantas salvajes Col-0 como control, las cuales se procesaron de la misma manera que las plantas en estudio.

Buffer MC: 10 mM Fosfato de sodio pH7, 50 mM NaCl, 0.1 M glucosa.

5.9.2. Extracción de núcleos.

El material (\approx 0.5 g) se redujo a un polvo fino utilizando el molinillo Retsch MM40, manteniendo los contenedores en frío con N₂. El polvo se transfirió a un tubo Falcon. Sobre este polvo se agregó 10 mL de buffer M1 y se resuspendió hasta lograr homogeneidad. El extracto generado se filtró utilizando un embudo de vidrio con una tela de 55 μ m de poro. El material que quedó en el filtro se lavó con 2.5 mL adicionales de buffer M1. Se centrifugó el filtrado a 1500 g por 20 min a 4 °C.

Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 2.5 mL de buffer M2. Se centrifugó a 1500 g por 10 min a 4 °C. Este lavado se repitió 5 veces.

Se lavó el sedimento una vez con 5 mL de buffer M3, y se centrifugó a 1500 g por 10 min a 4 °C.

El sedimento de núcleos obtenidos se resuspendió en 600 μ L de buffer de Sonicación, se adicionó 27 μ L de inhibidor de proteasas 25X (Roche), y se transfirió a un tubo de 2 mL.

El extracto de núcleos se sonicó utilizando el equipo Bioruptor (BioruptorTM UCD200), 12 veces durante 30 segundo a intervalos de 1 min. Una vez terminado se dejó en hielo 3-4 min.

La suspensión se centrifugó a 20000 g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo 2 mL. Este proceso se repitió dos veces más.

Buffer M1 (Preparar en el momento y frio): 10 mM Fosfato de Sodio pH 7.0, 0.1 M NaCl, 1 M 2-metil 2,4-pentanediol, 10 mM 2-mercaptoetanol, 1 pastilla de Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) para 50mL.

Buffer M2 (Preparar en el momento y frio): Igual que buffer M1 más 10 mM MgCl₂ y 0.5% (v/v) Triton X-100.

Buffer M3 (Preparar en el momento y frio): 10 mM Fosfato de Sodio pH 7.0, 0.1 M NaCl, 10 mM 2-mercaptoetanol, 1 pastilla de Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) para 50mL.

Buffer de Sonicación: 10 mM Fosfato de sodio pH 7, 0.1 M NaCl, 0.5% (p/v) Sarkosyl, 10 mM EDTA.

Inhibidor de proteasas 25X: Resuspender 1 pastilla de Complete Protease Inhibitor Cocktail en 2 mL de H₂O.

5.9.3. Preincubación con beads.

El extracto de cromatina se transfirió a un nuevo tubo conteniendo igual volumen de buffer IP (Aquí se separaron 70 µL del extracto para usar posteriormente como ADN de partida (input DNA), al input se le realizó el proceso de preincubación con las beads (Protein-A agarose beads), pero no la inmunoprecipitación). Se realizaron dos centrifugaciones a 20000g por 10 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5mL. Luego se agregó 56 µL de beads, previamente preparadas, y se incubó durante 1:30 hs a 4°C con rotación. Posteriormente se realizó una centrifugación a 3800g por 5min a 4°C, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se volvió a centrifugar a máxima velocidad durante 10 min a 4°C, nuevamente se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo.

Preparación de las beads: Se colocaron 112 µL de beads por muestra más un extra de 200 µL en tubos de 1.5 mL y se adicionó 1 mL de Buffer IP. El tubo se mezcló por inversión varias veces y luego se centrifugó a 3800g por 3 min y se descartó el sobrenadante. Este proceso se repitió una vez más procurando recuperar un volumen final de beads iguala la inicial.

Buffer IP: 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 10 µM ZnSO₄, 1% (v/v) Triton X-100, 0.05% (p/v) SDS.

5.9.4. Inmunoprecipitación.

Para la Inmunoprecipitación se agregó 1 µL de anticuerpo anti-GFP (1,5 µg) a la muestra y se incubó ON a 4 °C con rotación. Luego, se añadieron 56 µL de beads y se incubó durante 50 min a 4 °C con rotación. A continuación se centrifugó a 3800g por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y se siguió el proceso con las beads. Se realizaron 5 lavados con 700 µL de buffer IP

incubando durante 8 min a T ambiente con rotación. Entra cada lavado se realizó una centrifugación a 3800g por 5 min a 4 °C se removió el IP y se recuperaron las beads.

Finalmente, se eluyó el complejo ADN-proteína de las beads agregando 70 µL de buffer de elución frío. Se incubó 1 min a 37°C con agitación y luego se centrifugó a máxima velocidad por 1 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se le agregó 35 µL de Tris 1M pH = 9 para neutralizar. El paso de elución se repitió dos veces más y en el último se incubó durante 4 min. Por último, todo el volumen recuperado se centrifugó a máxima velocidad por 2 min y se transfirió el eluato a un nuevo tubo de 2 mL.

Buffer de elución: 1.25M Glicina, 5M NaCl 5M, 1/2000, 0.05%Tween-20.

5.9.5. Reversión del entrecruzamiento químico ADN-proteína, y purificación del ADN.

Se adicionó proteinasa K (Roche, cat. 03 115 836 001) al eluato (concentración final 0.5 mg/mL) y se incubó durante una noche a 37 °C. Desde este punto también se continuó con la muestra de “DNA input”. Luego, se adicionó una segunda alícuota de proteinasa K (la misma cantidad que antes) y se incubó a 65 °C por al menos 6 hs.

A continuación, se precipitó el ADN mediante el agregado de 2,5 volúmenes de etanol absoluto, 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH5.4 y 4 µL de glicógeno. Se incubó durante una noche a -20 °C.

Se centrifugó a 20000 g por 30 min a 4 °C. El ADN precipitado se resuspendió en 70 µL de agua milliQ.

Luego se purificó el ADN obtenido utilizando columnas para purificar productos de PCR (Qiagen PCR purification columns) y se eluyó en 35 µL de buffer de elución.

5.9.6. Cuantificación del enriquecimiento por qPCR.

Se realizaron diluciones 1/5 de las muestras y 1/50 del “ADN input” y se cuantificaron los fragmentos de ADN de interés por qPCR con la misma metodología que se describió en la sección 5.4.6. El cálculo del enriquecimiento se hizo con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001), utilizando como calibrador el “ADN input”. Se utilizaron los oligos de la tabla MM3.

Gen	Locus ID	Fragmento	Oligo Directo	Oligo Reverso
GRF3	At2g36400	Blanco	TCATAGCGATGTTGTGAAGAG	ATGAAATCAAACCTATAATTCAAC
		Control negativo	GTCTTCGCTGGCCACAAGTATT	TGTTGCTGTTGTAGTGGTGGCT
GRF5	At3g13960	Blanco	AGTCAGAGAGACAGGAGCATCAAGTG	GGGATGAAGAAGAAGAGTGTGGTCC
		Control negativo	TCAGTTCAATGTCTTAGCCTCTGC	CCCAACTCTCCAACCTCTCTCC

HB33	At1g75240	Blanco	CATCTCTCACAAAGGGCTCAGC	GCTCAAAGCTTTTGCTTGTGAAGG
------	-----------	--------	------------------------	--------------------------

Tabla MM3. Oligos utilizados en para la cuantificación del enriquecimiento por qPCR.

5.10. Recursos Bioinformáticos.

- **MEGA-X:** MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) es un software que implementa múltiples herramientas y métodos analíticos para Filogenómica y Filomedicina. Se utilizó este programa para realizar alineamientos y generar los arboles filogenéticos siguiendo la metodología publicada en Hall *et al* 2013(Hall, 2013).
- **mVISTA:** Es una herramienta que permite comparar secuencias de ADN de dos o más especies y visualizar estos alineamientos. Presenta una salida visualmente clara, que permite identificar fácilmente similitud de secuencias y diferencias. Utilizamos este software para el análisis de regiones promotoras.
- **T-COFFEE:** Es un programa para el alineamiento de secuencias múltiples.
- **RNAhybrid:** Es una herramienta para identificar la hibridación de menor energía libre de un ARN largo y uno pequeño. Identifica uno o más dominios de hibridación, seleccionando las regiones donde el ARN pequeño aparea con el largo. Esta ideada para la predicción de sitios blanco de miARNs. Utilizamos esta herramienta para el análisis de genes *GRFs*.

RESULTADOS I

6. Resultados Capitulo 1.

REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO EN PLANTAS POR EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN GRF3

6.1. Introducción

El rendimiento de los cultivos es una característica que depende de factores internos y externos. Los genes de rendimiento intrínseco (IYG, de “Intrinsic Yield Genes”) han sido definidos como aquellos genes que al ser mutados o expresados ectópicamente son capaces de generar órganos más grandes como hojas, raíces o semillas (Gonzalez et al, 2009). En este sentido, la modificación precisa de los IYG podría incrementar el rendimiento de cultivos y es por eso que constituyen una fuente potencial para aplicaciones biotecnológicas.

Se ha visto que en algunos casos la expresión ectópica de *GRFs* es suficiente para producir un aumento del tamaño de la hoja. En *Arabidopsis*, la sobreexpresión de los genes *AtGRF5* (Gonzalez et al, 2010; Horiguchi et al, 2005), *Brassica napus BnGRF2* (Liu et al, 2012) y *Brassica rapa BrGRF8* (Wang et al, 2014), utilizando el promotor 35S, producen incremento del tamaño foliar. A su vez, las plantas que expresan versiones resistentes a miR396 de los genes *AtGRF2 (rGRF2)* y *AtGRF3 (rGRF3)*, debido a la introducción de mutaciones silenciosas en el sitio de reconocimiento del miR396 (Figura I9.B), producen hojas más grandes respecto de las plantas silvestres (Rodriguez et al, 2010) (Debernardi et al, 2014).

Sin embargo, no siempre un incremento en los niveles de *GRFs* en *Arabidopsis* resulta en órganos más grandes, por ejemplo la sobreexpresión del gen *Os-GRF1* de *Oryza sativa* en *Arabidopsis* resulta en efectos pleiotrópicos, como hojas arrugadas, retraso en la floración y defectos en el desarrollo del carpelo (van der Knaap et al, 2000). Los resultados en cultivos también son variables. La sobreexpresión de *Zm-rGRF1* incrementa el tamaño de las hojas de maíz, pero también causa efectos perjudiciales como la generación de pelos grandes en la gluma y en el eje de la mazorca, que producen una reducción de la fertilidad (Nelissen et al, 2015). La sobreexpresión de *Zm-GRF10*, que le falta un dominio de transactivación, reduce el tamaño de la hoja de maíz (Wu et al, 2014). Además, en *Arabidopsis* el aumento de los niveles de *AtGRF7* y *AtGRF9* no producen aumento del tamaño de hojas (Kim et al, 2012; Liang et al, 2014; Wang et al, 2011a). *AtGRF7* está involucrado en la respuesta a estrés osmótico en plantas (Kim et al, 2012), mientras que sobre *AtGRF9* se ha reportado que actúa como represor del crecimiento (Arvidsson et al, 2011). En determinados órganos y condiciones los *GRFs* pueden afectar tanto al número de células como al tamaño (Che et al, 2015; Hu et al, 2015).

El hecho de que algunos *GRFs* incrementan el tamaño de la hoja sugiere que pueden actuar como IYG incrementando el tamaño de órganos de la planta y por lo tanto son una

valiosa herramienta para aplicaciones biotecnológicas. Sin embargo, no todos los *GRFs* generan un impacto positivo y en algunos casos pueden producir efectos negativos. En este capítulo, caracterizamos a *GRF2* y *GRF3* de *Arabidopsis* y encontramos que el gen *AtGRF3* insensible a miR396 (*rGRF3*), promueve de manera consistente el aumento del tamaño de hojas en *Arabidopsis thaliana*, y que esta habilidad depende de la secuencia aminoacídica del factor de transcripción. También demostramos, que *rGRF3* puede aumentar el tamaño de hojas, raíces y semillas en *Brassica oleracea*. Finalmente, encontramos que las plantas que expresan el transgén *rGRF3* aun en condiciones de estrés por sequía leve presentan hojas más grandes.

6.2. Resultados.

6.2.1. Análisis de la estructura génica de los *GRFs*.

En *Arabidopsis* hay nueve *GRFs* (Figura R1.1.A y B), siete de ellos presentan un sitio de reconocimiento de miR396 localizado sobre el final del dominio WRC (Figura R1.1.B y C). El sitio blanco del miARN es idéntico en cada uno de los *GRFs* con excepción de la octava posición donde hay una C en *GRF1-4*, una A en *GRF7-8* y una U en *GRF9* (Figura R1.1.C). La base variable en posición ocho queda desapareada, por lo tanto la interacción con el miR396 es similar para todos los factores de transcripción, sin embargo, la secuencia aminoacídica codificada varía (Figura R1.1.C).

El análisis de la estructura de intrones y exones de los genes *GRFs* de *Arabidopsis* permite ver que existen diferencias entre alguno de ellos, así como también en la distribución de los dominios característicos de la familia (Figura R1.1.B). Consistentemente con la similitud observada en el sitio de unión de miR396, los genes *GRF1-4* presentan una estructura similar de cuatro exones de tamaño semejante, el dominio QLQ en el segundo exón y el dominio WRC en el tercero. A su vez, dentro de este subgrupo, de acuerdo a la longitud de los intrones podríamos subdividir a *GRF1-2* y *GRF3-4*. Luego podríamos agrupar a *GRF5-6*, los cuales presentan tres y cuatro exones respectivamente, el dominio QLQ en el primero y el dominio WRC en el segundo. Estos dos *GRFs* no son regulados por miR396. Los *GRFs7, 8, 9* presentan las tres estructuras de exones e intrones diferentes. *GRF7* cuenta con tres exones y dos intrones pequeños, los dominios QLQ y WRC en el segundo exón. *GRF8* presenta dos exones pequeños en el extremo 5' luego un intrón largo y luego cuatro exones más, los dominios QLQ y WRC en los exones cuarto y quinto respectivamente. *GRF9* tiene cuatro exones, el dominio QLQ en el primer exón y a diferencia del resto de los *GRFs* presenta dos dominios WRC, uno en el segundo exón y otro en el tercero.

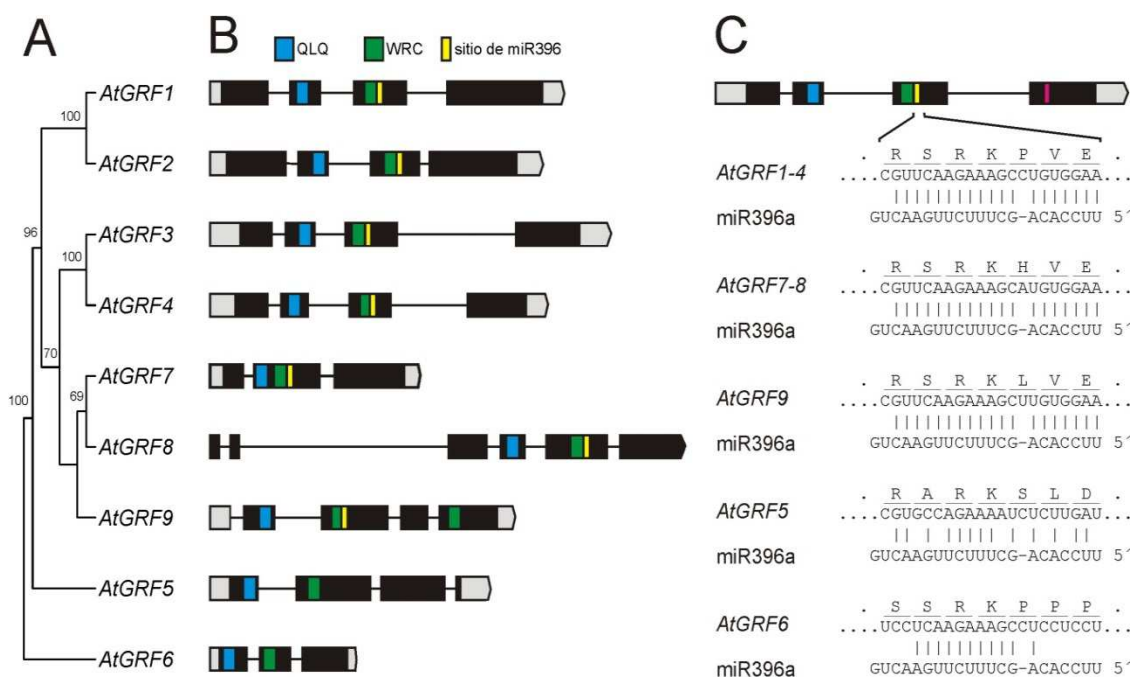


Figura R1.1. Análisis de los GRFs de *Arabidopsis thaliana*. A) Árbol filogenético de la secuencia aminoacídica completa de los GRFs de *Arabidopsis* construido por el método Neighbor joining. En los nodos se indican valores de bootstrap mayores a 50%. B) Esquema que representa la estructura de intrones y exones, localización de los dominios proteicos WRC y QLQ, y el sitio de unión de miR396. C) Esquema de representación de un GRF típico y una visión detallada de la interacción de los GRFs de *Arabidopsis* con miR396.

6.2.2. Actividad diferencial de los GRFs entre los miembros de la familia.

Para estudiar la pérdida de función de *MIR396*, preparamos y caracterizamos plantas que expresan un “mimic” contra el miR396 (*MIM396*). El “mimic” consiste en un ARN no codificante que tiene un sitio capaz de unir al miARN, pero que lo bloquea en su función y promueve su degradación (Franco-Zorrilla et al, 2007) (Todesco et al, 2010). Los “mimics” tienen una estructura particular, generando un desapareamiento de tres nucleótidos con el miARN entre las posición 10 y 11, que es el enlace que es cortado por la maquinaria de silenciamiento (Franco-Zorrilla et al, 2007) (Todesco et al, 2010). El *MIM396* generado cuenta con 9 sitios que pueden actuar como una esponja para miR396 (*9x-MIM396*) (Figura R1.2.A). Primero analizamos 20 plantas transgénicas primarias independientes transformadas con *9x-MIM396*. Observamos, que este constructo causa un incremento del área de la hoja que puede alcanzar el 70% en los casos más extremos (Figura R1.2.B y C). Posteriormente se seleccionaron tres líneas independientes homocigotas, y en estas plantas obtuvimos un aumento del área de la primera hoja de entre un 10 y un 37% (Figura R1.2.D).

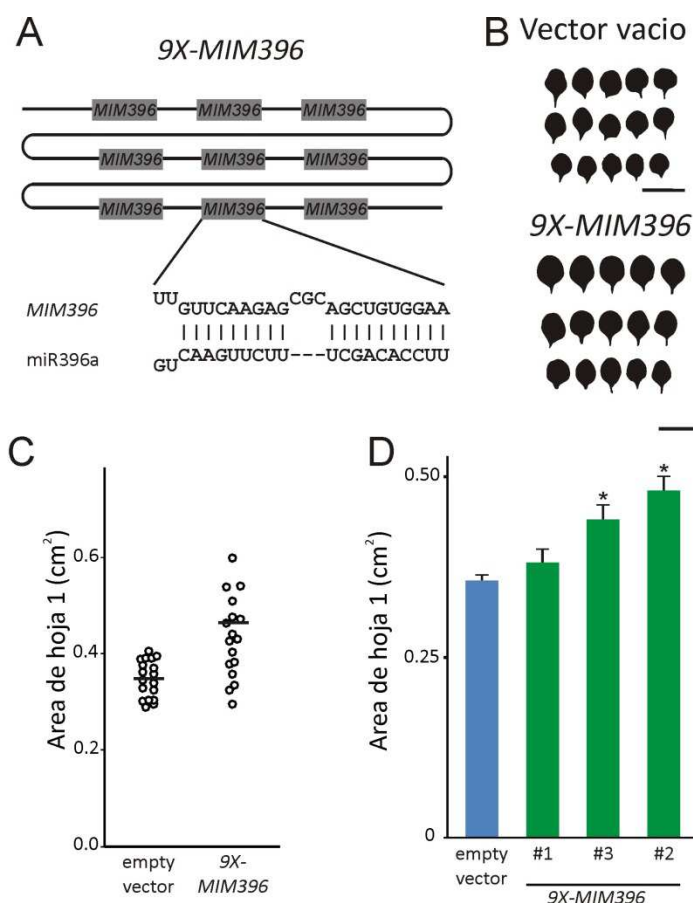


Figura R1.2. miR396 limita el tamaño de la hoja en Arabidopsis. A) Esquema del multi-mimic preparado contra miR396 (*9X-MIM396*). B-C) Distribución de tamaño de la hoja 1 completamente expandida en una población de transgénicas primarias de Arabidopsis con el vector vacío o con *9X-MIM396*. En el panel B, cada silueta corresponde a la hoja #1 a una planta transgénica independiente transformada con el vector indicado. En el diagrama de dispersión en el panel C, cada círculo indica el tamaño de una única hoja, la línea horizontal representa la mediana de la muestra. Barra = 1cm. D) Tamaño de hoja #1 en plantas control (vector vacío) y tres líneas transgénicas homocigotas independientes transformadas con *9X-MIM396*. Los datos mostrados corresponden al promedio \pm E.E.. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a la planta control, determinada por la prueba T-student ($p < 0.05$).

La línea con fenotipo más fuerte seleccionada, fue evaluada a nivel molecular y observamos que estas plantas presentan una caída del 50% en la expresión de *MIR396* (Figura R1.3.A). Esta disminución del miARN se ve reflejada en los niveles de los *GRFs*, *GRF2* y *GRF3* presentan un incremento del 30% (Figura R1.3.A). El nivel de expresión del miARN se midió también por Northern blot (Los blots de ARNs pequeños fueron realizados por la Lic. Arantxa Rojas), y se obtuvieron resultados semejantes (Figura R1.3.B).

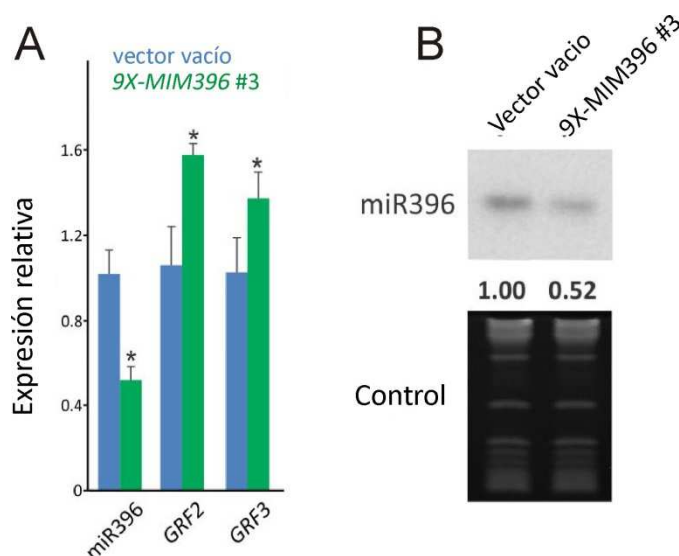


Figura R1.3. Análisis molecular de una línea estable 9X-MIM396. A) Niveles de expresión de miR396, *GRF2*, *GRF3* en plantas control (vector vacío) y 9X-MIM396. Los niveles de miR396 y *GRFs* fueron medidos por RT-qPCR y normalizados a la planta control. Los datos mostrados corresponden al promedio \pm E.E. de 3 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control, determinado a través de la prueba T-student ($p < 0.05$). B) Nivel de expresión de miR396 en plantas transformadas con el vector vacío y 9X-MIM396 #3, medido blots de ARNs pequeños. Los números indican la abundancia relativa. Los datos corresponden al promedio \pm E.E. de tres replicas biológicas. Como control de carga y transferencia se utilizó una sonda contra U6. El blot mostrado en la figura es un par representativo de las muestras control y 9X-MIM396.

Resultados previos han permitido ver que la sobreexpresión de los *GRFs* produce diferentes efectos, por ejemplo, mientras que *rGRF2*, *rGRF3* y *35S:GRF5* causan un incremento del tamaño de las hojas en *Arabidopsis* (Debernardi et al, 2014; Gonzalez et al, 2010; Rodriguez et al, 2010), la sobreexpresión de *GRF7* y *GRF9* no (Kim et al, 2012; Liang et al, 2014; Wang et al, 2011a). Además, la sobreexpresión de algunos *GRFs* de otras especies podrían también inhibir el crecimiento (van der Knaap et al, 2000). La observación de que la mayoría de los *GRFs* son regulados por miR396 en angiospermas y que el fenotipo de la expresión de *MIM396* fue un incremento del tamaño de las hojas, demuestran que el módulo *miR396/GRFs* controla el tamaño del órgano *in vivo*. Estos resultados nos incitaron a focalizarnos con más detalle en *rGRF2* y *rGRF3*, especialmente para estudiar sus potenciales aplicaciones biotecnológicas para aumentar el tamaño de las hojas y otros órganos.

Primero se analizaron 30 plantas transgénicas primarias que expresaban *rGRF2* o *rGRF3* desde su propio promotor (Figura R1.4.A y B) (El análisis en plantas T1 fue realizado por el Dr. Juan Manuel Debernardi). Aunque ambas construcciones producen un aumento del área de la hoja, los efectos producidos por *rGRF3* son significativamente mayores que los obtenidos con *rGRF2*. Luego seleccionamos líneas transgénicas homocigotas y determinamos los niveles de transcritos de los *GRFs*. Encontramos que un incremento de dos veces en la expresión de *GRF3* es suficiente para cambiar el tamaño de la hoja en un 70%, mientras que un aumento de

25 veces de los transcritos de *GRF2* produce un incremento similar del tamaño del órgano (Figura R1.4.D y E). En ambos casos, el aumento de tamaño de las hojas se debe a un aumento similar del número de células, sin que se produzca un cambio apreciable del tamaño de las células (Figura R1.4.F y G).

Un análisis más extenso de las plantas *rGRF2* permite ver que las hojas presentan determinados defectos morfológicos, como peciolo alargados y torcidos con hojas curvadas. En las plantas *rGRF3* no se observaron este tipo de cambios acompañando el incremento de tamaño (Figura R1.4.C). Para confirmar que el promotor no es la causa de las diferencias observadas entre *rGRF2* y *rGRF3*, se expresó a *rGRF2* y *rGRF3* desde el promotor de *GRF3* y observamos que *pGRF3:rGRF3* causa un aumento mayor del área de las hojas que *pGRF3:rGRF2* (Figura R1.4.H). Esto indica que es importante considerar tanto el nivel de expresión como la secuencia de la proteína *GRF* para aumentar eficientemente el tamaño del órgano. De esta manera, aunque ambos *rGRFs* pueden ser utilizados para aumentar el tamaño de las hojas, *rGRF3* resulta ser más eficiente.

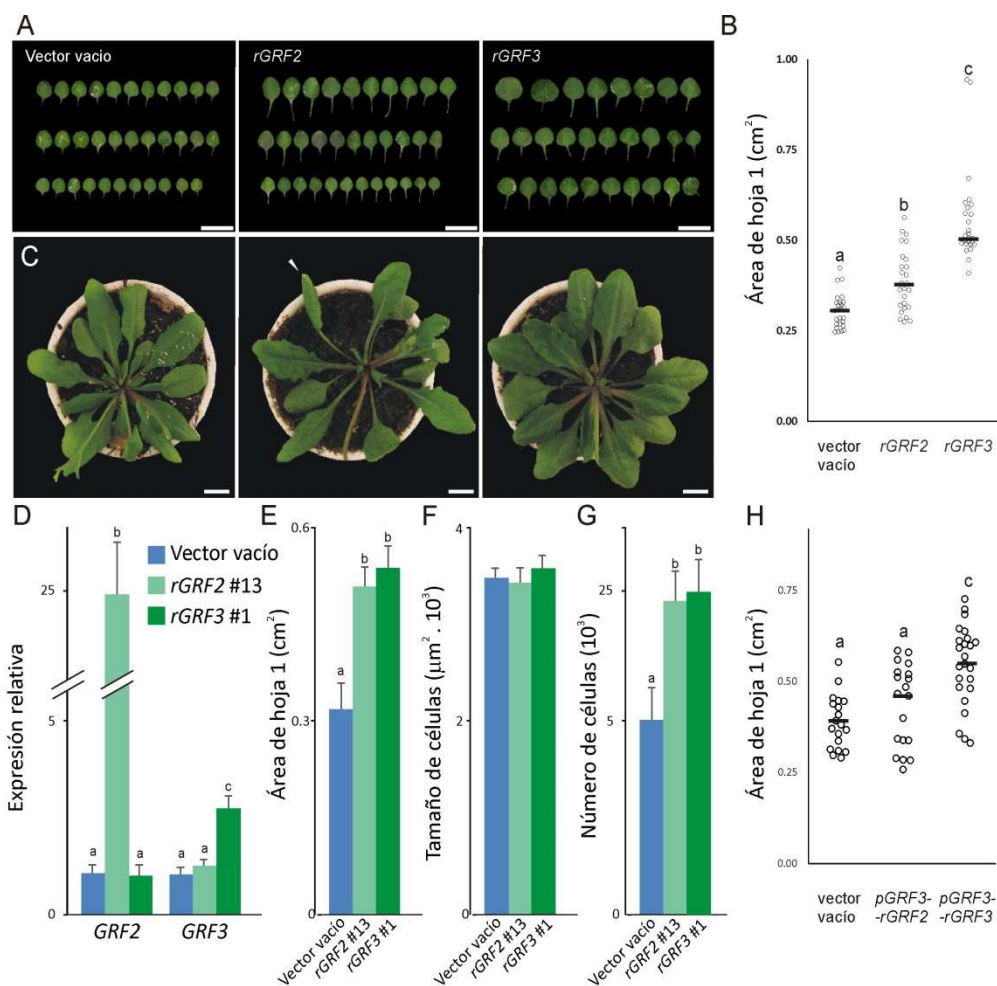


Figura R1.4 *GRF3* es más eficiente que *GRF2* para incrementar el tamaño de hojas. A-B) Distribución del tamaño de hoja #1 completamente expandida de una población de plantas transgénicas primarias T1 transformadas con el vector vacío, *rGRF2* o *rGRF3*. En el diagrama de dispersión, panel B, cada círculo representa el tamaño de una hoja de una planta transgénica independiente T1, la barra horizontal representa la mediana de la muestra. Las letras diferentes representan diferencias significativas, determinado por ANOVA seguido por la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$). Barra = 1cm. C) Plantas de 30 días transformadas con el vector vacío, *rGRF2* o *rGRF3*. Se puede ver en las plantas *rGRF2* el cambio en la morfología (flecha en blanco), los peciolo están alargados y torcidos, y las hojas curvadas hacia abajo. Barra = 1cm. D) Niveles de expresión relativa de *GRF2* y *GRF3* en plantas transgénicas homocigotas T3 transformadas con el vector vacío, *rGRF2* y *rGRF3*. Los niveles fueron determinados por RT-qPCR y normalizados a las plantas control (vector vacío). Los datos mostrados corresponden al promedio \pm E.E de 3 réplicas biológicas. Las letras diferentes indican diferencias significativas determinadas por ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$). E) Área de hoja 1, F) área de células del mesófilo en empalizada y G) número de células en las plantas control, *rGRF2* y *rGRF3*. Los datos mostrados corresponden al promedio \pm E.E. Las letras diferentes indican diferencias significativas determinado por ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$). H) Distribución del tamaño de hojas #1 completamente expandidas en una población de plantas de *Arabidopsis* transgénicas primarias T1, transformadas con *rGRF2* y *rGRF3* bajo control del promotor de *GRF3*. En el diagrama de dispersión cada círculo representa el tamaño de una hoja de una planta transgénica independiente, la barra horizontal representa la mediana. Las letras diferentes indican diferencias significativas determinadas por ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$).

6.2.3. La expresión de *GRFs* tipo *AtGRF3* de distintas especies producen un incremento del tamaño de hojas en *Arabidopsis*.

Dado que *rGRF3* de *Arabidopsis* resulta ser una potencial herramienta para promover el incremento del tamaño de órganos, decidimos evaluar también la expresión de secuencias de *GRF3* de otras especies en *Arabidopsis*. Para esto se analizaron en las bases de datos las secuencias de los factores de transcripción *GRFs* de arroz (Choi et al, 2004) y soja (Zhang et al, 2011), y se seleccionaron aquellos de mayor similitud a *AtGRF3* (Anexo R1). Luego, expresamos los *GRFs* tipo *AtGRF3* de soja y arroz en *Arabidopsis* bajo control del promotor de *AtGRF3* en *Arabidopsis*. Como ambos genes presentan sitio de unión de miR396, se introdujeron mutaciones silenciosas para evitar el reconocimiento del miARN. Las plantas transformadas con dichos vectores mostraron un incremento de tamaño semejante al producido por *rGRF3* de *Arabidopsis* (Figura R1.5.A y B) (Plantas generadas por el Dr. Ramiro Rodriguez).

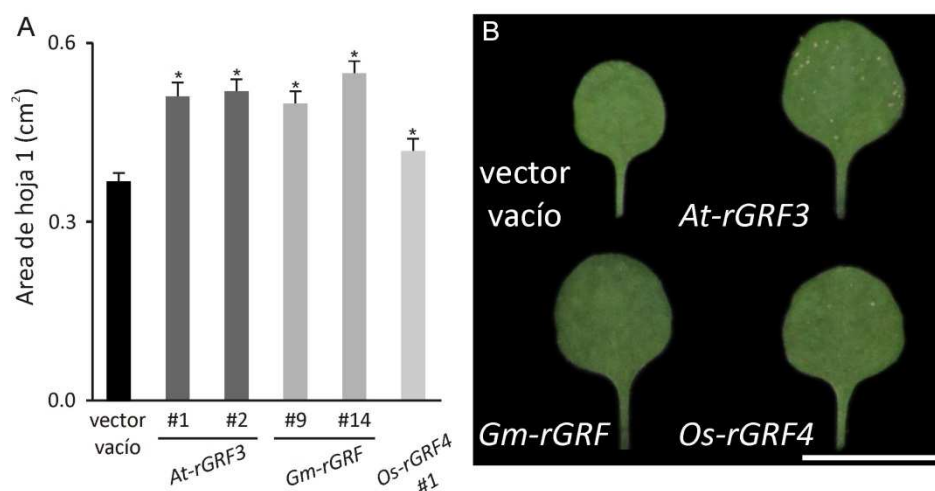


Figura R1.5. GRFs tipo *At-GRF3* aumentan el tamaño de las hojas en *Arabidopsis thaliana*. A) Área de hojas #1 completamente expandidas de plantas de *Arabidopsis* transgénicas que expresan *At-rGRF3* o los ortólogos seleccionados en soja (*Gm-rGRF*) o arroz (*Os-rGRF4*). Los datos presentados corresponden al promedio \pm E.E de 20 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de las plantas transformadas con el vector vacío, determinado por la prueba T-student ($p < 0.05$). B) Hoja #1 de plantas de *Arabidopsis* transgénicas que expresan *At-rGRF3* o los ortólogos seleccionados en soja (*Gm-rGRF*) o arroz (*Os-rGRF4*). Barra = 1 cm.

Por otro lado, para evaluar el potencial de *rGRF3* como herramienta biotecnológica se prepararon plantas transgénicas de *Brassica oleracea* que expresaran *rGRF3* de *Arabidopsis*. Llevamos a cabo un análisis de dos líneas independientes y encontramos un incremento significativo del área de las hojas de 20 y 32% respecto de las plantas silvestres (wt) (Figura R1.6.A y B). Este incremento se correspondía con la expresión de *rGRF3* de *Arabidopsis* la cual se cuantifico por RT-qPCR (Figura R1.6.C). También el análisis de las hojas de líneas transgénicas permitió ver que el incremento de tamaño es causado por un aumento en el número de células y no por aumento de tamaño de las mismas. Se analizó también el crecimiento de la raíz (Figura R1.6.F y G) y (Figura R1.6.D y E) el tamaño de las semillas. La evaluación del crecimiento de la raíz en las plantas *B. oleracea* *rGRF3* #10 mostró que presentan una mayor velocidad de crecimiento de la raíz primaria respecto de las plantas control (Figura R1.6.G). Además, estas plantas tienen un incremento del tamaño de las semillas del 10% (Figura R1.6.D y E) (Las medidas de tamaño de semillas y crecimiento de raíz fueron realizados por la Lic. Camila Goldy). De acuerdo a estos resultados, los GRFs del tipo *AtGRF3* de diferentes especies son capaces de producir un incremento del tamaño de órganos, incluyendo hojas, raíz y semillas, cuando son desacoplados de la regulación por miR396.

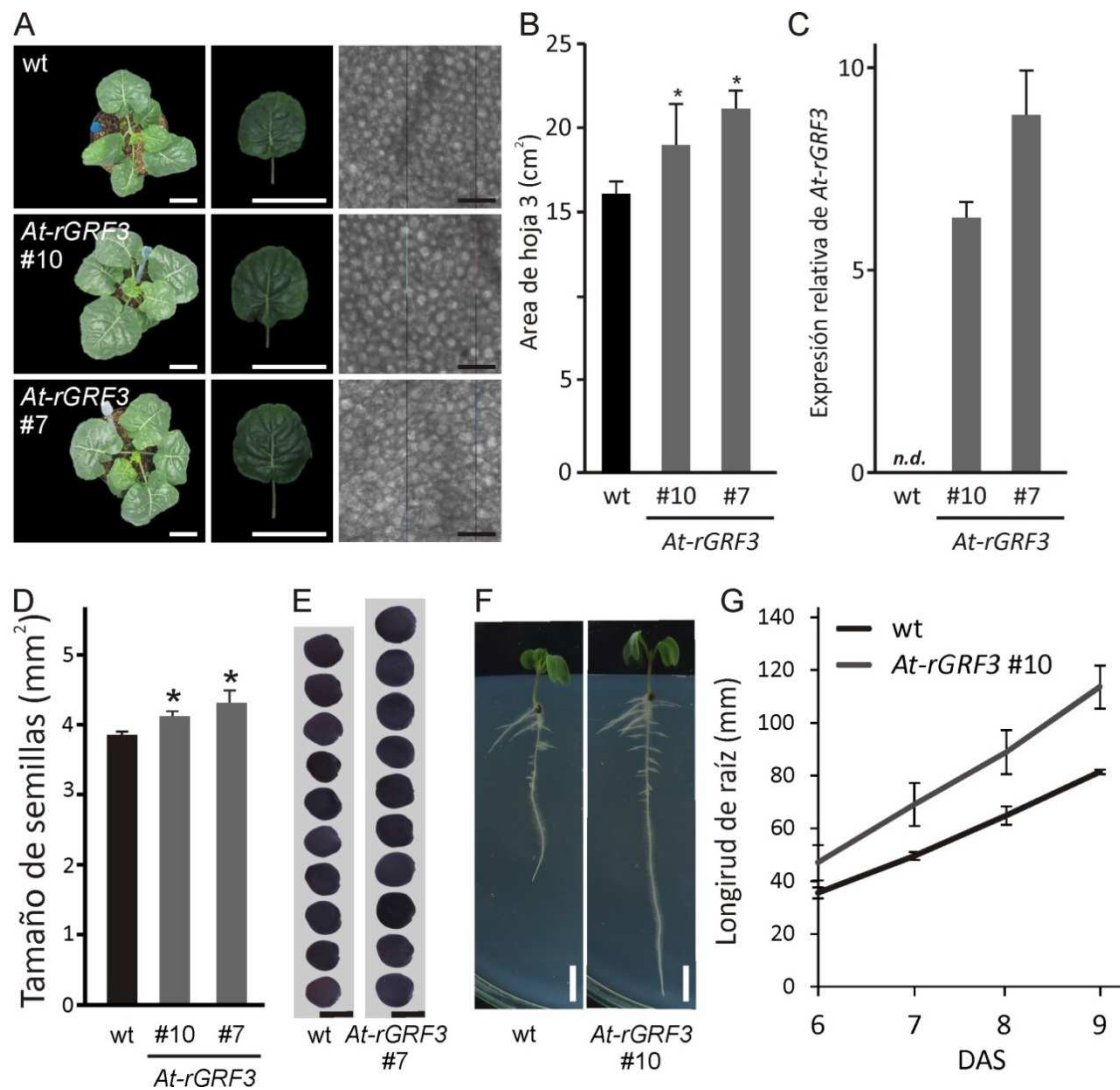


Figura R1.6. *rGRF3* incrementa el tamaño de los órganos en *Brassica oleracea*. A) Plantas de *Brassica oleracea* silvestre (wt) y transgénicas que expresan *At-rGRF3*. A la izquierda, plantas de 4 semanas. En el medio, hoja #3 completamente expandida. A la derecha, vista paradermal del mesófilo en empalizada en hoja #3 completamente expandida. B) Área de hoja #3 de plantas de *B. oleracea* de 4 semana wt y transgénicas. Los datos mostrados corresponden al promedio \pm E.E.. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a Col-0 determinada por la prueba T-student ($p < 0.05$). C) Niveles de expresión de *At-rGRF3* en plantas transgénicas de *B. oleracea*, determinados por RT-qPCR. Los datos mostrados corresponden al promedio \pm E.E. de 3 réplicas biológicas. D-E) Tamaño de las semillas de plantas *B. oleracea* wt y *At-rGRF3* #10 y #7. Los datos mostrados en D) corresponden al promedio \pm E.E. de 30 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de las plantas wt determinada por la prueba T-student ($p < 0.05$). F-G) Arquitectura de la raíz F) y crecimiento de la raíz G) en plantas de *B. oleracea* wt y *at-rGRF3* #10. Los datos mostrados corresponden al promedio \pm E.E. de 6 réplicas biológicas.

6.2.4. Rol del nodo *miR396/GRFs* bajo condiciones de estrés.

El estrés por sequía es una situación bastante compleja, que dispara diferentes tipos de respuesta de acuerdo a la magnitud del estrés y el estado de desarrollo de la planta (Claeys &

Inze, 2013). En particular, las condiciones de limitación de agua reprimen la proliferación y expansión celular de órganos en desarrollo y/o inducen una serie de respuestas de tolerancia y supervivencia en los órganos maduros (Claeys & Inze, 2013; Clauw et al, 2015; Dubois et al, 2017). En condiciones de campo, la disponibilidad limitada de agua reduce el crecimiento de las plantas, la acumulación de biomasa y por lo tanto también el rendimiento de semillas (Skirycz et al, 2011). Evaluamos la respuesta a estrés por sequía moderada que consiste en una reducción del 55% del contenido de agua utilizando la plataforma de fenotipo automático WIWAM (Skirycz et al, 2011). Estos experimentos fueron llevados a cabo por la Dra. María Florencia Ercoli en el contexto de una colaboración con el laboratorio del Dr. Dirk Inze en Bélgica. Bajo dichas condiciones experimentales, las plantas control transformadas con un vector vacío tuvieron una reducción del área de la roseta (Figura R1.7.A) y una reducción del 35% del área de la hoja 1 (Figura R1.7.F).

Se chequeó también la expresión de *MIR396B* utilizando el reportero transcripcional *pmiR396B:GUS*, que permitió hacer un monitoreo de la expresión del gen *MIR396B*, que es el más abundante en hojas. A los 11 días después de sembradas las plantas (DAS), en los potes regados regularmente, *MIR396B* se expresa en bajos niveles en el extremo proximal de la hoja tres, que aún se encuentra en estado de proliferación (Figura R1.7.B y C). El nivel más alto de expresión se observa en la zona distal, donde las células ya han salido del ciclo celular. Cuando las plantas son sometidas a estrés por sequía moderada el tamaño de las hojas se reduce y el reportero de miR396 es detectado en un área mayor de la zona distal de la hoja con mayor intensidad (Figura R1.7.B y C). De acuerdo con esto la cuantificación por blots de ARNs pequeños muestran un incremento del 70% en los niveles de miR396 maduro en las hojas en desarrollo de plantas sometidas a estrés (Figura R1.7.D). Por el contrario, los niveles de transcripto de *AtGRF3* disminuyen aproximadamente un 60% (Figura R1.7.E). En conjunto estos resultados indican que la red de miR396 responde al estrés por sequía. A continuación, se evaluó el rol del nodo *miR396/GRFs* durante el estrés por sequía. Para esto, se analizó primero la respuesta a estrés por sequía moderada de plantas *35S:miR396*, las cuales tienen hojas más pequeñas debido a la sobreexpresión del miARN y la represión de los *GRFs* (Rodríguez et al, 2010) (Figura R1.7.F). Cuando estas plantas son sometidas a condiciones de sequía, no se observa una reducción aún mayor del tamaño de las hojas (Figura R1.7.F), esto indica que la sobreexpresión de miR396 enmascara el efecto de inducción endógena de *MIR396*, previamente mostrado, que se produce en las plantas estresadas.

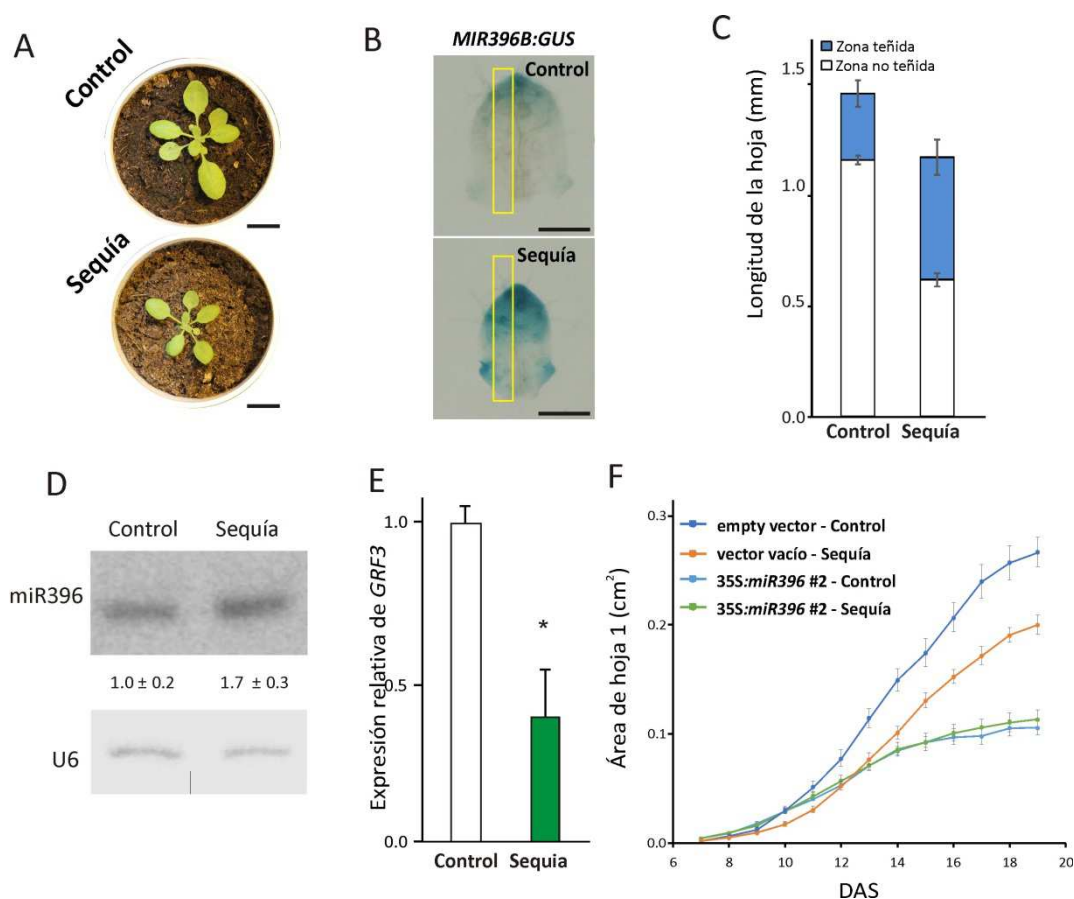


Figura R1.7. Respuesta del sistema *miR396/GRFs* al estrés por sequía. A) Disminución del área de la roseta en plantas control transformadas con el vector vacío a los 19 días, sometidas a estrés por sequía moderada. Barra = 1cm. B) Inducción prematura de *MIR396b* durante el estrés por sequía moderada. Se utilizó un reportero *pMIR396b:GUS* para visualizar la expresión de *miR396b* en condiciones normales y de sequía. La tinción se realizó en plantas de 11 días. Barra = 0.5mm. C) Longitud de la zona teñida con GUS (azul) y sin teñir (blanco) a lo largo de las hojas en condiciones normales y de sequía. Las medidas fueron tomadas en hojas teñidas como las del panel B, en un área definida lo largo de la hoja. Esta área está marcada en amarillo. Los datos presentados son el promedio \pm E.E. de 20 hojas. D) Inducción de *miR396* luego del tratamiento de sequía en las hojas en desarrollo. La acumulación de *miR396* en extractos de ARN total de hojas como las del panel B fue estimada por blots de ARNs pequeños. Los números indican la abundancia relativa respecto de las plantas control. Los datos presentados corresponden al promedio \pm E.E. de dos replicas biológicas. Como control de carga y transferencia se utilizó una sonda contra el snARN U6. El blot mostrado en la figura es un par representativo de las muestras de plantas crecidas en condiciones control y de sequía. E) Niveles de expresión de *GRF3* en plantas crecidas en condiciones control y de sequía. Los datos presentados, están normalizados al valor de expresión en condición control y corresponde al promedio \pm E.E. de tres replicas biológicas. El asterisco indica diferencias significativas respecto del control determinado por T-Student ($p < 0.05$). F) Crecimiento de la hoja #1 en condiciones control y de sequía, de plantas control (vector vacío) o *35S:miR396*. El crecimiento se siguió desde los 7 hasta los 19 días después de la siembra en la plataforma WIVAM. Los datos presentados corresponden al promedio \pm E.E. de 10 réplicas biológicas

Cuando se aplicó la condición de estrés a plantas *rGRF3*, el tamaño de las hojas se redujo con respecto al de la condición control (Figura R1.8.A y B). Sin embargo, al final del experimento, 20 días después de la siembra (DAS), las hojas de las plantas *rGRF3* eran significativamente mayores que las de las plantas control crecidas en condiciones de sequía (Figura R1.8.B). Para chequer que las diferencias no se debieran a un aumento del plastocrono por una mayor

expresión de *GRF3* o a la condición de sequía ensayada, se realizaron estas medidas de tiempo pero no se encontraron diferencias (Figura R1.8.C y D). Por lo tanto, las diferencias de tamaños de roseta observados, se deben principalmente a un cambio en el tamaño del organo y no a cambios en el tiempo de desarrollo.

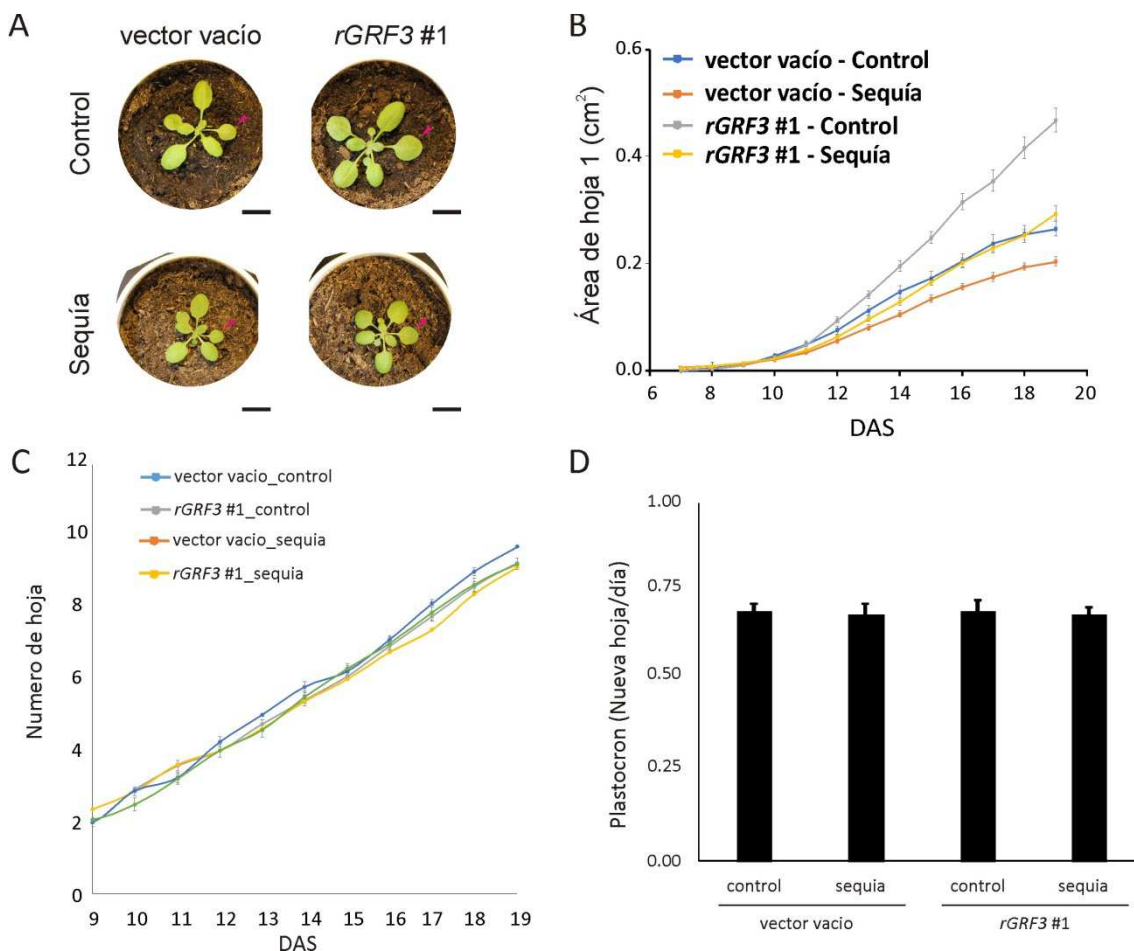


Figura R1.8. *rGRF3* reduce los efectos del estrés por sequía. A) Rosetas de plantas control y *rGRF3* de 19 días crecidas en condiciones control y de sequía. Las flechas señalan la hoja 1. Barra = 1cm. B) Crecimiento de la hoja 1 de plantas control y *rGRF3* crecidas en condiciones control y de sequía. El tamaño de las hojas fue seguido desde el día 7 al 19 después de la siembra en la plataforma WIWAM. Los datos presentados corresponden al promedio \pm E.E. de 10 réplicas biológicas. C) Análisis del número de hojas a lo largo del tiempo en las plantas control y *rGRF3*, en condiciones control y de sequía. D) Medida del plastocron (expresada como el número de nuevas hojas por día) en plantas control y *rGRF3*, en condiciones normales y de sequía.

6.3. Discusión.

En este capítulo, demostramos que los *GRFs* tipo *AtGRF3* de varias especies como soja y arroz pueden incrementar sistemáticamente el tamaño de hojas, raíz y semillas en especies *Brassicaceas*, como *Arabidopsis thaliana* y *Brassica oleracea*, cuando desacoplamos la regulación de miR396.

Los trabajos previamente reportados, en los que se ha utilizado a los *GRFs* para aumentar el tamaño y rendimiento de la planta han presentado diversos resultados. Por un

lado, la utilización de un “mimic” *MIM396* ha permitido mejorar el crecimiento en tomate (Cao et al, 2016). También, se han obtenido alelos naturales de *Os-rGRF4*, un *GRF* de arroz regulado por miR396 que presenta homología a *AtGRF3*, que tienen mutaciones en el sitio de reconocimiento por miR396 y producen aumento del tamaño de hojas, peso del grano y rendimiento de las plantas de arroz (Che et al, 2015; Duan et al, 2015; Hu et al, 2015; Li et al, 2016). En contraposición, la sobreexpresión de *GRF1* en *Arabidopsis* (van der Knaap et al, 2000) o *Zm-GRF1* en maíz (Nelissen et al, 2015) producen defectos de desarrollo que afectan la fertilidad de la planta y la producción de semillas. Los resultados aquí obtenidos sugieren que es importante elegir la secuencia codificante de *GRF* adecuada para incrementar el crecimiento de los órganos de la planta y eventualmente el rendimiento de un cultivo. También, indican que la expresión controlada de genes del tipo *AtGRF3*, tienen mayores posibilidades de aumentar el tamaño de los órganos de la planta sin generar defectos asociados. El potencial biotecnológico de los *GRFs* dependería entonces de la correcta elección de la secuencia codificante entre los distintos miembros de la familia y el nivel de expresión.

En condiciones de campo, las plantas cultivables casi nunca crecen en condiciones óptimas. Generalmente, enfrentan una variedad de estreses ambientales, como la sequía, que reducen el crecimiento y rendimiento de las plantas. Una de las respuestas al estrés por sequía es la represión del crecimiento para limitar el tamaño del tallo, reducir la superficie de evaporación y adecuar la demanda de los tejidos frente a la escasez de recursos debida a la restricción de los estomas y el metabolismo (Claeys & Inze, 2013). Esto ocurre a través de una transición prematura de la proliferación celular a la expansión celular combinado con una reducción de la magnitud de expansión celular (Aguirrezabal et al, 2006; Clauw et al, 2015).

En las hojas de especies monocotiledóneas y dicotiledóneas, el miARN miR396 se expresa en bajos niveles en el meristema y se induce en estadios tardíos para promover la transición de proliferación celular a expansión y maduración (Bertolini et al, 2013; Candaele et al, 2014; Debernardi et al, 2012; Rodriguez et al, 2010). Encontramos que en condiciones de estrés por sequía moderada miR396 se induce prematuramente y *AtGRF3* es reprimido. En conjunto estos resultados indican que miR396 podría formar parte de los mecanismos genéticos que limitan el tamaño de la hoja en condiciones de escasez de agua.

Varios estudios de RNA-seq y microarrays han permitido observar que *MIR396* puede responder a otros tipos de estrés abiótico, como aluminio (Chen et al, 2012), cadmio (Ding et al, 2011), sal (Ding et al, 2011) y estrés alcalino (Gao et al, 2010). Recientemente, también se ha demostrado que, tanto en *Arabidopsis* como en maíz, *MIR396* es inducido prematuramente por UV-B en las hojas en desarrollo. Esta inducción reprime la expresión de los *GRFs* y

disminuye la proliferación celular, conduciendo a la generación de hojas más pequeñas con menos células (Casadevall et al, 2013; Fina et al, 2017).

Las plantas que expresan *GRF3* insensible a miR396 presentan reducción del tamaño en condiciones de estrés por sequía moderada. Sin embargo, las hojas de las plantas *rGRF3* son significativamente más grandes que las de las plantas control crecidas en las mismas condiciones. De acuerdo con esto, *At-rGRF3* es capaz de incrementar el tamaño de órganos de la planta en condiciones óptimas y adversas de crecimiento.

Se ha estudiado que *AtGRF7* en *Arabidopsis* funciona como represor de los genes de respuesta a estrés, incluyendo *DEHYDRATATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN2A (DREB2A)*. Este gen es un regulador master de la respuesta a condiciones de agua limitada. Por lo tanto, *GRF7* evita los efectos perjudiciales de la respuesta a estrés durante el crecimiento del órgano y la proliferación celular. La inactivación de *GRF7* por miR396 en respuesta al estrés por sequía podría permitir un aumento de *DREB2A* y entonces activar la respuesta a sequía.

El resultado que muestra que las plantas *rGRF3* son más grandes sin ser más sensibles a la sequía es de alguna manera sorprendente. Sin embargo, también concuerdan con resultados que muestran que plantas *MIM396* son más grandes que las silvestres luego del tratamiento con UV (Casadevall et al, 2013). Es posible entonces que *GRF3* cumpla funciones adicionales además de la estimulación de la proliferación. También es necesario destacar que las plantas analizadas presentan un incremento moderado en los niveles del factor de transcripción. No podemos descartar que un incremento mayor conduzca a una sensibilidad al estrés.

En resumen, los resultados presentados en este capítulo indican que a través de la manipulación de factores de transcripción del tipo *AtGRF3*, podría ser posible aumentar el tamaño de la planta incluso en condiciones de estrés. Es importante mencionar, que los cambios a nivel genético requeridos se limita a unos pocos pares de bases en el gen del *GRF* apropiado seleccionado. Por lo tanto, es posible utilizar tecnologías de edición genética para introducir estos cambios en la especie de cultivo de interés.

RESULTADOS II

7. Resultados Capitulo 2.

ARF2 ACTÚA SOBRE EL SISTEMA *MIR396/GRFs* EN EL CONTROL DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL DESARROLLO DE LAS HOJAS DE *ARABIDOPSIS*.

7.1. Introducción

El desarrollo de las hojas comienza en los márgenes del meristema apical del tallo donde se genera un primordio que presenta alta proliferación celular. Posteriormente, la hoja adquiere su forma aplanada característica y se produce un frente de arresto mitótico que avanza desde la punta de la hoja hacia la base. La proliferación celular cesa y las células continúan creciendo solo por expansión, hasta que la hoja alcanza su tamaño final (Beemster et al, 2005; Donnelly et al, 1999). En la última etapa de vida de la hoja, se produce el proceso de senescencia, que consiste en la muerte programada y organizada del órgano, permitiendo la redistribución en la planta de los recursos almacenados. Estos procesos se encuentran regulados por vías de señalización hormonal y múltiples factores de transcripción, incluyendo los *GRFs*.

Siete de los *GRFs* de *Arabidopsis* son regulados a nivel post transcripcional por el miARN *miR396* y esta interacción se encuentra conservada tanto en Angiospermas como Gimnospermas. *miR396* se acumula a medida que avanza el desarrollo de la hoja y restringe la expresión de los *GRFs* a la zona de proliferación celular.

GRF5, junto con *GRF6*, no se encuentra regulado por el miARN *miR396*. Sin embargo, ambos genes presentan un patrón de expresión similar al de los demás *GRFs* durante el crecimiento del órgano (Horiguchi et al, 2005; Rodriguez et al, 2010). Plantas mutantes en *grf5* presentan hojas más pequeñas y con menor número de células. Por el contrario, la sobreexpresión de *GRF5* genera hojas más grandes con mayor número de células (Gonzalez et al, 2010; Horiguchi et al, 2005).

La regulación a nivel post transcripcional de los *GRFs* por *miR396* se encuentra bien descrita pero no hay demasiado conocimiento sobre la regulación a nivel transcripcional. Se ha observado, que *TCP4* regula positivamente a *miR396* en forma directa (Schommer et al, 2014) y negativamente a *GRF5*, *GRF6* y *GIF1* (Rodriguez et al, 2010), sin embargo el mecanismo de regulación de estos últimos genes no se conoce aún. Recientemente se ha identificado el factor de transcripción *ORE15* como un activador transcripcional de los *GRFs*. *ORE15* regula positivamente la proliferación celular y suprime la senescencia de las hojas (Kim et al, 2018).

Por otro lado, mediante técnicas de inmunoprecitación de la cromatina seguida de secuenciación (Chip-seq), se ha identificado la unión de varios factores de transcripción a las

secuencias cercanas de los *GRFs*. Los promotores de *GRF1* y *GRF8* de *Arabidopsis* fueron identificados por experimentos de CHIP-chip en inflorescencia como loci genómicos que contienen regiones de unión para *APETALA2* (*AP2*) y *SCLAMUTZE* (*SMZ*), estos factores de transcripción están involucrados en la transición a floración y en la especificación de la identidad del órgano floral (Yant et al, 2010). *GRF5* ha sido identificado como un gen blanco del factor de transcripción *LEAFY* (*LFY*), que es un regulador master de la floración y dirige modelado del órgano floral (Winter et al, 2011). También se han identificado sitios de unión de *JAGGED*, que estimula el crecimiento de los órganos vegetativos y reproductivos, en los genes *GRF4*, *5*, *6*, *8* y *9*, pero solo *GRF8* parece estar regulado directamente por este factor de transcripción de acuerdo a estudios de transcriptoma (Schiessl et al, 2012). Por último *APETALA1* (*AP1*) y *SEPALLATA3* (*SEP3*), involucrados en la identidad del meristema floral y reguladores homeóticos de la identidad de sépalos y pétalos, presentan unión a secuencias regulatorias de varios *GRFs* en diferentes estadios del desarrollo de la flor (Pajoro et al, 2014). Es importante remarcar que estos experimentos identifican blancos transcripcionales candidatos para los factores de transcripción analizados, pero la relevancia biológica de estas relaciones necesita ser estudiadas mediante ensayos bioquímicos y genéticos.

En este capítulo, desarrollamos un estudio evolutivo de la regulación del miR396 sobre los *GRFs*. Luego nos focalizamos en el análisis del promotor de *GRF5* orientado a la identificación de reguladores transcripcionales de dicho gen. En *Arabidopsis* esta regulación cobra importancia al no ser *GRF5* un blanco del miR396.

7.2. Resultados.

7.2.1. Análisis de la regulación de los *GRFs* por el miR396 en diferentes especies.

Los *GRFs* pueden ser identificados en las especies primitivas briofitas *Marchantia polymorpha* y *Physcomitrella Patens* (Omidbakhshfard et al, 2015), plantas en las que no está presente el miARN miR396. En la licofita *Selaginella moellendorffii*, se encuentran cuatro genes que pertenecen a la familia de los *GRFs* y también uno para miR396, sin embargo el análisis de estos genes permite ver que no existe un vínculo regulatorio ya que dichos *GRFs* no presentan sitio blanco. Sin embargo, a partir de la aparición de las plantas vasculares, el nodo regulatorio *miR396/GRF* se encuentra conservado.

En *Arabidopsis thaliana* existen dos *GRFs* que no son regulados por miR396. Para indagar el vínculo entre la familia de factores de transcripción *GRFs* y el miARN miR396, decidimos estudiar la presencia del sitio blanco de miR396 en los *GRFs* de distintas especies. Nos focalizamos en el clado Rosidae y analizamos las secuencias codificantes de los *GRFs* de 27

especies. En total analizamos 301 *GRFs*, y el tamaño de la familia *GRF* en las distintas especies varió de 6 a 26 miembros. Utilizando el software RNAhybrid buscamos los sitios blanco del miR396 para cada gen. La mayoría de los *GRFs* tienen un sitio blanco localizado en la última parte de la región que codifica para el dominio WRC, y tiene una secuencia característica que aparea con la del miARN en todas sus bases excepto la de la posición 13, donde se genera un desapareamiento (Figura R1.1.A y B). Dentro de los subclados *Malpighiales* y *Brassicales-Malvales* encontramos las especies *Manihot esculenta* y *Gossypium raimondii* en las cuales existen dos y un *GRFs*, respectivamente, con cambios en la secuencia blanco que generan uno o tres sitios de desapareamiento extras (Figura R2.1.A y C). El grupo *Brassicaceae* resulta particular, ya que en este clado todas las especies tienen al menos dos *GRFs* que no tienen sitio blanco para miR396. Es posible identificar en estos genes un sitio que habría sido originalmente el de reconocimiento del miARN, de acuerdo su ubicación respecto del dominio WRC y el alineamiento de las secuencias aminoacídicas y nucleotídicas. Sin embargo, todos ellos aparean de manera imperfecta con miR396 generando múltiples sitios de desapareamiento y gaps (Figura R2.1.D).

Los genes no regulados por miR396, fueron organizados filogenéticamente de acuerdo a su secuencia aminoacídica, y se separan en dos grupos (Figura R2.1.C). Por un lado encontramos los que agrupan con *GRF5* y por el otro los que agrupan con *GRF6*, de *Arabidopsis*. Dentro de cada conjunto los miembros presentan mutaciones semejantes en la región que debiera ser reconocida por miR396. Además, es posible identificar tres mutaciones comunes en todos estos genes, en las posiciones 15, 17 y 20. Sería factible pensar, que en un gen ancestro a *GRF5* y *GRF6* se produjeron estas primeras mutaciones, conduciendo a la pérdida de regulación por el micro ARN y posteriormente se produjo la duplicación de dicho gen.

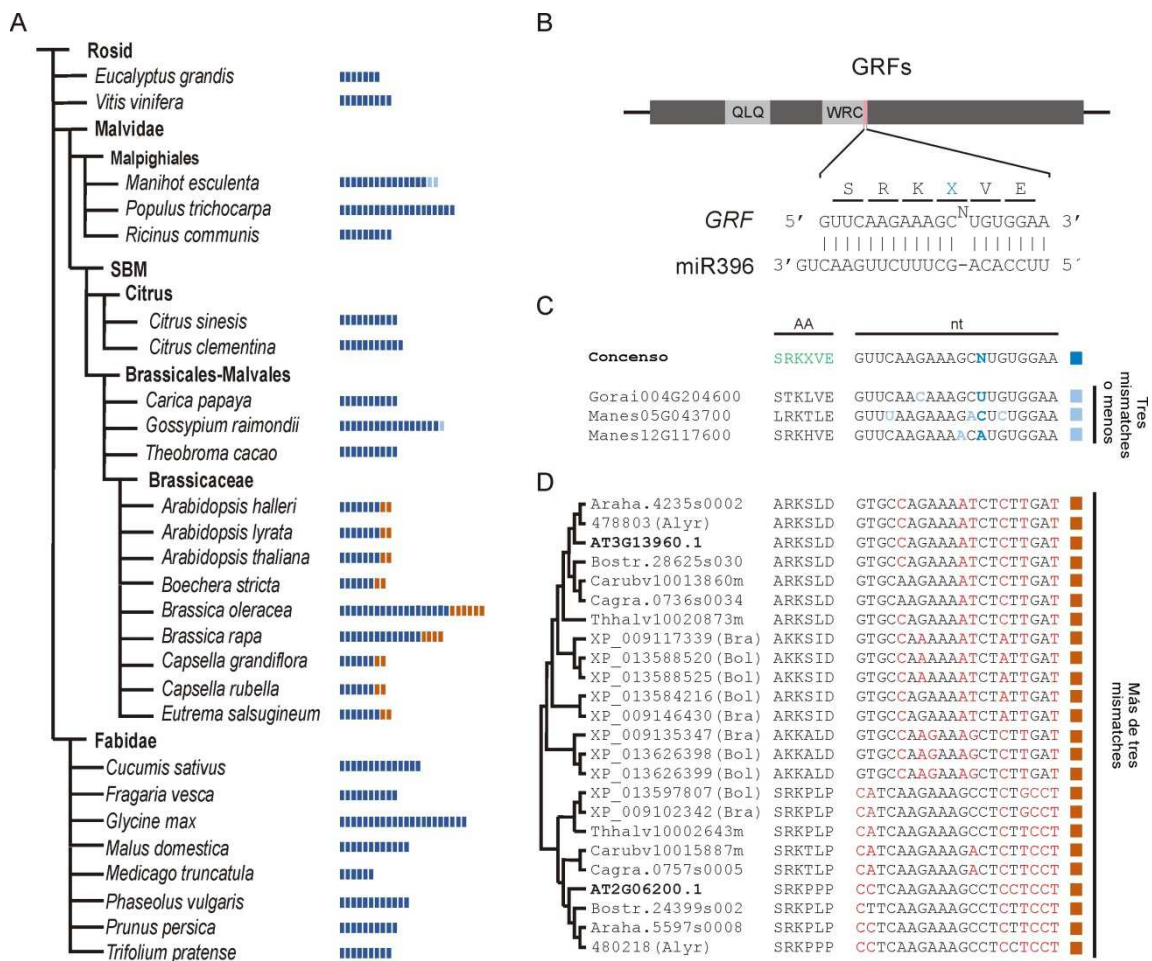


Figura R2.1. Análisis del sitio blanco de miR396 en GRFs de distintas especies. A) Representación en forma de árbol de 25 especies correspondientes al taxón *Rosidae*. A la derecha se indica el número de genes *GRFs* presentes en cada especie con cuadrados. Según el color del mismo se indica si el gen presenta un sitio blanco idéntico al consenso (Azul oscuro), con tres errores o menos con respecto al consenso (celeste), y más de tres sitios de desapareamiento (naranja). B) Esquema de la estructura de los *GRFs*, señalando la ubicación del sitio de reconocimiento consenso del miR396, su secuencia nucleotídica y los aminoácidos codificados en ella. C) Alineamiento de las secuencias de los sitios que tiene tres errores o menos. D) Alineamiento de las secuencias de los sitios que tienen más de 5 cambios con respecto al consenso. Se encuentran organizados de acuerdo al árbol filogenético construido con las secuencias aminoacídicas completas de los genes utilizando el método Maximum-Likelihood.

7.2.2. El promotor de *GRF5* cumple un rol primordial en la determinación del patrón de expresión del gen en hoja.

En *Arabidopsis*, *GRF5* no se encuentra regulado por miR396, pero a lo largo del desarrollo de la hoja presenta una patrón de expresión semejante al de los demás *GRFs* (Horiguchi et al, 2005; Rodriguez et al, 2010). Junto a los demás genes de su familia, se caracterizan por presentar una expresión máxima en los estadios más tempranos del desarrollo de la hoja, que decrece de manera complementaria al incremento del miARN a media que el proceso avanza (Rodriguez et al, 2010).

Utilizando un reportero transcripcional de *GRF5*, por fusión de su promotor a *GUS*, analizamos su expresión en plántulas de 11 y 14 días. Lo comparamos con los reporteros traduccionales de *GRF2* y *rGRF2* (versión insensible al miARN). Se observa, que el promotor de *GRF5* presenta un área de expresión que se corresponde con tejido joven conteniendo células en proliferación. Esta expresión es similar a la de *GRF2* silvestre, regulado por miR396. En las hojas más jóvenes ambos reporteros se visualizan cubriendo casi toda la superficie, y en las más adultas la expresión queda restringida a la base del órgano. En las plantas en las que el reportero esta fusionado a *rGRF2*, las hojas se tiñen completamente de azul confirmando que el patrón de expresión de *GRF2* en hojas jóvenes se debe a la represión post-transcripcional por miR396. Sin embargo, a diferencia de *GRF2*, la regulación transcripcional del promotor de *GRF5* sería suficiente para dirigir la expresión de este gen en tejido en proliferación.

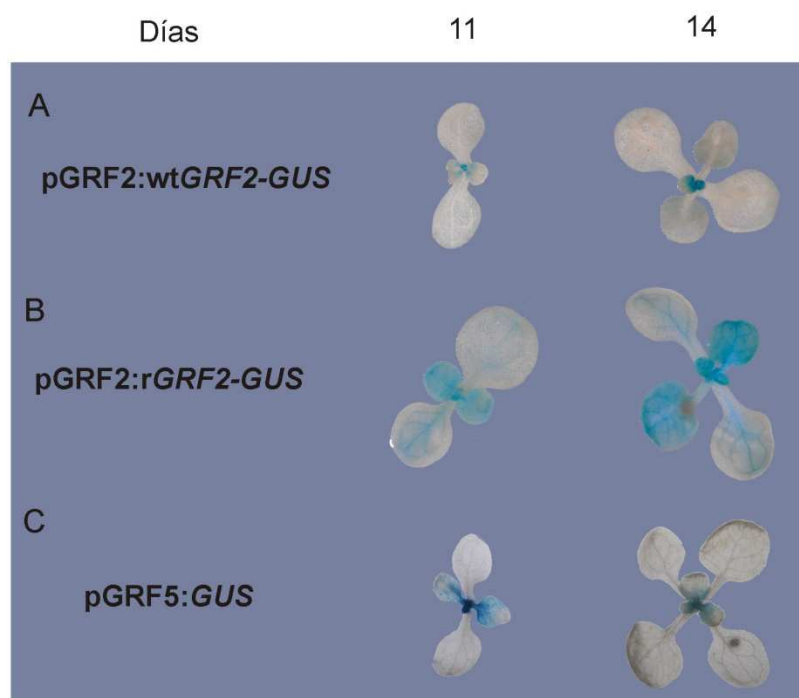


Figura R2.2. Regulación de *GRF5* en relación con *GRF2* salvaje o insensible a miR396. A) Expresión de *pGRF2:wtGRF2-GUS* en plántulas de 11 y 14 días. B) Expresión de *pGRF2:rGRF2-GUS* en plantas de la mismo tiempo que en A. C) Expresión del reportero *pGRF5:GUS*.

Considerando estas observaciones, decidimos estudiar el promotor *GRF5* y buscar elementos importantes para la regulación transcripcional del mismo. Para esto, utilizando la base de datos de Phytozome seleccionamos todos sus genes ortólogos dentro del grupo *Brassicaceae*. Incluimos también promotores de las especies *Theobroma cacao* y *Gossypium raimondii*, que pertenecen al grupo *Brassicales-Malvales* pero en las cuales todos los *GRFs* son regulados por miR396 (Figura R2.1.A). A su vez identificamos los ortólogos de *GRF2*, para analizar de manera comparativa. Mediante un análisis filogenético empleando las secuencias

aminoacídicas, verificamos que los genes seleccionados se agrupaban con el gen correspondiente de Arabidopsis (Figura R2.3.A).

Para analizar los promotores consideramos 2000 pb corriente arriba, además incorporamos a estas secuencias el primer exón. Todas las secuencias fueron comparadas a la de su gen ortólogo en Arabidopsis, *AtGRF5* o *AtGRF2*, con la herramienta mVISTA. Los gráficos VISTA generados, usando una ventana de análisis de 100pb con un ancho mínimo de conservación de 100pb, permiten ver varias secuencias con homología superior al 70% (Figura R2.3.B). Para ambos genes se ve un buen alineamiento del primer exón, y en la mayoría también de la región 5'UTR. Focalizándonos en el promotor, pudimos reconocer al menos 5 sectores de alta homología que se repiten en todos los ortólogos de *GRF5* no regulados por el miARN. Sin embargo, los *GRF5* de *Theobroma cacao* y *Gossypium raimondii* en los cuales la regulación por miR396 es activa, no tienen regiones de alta homología con su par de Arabidopsis. Para el caso de *GRF2* pudimos identificar dos sectores que mantienen conservación en casi todos los miembros del grupo.

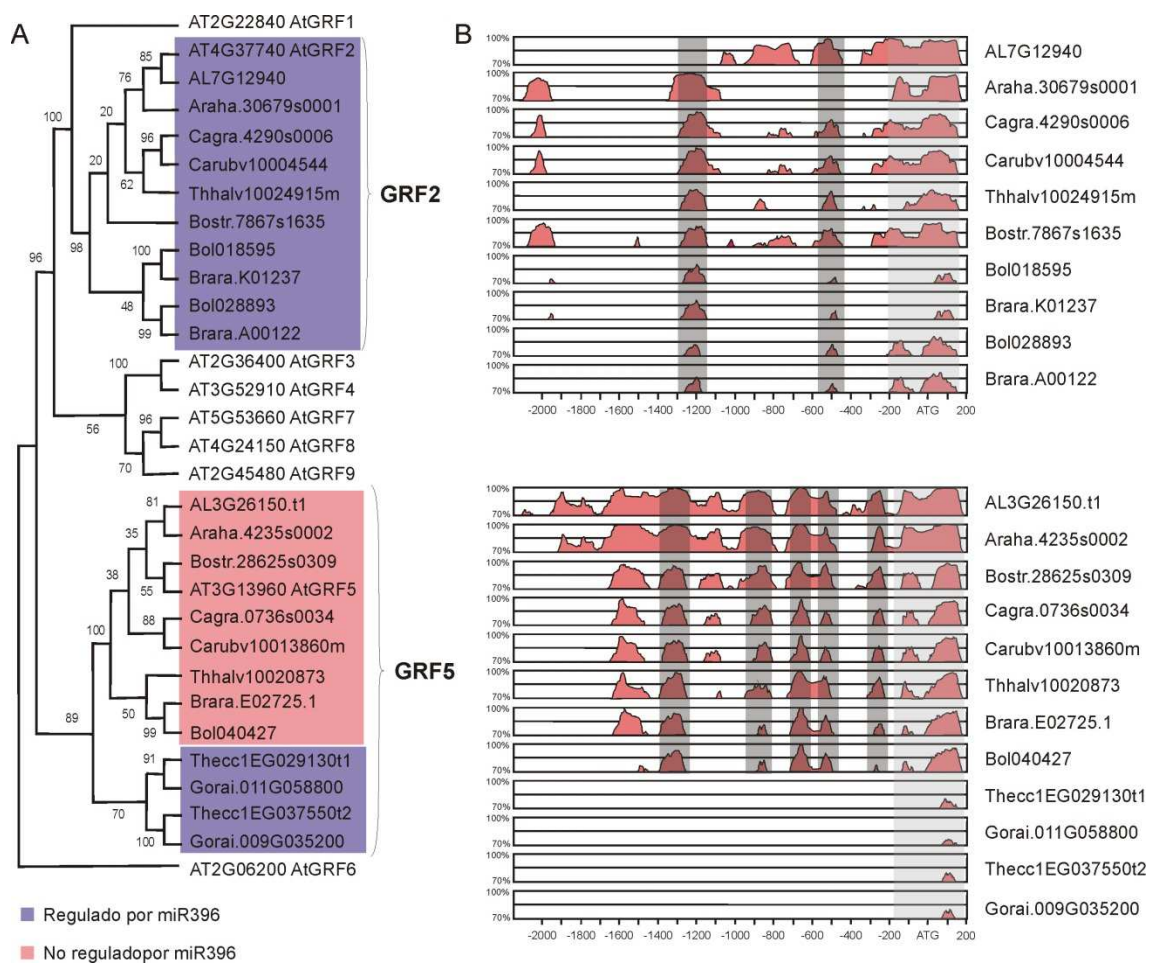


Figura R2.3. Conservación del promotor de *GRF5* y *GRF2* en distintas especies. A) Árbol filogenético de los *GRFs* de *Arabidopsis* y los ortólogos de *GRF2* y *GRF5*. Construido a partir de las secuencias aminoacídicas completas de los genes utilizando el método Maximum-Likelihood. El recuadro violeta indica los ortólogos regulados por miR396, el recuadro rosa los no regulados por el miARN. Notar que *GRF2* está regulado por miR396 en todas las especies analizadas, mientras que el control de *GRF5* por miR396 se pierde en *Brassicaceae*. B) Gráfico vista de comparaciones de a pares, de 2kpb corriente arriba del sitio ATG de los ortólogos de *GRF2* (superior) y *GRF5* (inferior), respecto del correspondiente gen de *Arabidopsis*. En gris claro se señala el primer exón. En gris oscuro indica las regiones conservadas en los promotores de cada gen.

7.2.3. Búsqueda de factores de transcripción reguladores de *GRF5*.

De acuerdo al análisis de la secuencia promotora de *GRF5* existen múltiples regiones conservadas en las *Brassicaceas*, que podrían contener elementos reguladores en cis. Entonces realizamos una búsqueda de factores de transcripción que puedan estar uniéndose al promotor. Analizamos los datos de DAP-seq públicos (O'Malley et al, 2016) e identificamos 14 factores que presentan sitios de unión en un rango de 4000 pb corriente arriba del sitio ATG de *GRF5*. Luego para cada uno de ellos evaluamos su perfil de unión en dicha región para conocer la intensidad de los picos (Tabla R2.1). A su vez recolectamos los datos biológicos de cada factor de transcripción presentes en la base de datos NCBI (Tabla R2.2).

Factor de Transcripción	Cromosoma	Sitio de inicio	Sitio de finalización	Score	Intensidad de la señal
FRS9	chr3	4608243	4608444	233	143.5
LHY1	chr3	4607972	4608173	153	76.9
LHY1	chr3	4607878	4608079	140	58.1
ARF2	chr3	4607748	4607949	119	148.0
REM19	chr3	4607643	4607844	137	55.3
BBX31	chr3	4607608	4607809	117	24.0
dof42	chr3	4607574	4607775	141	13.0
GRF6	chr3	4607323	4607524	113	11.0
SGR5	chr3	4607064	4607265	113	13.0
ABI3VP1	chr3	4607051	4607252	143	62.6
MP	chr3	4607032	4607233	150	942.0
REM19	chr3	4607010	4607211	124	36.9
REM19	chr3	4605661	4605862	147	69.8
LHY1	chr3	4605656	4605857	129	42.0
ANL2	chr3	4605309	4605510	181	57.0
ARF2	chr3	4604619	4604820	105	40.0
MP	chr3	4604615	4604816	128	536.0
WRKY40	chr3	4604584	4604785	106	49.0
LBD19	chr3	4604262	4604463	104	27.0
LBD2	chr3	4604248	4604449	133	35.0

Tabla R2.1. Localización e intensidad de señal de los picos de unión de factores de transcripción en la región correspondiente a 4000pb corriente arriba de *GRF5*.

Entre los genes identificados, encontramos a *GRF6*. En el laboratorio, contamos con datos de RNA-seq de ápices de plantas de 11 días, sobreexpresantes de *miR396*, que expresan *rGRF3*, bajo su propio promotor, fusionado al receptor del glucocorticoide (GR). Este sistema permite controlar la actividad de proteínas nucleares mediante la adición a las plantas del glucocorticoide sintético dexametasona (dex) (Lloyd et al, 1994). En ausencia de dex el

dominio GR es retenido en el citoplasma por unión a chaperonas endógenas. La adición de dex libera las proteínas de esta retención de manera que pueden ser traslocadas al núcleo y activar las respuestas transcripcionales corriente abajo. Consultamos los resultados de este experimento y analizamos el cambio en los niveles de los *GRFs* tras el tratamiento con dex (Tabla R2.2). En estos experimentos es posible ver un aumento significativo de los niveles de *GRF5* y *6*, por encima de otros *GRFs* (Figura R2.4). Entonces, es factible que el putativo sitio de unión de *GRF6*, sea un sitio de sensado de los factores de transcripción *GRFs*, en un mecanismo de feedback regulatorio positivo.

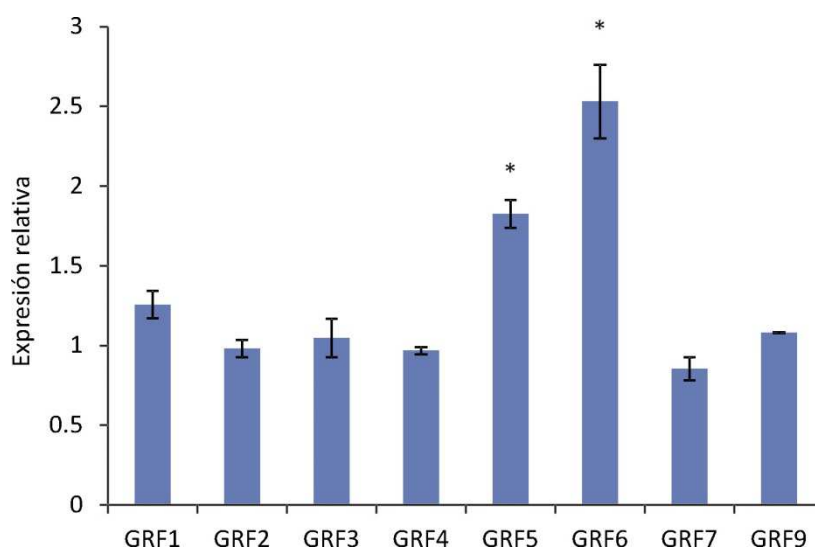


Figura R2.4. Expresión de *GRFs* en ápices de plantas 35S:*miR396*xpGRF3:rGRF3-GFP-GR de 11 días, tras el tratamiento con dexametasona 25µM durante 4 hs. Estos datos provienen de un RNA-seq que es parte del trabajo de Tesis de Antonella Ferela, resultados aún no publicados. Los datos mostrados corresponden al promedio ± E.E. de 2 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a Col-0 determinado a través de la prueba T-student ($p < 0.05$).

El siguiente gen de interés que encontramos, de acuerdo a su descripción y sus picos de unión al promotor de *GRF5*, fue *ARF2*. Este gen codifica un represor transcripcional y destacan las características de las mutantes *arf2*, que muestran incremento del tamaño de hojas y semillas, y retardo en la senescencia (Tabla R2.2). Estos efectos son comunes con los de plantas sobreexpresantes de los *GRFs*. *ARF2* presenta dos picos en el rango del genoma evaluado corriente arriba de *GRF5* y el más cercano al gen tiene un elevado valor de intensidad (Tabla R2.1).

Gen	Descripción
<i>REM19</i> AT1G49480	Encodes a nuclear-localized DNA-binding protein that interacts with ITN1 at the PM and nuclei in vivo and may regulate ITN's subcellular localization.
<i>VRN1</i> At3g18990	AP2/B3-like transcriptional factor family protein. Required for vernalization. Essential for the complete repression of FLC in vernalized plants. Required for the methylation of histone H3
<i>ANL2</i> AT4G00730	Homeobox-leucine zipper family protein / lipid-binding START domain-containing protein. Encodes a homeodomain protein of the HD-GLABRA2 group. Involved in the accumulation of anthocyanin and in root development.

ARF2 AT5G62000	Encodes an auxin response factor. Mutants have many defects including enlarged rosette leaves, reduced fertility, later senescence, hypocotyl elongation defects, enlarged seeds and enlarged cotyledons. May not mediate auxin effects. Increase in seed size due to increased cell proliferation.
<i>MP</i> AT1G19850	Encodes a transcription factor (IAA24) mediating embryo axis formation and vascular development. Similar to AUXIN RESPONSIVE FACTOR 1 (ARF1) shown to bind to auxin responsive elements (AREs), and to the maize transcriptional activator VIVIPAROUS 1 (VP1). In situ hybridization shows expression in provascular tissue of embryos, the emerging shoot primordia, then is restricted to provascular tissue, and in the root central vascular cylinder.
<i>WRKY40</i> AT1G80840	Pathogen-induced transcription factor. Binds W-box sequences in vitro. Forms protein complexes with itself and with WRKY60. Coexpression with <i>WRKY18</i> or <i>WRKY60</i> made plants more susceptible to both <i>P. syringae</i> and <i>B. cinerea</i> . <i>WRKY18</i> , <i>WRKY40</i> , and <i>WRKY60</i> have partially redundant roles in response to the hemibiotrophic bacterial pathogen <i>Pseudomonas syringae</i> and the necrotrophic fungal pathogen <i>Botrytis cinerea</i> , with <i>WRKY18</i> playing a more important role than the other two.
<i>LBD19</i> AT2G45410	LOB domain containing protein 19
<i>LBD2</i> AT1G06280	LOB domain containing protein 2
<i>FRS9</i> AT4G38170	FAR1-related sequence 9
<i>.LHY1</i> AT1G01060	Homeodomain-like superfamily protein. <i>LHY</i> encodes a myb-related putative transcription factor involved in circadian rhythm along with another myb transcription factor <i>CCA1</i>
<i>BBX31</i> AT3G21890	B-box type zinc finger family protein
<i>DOF4.2</i> AT4G21030	Dof-type zinc finger domain-containing protein. Encodes a nuclear protein that can bind DNA in a sequence specific manner and is involved in seed coat development and shoot branching. It has been shown to activate transcription of a target gene, <i>AtEXPA9</i>
GRF6 AT2G06200	Growth regulating factor encoding transcription activator. One of the nine members of a GRF gene family, containing nuclear targeting domain. Involved in leaf development and expressed in root, shoot and flower
<i>SGR5</i> AT2G01940	C2H2-like zinc finger protein. May be involved in an early event in shoot gravitropism such as gravity perception and/or a signaling process subsequent to amyloplast sedimentation as a putative transcription factor in gravity-perceptive cells.

Tabla R2.2. Descripción de los genes identificados por DAP-seq, que se unen a la región corriente arriba de *GRF5*. Datos extraídos de la base de datos de NCBI.

Anteriormente se mencionó que había cinco regiones conservadas en el promotor de *GRF* (Figura R2.3.B). A su vez el motivo de unión al ADN de *ARF2* fue determinado por análisis de DAP-seq (Figura R2.5.B). A continuación, realizamos un alineamiento por T-coffee de los promotores (Anexo R2) y usamos la herramienta FIMO (Grant et al, 2011) para localizar los motivos putativos de unión de *ARF2*. Seleccionamos sitios que tuvieran un p-value menor a 0.01, y que estuvieran en las regiones conservadas. Los sitios identificados caen en las regiones III y V (Figura R2.5.A). En particular, en la región III hay una mayor densidad de motivos, que a su vez coinciden con el pico de unión de *ARF2* por DAP-seq (Figura R2.5.C). Para verificar la actividad de esta zona como elemento regulatorio generamos una versión mutante del promotor de *GRF5* fusionado a *GUS*. En este promotor se delecionaron 71 pb, removiendo completamente los motivos localizados en la zona III. Observamos, que en las plantas en las que el reportero se encuentra bajo la actividad del promotor mutante, la expresión se expande a toda la superficie de la hoja (Figura R2.5.D). De esta manera, confirmamos que en la zona identificada se encuentra un elemento de regulación negativa en cis y que *ARF2* es el factor de transcripción candidato que estaría uniéndose a dicho sitio.

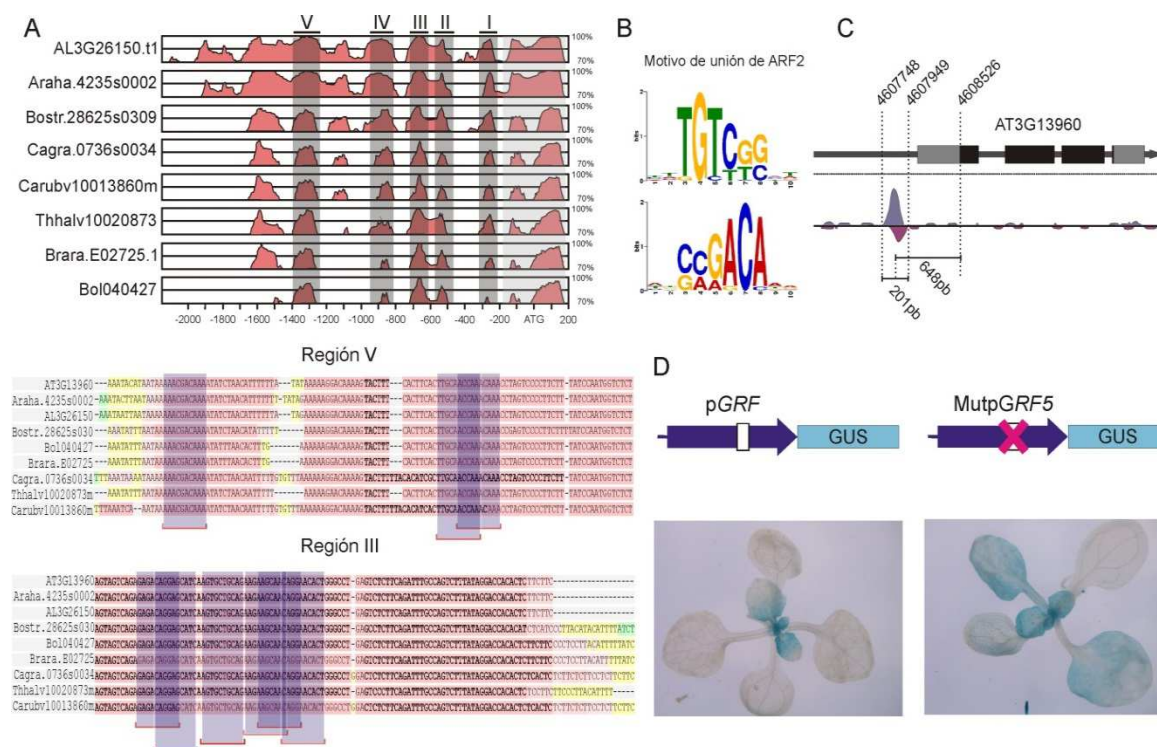


Figura R2.5. El promotor de GRF5 presenta sitios de unión de ARF2. A) En la parte superior, gráfico mVISTA en el cual se identifican las 5 regiones presentes en los alineamientos de pares de la región promotora de GRF5 de Arabidopsis con la de sus ortólogos (Adaptación de la figura R2.3). En la parte inferior, alineamiento por T-coffee de una parte de las regiones V y III, en las cuales se encuentran los motivos de unión de ARF2, sombreados en azul. B) Motivo de unión de ARF2 determinado por DAP-seq. C) Diagrama de la localización del pico de unión de ARF2 determinado por DAP-seq, respecto del sitio de inicio de transcripción de *GRF5* (AT3G13960). D) Esquema del promotor de *GRF5* silvestre y mutante en el sitio de alta afinidad por ARF2, fusionados a GUS. Debajo, patrón de expresión de los promotores en plántulas de 14 días.

7.2.4. ARF2 regula negativamente la expresión de *GRF5*.

Las mutantes *arf2* se caracterizan por presentar múltiples fenotipos entre los cuales se puede mencionar aumento del tamaño de las hojas de la roseta, tallos gruesos, defectos en la apertura de la flor. Estos efectos están asociados con un aumento de la división y expansión celular (Ellis et al, 2005; Okushima et al, 2005a; Schruff et al, 2006). Las plantas sobreexpresantes de *GRF5* también producen hojas de mayor tamaño, como resultado de un incremento en el número de células (Horiguchi et al, 2005), y retardo en la senescencia, vinculado a la promoción de la división de los cloroplastos y el incremento en el número (Figura R2.6.A y B) (Debernardi et al, 2014; Vercruyssen et al, 2015).

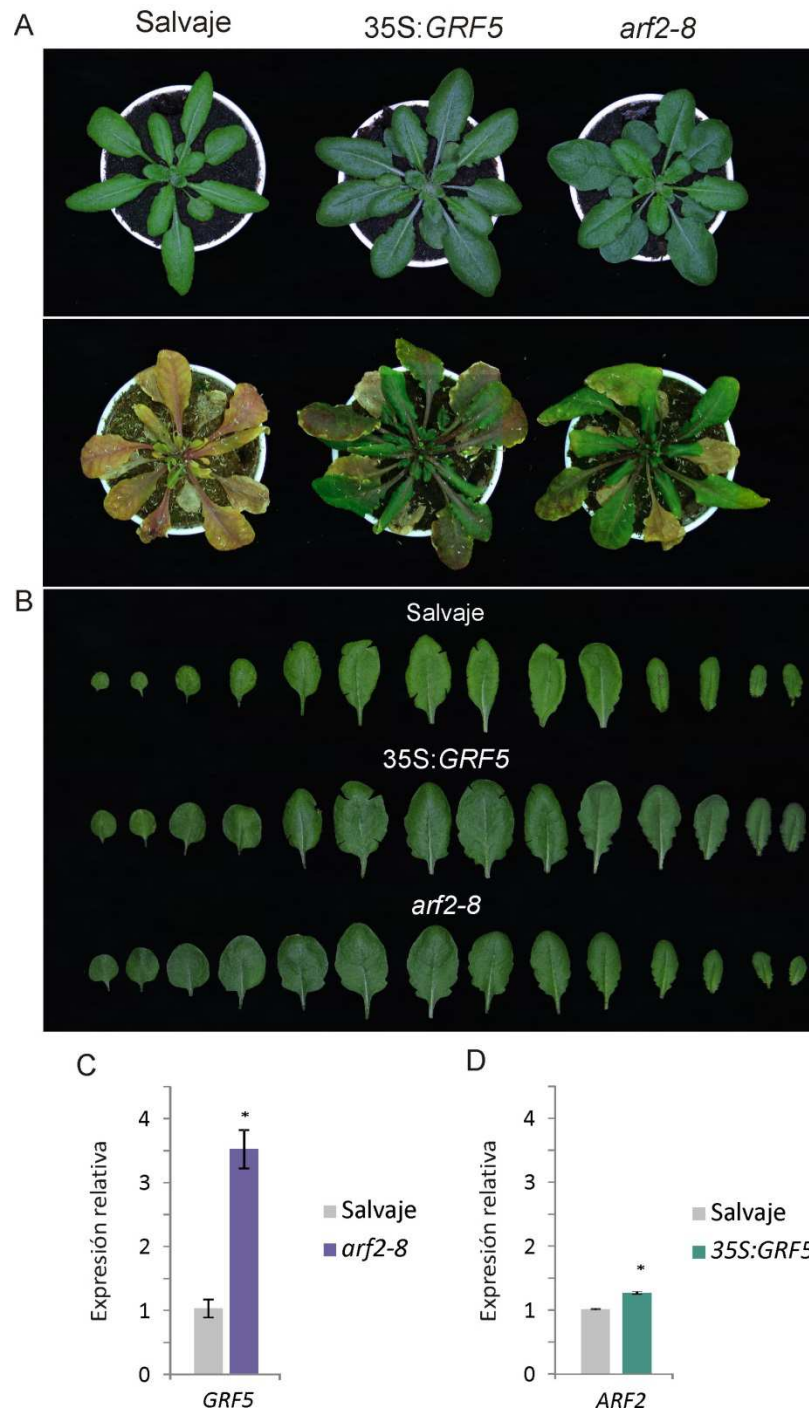


Figura R2.6. Regulación de *GRF5* por *ARF2*. A) Plantas de 25 días, primer panel, y 60 días, segundo panel, crecidas en día largo. B) Desglose de rosetas de plantas de 25 días. C) Niveles de expresión de *GRF5* en hoja 3 de plántulas de 12 días, salvaaje y mutante *arf2-8*. Los valores de expresión fueron determinados por RT-qPCR y normalizados a plantas salvaajes. D) Niveles de expresión de *ARF2* en hoja 3 de plántulas de 12, días salvaaje y sobreexpresante de *GRF5*. Los valores de expresión fueron determinados por RT-qPCR y normalizados a plantas salvaajes. Los datos mostrados corresponden al promedio \pm E.E. de 3 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a las plantas silvestres determinado a través de la prueba T-student ($p < 0.05$).

Para estudiar el potencial vínculo existente entre las dos vías de control del desarrollo, realizamos un análisis comparativo a nivel fenotípico y molecular de las dos líneas. En ambos

casos pudimos ver, de manera consistente con los resultados previamente publicados, el incremento de tamaño de las hojas en mutantes de *arf2* y sobreexpresantes de *GRF5* (Figura R2.6.A y B). También pudimos ver que las hojas de las dos plantas en estudio presentan un color verde más oscuro. Posteriormente, observamos que a los 60 días cuando las plantas salvajes ya senescieron, las plantas mutantes *arf2-8* y las sobreexpresantes de *GRF5* aún permanecen verdes, denotando el retardo en la senescencia (Figura R2.6.A).

Evaluamos luego, que ocurre a nivel molecular en estas líneas. Encontramos que en las plantas *arf2-8*, el nivel de expresión de *GRF5* se encuentra aumentado más de tres veces (Figura R2.6.C). Por el contrario, en las plantas sobreexpresantes de *GRF5* no se observa disminución de los niveles de *ARF2*, sino que se produce un leve aumento (Figura R2.6.D).

A continuación, evaluamos la asociación directa de *ARF2* al promotor de *GRF5*. En la sección anterior identificamos el potencial sitio de unión de *ARF2* y verificamos que actuaba como un elemento regulador en cis. Entonces hicimos un ensayo de ChIP-qPCR utilizando plantas salvajes y plantas que expresaban *ARF2* fusionado a GFP. Analizamos el enriquecimiento del fragmento blanco en el promotor de *GRF5*. Como control negativo, se observó el enriquecimiento de una región diferente del gen y como control positivo, evaluamos el enriquecimiento del sitio de unión de *HB33* que es regulado negativamente por *ARF2* ((Wang et al, 2011b) (Figura R2.7.A). El fragmento del promotor de *GRF5* presentó un enriquecimiento de 4 veces en las plantas *ARF2-GFP*, respecto de las plantas salvajes. En contraste, no hubo diferencia significativa en el fragmento control negativo y el control positivo funcionó correctamente (Figura R2.7.B).

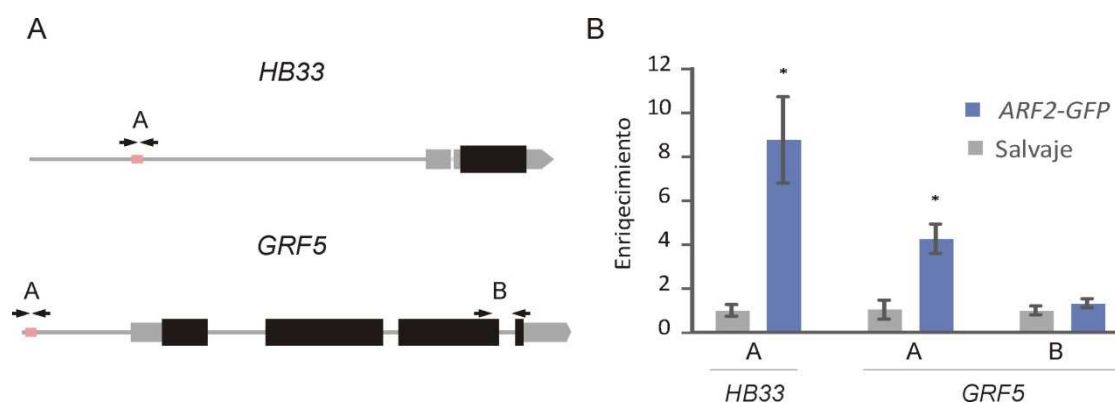


Figura R2.7. Unión de ARF2 al promotor de GRF5. A) Representación esquemática de los genes *HB33* y *GRF5*. A y B señalan la localización de los amplicones utilizados para el análisis de ChIP-qPCR. En rosa, se señala la ubicación de la zona de unión de *ARF2*, identificada por DAP-seq. B) Unión de *ARF2* a los promotores de *HB33* y *GRF5*. El enriquecimiento se determinó en base a la cantidad de amplicón en la muestra inmunoprecipitada en relación con la presente en el "ADN input". El enriquecimiento relativo, se normalizó de acuerdo al enriquecimiento del fragmento en la planta salvaje. Los datos mostrados corresponden al promedio \pm E.E. de 3 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a las plantas silvestres determinado a través de la prueba T-student ($p < 0.05$).

Se generaron también, cruza entre plantas mutantes *grf5* y *arf2-8*. Las plantas *grf5* presentan hojas más pequeñas que las silvestres (Figura R2.8.A). Esto fue cuantificado a través de la medida de área de hojas 1 y 2 (Figura R2.8.B). La reducción de tamaño observada, es resultado de un menor número de células ya que no se observa diferencia significativa en las dimensiones de las células (Figura R2.8.C y D). Además las hojas de estas plantas tienen forma lanceolada (Figura R2.8.A). De manera opuesta, en las mutantes *arf2-8* el área de las hojas es mayor que en las plantas salvajes (Figura R2.8.B). En este caso, se puede ver un aumento del número de células pero también muestran mayor expansión (Figura R2.8. C y D), en concordancia con resultados publicados previamente (Schruff et al, 2006).

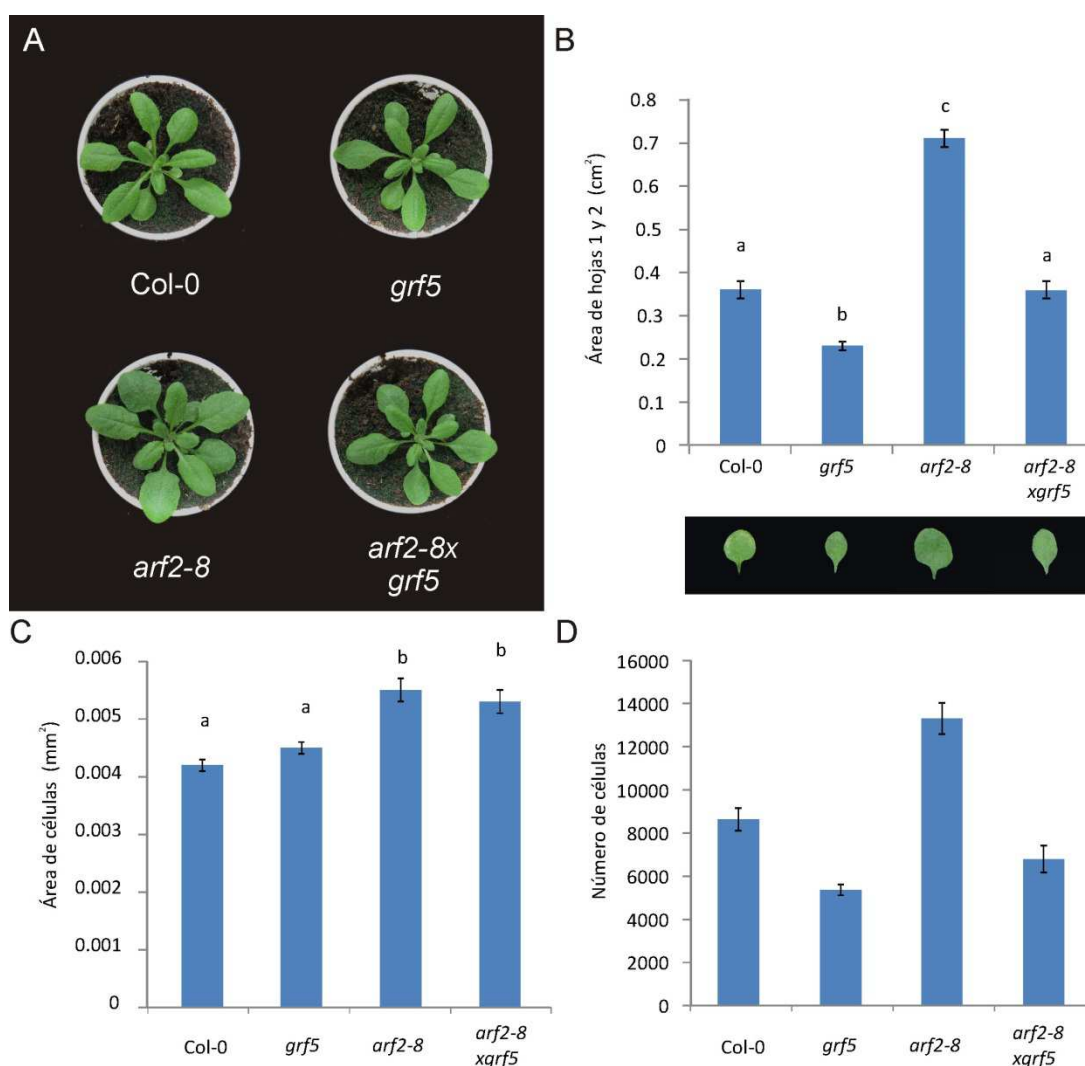


Figura R2.8. Análisis de plantas doble mutantes *arf2xgrf5* A) Rosetas de plantas: salvaje, *grf5*, *arf2-8*, *arf2-8xgrf5*. B) Área de hojas 1 y 2 de cada línea. C-D) Área y número de células en cada línea. Letras diferentes indican diferencias significativas determinado por ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$).

Las plantas doble mutantes obtenidas *arf2-8xgrf5*, se asemejan a las plantas *grf5* en cuanto a la morfología de las hojas (Figura R2.8.A). La doble mutante también presenta un menor número de células que las plantas silvestres, sugiriendo que parte de los efectos

observados en *arf2* se deben a la desregulación de *GRFs*. El tamaño de las células fue mayor en la doble mutante que en plantas silvestres, esto probablemente se debe al efecto que produce *arf2* sobre la expansión celular (Figura R2.7.B).

7.2.5. Mutaciones en *GIF1* suprimen el fenotipo de *arf2*.

GIF1 es un co-activador de los *GRFs* y se ha visto que presenta mayor afinidad por *GRF5* que por otros *GRFs* *in vivo* (Debernardi et al, 2014; Vercruyssen et al, 2014). La mutación de *GIF1* causa reducción del tamaño de la hoja por disminución de la proliferación celular (Horiguchi et al, 2005). Como estrategia complementaria a las cruces de *arf2-8* y *grf5*, generamos también por cruce, plantas dobles mutantes *arf2* y *gif1*. Estas plantas presentan el mismo fenotipo que las simples mutantes *gif1* (Figura R2.9.A) siendo las hojas de menor tamaño que las de plantas salvajes (Figura R2.9.B). El número de células de la doble mutante fue similar a *gif1* (Figura R2.9.D), indicando nuevamente que el mayor número de células observado en la mutante *arf2* requiere de la actividad del complejo *GRF-GIF*. Es interesante que el tamaño de las células resultado ser un efecto aditivo entre *arf2* y *gif1* (Figura R2.9.C), sugiriendo que este efecto en *arf2* es independiente de los *GRFs*.

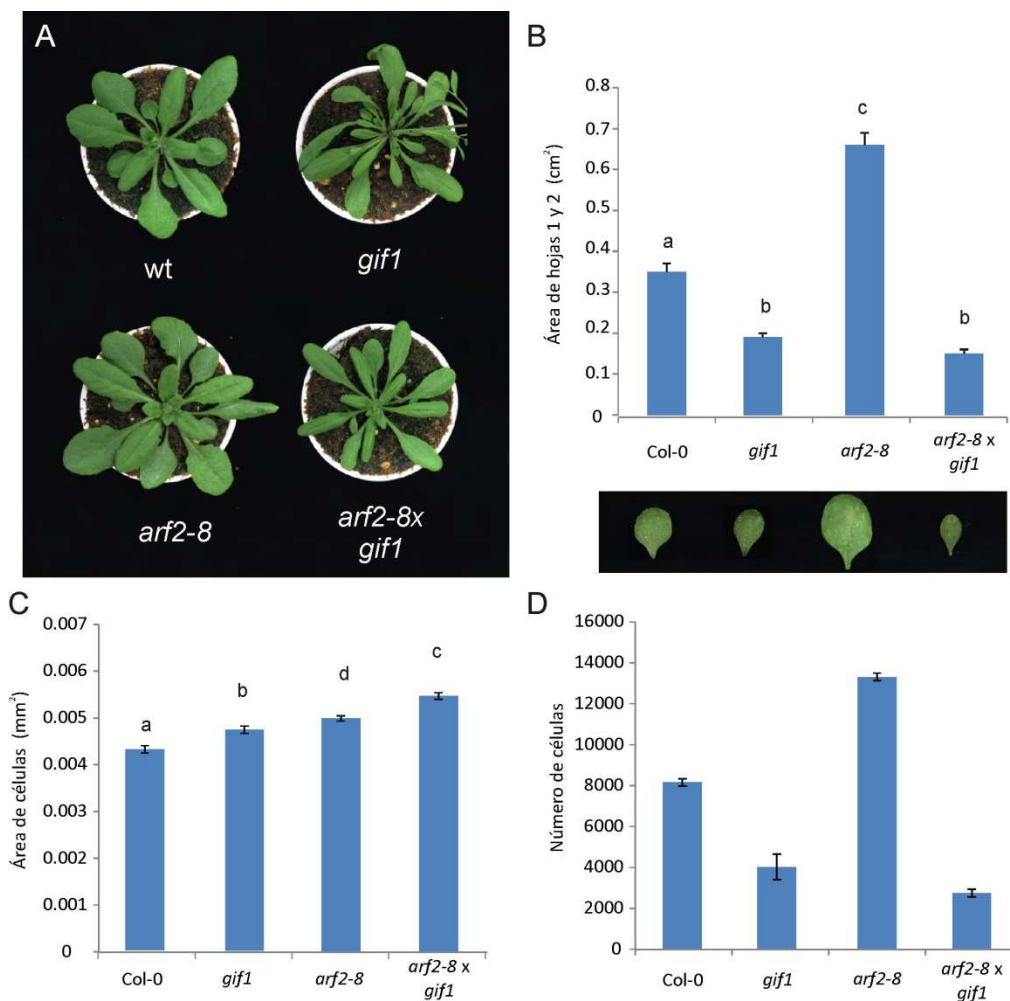


Figura R2.9. Análisis de plantas doble mutantes *arf2 gif1*. A) Rosetas de plantas: salvaje, *gif1*, *arf2-8* y *arf2-8 gif1*. B) Área de hojas 1 y 2 de cada línea. C-D) Área y número de células en cada línea. Letras diferentes indican diferencias significativas determinado por ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$).

De acuerdo a los resultados de las dos últimas secciones, *ARF2* se encuentra actuando en la misma vía que el sistema *GRF-GIF*, las mutaciones de *grf5* o de *gif1* son epistáticas sobre la mutación de *arf2*. Además, *ARF2* se une al promotor de *GRF5* y los niveles de expresión del gen bajan en el contexto de la mutante *arf2*. Esto indica, que *ARF2* regula negativamente y de forma directa la expresión de *GRF5*.

7.2.6. Relación entre *ARF2* y los *GRFs* regulados por miR396.

Decidimos estudiar, si existe también un vínculo entre *ARF2* y otros *GRFs* regulados por miR396. Primero, medimos los niveles de expresión de *GRF1*, 2, 3 y 4 en la mutante de *ARF2* y observamos, que *GRF1*, 3 y 4 muestran mayor nivel de expresión (Figura R2.10.A). También medimos los niveles de *ARF2* en plantas que sobreexpresan *GRF3* (*rGRF3*), y observamos que los niveles de *ARF2* no varían (Figura R2.10.B), de igual manera a como ocurre en las plantas que sobreexpresan *GRF5*.

Luego, chequeamos las bases de datos de DAP-seq para evaluar si los *GRFs* tenían sitios de unión de *ARF2*. En esta ocasión observamos picos dentro de las unidades transcripcionales de *GRF1*, 3 y 4 (Figura R2.10.C). Es interesante que los picos en *GRF3* y *GRF4* se encuentren en el tercer intrón en similar posición. En el gen *GRF1* el pico se encuentra en el tercer exón cercano a la posición observada en los intrones de *GRF3* y 4 (Figura R2.10.C). A su vez, en las secuencias correspondientes a los picos de unión pudimos identificar motivos correspondientes al sitio de unión de *ARF2*. En el caso de *GRF2*, que no mostro un aumento significativo de expresión en *arf2-8*, tampoco identificamos un potencial sitio de unión (Figura R2.10.C).

A continuación, chequeamos por ChIP-qPCR el sitio de unión de *GRF3*. Observamos que las plantas que expresan *ARF2-GFP* presentan un enriquecimiento del sitio de unión de *ARF2*, respecto de las plantas salvajes (Figura R2.10.D). Además, no se observó enriquecimiento del sitio control ubicado en otra región del gen.

Para evaluar el efecto de este vínculo regulatorio a nivel del desarrollo de las plantas, se generaron cruza de *arf2-8* con una línea transgénica estable *35S:miR396b*. La sobreexpresión de miR396 genera hojas más pequeñas que las plantas salvajes, como resultados de la reducción de los niveles de expresión de los *GRFs* blanco (Figura R2.10.E y F). Estas plantas tienen un menor número de células, de mayor tamaño (Figura R2.9.G y H). Las cruza *arf2* x *35S:miR396* presentaron igual tamaño y morfología que las sobreexpresantes del

miARN (Figura R2.10.E). Cuantificamos esto a través del área de las hojas 1 y 2 (Figura R2.10.F). A nivel celular, en estas plantas también hay una significativa reducción del número de células y se observa una mayor expansión celular incluso que en las plantas *35S:miR396* y *arf2-8* (Figura R2.10.G y H). Esto indica que la sobreexpresión del miARN es epistático sobre la mutación de *ARF2* en cuanto a la proliferación celular, y por lo tanto *ARF2* se encuentra actuando por arriba del bloque *miR396/GRFs* en la vía regulatoria que controla la proliferación celular durante el desarrollo de la hoja. Sin embargo, *ARF2* y *miR396* afectarían el tamaño celular por vías independientes.

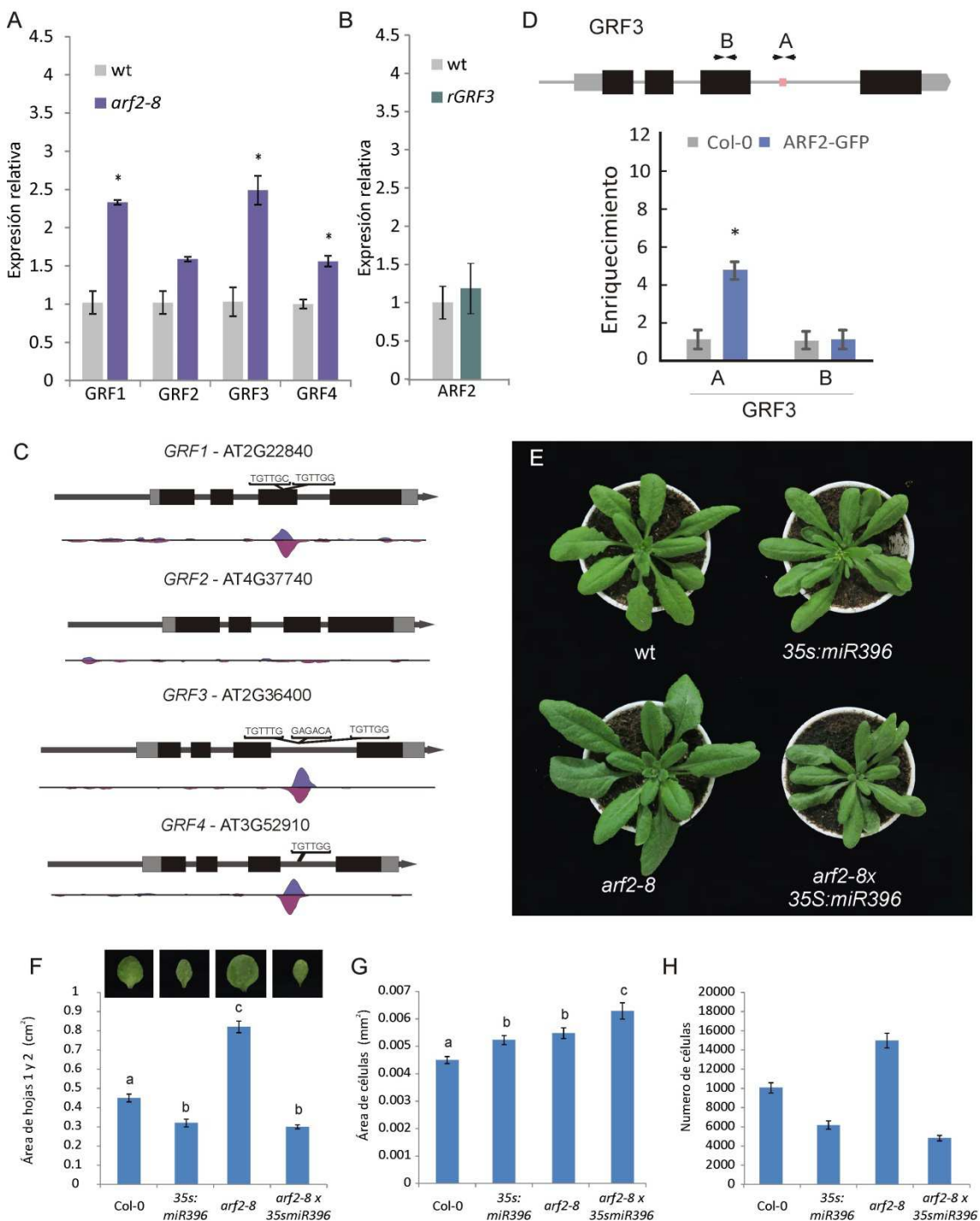


Figura R2.10. Interacción entre ARF2 y el sistema miR396-GRF. A) Niveles de expresión de *GRF1*, 2, 3 y 4 en hoja 3 de plántulas de 12 días, salvaje y mutante *arf2-8*. Los valores de expresión fueron determinados por RT-qPCR y normalizados a plantas salvajes. B) Niveles de expresión de *ARF2* en hoja 3 de plántulas de 12 días salvaje y *rGRF3*. Los valores de expresión fueron determinados por RT-qPCR y normalizados a plantas salvajes. Los datos mostrados corresponden al promedio \pm E.E. de 3 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a las plantas silvestres determinado a través de la prueba T-student ($p < 0.05$). C) Perfil de la unión de ARF2 determinado por DAP-seq en las regiones genómicas correspondientes a los genes *GRF1*, 2, 3 y 4. Se indica también los motivos de unión de ARF2 identificados en la secuencia correspondiente a la zona del pico. D) Representación esquemática del gen *GRF3*. A y B señalan la localización de los amplicones utilizados para el análisis de CHIP-qPCR. En rosa, se señala la ubicación de la zona de unión de ARF2, identificada por DAP-seq. Debajo, unión de ARF2 al gen *GRF3*. El enriquecimiento se determinó en base a la cantidad de amplicón en la muestra inmunoprecipitada en relación con la presente en el "ADN input". El enriquecimiento relativo, se normalizó de acuerdo al enriquecimiento del fragmento en la planta salvaje. Los datos mostrados corresponden al promedio \pm E.E. de 3 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a Col-0 determinado a través de la prueba T-student ($p < 0.05$). E) Rosetas de plantas: salvaje, 35S:*mir396*, *arf2-8*, *arf2-8x35S:mir396*. F) Área de hojas 1 y 2 de cada línea. C-D) Área y número de células en cada línea. Letras diferentes indican diferencias significativas determinado por ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$).

En conjunto, estos resultados muestran que *ARF2* tiene también un rol como regulador negativo de los genes regulados por *miR396*. Verificamos que se une de manera directa al gen *GRF3* y pareciera hacerlo de igual manera con los genes *GRF1* y 4.

7.2.7. ARF2 afecta los niveles de miR396 a través de un feedback regulatorio.

Evaluamos también que ocurre con la expresión del miARN *miR396* en las plantas mutantes *arf2-8*. La medida por qPCR nos permitió ver que estas mutantes presenta una reducción en el nivel de expresión de *miR396* (Figura R2.11.A). Además, generamos cruza entre *arf2-8* y una línea transgénica estable que expresa *GUS* bajo el control del promotor de *miR396*. En estas plantas observamos que la zona de expresión del miARN se encuentra reducida en el contexto de la mutante (Figura R2.11.B).

Realizamos un análisis de la región genómica del gen que codifica para *miR396*, pero no identificamos sitio de unión de ARF2. Por lo tanto, consideramos la posibilidad de una regulación indirecta. Se ha reportado anteriormente, que la sobreexpresión de versiones salvajes o resistentes al micro RNA de *GRF1* y *GRF3*, producen una disminución en la expresión de *miR396* (Hewezi & Baum, 2012). La cuantificación del miARN en nuestras plantas que expresan *rGRF3* nos permitió verificar que se produce una reducción de la expresión de *miR396* (Figura R2.11.C). Entonces, es posible que en las plantas *arf2-8* La desregulación de los *GRFs* y el aumento de expresión esté incidiendo sobre la expresión del miARN, reprimiéndolo.

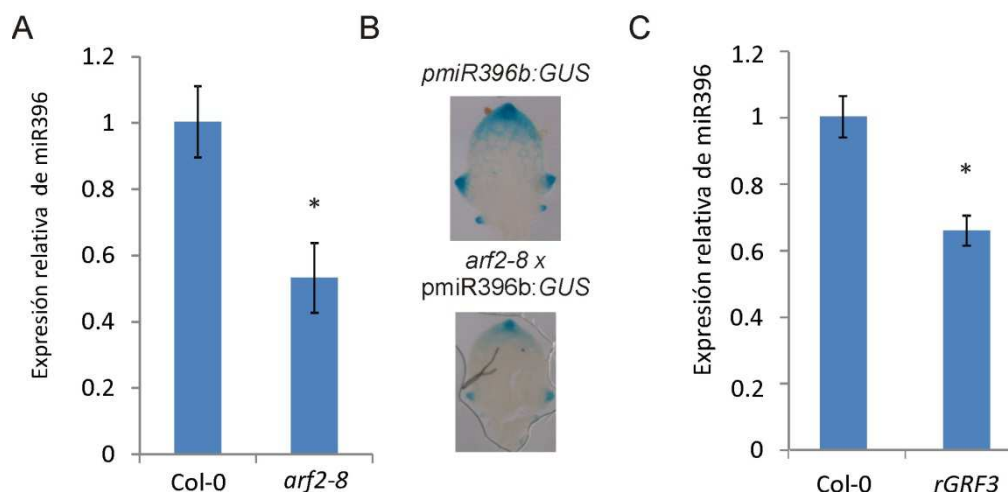


Figura R2.11. Reducción de la expresión de miR396 en plantas *arf2-8*. A) Expresión relativa del *miR396* en plantas Col-0 y *arf2-8*. Los valores de expresión fueron determinados por RT-qPCR y normalizados a plantas salvajes. Los datos mostrados corresponden al promedio \pm E.E. de 3 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a Col-0 ($p < 0.05$). B) Expresión del reportero del *miR396* en la hoja4 de plántulas de 12 días, Col-0 y *arf2-8*. C) Expresión relativa de *miR396* en plantas Col-0 y *rGRF3*. Los valores de expresión fueron determinados por RT-qPCR y normalizados a plantas salvajes. Los datos mostrados corresponden al promedio \pm E.E. de 3 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a Col-0 determinado a través de la prueba T-student ($p < 0.05$).

7.2.8. Interacción entre *rGRF3* y *arf2*.

Algunos de los *GRFs* regulados por miR396, estarían además regulados por ARF2 de manera directa o indirecta a través del cambio en los niveles de miR396. Para estudiar qué ocurre al suprimir ambas vías regulatorias represoras de la expresión de los *GRFs*, preparamos cruza de las plantas mutantes *arf2* y una línea estable de *rGRF3*. Las plantas *rGRF3* generan un aumento del área de las hojas de aproximadamente un 50%, en las mutantes de *arf2* el tamaño de las hojas es cercano al doble de la salvaje (Figura R2.12.A y B). En las cruza, *rGRF3* x *arf2*, el incremento en el área de las hojas fue aún mayor que en las líneas individuales *rGRF3* o *arf2* (Figura R2.12.A y B). Este efecto se debe mayoritariamente al aumento del número de células (Figura R2.12.C y D).

Por lo tanto, la supresión de ambas instancias regulatorias, sumado a que la ausencia de *ARF2* también podría estar afectando a otros *GRFs*, conducen a un incremento aún mayor en el tamaño de las hojas de *Arabidopsis*. Cabe considerar, que el control simultáneo de ambos mecanismos regulatorios puede ser una estrategia para lograr plantas con mayor acumulación de biomasa.

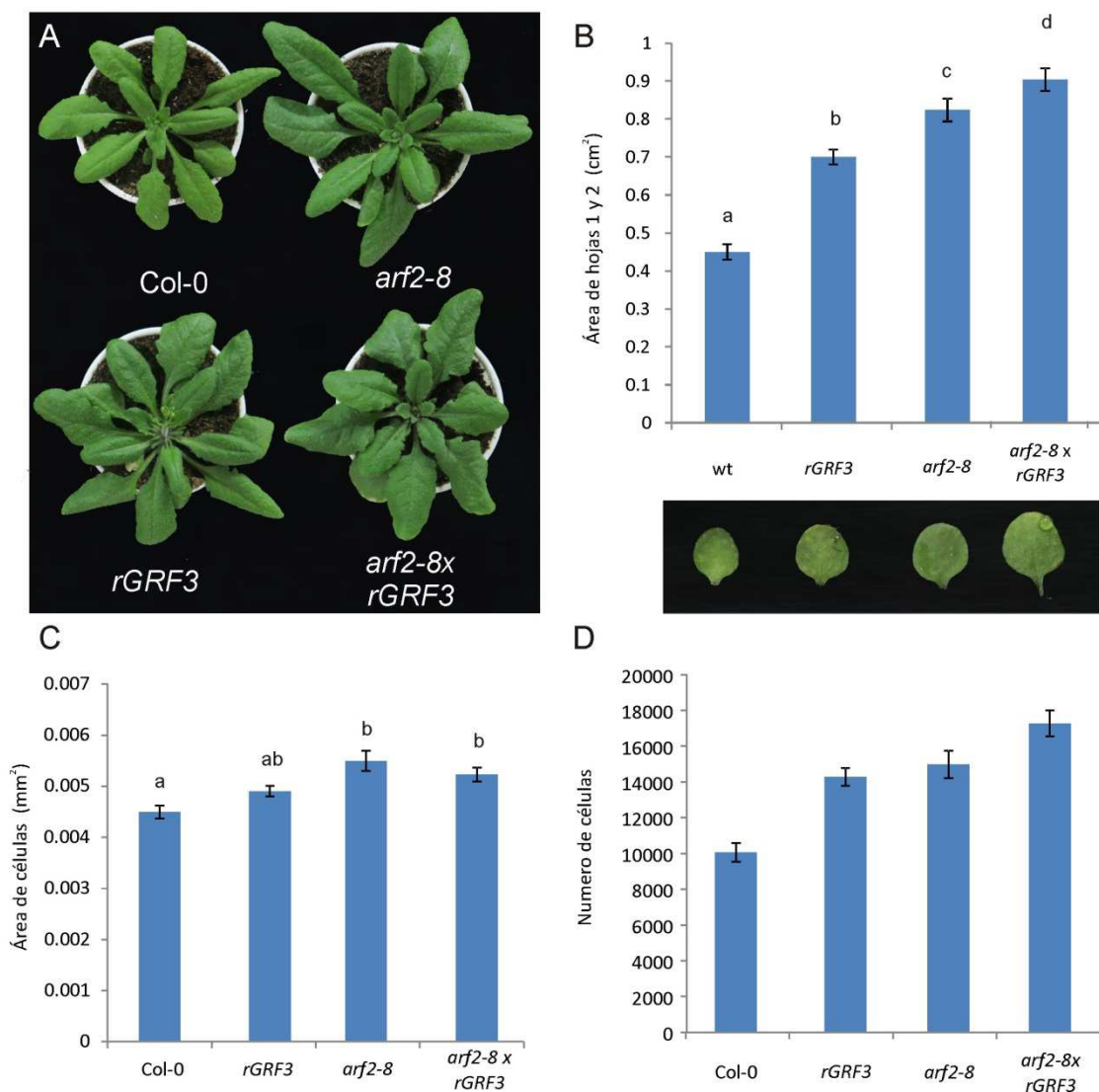


Figura R2.12. Análisis de plantas *arf2 x rGRF3*. A) Rosetas de plantas: salvaje, *rGRF3*, *arf2-8*, *arf2-8xrGRF3*. B) Área de hojas 1 y 2 de cada línea. C-D) Área y número de células en cada línea. Letras diferentes indican diferencias significativas determinado por ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$).

7.2.8. ARF2 regula el sistema *miR396/GRFs* en raíz.

El miR396 y los *GRFs*, participan también en el control del desarrollo de la raíz. En nuestro grupo se estudió que la sobreexpresión del miARN produce un alargamiento de la zona meristemática. Esto se debe a que se produce una reducción de la velocidad del ciclo celular y un aumento de la elongación de las células del meristema (Ercoli et al, 2016). *ARF2* también se expresa en la raíz (Figura R2.13.A) y se ha visto que *arf2* presenta una reducción del largo de la zona meristemática (Promchuea et al, 2017).

Por lo tanto, decidimos ver qué tipo de vínculo existe entre *ARF2* y el sistema miR396/*GRFs* en la raíz. Las plantas transformadas con el reportero del promotor de *GRF5*

mutado en el sitio de unión de ARF2, presentan una fuerte activación de la expresión en la raíz, la cual es nula para el promotor salvaje (Figura R2.13.B). Evaluamos también que ocurría con el largo de la zona meristemática en las cruzas *arf2xmiR396*. Estas plantas, presentan un alargamiento del meristema al igual que como ocurre en las plantas sobreexpresantes del miARN (Figura R2.13.C y D). En base en estos resultados, es probable que la relación entre los sistemas regulatorios sea igual a como ocurre en el control del desarrollo de la hoja, con *ARF2* actuando por arriba del sistema *miR396/GRFs*.

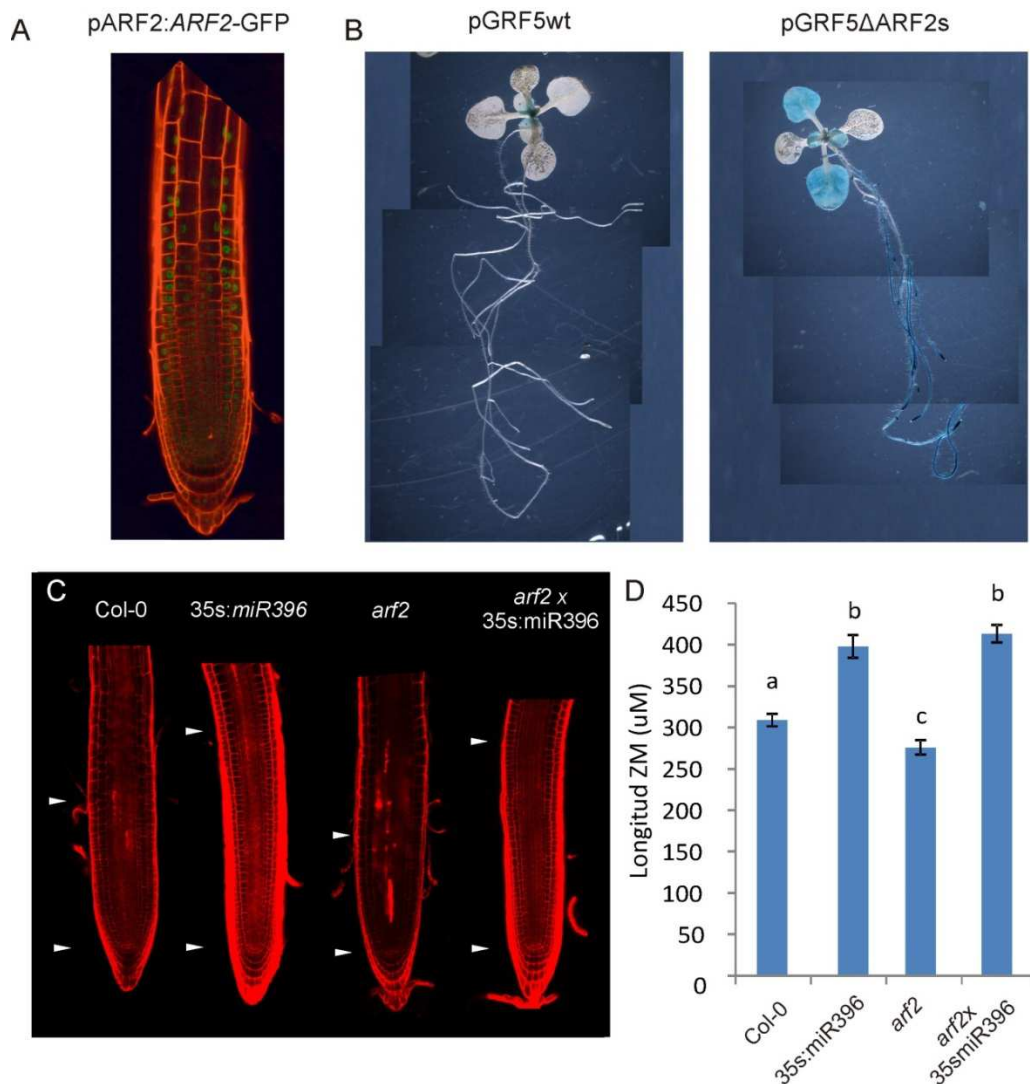


Figura R2.13. Los sistemas regulatorios de ARF2 y miR396/GRFs están vinculados en la raíz. A) Expresión del reportero traduccional de *ARF2* por fusión a *GFP*. B) Patrón de expresión del reportero del promotor de *GRF5* salvaje y mutante en el sitio de afinidad de *ARF2*, en raíces de plántulas de 14 días. C) Arquitectura de la punta de la raíz siete días post siembra en las plantas control (Col-0), *35S:miR396*, *arf2-8* y *arf2-8x35S:miR396*. Las puntas de flecha inferiores marcan la posición del CQ, mientras que las puntas de flechas superiores marcan el final del meristema (ZM), donde las células comienzan a alargarse. D) Evaluación del largo de la zona meristemática de cada línea. Se graficaron los valores promedios \pm EE de 15 réplicas biológicas. Letras diferentes indican diferencias significativas determinado por ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$).

7.2.9. Relación entre miR396/GRFs y ARF2 en el control de la senescencia.

Por último, evaluamos la relación entre los sistemas regulatorios en el control de la senescencia. Las plantas *arf2* presentan un retardo en el tiempo de senescencia. Evaluamos, en las diferentes líneas y cruzas, este proceso realizando un experimento en el que indujimos la senescencia, de hojas que recién habían llegado a la madurez, por incubación en oscuridad luego de haberlas cortado de la planta (Oh et al, 1997). El proceso se monitoreo midiendo el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fv/Fm) (Maxwell & Johnson, 2000). Ya en las hojas a los 5 días de iniciación del proceso se pueden visualizar las diferencias de tiempo de senescencia entre cada línea (Figura R2.14.A). Las hojas de plantas salvajes completan su senescencia a los 8 días (Figura R2.14.B). En el caso de las plantas que sobreexpresan miR396, la senescencia es más rápida (Figura R2.14.B). Por el contrario, en las plantas que expresan la versión resistente de *GRF3* lo hacen a los 12 días (Figura R2.14.B). Las plantas *arf2*, tienen un retardo aún mayor y el proceso se extiende hasta pasados los 16 días (Figura R2.14.B). Al analizar las cruzas vimos que en las plantas *arf2x35S:miR396* se produce un retardo en la senescencia y se acerca a los tiempos de *arf2* (Figura R2.14.B). Esto indica que, en el control de este proceso, el vínculo entre la vía regulatoria de *arf2* y la del sistema *miR396/GRFs* es diferente al que identificamos en el control del crecimiento de la hoja. En este caso la mutación de *arf2* tiene efecto epistático sobre los *GRFs*. De manera consistente con esto, en las cruzas *arf2xrGRF3* la curva del rendimiento cuántico del fotosistema coincide en casi todos sus puntos con los de la mutante *arf2*.

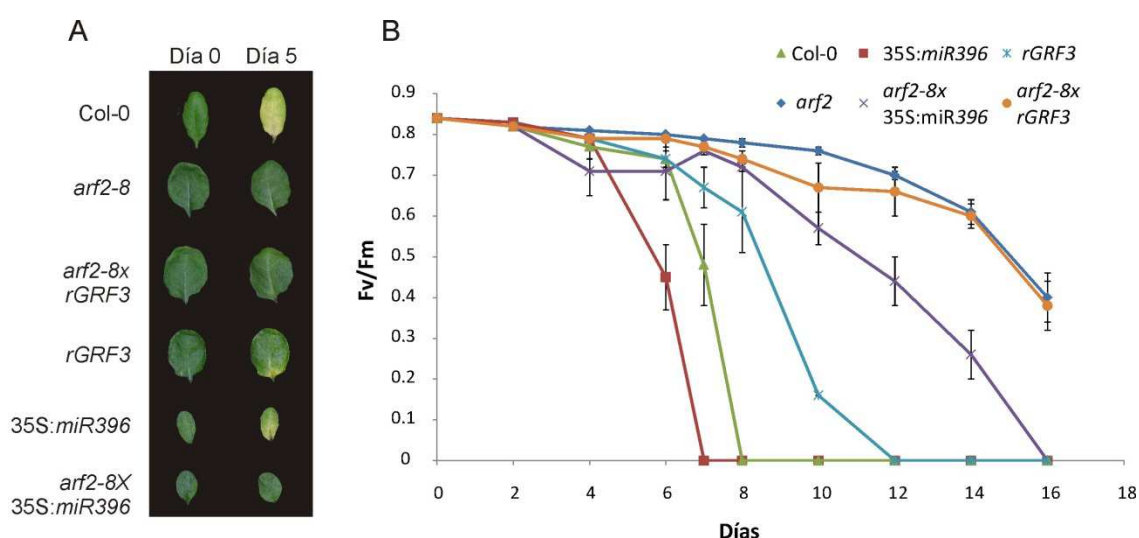


Figura R2.14. Efecto epistático de *arf2* sobre el sistema *miR396/GRFs* en el control de la senescencia de las hojas. A) Hoja 5 de las líneas: Col-0, *gif1*, *arf2*, *rGRF3*, *arf2xrGRF3*, *arf2xgif1*, al comienzo del tratamiento de inducción de la senescencia por oscuridad (Día 0). Luego se presentan las mismas hojas a los 5 días del tratamiento. B) Medidas del rendimiento cuántico máximo del PSII de hojas inducidas a senescer por oscuridad. Los resultados representan el promedio \pm EE de 10 hojas.

7.3. Discusión.

7.3.1 Evolución de la regulación de los *GRFs* por miR396.

La red regulatoria de miR396/*GRFs* se encuentra conservada en las plantas terrestres tanto angiospermas como gimnospermas. El análisis de los *GRFs* del clado *Rosidae* nos ha permitido identificar que el sitio regulatorio de miR396 se encuentra ampliamente conservado. En la mayoría de las especies, todos los miembros de la familia GRF presentan regulación por miR396.

Sin embargo, dentro de las *Brassicaceas* existen *GRFs* que han perdido la regulación por miR396. Estos se pueden a su vez agrupar en dos clados correspondientes a *GRF5* y *GRF6* de *Arabidopsis thaliana*. Consideramos que estos dos grupos podrían provenir de un único gen ancestral que haya acumulado los primeros cambios que condujeron a la pérdida de regulación. Posteriormente se habría duplicado dando lugar a los genes tipo *GRF5* y *6*, que continuaron sumando variaciones en el sitio blanco de miR396.

Este tipo de cambios regulatorios se ha visto y estudiado también para el caso de los genes de los factores de respuesta a auxina (*ARF*). Dentro de esta familia se puede identificar el subgrupo de los genes *ARF1*, *2*, *3*, *4* y *9*, de los cuales *ARF2*, *3* y *4* son regulados por tasi-ARNs, *ARF3* y *4* presentan duplicado a su vez el sitio blanco, mientras *ARF1* y *9* han perdido la regulación en *Arabidopsis* (Xia et al, 2017). Sin embargo, se desconoce en este momento los mecanismos regulatorios que controlan a *ARF1* y *9*.

El análisis de otras familias de genes regulados por miARNs, vinculados al desarrollo de la hoja, permite ver de manera semejante la ocurrencia de miembros cercanos, estructural y funcionalmente, no regulados. Es el caso de los genes *CUC1*, *2* y *3* que controlan los dominios límites durante la formación de órganos en el meristema, y las serraciones de la hoja. Estos genes tienen un ancestro común regulado por miR164, sin embargo, *CUC3* ha perdido la regulación (Viallette-Guiraud et al, 2011). En el caso de los genes *TCP* de clase II, también se puede identificar el subgrupo denominado CIN, involucrado en el control de la proliferación celular en la hoja, integrado por ocho miembros estrechamente relacionados de acuerdo a su secuencia aminoacídicas, de los cuales cinco son regulados por mi319 y los tres restante no (Efroni et al, 2008; Li, 2015; Palatnik et al, 2003).

7.3.2. La represión a nivel transcripcional de *GRF5* compensa por la falta de regulación post-transcripcional por miR396.

Recientemente se ha descrito la evolución de dos mecanismos regulatorios diferentes de los genes de *RSL* de clase I en las plantas terrestres. Estos genes controlan positivamente el

desarrollo de estructura que derivan de células epidérmicas. En la angiosperma *Arabidopsis thaliana* los *RSL* son regulados por la proteína GL2 mientras que se ha encontrado que en las primitivas plantas hepáticas como *Marchantia polymorpha* son reprimidos por un miARN (Honkanen et al, 2018). Nuestros estudios complementan a los descriptos para GL2, y muestran la diversificación de un sistema de represión durante la evolución, partiendo de un primer control por miR396 que se diversifica para depender también de la regulación transcripcional.

En este trabajo estudiamos la regulación a nivel transcripcional de *GRF5*. Este gen desempeña funciones redundantes con los *GRFs* involucrados en el control de la proliferación celular regulados por miARN y a su vez presenta un patrón de expresión semejante. Identificamos en el promotor de *GRF5* múltiples regiones conservadas que pueden estar directamente vinculadas a la regulación transcripcional. En comparación, en el promotor de *GRF2* encontramos una menor conservación a nivel del promotor, en concordancia con el rol de miR396 en la expresión de este gen.

Mediante un análisis de los resultados de un experimento de DAP-seq (O'Malley et al, 2016), pudimos seleccionar una serie de sitios de unión de factores de transcripción en la región promotora de *GRF5*. Entre ellos, dos resultan particularmente interesantes. Por un lado encontramos un sitio de unión para GRF6. Los miembros de una familia de factores de transcripción suelen reconocer motivos de ADN muy similares (Franco-Zorrilla et al, 2014). El motivo de unión de GRF6 y GRF9 de acuerdo a los resultados de DAP-seq, coinciden con el previamente identificado para GRF7 (Kim et al, 2012). En el laboratorio también hay resultados no publicados de CHIP-seq que identifican el mismo núcleo en el sitio de unión de GRF3. Por lo tanto, este motivo podría unir otros GRFs también y funcionar como un sitio de sensado de los genes de la familia. De acuerdo a nuestros resultados de RNA-seq en ápices de parte aérea de *Arabidopsis* que tienen el sistema inducible de *rGRF3*, *GRF5* se activa tras la activación de *rGRF3*, indicando un mecanismo de feedback positivo.

En segundo lugar, identificamos que el promotor tiene un sitio de unión de ARF2. Este factor de transcripción es un regulador negativo, que se ha visto involucrado en múltiples procesos de desarrollo (Ellis et al, 2005; Okushima et al, 2005a; Schruff et al, 2006). La remoción del sitio de unión produce expansión de la zona de actividad del promotor, indicando la importancia de este sitio para la determinación del patrón de expresión de *GRF5* en la hoja y también en la raíz.

El promotor de *GRF5* no se encuentra conservado en especies relativamente cercanas a *Arabidopsis* como *Theobroma cacao* y *Gossypium raimondii*, en las cuales el gen conserva la regulación del miARN (Figura R2.3). Esto podría indicar que tras la pérdida regulatoria a nivel

post transcripcional el gen adquirió mecanismos regulatorios a nivel transcripcional. Para confirmar esta hipótesis, sería interesante evaluar la actividad de los promotores de estas especies en *Arabidopsis*.

7.3.3. ARF2 actúa sobre los GRFs en el control de la proliferación celular en hojas.

El desarrollo de la hoja se basa en las fases subsiguientes de proliferación y expansión celular. El factor de transcripción GRF5 promueve la duración de la fase de proliferación celular, estimula la división de cloroplastos, resultando en un mayor número de cloroplastos por células (Vercruyssen et al, 2015). En las plantas sobreexpresantes de *GRF5* se observa mayor expresión y expansión de la región de expresión de *CYCB1;1* que identifica células en activa división (Horiguchi et al, 2005). Además, las plantas con elevados niveles de *GRF5* muestran retardo en la senescencia (Vercruyssen et al, 2015) y por el contrario en las mutantes en dicho gen se acelera el proceso, de igual manera que en las sobreexpresantes de *miR396* (Debernardi et al, 2014).

ARF2 es un regulador pleiotrópico que se une a elementos de respuesta auxina y reprime la expresión de sus genes blanco para regular el desarrollo de la planta. Las mutantes en *ARF2*, presentan hojas más grandes y verdes, tallos más gruesos, defectos en la apertura de la flor, y retardo en la senescencia de la hoja y floración (Ellis et al, 2005; Okushima et al, 2005a; Schruff et al, 2006). El efecto del aumento de tamaño de los órganos se ha vinculado a un aumento de la división celular y expansión celular

En este trabajo demostramos que ARF2 actúa como un represor transcripcional que regula directamente la expresión de *GRF5*. De esta forma se vinculan en una vía que controla el tamaño de la hoja a través de la proliferación celular. En ausencia de *ARF2*, *GRF5* se expresa en mayores niveles y se expande su zona de expresión. Es por esto que la mutación *grf5* suprime el efecto de aumento de tamaño de las hojas de *arf2*. El mismo efecto produce la mutación en *GIF1*, cofactor de los GRFs y que interactúa principalmente con *GRF5* (Debernardi et al, 2014; Vercruyssen et al, 2014). A su vez, encontramos que *ARF2* también regularía otros GRFs, verificamos la unión al gen *GRF3*. Es probable que en el contexto de estos GRFs regulados por *miR396* el rol de ARF2 sea secundario. De manera indirecta también afecta la expresión de *miR396*, y en las mutantes *arf2* se observa una restricción de la zona de expresión del miARN.

En la raíz, encontramos que los efectos del sistema *miR396/GRFs* son epistáticos sobre los de *arf2*. De esta manera sería posible que se mantenga la relación regulatoria similar a la que identificamos en el control de la proliferación celular en hojas. En el meristema de la raíz, los genes *PLETHORA (PLT)* son factores claves que controlan la división y diferenciación celular

(Aida et al, 2004). Los *GRFs* reprimen la expresión de *PLTs* en las células de activa proliferación celular (Rodríguez et al, 2015). También se ha visto que *ARF2* afecta de manera indirecta los niveles de expresión de *PLT1* en la raíz (Promchuea et al, 2017). Sería interesante profundizar en el vínculo entre *ARF2*, *GRFs* y *PLT* en el sistema de desarrollo radicular.

En el proceso de senescencia, sin embargo, la relación entre *ARF2* y el sistema de *miR396/GRFs* sería diferente, Las plantas *arf2 x 35S:miR396* presentan hojas chicas (resultado de disminuir la actividad de los *GRFs*), pero que senescen tardíamente (característica de la mutante *arf2*). Se ha demostrado que los *GRFs* pueden aumentar la fase proliferativa y tamaño final de la hoja sin afectar la senescencia, es decir que son dos funciones independientes de los *GRFs* (Debernardi et al, 2014). Para el caso de *ARF2*, se ha considerado que el efecto de retraso de la senescencia en la mutante podría ser debido al efecto de extensión de la fase de proliferación (Schruff et al, 2006). Sin embargo, nuestros resultados de las cruza con las mutantes en los *grfs* o *gif* y la sobreexpresante del *miR396*, indican que ambos procesos serían actividades de *ARF2* independientes, uno de ellos dependería de los *GRFs* (proliferación celular), mientras que el otro sería independiente de los mismos (Senescencia).

En resumen, proponemos el modelo de la Figura R2.15 según el cual: *GRF5* es regulado a nivel transcripcional por *ARF2*, que lo reprime restringiendo la expresión a la zona de proliferación celular en hojas. A su vez, su expresión puede ser activada por otros factores de transcripción de su propia familia. *ARF2* también es capaz de reprimir algunos de los *GRFs* regulados por *miR396*, y vimos que se une de manera directa al gen *GRF3*. Además, afecta la expresión del miARN de manera indirecta, lo que podría ser explicado a través del feedback regulatorio negativo que producen los *GRFs* sobre *miR396*.

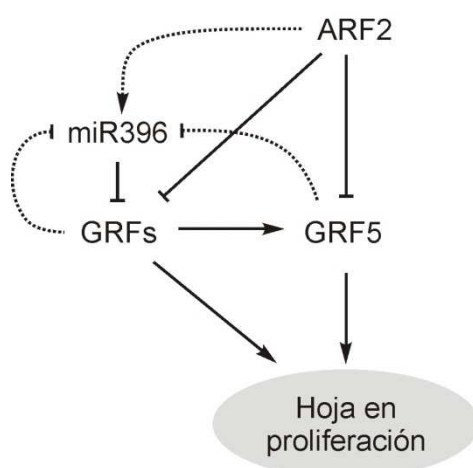


Figura R2.15. Modelo propuesto de control de la proliferación celular en hojas en desarrollo, a través de las nuevas relaciones regulatorias identificadas.

CONCLUSIONES.

8. Conclusiones.

8.1. Conclusiones I.

En la primera parte de este trabajo de Tesis se profundizó en la caracterización del sistema *miR396/GRFs* en el control del desarrollo de la hoja, enfocándose en su aplicación como herramienta biotecnológica.

- Se realizó un análisis descriptivo de la estructura génica y el sitio de unión del miARN *miR396* de los genes *GRFs* de *Arabidopsis thaliana*.
- Se generó un “multimimic” contra *miR396* (*9X-MIM396*) capaz de producir una reducción de los niveles de expresión del miARN y el consecuente aumento de los niveles de los *GRFs* blancos, *GRF2* y *GRF3*.
- La expresión del “multimimic”, *9X-MIM396*, produce un aumento significativo del área de las hojas de *Arabidopsis*.
- Se realizó un análisis comparativo de los efectos de los alelos insensibles a la regulación por *miR396*, *rGRF2* y *rGRF3* de *Arabidopsis*, en el control del desarrollo y tamaño foliar.
- *rGRF3* resultó ser un activador más eficiente sugiriendo que la secuencia de aminoácidos es importante para determinar la actividad promotora del crecimiento.
- Se evaluó la efectividad de *rGRF3* como herramienta biotecnológica en plantas de *Brassica oleracea*.
- Las plantas de *Brassica* transgénicas que expresan mayor nivel de *GRF3* presentaron un incremento del tamaño de hojas, raíz y semillas.
- Se identificó que la red de *miR396* se induce en condiciones de estrés por sequía.
- Se evaluó el efecto de *rGRF3* en condiciones de estrés por sequía y se observó que plantas que expresan *rGRF3* desarrollaron hojas más grandes que las silvestres, incluso en condiciones de estrés.

8.2. Conclusiones II.

En la segunda parte de esta Tesis identificamos y caracterizamos el vínculo regulatorio entre la red de *miR396/GRFs/GIFs* y el factor de transcripción *ARF2* en el control de la proliferación celular, integrando el sistema *miR396-GRF* con otros reguladores del programa de desarrollo de la hoja.

- Se desarrolló un estudio evolutivo de la regulación de miR396 sobre los *GRF* en el clado *Rosidae*. Identificamos que la mayoría de los *GRFs* analizados tiene conservado el sitio de unión de miR396.
- Encontramos que en *Brassicaceas* un grupo de genes *GRFs* han perdido la regulación por miR396. Estos genes están relacionados a *GRF5* y *GRF6* de *Arabidopsis thaliana* que carecen del sitio de reconocimiento de miR396.
- Se analizó la conservación de la región promotora de *GRF5* en *Brassicaceas* e identificamos potenciales sitios de unión de factores de transcripción. Entre ellos cabe destacar un sitio de unión de *GRFs* y uno de *ARF2*.
- Análisis de genes reporteros, demostraron que la regulación transcripcional de *GRF5* es esencial para expresar este factor de transcripción en células en proliferación.
- Una delección en la región del promotor de *GRF5* reconocida por *ARF2* causa la expresión ectópica de *GRF5*, sugiriendo que *ARF2* reprime la expresión de *GRF5*.
- Validamos experimentalmente que *ARF2* se une al promotor de *GRF5* y lo reprime transcripcionalmente.
- Encontramos que *ARF2* también regula otros *GRFs* y de manera indirecta al miARN miR396. Validamos la unión del factor de transcripción al gen *GRF3*.
- Caracterizamos mediante análisis genéticos el vínculo entre *ARF2* y el sistema *miR396/GRFs/GIFs* en el control de la proliferación celular en hojas.
- Identificamos que *ARF2* actúa por arriba del nodo *miR396/GRF* en la cascada regulatoria, y que el fenotipo de mutantes *arf2* puede ser suprimido disminuyendo la actividad de *GRF5* y otros *GRFs*.
- *ARF2* tendría un rol principal en la regulación de *GRF5* y un rol secundario sobre otros *GRFs* regulados post transcripcionalmente por miR396.
- Analizamos la relación entre *ARF2* y el sistema *miR396/GRFs* en otros procesos del desarrollo de la planta. Encontramos indicios de que en el control del desarrollo de la raíz exista un vínculo regulatorio entre *ARF2* y *miR396/GRFs* semejante al identificado en el desarrollo foliar.
- En el control del proceso de senescencia encontramos que *ARF2* actúa de manera independiente del sistema *miR396/GRFs*.

9. ANEXO.

9.1 Anexo R1

Tabla A1. Selección de los genes de soja y arroz para expresar de manera heteróloga en Arabidopsis.

Organismo	Gen	Base de dato	Similitud con AtGRF3 (%)	GRF seleccionado
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtGRF1	Kim et al (2003) The Plant Journal	36.8	
	AtGRF2		32.6	
	AtGRF3		100.0	(+)
	AtGRF4		74.8	
	AtGRF5		29.8	
	AtGRF6		26.9	
	AtGRF7		35.9	
	AtGRF8		33.1	
	AtGRF9		26.7	
<i>Oryza sativa</i>	OsGRF1	Choi et al. (2004) Plant Cell Physiol	32.0	
	OsGRF2		34.8	
	OsGRF3		32.4	
	OsGRF4		38.2	(+)
	OsGRF5		32.0	
	OsGRF6		33.3	
	OsGRF7		33.0	
	OsGRF8		32.2	
	OsGRF9		37.4	
	OsGRF10		29.7	
	OsGRF11		21.1	
	OsGRF12		23.7	
<i>Glycine max</i>	Glyma.01G148600	Plant Transcription Factor Database	38.1	
	Glyma.01G234400		36.9	
	Glyma.03G192200		58.9	(+)
	Glyma.04G230600		31.6	
	Glyma.07G038400		30.2	
	Glyma.09G068700		32.7	
	Glyma.09G212500		37.0	
	Glyma.10G067200		54.5	
	Glyma.11G008500		37.9	
	Glyma.11G110700		36.6	

	<i>Glyma.11G208</i> 800		56.1	
	<i>Glyma.12G014</i> 700		36.0	
	<i>Glyma.13G109</i> 500		31.9	
	<i>Glyma.15G176</i> 500		33.3	
	<i>Glyma.16G007</i> 600		32.0	
	<i>Glyma.17G050</i> 200		33.0	
	<i>Glyma.17G232</i> 600		34.2	
	<i>Glyma.17G232</i> 700		34.0	
	<i>Glyma.19G192</i> 700		60.3	
	<i>Glyma.U02860</i> 0		34.0	
	<i>Glyma.U02870</i> 0		34.4	

9.2 Anexo R2

Alineamiento de las regiones corriente arriba de genes ortólogos a *At-GRF5*

T-COFFEE, Version_11.00.d625267 (2016-01-11 15:25:41 - Revision d625267 - Build 507)

Cedric Notredame

SCORE=910

BAD AVG GOOD

*

AT3G13960|Chr3_ : 89
 Araha.4235s0002 : 90
 AL3G26150 : 89
 Bostr.28625s030 : 89
 Bol040427 : 90
 Brara.E02725 : 87
 Cagra.0736s0034 : 89
 Thhalv10020873m : 88
 Carubv10013860m : 90
 cons : 91

```

AT3G13960|Chr3_ -----T-----
Araha.4235s0002 -----
AL3G26150 -----TCAAGAGTGGAGCTCTAAT-----
Bostr.28625s030 -----TAAGTCTACT-----
Bol040427 T-----
Brara.E02725 TATGCTCTGAAATGGAAATATCCCAAGTCAAAGGTTTTCAACCTCTTCATTAACCTTAT
Cagra.0736s0034 -----TCATAACGTTTTAGAAA-----
Thhalv10020873m -----
Carubv10013860m -----
    
```

cons

```

AT3G13960|Chr3_ -----A-----
Araha.4235s0002 -----
AL3G26150 -----A-----
Bostr.28625s030 -----T-----
Bol040427 -----
Brara.E02725 TCACATCATGATCGTCACTTTGACCAACCCGGACAGATCTAGCTACGTGTTTAGCGCTCTATA
Cagra.0736s0034 -----A-----
Thhalv10020873m -----
Carubv10013860m -----
    
```

cons

```

AT3G13960|Chr3_ TGTGTAGGTACCATCTTACATATCTCCA--TATACGCATGCATATCATTTTCGAACCAATTTA
Araha.4235s0002 -----CGTGCTTTTACC-----
AL3G26150 TGTTTAGGTACCATCTTCAATCTCTAGATATACACATGCATATCACTTTCGAACCAATTTA
Bostr.28625s030 TGCTCAATGTTATCAATCATACTATTT-----GAAT---TTTTA
Bol040427 -----
Brara.E02725 TGTTTAGGTACCATTGCATCTTTCATAATATAACAACACATATTC-----
Cagra.0736s0034 ACTACAATGGTATCCAACAGATTAT-----
Thhalv10020873m -----
Carubv10013860m -----
    
```

cons

```

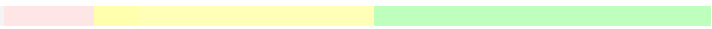
AT3G13960|Chr3_ GAAGGTGATGTA-----TAT-----AATCAAAAGTATTTAGGATGATGGTTTATCGCG
Araha.4235s0002 TGAAACGACTTA-----TAT-----TATGAAACGGA-----
AL3G26150 GAAGGTGAAGTT-----CAACAGTATATAATTA AAAAGTATTTAGGATGAATGTTTCATTGCT
Bostr.28625s030 CAACACGTTGTAGCGGACTAC-----TTTGTTCCTTTTTACAAACAAAA-----
Bol040427 -----
Brara.E02725 -----TTGAAATGTGTTTATTGTGATAGTTAATTGGT
Cagra.0736s0034 -----TG-----
Thhalv10020873m -----
Carubv10013860m -----
    
```

cons

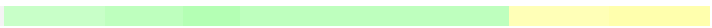
```

AT3G13960|Chr3_ TGAACACCATTTGTTTAAAGTACGTGGTCAT--C-----GCAAGGTAACCATCTTTAT
Araha.4235s0002 -----
AL3G26150 TGAACGCCATTTATTATGTACAGTGGTCATGGTAAAGAGGTAAGTAAAGTAACCATCTTAAAT
    
```

Bostr.28625s030 -----
 Bol040427 -----
 Brara.E02725 TACCTGCCTAATGACACTAAATACAAAACT--TGCAGAATCACAGAATATATCTAACAATT
 Cagra.0736s0034 -----
 Thhalv10020873m -----
 Carubv10013860m -----

cons 

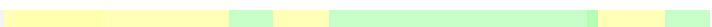
AT3G13960|Chr3_ TTTCTTGGGTG-----ATCTTCACTAGCTATATA-----TTAACCAATTACATATGT
 Araha.4235s0002 -----GGGAGTATGT
 AL3G26150 TTTTGTGTGTGACCGATATATCTTCACTAAGTCTATAATAAATAATTAAATTACATATGT
 Bostr.28625s030 -----TATGTAAGAGACAGACTA
 Bol040427 -----
 Brara.E02725 ACTAGACCAATTCAGAAACTAACTTCGAAAAGAAAATTCACTTTATCATTCAAATTCCTGTT
 Cagra.0736s0034 -----TCGATCAAAGACAATAAG
 Thhalv10020873m -----TAT
 Carubv10013860m -----GACAATAAG

cons 

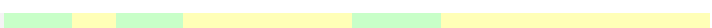
AT3G13960|Chr3_ ATTATTTTGTACTGAAGAAAGGATATAATTTGTAATCGCCAAATGATTGAATTAGTATTTGCT
 Araha.4235s0002 ATTATTTTGTACTGAAGAAATGATGTAATTTGTAATCGCCAAATGATAGAATTAGTATTTGCT
 AL3G26150 ATTATTTTGTACTGAAGAAAGGATATAATTTGTAATGCCAAATGATAGAATTAGTATTTGCT
 Bostr.28625s030 CTTTGTGTTGCAAAACAAAATCGTTTCTTATTTACCATTTCATAATTTTTTCAGTTTGCAAAACAA
 Bol040427 -----
 Brara.E02725 GTAAACATATATATCTTTATCCTTACAAGTTCAGTTTTACAAATCTTTTTATATTCGTGTTAT
 Cagra.0736s0034 A-----
 Thhalv10020873m ACTAATTATTGAGTTTGAAGAATCGTGAATTATATTTATCAATTCGCCAAGTCATACATAAT
 Carubv10013860m A-----

cons 

AT3G13960|Chr3_ AATTACAAAAATTTGTAGAAA-----TCGCGATAATTATCAACTTTTT-TACTATATCC
 Araha.4235s0002 AATTACAAAAATTTGTACAATCAAGATATATACTATATATGGTGAATTTTTTACTATATTC
 AL3G26150 AATTACAAAAATTTGTACAATCACGATATATACTATATATGGTCAACTTTTT-TACTATATTC
 Bostr.28625s030 TTTTATGGAAAATAG-----ACATTGG-TATGCTATTG
 Bol040427 -----
 Brara.E02725 AGTTCTACTAATCAGAGCAATTTTC-----TTAGTCCAACCTTTGT-TTATTTTGTC
 Cagra.0736s0034 -----
 Thhalv10020873m ATCAACTTCCT--CGTTCAAA-----TTTTGGCTGTAATAATCATT-TCTTATATTC
 Carubv10013860m -----

cons 

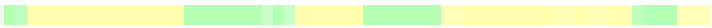
AT3G13960|Chr3_ CATCATTCTACTATTACGCAATGTTATCAATTGT---ACTAGTTTGTTCATCCACTATGTAA
 Araha.4235s0002 CACCATTCTACTATTACTTAATGTTATCAATTGT---ACTAGTTAGTATCATCCACTATATGT
 AL3G26150 CACCATTCTACTATTACTTAATGTTATCAATTGT---ACTAGTTAGTATCATCCACTATATGT
 Bostr.28625s030 TCCATCCAAAATACTAAGGTGATCTAGTCTACAA---ATGGATTAGTTCATTCCGATCCAAATGC
 Bol040427 -----
 Brara.E02725 ATTCAAGTCGAAGAATTAGAATCTTCACAAATGTT---TAGAAAA-----
 Cagra.0736s0034 -----TGATCTAGTCTACTACAGACGGGTTAATTCATTCTATCCAATAC
 Thhalv10020873m TCTACG-----TATACTATTAGCAATTTGAACATTTTTTGTGTAATCGAATCA
 Carubv10013860m -----TGATCTAGTCTACTACAGACGGGTTAATTCATTCTATCCAATAC

cons 


AT3G13960|Chr3_ AATCATTCAAACCTAAAGT--CGAT-----G--CTCATC
 Araha.4235s0002 AATCAATCAAACCTAAAT--TGAT-----G-----
 AL3G26150 AATCATTCAAACCTAAAT--TGAT-----G-----
 Bostr.28625s030 AACAAATTAACCTAAATTTAAG-----G-----
 Bol040427 -----
 Brara.E02725 -----AACCTTTGAG-----A-----
 Cagra.0736s0034 AACAAATTAACCTAAATTTGAG-----G-----
 Thhalv10020873m AACTATATCTCATAATTATTTAGAACAACAAAAGAAAGAAACGAAAATAATGGATCATGCAT
 Carubv10013860m AACAAATTAACCTAAATTTGAG-----G-----

cons 


AT3G13960|Chr3_ AGCTCATGTATATGTA-----T--GTATCATGTATATGTACATAAGATATAAAA---CCT
 Araha.4235s0002 --ATCATGTATATATA-----T--GTATCA-----TGTATGTGTACATTATATATATAA
 AL3G26150 -ATCATGTAAATGTATG-----T--ATGTAT-----GAGTACATTATATTAGA---TAT
 Bostr.28625s030 --ATCATGTATATGTAAGAAATTTATGAATGA-----GTGCATTATGTATCGAC---TTA
 Bol040427 -----
 Brara.E02725 ---AATATGTATATATT-----TTAGTTT-----CTGCATGTGTGAACCTAT---GTA
 Cagra.0736s0034 --ATCATGTATATGTA-----T--GAACGA-----GAGCATAATGCATCGAA---GAC
 Thhalv10020873m TGATCAAGTTGATGTA-----TGTGTGA-----ATTGTGTATATATAATAT---AT
 Carubv10013860m --ATCATGTAGATGTA-----T--GAATGA-----GAGCATACTGCATCGAA---GAC

cons 

AT3G13960|Chr3_ ---TTAT-----AGATGTGCATGTAAAAGAATGGTAGATAGTAGTAGTAG-----
 Araha.4235s0002 AAACCTTAT-----AAATGTGCATGTA-AAGAATGGTAGATAGTAGTAGTAG-----
 AL3G26150 AAACCTTAT-----AAATGTGCATGTA-AAGAATGGTAGATAGTAGTAGTAG-----
 Bostr.28625s030 TAA-----ATGTGTATGTA-AAGAACGGTAGATAGTAGGTGTGTAAGG-
 Bol040427 -----
 Brara.E02725 TGTGTATACTTATGTGTATGTGTGAGTATGCA-TAGAATGGTAGATTG-----TAG-----
 Cagra.0736s0034 TTATAAGA-----GTATGTGTAAGTA-AAGAATGGTAGATAGTGGTAGTAGTAGCA
 Thhalv10020873m TCATATATGTAAGT-----ATGTGAGTATGTA-TAGAATGGTAGATTGTAGGTGT-----
 Carubv10013860m TTATAAGA-----GTATGTGTAAGTA-AAGAATGGTAGATAGTGGTAGTAGCAGT-

cons 

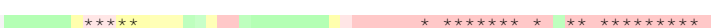
AT3G13960|Chr3_ -----GTGTGTAAGGAGAAAGATCTAGGGGGCTTCA-AAAAAAGGAGAGAA
 Araha.4235s0002 -----GTGTGTAAGGAGAAAGATCTAGGGGGCTTCA-AAAAAAGGAGAGAA
 AL3G26150 -----TAGGTGTGTAAGGAGAAAGATCTAGGGGGCTTCA-AAAAAAGGAGAGAA
 Bostr.28625s030 -----AGAAGAAAGATCTAGGGGGCTTA--AAAAAAGGAGAGAA
 Bol040427 -----
 Brara.E02725 -----GTGTGTAAGGAGAAAGATCTAGGGGGCTTCA-AAAAAAGGAGAGAA
 Cagra.0736s0034 GTAGTAGTAGGAGTAGGTGTGTAAGGAGAAAGATCTAGGGGGCTTCAGAAAAAAGGAGAGAA
 Thhalv10020873m -----GTAAGAAGAAAGATCTAGGGGGCTTCA-AAAAAAGGAGAGAA
 Carubv10013860m --AGTAGTAGGAGTAGGTGTGTAAGGAGAAAGATCTAGGGGGCTTCAGAAAAAAGGAGAGAA

cons 

AT3G13960|Chr3_ AAGGACAGAGCATGTGAAAAGAGACAGAGAAACAAACAGAGGAGTGAACAGTCTTACTC---T
 Araha.4235s0002 AAGGACAGAGCATGTGAAAAGAGACAGAGAAACAAACAGAGGAGTGAACAGTCTTACTC---T
 AL3G26150 AAGGACAGAGCATGTGAAAAGAGACAGAGAAACAAACAGAGGAGTGAACAGTCTTACTCCTTT
 Bostr.28625s030 AAGGACAGAGCATGTGAAAAGAGACAGAGAAACAAACAGAGGAGTGAACAGTCTTACTCT---
 Bol040427 -----
 Brara.E02725 AAGGACAGAGCATGTGAAAAGAGACAGAGAAACAAACAGAGTGTGAACAGTCTTACTCT---
 Cagra.0736s0034 AAGGACAGAGCATGTGAAAAGAGACAGAGAAACAAACAGAGGAGTGAACAGTCTTACTCT---
 Thhalv10020873m AAGGACAGAGCATGTGAAAAGAGACAGAGAAACAAACAGAGTGTGAACAGTCTTACTCTC---
 Carubv10013860m AAGGACAGAGCATGTGAAAAGAGACAGAGAAACAAACAGAGGAGTGAACAGTCTTACTCT---

cons 

AT3G13960|Chr3_ -----TTTTTT-----TTCTATGCACCTAATGAACC-CAACCCCTCTGT
 Araha.4235s0002 -----TTTTTT-----TTCTATGCACCTAATGAACC-CAACCCCTCTGT
 AL3G26150 TTTTTTTTTTTTT-----TTCTATGCACCTAATGAACC-CAACCCCTCTGT
 Bostr.28625s030 -----TTTTTTTTTT-CC-----CTCTGCACCTAATGAACA-CAGCCCTCTCTGT
 Bol040427 -----TTTTTT-----TTCTGCACTAATGAACC-CAACCCCTCTGT
 Brara.E02725 -----TTTTTT-----TTCTGCACTAATGAACC-CAACCCCTCTGT
 Cagra.0736s0034 -----TTTTTTTTTT-CT-----TTCTGTACTAATGAACC-CAACCCCTCTGT
 Thhalv10020873m -----TTTTTTTTCC-TTCTTTTTTTTTCCTCTGAGTGAAC-CAACCCCTCTGT
 Carubv10013860m -----TTTTTTTTTTGCT-----TTCTGTACTAATGAACC-CAACCCCTCTGT

cons 

AT3G13960|Chr3_ A-TATTTCTGATTCCTCACATGCTTCCTCTCTTTTTTATCCGAAAACCTTTCTTCA---G
 Araha.4235s0002 A-TATTTCTGATTCCTCACATGCTTCCTCTCTTTTTTATCCGAAAACATTTTTTTTCAG
 AL3G26150 A-TATTTCTGATTCCTCACATGCTTCCTCTCTTTTTTATCCGAAAACCTTTTTTTTCAG
 Bostr.28625s030 A-TATTTCTGATTCCTCACATGCCTTCTCTCTTTTTTATCCGAAAACCTTTTTTCAA-----
 Bol040427 AGTATTTCTGATTCCTCACATGCCTTCCTCTCTTTCTTATTCTATTTCTATAAAAATAATG-
 Brara.E02725 AGTATTTCTGATTCCTCACATGCCTTCCTCTCTTTCTTATTCTATTTCTATAAAAATAATG-
 Cagra.0736s0034 A-TATTTCTGATTCCTCACATGCCTTCCTCTTTTTTCTTTCTTATTCTATTCCTCTCTCAATAT
 Thhalv10020873m A-TATTTCTGATTCCTCACATGCCTTCTCTCTTTCTTATTCTATTTCTATAATGCCAAAA-

Carubv10013860m	A-TATTTCTGATTCTTCACATGCCCTTCTCTTTTTCTTTCTTTATTCCTCCTCTAAATAT
cons	* ***** * * ** * ** *
AT3G13960 Chr3	-----TA-----AAAACCA--ATGCCGAAA-----
Araha.4235s0002	-----TA-----AAAATA--ATGCCGAAA-----
AL3G26150	-----TA-----AAAATA--ATGCCGAAA-----
Bostr.28625s030	-----TTGTATAGATTGATAAAATA--ATGCCGATA--TA-----
Bol040427	-----CCTGA-A-----
Brara.E02725	-----CCTGG-A-----
Cagra.0736s0034	ATATATAAT-TTGTATAAATGATAAAATTAGGGATGTCGATATAGAAATATATATATATA
Thhalv10020873m	-----A-----
Carubv10013860m	TTAAATTAGTTTGTATAAATGATAAAATTAGGGATGTTGCGCGATATAGAAAAATATATA
cons	*****

	Región V
AT3G13960 Chr3	---AAATACATAAATAAACAAGCAAAAATATCTAACATTTTTTA---TATAAAAGGACAAAAG
Araha.4235s0002	---AAATACATAAATAAACAAGCAAAAATATCTAACATTTTTTA---TATAGAAAAGGACAAAAG
AL3G26150	---AAATATTAATAAATAAACAAGCAAAAATATCTAACATTTTTTA---TAGAAAAGGACAAAAG
Bostr.28625s030	---AAATATTTAATAAATAAACAAGCAAAAATATCTAACATTTTTT-----AAAAGGACAAAAG
Bol040427	---AAATATTTAATAAATAAACAAGCAAAAATATTTAACACTTTG-----AAAAAGAACAAAAG
Brara.E02725	---AAATATTTAATAAATAAACAAGCAAAAATATTTAACACTTTG-----AAAAAGGACAAAAG
Cagra.0736s0034	TTTAATAAATAAATAAACAAGCAAAAATATCTAACATTTTTTGTGTTAATAAAGGACAAAAG
Thhalv10020873m	---AAATATTTAATAAATAAACAAGCAAAAATATCTAACATTTTT-----AAAAAGAACAAAAG
Carubv10013860m	TTTAAATCA--AAATAAACAAGCAAAAATATCTAACATTTTTTGTGTTAATAAAGGACAAAAG
cons	* * * ***** ** ***** *****

AT3G13960 Chr3	TACTTT---CACTTCACTTGAACCAAAACAACCTAGTCCCCTTCTT-TATCCAATGGTCTCT
Araha.4235s0002	TACTTT---CACTTCACTTGAACCAAAACAACCTAGTCCCCTTCTT-TATCCAATGGTCTCT
AL3G26150	TACTTT---CACTTCACTTGAACCAAAACAACCTAGTCCCCTTCTT-TATCCAATGGTCTCT
Bostr.28625s030	TACTTT---CACTTCACTTGAACCAAAACAACCGAGTCCCCTTCTTTTATCCAATGGTCTCT
Bol040427	TACTTT---CACTTCACTTGAACCAAAACAACCTAGTCCCCTTCTT-TATCCAATGGTCTCT
Brara.E02725	TACTTT---CACTTCACTTGAACCAAAACAACCTAGTCCCCTTCTT-TATCCAATGGTCTCT
Cagra.0736s0034	TACTTTTACACATCGTTGCAACCAAAACAACCTAGTCCCCTTCTT-TATCCAATGGTCTCT
Thhalv10020873m	TACTTT---CACTTCACTTGAACCAAAACAACCTAGTCCCCTTCTT-TATCCAATGGTCTCT
Carubv10013860m	TACTTTTACACATCACTTGAACCAAAACAACCTAGTCCCCTTCTT-TATCCAATGGTCTCT
cons	***** ** * ***** ***** ***** *****

AT3G13960 Chr3	CCCCTGCTCTCTATTTCTCATCTAAACACCCTTTCTTTCTTTCTTATTTACCATTTTGCACA
Araha.4235s0002	CCCCTGCTCTCTATTTCTCATCTAAACACCCTTTCTTTCTTTCTTATTTACCATTTTGCAC
AL3G26150	CCCCTGCTCTCTATTTCTCATCTAAACACCCTTTCTTTCTTTCTTATTTACCATTTTGCAC
Bostr.28625s030	TCCCTGCTCTCTATATCTCATCTA-ACACCCTCTCTTATTCTTATTTACCATTTTGCAC
Bol040427	TGACTGCTCTCTATATCTCAGCTAAATACCCTTTCTTTCTTTCTTATTTACCATGATGACAC
Brara.E02725	TGACTGCTCTCTATATCTCAGCTAAATACCCTTTCTTTCTTTCTTATTTACCATGATGACAC
Cagra.0736s0034	TCCCTGCTCTCTATTTCCCCTATCTAAACACCCTTTCTTTCTTTCTTATTTACCATTTGCAC
Thhalv10020873m	TCCCTGCTCTCTATTTATCATCTAAACACCCTTTCTTTCTTTCTTAAATACCATTTTGCAC
Carubv10013860m	TCCCTGCTCTCTATTTCCCCTATCTAAACACCCTTTCTTTCTTTCTTATTTACCATTTGCAC
cons	***** ** * * ***** * ** ***** ***** * **

AT3G13960 Chr3	CTTATGTAAGAGATGTTAAGAAG-----
Araha.4235s0002	CTTATGTAAGAAAATGTTAAGAAG-----
AL3G26150	CTTATGTAAGAAAATGTTAAGAAA-----
Bostr.28625s030	CTTTTGAAA-----TAAACCAACATTTCTA---TGTAAGATGTTAATA
Bol040427	CTTATCAAAACA-----CACCACATATTTCTACATA---TATCACCATGTAAGAAA
Brara.E02725	CTTATCAAAACA-----CACCACATACTTCTACATA---TATCACCATGTAAGAAA
Cagra.0736s0034	CTTATTTTTTATTT-ACAAAAAAGAAACCACATTTTCTA---TGCAATATGTTAATA
Thhalv10020873m	CTTTAGAAATA-----GAAGAGTGAAGACCACATTTCTTTCTATATCACCATGTAAG
Carubv10013860m	CTTATGTTATACAGAAAAAAGAAACCACATTTTCTA---TGCAATATGTTAATA
cons	***

AT3G13960 Chr3	-----AAAATGTGAAA---ATTTAGTAAAATCTCTCTTTTGTATTGTC
Araha.4235s0002	-----AAAATGTGAGA---TTTAGTAAAATCTCTTTTTTCTATTGTC
AL3G26150	-----AAAATGTGAGA---AGTAAAATCTCTTTTCTATTGTC
Bostr.28625s030	G-----AAAATGTGAAA---TTGTAAATCTTTGTTTCTATTGTC

Bol1040427 CTAATAAACTTTGACAAAAAATGAATGGTCAAATATTAAATTTACCTTGTTCCTTTAGA
 Brara.E02725 CTAATAAACTTTGACAAAAA-ATGAATTGTCAAATATTAAATTTACCTTGTTCCTTTAGA
 Cagra.0736s0034 G-----AAAACAAAAT-----TTGTAAAAA-----TCTTTTGTGTC
 Thhalv10020873m CTATA--ACGTTGACAAAAAATATGAAA---T--GT--AAGCTTTACTTTTTTTTGTGA
 Carubv10013860m G-----AAAACAAAAT-----TTGTAAAAA-----CTTTTGTGTC

cons ** * ** *

AT3G13960|Chr3_ GTCAGAACTGTAAAAT---AA-TCTTACTCTTTTTCAAGTCAGCATATAAGTTTGGTTTCTT
 Araha.4235s0002 GTCAGAACTGTAAAATCTAAA-TATTACTCTTTTTCAAGTCAGCAAAAAAGTTTGGTTTCTT
 AL3G26150 GTCAGAACTGTAAAATCTAAA-TATTACTCTTTTTCAAGTCAGCAAAAAAGTTTGGTTTCTT
 Bostr.28625s030 GTCAGAGACTGTAAAATCTAAA-TATTACTCTTTTTCAAGTCAGCAAAAAAGTTTGGTTTCTT
 Bol1040427 GTCAGCAAAGCGTGAATATTTTCAATTTAATTTT-----AAAAAGTTTGATTCTCTC
 Brara.E02725 GTCAGCAAAGCGTGAATATTTTCAATTTAATTTT-----TAAAAGTTTGATTCTCTC
 Cagra.0736s0034 GTCAGAACTGTAAAATCTAAAATATTACTCTTTTTCAAGTCAGCAAAAAAGTTTGGTTTCTT
 Thhalv10020873m GTAACGCAGCGCAAACCGTAAA-TATTTATGTATCTTTAGT---TAAAAAGTTTGGTTCTTT
 Carubv10013860m GTCAGAACTGTAAAATCTAAAATATTACTCTTTTTCAAGTCAGCAAAAAAGTTTGGTTTCTT

cons ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AT3G13960|Chr3_ C-TCCCGAGTCAGAGATT-CGTGC-AGTGATGATACAAGAAGCTTATCCGAATTCCTTTTCAT
 Araha.4235s0002 CTTCCCGAGTCAGAGATT-CGTGCCAGTGATGATACAAGAAGCTCATTCCGAATTCCTTTTCAT
 AL3G26150 CTTCCCGAGTCAGAGATT-CGTGCCAGTGATGATACAAGAAGCTCATTCCGAATTCCTTTTCAT
 Bostr.28625s030 CTTCTCGAGTCAGAGATT-CGTG-CAGTGATAC---AAGAAGCTCATTCCGAATTCCTTTTCAT
 Bol1040427 TTTATCGAGTCAGAGATT-TGTG-CAGTGATAC-----AAGAAGCTCATTCCGAATTCCTTTTCAT
 Brara.E02725 TTTACCGAGTCAGAGATT-TGTG-CAGTAATAC-----AAGAAGCTCATTCCGAATTCCTTTTCAT
 Cagra.0736s0034 CTTCTCGAGTCAGAGATT-CGTG-CAGTGATACACAAGAAGCTCATTCCGATTCCTTTATCA
 Thhalv10020873m CTTCCCGAGTCAGAGATT-TGTG-CAGTGATAC---AAGAAGCTCATTCCGAATTCATTAAT
 Carubv10013860m CTTCTCGAGTCAGAGATT-CGTG-CAGTGATACACAAGAAGCTCATTCCGATTCCTTTATCA

cons * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AT3G13960|Chr3_ AAATACTCGTATTTCTTCTTTTCTTTTCTTTT--TTTAAACATCTATCTGTTCTTCT
 Araha.4235s0002 AAATACTCGTATTTCT-----TC-TTT--TTTACATCTATCTGTTTCTTCT
 AL3G26150 AAATACTCGTATTTCT-----TCTTTT--TTTACATCTATCTGTTTCTTCT
 Bostr.28625s030 GAATACTGTATTTCT-----TTTCTTTTACATCTATCTGTTTCTTCT-T
 Bol1040427 -----TCGTCAAT-----TCTTTT--TTTCAACACATCTACAGTTGTT
 Brara.E02725 -----TCGTCAAT-----TCTTTT--TTTCAACACATCTATCAGTTGTT
 Cagra.0736s0034 TAAATAAAATACTTGT-----AG-----TTTCAACATCTATCAGTTGTT
 Thhalv10020873m AAATACTCGTCAATTC-----TGTTTT--TTTCAACATCTATCAGTTGTT
 Carubv10013860m TAAATAAAATACTTGT-----AG-----TTTCAACATCTATCAGTTGTT

cons * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AT3G13960|Chr3_ TGCATCTATCTGATTTTCTCTGTCCTTTAGACAGTA-----ATAACAGA---GCTCA
 Araha.4235s0002 TGCATCTATCTGATTTTCTCTGTCCTTTAGACAGTA-----ATAACAGA---GCTCA
 AL3G26150 TGCATCTATCTGATTTTCTCTGTCCTTTAGACAGTA-----ATAACAGA---GCTCA
 Bostr.28625s030 TGCATCTATCTGATTTCCCTCTGTCCTTTAGACTGTA-----ATAACAGA---GCTCA
 Bol1040427 TTTATCTATCTGATTTTCACTGCGC--TAGTCAGTA-----ATATCAGG---GTTCA
 Brara.E02725 TTTATCTATCTGATTTTCACTGCGC--TAGTCAGTA-----ATATCAGG---GTTCA
 Cagra.0736s0034 -----TATTTCCCTGTGCG--TAGACAGTAGCGTATTTATTTACAGA---GCTCA
 Thhalv10020873m TTTATCTATCTGATTTTCTACTGTCCTTTAGACAGTA-----ATACCAGCAGGGTCTCA
 Carubv10013860m -----TATTTCCCTGTGCG--TAGACAGTAGCGTATTTATTTACAGA---GCTCA

cons ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AT3G13960|Chr3_ CTAATGTAA--TAAAT-----AAAAAATGAGCTCAATAAAAAGGT
 Araha.4235s0002 CTAATGTGTAATAAAC-----AAAAAATGAGCTCAATAAAAAGGT
 AL3G26150 CTAATGTGTA--TAAA-----CAAAAAATGAGCTCAATAAAAAGGT
 Bostr.28625s030 CTAATGTAA--TAAACGAAA-----AATGAAAAAATGAGCTCAATA--AAAAG
 Bol1040427 ATAAATGTAA--ATAATGTTTT-----AAAAGGAGTTTCAATAAAGAGG
 Brara.E02725 ATAAATGTAA--ATAATGTTTT-----AAAAGGAGTTTCAATAAAGAGG
 Cagra.0736s0034 CTCATGTAA--TAAACAAAAGAAAA-----ACAATGAGCTTAATAGAAAAGG
 Thhalv10020873m CTGAATTTTAAATTA-----AAAAAATGAGCTCATTAATAAAGG
 Carubv10013860m CTCATGTAA--TAAACAAAAGAAAA-----AATGAGCTTAATAGAAAAGG

Región IV

cons * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AT3G13960|Chr3_ AAATGGCACTCATTTTTAGGCCATCAAGTGTGGGATACAGCTGAAATTAAAAAG---CGGTC
 Araha.4235s0002 AAATGGCACTCATTTTTAGGCCATCAAGTGTGGGATACAGCTGAAATTAAAAAG---CGGTC
 AL3G26150 AAATGGCACTCATTTTTAGGCCATCAAGTGTGGGATACAGCTGAAATTAAAAAG---CGGTC
 Bostr.28625s030 AAATGGCACTCATTTTTAGGCCATGAAGTGTGGGATACAGCTGAAATTAAAAAG---CGGTC
 Bol040427 AAATGGCACACATTTTTAGGCCATCAAGTATTGGGATACAGCTGAAATTTAAAAGA-GCATC
 Brara.E02725 AAGTGGCACACATTTTTAGGCCATCAAGTATTGGGATACAGCTGAAATTTAAAAGA-GCATC
 Cagra.0736s0034 AAATGGCACTCATTTTTAGGCCATCAAGTGTGGGATACAGCTGAAATTATAAAG-T-CGGTC
 Thhalv10020873m AAACGGCACTCATTTTTAGGCCATGGAGTATTGGGATACAGCTGAAATTTAAAAAAGGCATC
 Carubv10013860m AAATGGCACTCATTTTTAGGCCATCAAGTGTGGGATACAGCTGAAATTATAAAG-T-CGGTC

cons ** ***** ***** * ** ** **

AT3G13960|Chr3_ AGCTCAAAGGAAAAATA--AATAAAAAAGATCCCAAAAATCAATGCACTTTTATAGAAAA
 Araha.4235s0002 AGCTTAAAGGAAAAAAT-----AAAAAGATCCCAAAAATCAATGCACTTTTATATATA
 AL3G26150 AGCTTAAAGGAAAAAAT-----AAAAAGATCCCAAAAATCAATGCACTTTTATATA
 Bostr.28625s030 AGCTCAAAGGAAAGAA-----AATAAAAAAGATCCCAAAAATCAATGCACTTT-----AAA
 Bol040427 TGTTCAAGGAAAGAA-----AAAAAGATCCCAAAAATCAAAATTTATTATATAACT
 Brara.E02725 TGTTCAAAGGAAAGAA-----AAAAAGATCCCAAAAATATACAAATTTATTATGATAACT
 Cagra.0736s0034 AGCTCAAAGGAAAGAACT--AATAAAAAAGATCCCAAAAATCAATGCACTCTTTT--AAA
 Thhalv10020873m TGCTCAAAGGTTGAA-----AATAAAAAAGATCCCAAAAATCAATGCACTTTTAA----GAA
 Carubv10013860m AGCTCAAAGGAAAGAACTAATAAAAAAGATCCCAAAAATCAATGCACTCTTTT-TAAAA

cons * * **** ** ***** ** *

AT3G13960|Chr3_ A-----ATACACATAATTTCAAAAAATACT--TAAATTTGA-----
 Araha.4235s0002 AAAAAACACACAATAAT---TATATATAGTTTCAAATAAACGAATAGAAAAAA-----
 AL3G26150 AAAAAACACACAATAATTTACATATATATAGTTTCAAATAAACGAATATAAAAAAA-----
 Bostr.28625s030 AAAAAACACACAATAAGTTATATATA----GTTTCAAATAAATTAATTTTAA-----
 Bol040427 TAAAA-----TCAAAAATAAAAAGGTTAATATTGA-----
 Brara.E02725 TAAAA-----TAAAAAAAAGGTTAATATTGA-----
 Cagra.0736s0034 AACAAAACACAATAAGTTATATATATAGAGTTTCATAATAAAATCAACAATAAAAAA----AA
 Thhalv10020873m AAAAAATACAAATGGTTATAGGTGTATAAATTCAAAATAAT-----AAAAAA-----
 Carubv10013860m AACAAAACACAATAAGTTATATATATAGAGTTTCATAATAAAATCAACAATATATAAAAAAA

cons ***** ** *

AT3G13960|Chr3_ ---AAAATAAG-A---TGAAGAAAGGATTGAGA-----AGAGAGGAAAG
 Araha.4235s0002 ---TGAATAAT-A---TGAAGAA-AGATTGAGA-----AGAGAGGAAAG
 AL3G26150 ---TGAATAAT-A---TGAAGAA-AGATTGAGA-----AGAGAGGAAAG
 Bostr.28625s030 AAATGGGTAATT-T---GAAGAA-AGATTGAGA-----AGAGAGGAAAG
 Bol040427 ---AGACTA---T---TGAGAAA-AATTAAGGG-----AGAGAGGAAAG
 Brara.E02725 ---AGACTA---T---TGAGAAA-AATTAAGGG-----AGAGAGGAAAG
 Cagra.0736s0034 AAAGAGAGTAATTTTGAAGAG-----AGAGAGGAAAG
 Thhalv10020873m ---GGGGTAAT-A---TTGAAGA-AGATTGAGA-----AGAGAGGAAAG
 Carubv10013860m AGAGAGAGTAATTTTGAAGAGAAA-AGATTGAGAGAGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGAAAG

cons * ** ** **

Región III

AT3G13960|Chr3_ AGTAGTCAGAGAGACAGGAGCATCAAGTGTGCAGAAGAAGCAACAGGAACACTGGGCCT-GA
 Araha.4235s0002 AGTAGTCAGAGAGACAGGAGCATCAAGTGTGCAGAAGAAGCAACAGGAACACTGGGCCT-GA
 AL3G26150 AGTAGTCAGAGAGACAGGAGCATCAAGTGTGCAGAAGAAGCAACAGGAACACTGGGCCT-GA
 Bostr.28625s030 AGTAGTCAGAGAGACAGGAGCATCAAGTGTGCAGAAGAAGCAACAGGAACACTGGGCCT-GA
 Bol040427 AGTAGTCAGAGAGACAGGAGCATCAAGTGTGCAGAAGAAGCAACAGGAACACTGGGCCT-GA
 Brara.E02725 AGTAGTCAGAGAGACAGGAGCATCAAGTGTGCAGAAGAAGCAACAGGAACACTGGGCCT-GA
 Cagra.0736s0034 AGTAGTCAGAGAGACAGGAGCATCAAGTGTGCAGAAGAAGCAACAGGAACACTGGGCCTGGA
 Thhalv10020873m AGTAGTCAGAGAGACAGGAGCATCAAGTGTGCAGAAGAAGCAACAGGAACACTGGGCCT-GA
 Carubv10013860m AGTAGTCAGAGAGACAGGAGCATCAAGTGTGCAGAAGAAGCAACAGGAACACTGGGCCTGGA

cons ***** ** **

AT3G13960|Chr3_ GTCTCTTCAGATTTGCCAGTCTTTATAGGACCACACTCTCTTC-----
 Araha.4235s0002 GTCTCTTCAGATTTGCCAGTCTTTATAGGACCACACTCTCTTC-----
 AL3G26150 GTCTCTTCAGATTTGCCAGTCTTTATAGGACCACACTCTCTTC-----
 Bostr.28625s030 GCCTCTTCAGATTTGCCAGTCTTTATAGGACCACACTCTCATCTCTTACATACATTTTATCT
 Bol040427 GTCTCTTCAGATTTGCCAGTCTTTATAGGACCACACTCTCTTCCTCTCTTACATTTTATC
 Brara.E02725 GTCTCTTCAGATTTGCCAGTCTTTATAGGACCACACTCTCTTCCTCTCTTACATTTTATC
 Cagra.0736s0034 CTCTCTTCAGATTTGCCAGTCTTTATAGGACCACACTCTCACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC
 Thhalv10020873m GTCCCTTCAGATTTGCCAGTCTTTATAGGACCACACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC
 Carubv10013860m CTCTCTTCAGATTTGCCAGTCTTTATAGGACCACACTCTCACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC

cons * ***** **

Región II

AT3G13960|Chr3_ -----TTCATCCCCCTTACATACATTTTATCTAT-----TTTACATTTTACAATATTG
 Araha.4235s0002 -----TTCATCCCCCTA-CATACATTTTATATTTTATCTATTTTAAACATTTACAATATTG
 AL3G26150 -----TTCATCCCCCTA-CATACATTTTATATTTT-TTATCTATTTTAAACATTTACAATATTG
 Bostr.28625s030 -----AT-----TTAACATTTACAATATTG
 Bol040427 TATC-----CATCTATTTTAAACATTAAACAATATTG
 Brara.E02725 TATC-----TATCTATTTTAAACATTAAACAATATTG
 Cagra.0736s0034 TTCTCCTTCATCCCCCTA-CCTTACC-----TACATATTTTACAATATTG
 Thhalv10020873m -----ATCTATTTTAAACATTTACAATATTG
 Carubv10013860m TTCTCCTTCATCCCCCTA-CCTTACC-----TACATATTTTACAATATTG

cons * * ** *****

AT3G13960|Chr3_ GATATTTTAAATGTTGTTTTGATTTTACACTACATGGCAA-ACTCCTTAAAAGCTCTTGTCCT
 Araha.4235s0002 GATATTTTAAATGTTGTTTTGATTTTACACTACATGGCAA-ACTCCTTAAAAGCTCTTGTCAT
 AL3G26150 GATATTTTAAATGTTGTTTTGATTTTACACTACATGGCAA-ACTCCTTAAAAGCTCTTGTCAT
 Bostr.28625s030 GATATTTTAAATGTTGTTTTGATTTTACACTACATGGCAAAACTCCTTAAAAGCTCTTGTCCT
 Bol040427 GATATTTTAAATGTTGTTTTGATTTTACACTACATGGCAA-ACCCCTTAAAAGCTCTTGTCCT
 Brara.E02725 GATATTTTAAATGTTGTTTTGATTTTACACTACATGGCAA-ACCCCTTAAAAGCTCTTGTCCT
 Cagra.0736s0034 GATATTTTAAATGTTGTTTTGATTTTACACTACATGGCAA-ACTCCTTAAAAGCTCTTGCTT
 Thhalv10020873m GATATTTTAAATGTTGTTTTGATTTTACACTACATGGCAA-ACTCCTTAAAAGCTCTTGTCCT
 Carubv10013860m GATATTTTAAATGTTGTTTTGATTTTACACTACATGGCAA-ACTCCTTAAAAGCTCTTGCTT

cons ***** ** ***** *

AT3G13960|Chr3_ GATGTGATTCTTTTCT
 Araha.4235s0002 GATGTGATTCTTTTCT-----TCTATTTATTTTGT
 AL3G26150 GATGTGATTCTTTTCT-----TCTATTTATTTTGT
 Bostr.28625s030 GATGTGATTCTTTCTTG-----TTTTTTGTTCTT
 Bol040427 CATCTGACATTTTCTTGA-----CATCCATCTCCATTAGATTTCTTTTATGAATGTTT
 Brara.E02725 CATCTGACATTTTCTTGA-----CATCTATCTCCATTAGATTTCTTTTATGAATGTTT
 Cagra.0736s0034 GATTTGATTCTTTTCTA-----TTCTTTTCTTCTTCT
 Thhalv10020873m CTTATGATATATATATATATATATATTTATTTATATTTGTT
 Carubv10013860m GATTTGATTCTTTTCTA-----TTCTTTTCTTCTTCT

cons * * * *

AT3G13960|Chr3_ -----
 Araha.4235s0002 -----
 AL3G26150 -----
 Bostr.28625s030 -----
 Bol040427 GTGATTTAACTCTTTGATTTAACTACCAACCATATAAAAATCATGATTTCTTTTATTAATATT
 Brara.E02725 GTGATTTAACTCTTTGATTTAACTATCAACCATACAAAATCATGATTTCTTTTATTAATA--
 Cagra.0736s0034 -----
 Thhalv10020873m -----
 Carubv10013860m -----


cons

AT3G13960|Chr3_ ----TTCAACACTGTCTAAATATCTCTC-----
 Araha.4235s0002 -TCTTTTTAACACTGTCTATATATCTCTC-----
 AL3G26150 -TCTTTTTAACACTGTCTATATATCTCTC-----
 Bostr.28625s030 -----TTTATCTCTC-----
 Bol040427 TTCTCCCAAATATCTTATCTTCTCTAATTTTTTCATAGTAAGACTAGTTACAATGGGGAT
 Brara.E02725 -----TTTTT-----
 Cagra.0736s0034 -----TTTATCTCTT-----
 Thhalv10020873m -TTTTTTGACATAACTTATCTATCTTT-----
 Carubv10013860m -----TTTATCTCTT-----

cons

AT3G13960|Chr3_ -----
 Araha.4235s0002 -----
 AL3G26150 -----
 Bostr.28625s030 -----
 Bol040427 GTTAAATCATTTTTCAACAGTTAATAGCTACACCGAAGTAGTTGAAAACCAAATAATCT

Brara.E02725 -----
 Cagra.0736s0034 -----
 Thhalv10020873m -----
 Carubv10013860m -----

cons 

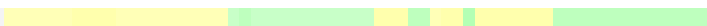
AT3G13960|Chr3_ -----TCT-----
 Araha.4235s0002 -----TCT-----
 AL3G26150 -----TCT-----
 Bostr.28625s030 -----TCT-----
 Bol040427 GAGGTGGATTTCATGTAGTTAAAAGTATTCACATGTTGAATACTCACAGTGGGATCCATCT
 Brara.E02725 -----
 Cagra.0736s0034 -----TCT-----
 Thhalv10020873m -----TCT-----
 Carubv10013860m -----TCT-----

cons 

AT3G13960|Chr3_ T-----CTTTGTGATCACTCT-TTGATTATTAACT-----TTCTGA
 Araha.4235s0002 -----
 AL3G26150 TGAAATGTATAATGAAATGTTTGTGATAGCTCT-TTGATTATTAACT-----CTTTGA
 Bostr.28625s030 TAAATTCCTTAATGAATGTTTGTGATAAATC--TTTGATTATTAACACATATTATATAAA--
 Bol040427 TATTATTTTAAATTTATAGTGCATCTTGAATCTTTAA-----
 Brara.E02725 -----
 Cagra.0736s0034 TAAAAATTTTAAATGAATATCTTTTGATAAACTCGTTGAGTTTATAACACATACTATATAATA
 Thhalv10020873m --TATTTTTTTATATTTTTTGTGAAAGAACTCTTTTTTTTATAAATCATGTATTCGTTTTGA
 Carubv10013860m TAAAAATTTAATGAATATTTTTTGATAAACTCGTTGAGTTTATAACACATACTATATAATA

cons 

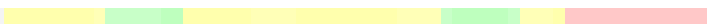
AT3G13960|Chr3_ TTACCA-----TTC--CCCCAAATA-----
 Araha.4235s0002 -----
 AL3G26150 TTAACA-----TTC--CCC-CAAAATA-----
 Bostr.28625s030 -----TAACATGTTTCGT-TTGATTAAACATTC--GAC-CAAAATA-----
 Bol040427 -----AGTCAATTTATCTTATAATAAATATATATTT--TG-TAAAAATA-----
 Brara.E02725 -----CT--CC-CAAAATA-----
 Cagra.0736s0034 TAAATAAGTATCATGTTTCGT-TTGATTAAACATTGTGGAT-CAAAATA-----
 Thhalv10020873m CTAATA-----TTC--CCT-TAAAACACATTATTTTTTTAT
 Carubv10013860m TAAATAAGTATCATGTTTCGT-TTGATTAAACATTGTGGAT-CAAAATA-----

cons 

AT3G13960|Chr3_ -----AACCTAC-----TAGA--GTGTGACTA
 Araha.4235s0002 -----
 AL3G26150 -----AACCTAC-----TAGA--GTGTGACTA
 Bostr.28625s030 -----AACCTAC-----TAGA--GTGTGACTA
 Bol040427 -----ATTATATGAAAATTCATCATTTTTAGTGGTTTATAAATAGA--GATTTGGTT
 Brara.E02725 -----CTTATAT-----TTC
 Cagra.0736s0034 -----AACCTAC-----TAGATCAGTGTCACTA
 Thhalv10020873m ATTTAATATAGTCATAA-----GAGA--GTGTGACGA
 Carubv10013860m -----AACCTAC-----TAGATCAGTGTCACTA

cons 

AT3G13960|Chr3_ ATTGAT-----AGTAATCTCTATTGTGAATAATC---TTTTAT-----
 Araha.4235s0002 -----
 AL3G26150 GCTAATATTTGTATACAGTAATCTCTATTCTGTAATAAAAAAAAAATTTAT-----
 Bostr.28625s030 ATTGTAAT-----ACTAATCTCTATTCTCTACTAAT---TATAT-----
 Bol040427 TATTTGATTTGGATACATAAAAAATTTTTCTTAATATAAGATAAAATATGGGATAGAATGTT
 Brara.E02725 TCTAATTTGT-----
 Cagra.0736s0034 ATTGTAAT-----AGTAAGAGTG-----TGATC-----TTTAT-----
 Thhalv10020873m AATGTAAT-----AGTAATCTCCGTTCTGTAATAACT-----TTAT-----
 Carubv10013860m ATTGTAAT-----AGTAAGAGTG-----TGATC-----TTTAT-----

cons 

AT3G13960|Chr3_ -----

```
Araha.4235s0002 -----
AL3G26150 -----
Bostr.28625s030 -----
Bol040427      G A A T T T A T T A A A G T A G A A T A A A A T T G A A A A T T A T T G A T G T A A T A G G T G G A G A A A G A G A A G
Brara.E02725 -----
Cagra.0736s0034 -----
Thhalv10020873m -----
Carubv10013860m -----
```

cons

```
AT3G13960|Chr3 -----
Araha.4235s0002 -----
AL3G26150 -----
Bostr.28625s030 -----
Bol040427      G T G A G G T G G A T T G A T A A A A G G T G T A A G G T T G A A T A T T C C A A C A A A T A T A C A T A G T C T A A T
Brara.E02725 ----- T T C A T A G T A A T
Cagra.0736s0034 -----
Thhalv10020873m -----
Carubv10013860m -----
```

cons

```
AT3G13960|Chr3 ----- C T T C C T C A A T A C A A A A --- A A G T A G G G T A
Araha.4235s0002 ----- A A A --- G T G G G T A T A
AL3G26150 ----- C T T C C T A A A T A C A A A A A A G T G A G G T A T A
Bostr.28625s030 ----- C T C T C C T A A A T A C A A A A --- A T A G G G T A T A
Bol040427      A G A G T G T G A C T A A T T G T A T A G T A A T C T T T G T T C T A T A G T T A A C T A C A - G A --- A A C A T A T T A G
Brara.E02725    A G A G T G T G A C T A A T T G T A T A G T A A T C T T T G T T C T A T A G T T G A C T A C A - A A --- A A A T A T T A G
Cagra.0736s0034 ----- T A C A A T T A A A T A C A - A A --- A A A T A G G G T A
Thhalv10020873m ----- A T T C C C A A A A T A C A - A A --- A A A T A A A G T A
Carubv10013860m ----- T A C A A T T A A A T A C A - A A --- A A A T A G G G T A
```

cons

Región I

```
AT3G13960|Chr3 T A T A T A T A A A A G A G G G A G T G G C C T C G T G T A G A G A A A G A A C C T A G C T A G T --- G T T C A T G C A A T
Araha.4235s0002 T A T A T A T A A A A G A G G G A G T G G C C T C G T G T A G A G G A A G A A C C T A G C T A G T --- G T T C A T G C A A T
AL3G26150      T A T A T A T A A A A G A G G G A G T G G C C T C G T G T A G A G G A A G A A C C T A G C T A G T --- G T T C A T G C A A T
Bostr.28625s030 T A A A T A T A A A A G A G G G A A T G G T C T C G T G A A G A G G A A G A A C C T A G C T A G T --- G T T C A T G C A A T
Bol040427      T A T A T A - T A A A G T G G G T A T G G C C T C G T G A A A A G G T A G A G G C T A G C T A G T --- G T T C A T G C A A A
Brara.E02725    T A T C T A T A A A A G A G G C A T G G C C T C G T T A A A A G G T A G A G G C T A G C T A G T --- G T T C A T G C A A A
Cagra.0736s0034 T A T A T A T A A A A G A G A A T G G T C T C G T G A A G A G G A A G A A C C T A G C T A G T C T T G T T C A T G C A A T
Thhalv10020873m T A T A T A T A A A A G A G G G A A T G G C C T C G T G A A G A G G A A G A A G C T A G C T A G T --- G T T C A T G C A A A
Carubv10013860m T A T A T A T A A A A G A G A A T G G T C T C G T G A A G A G G A A G A A C C T A G C T A G T C T T G T T C A T G C A A T
```

cons ** *

```
AT3G13960|Chr3 T T G C A T C T G A G G A A T A T A T G C T T A --- G A A A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G --- A G A G A
Araha.4235s0002 T T G C A T C T G A G G A A T A T A T G C T T A --- G A A A G A G A A A G A G A G A G A G A --- -----
AL3G26150      T T G C A T C T G A G G A A T A T A T G C T T A --- G A A A G A G A A A G A G G G A G A G A --- -----
Bostr.28625s030 T T G C A T C T G A G G A A T A T A T G C T T T --- A G A G A G A G A G A G A G A G A --- -----
Bol040427      T T G C A T C T G A G G A A T A T A T G T T G A --- G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A
Brara.E02725    T T G C A T C T G A G G A A T A T A T G T T T A --- G A G A G --- A G A G A G --- A
Cagra.0736s0034 T T G T A T C T G A G G A A T A T A T G C T T T --- A G A G T G A G A G A G A G A G A G A --- -----
Thhalv10020873m T T G C A T C T G A G G A A T A T A T G C T T A --- G A G A G A G A G A G G G A G A G A --- -----
Carubv10013860m T T G C A T C T G A G G A A T A T A T G C T T T A G A G T G A G A G A G A G A G T G A G A G A --- -----
```

cons *** *

5'UTR

```
AT3G13960|Chr3 G A G A G A G A G A G A G A T A T C A A A C C A G A G G A A A A G A G T G A C A G A G A A A G --- T G G T --- C A T C T
Araha.4235s0002 ----- G A T A T A T C A A A C C A G A A G A A A G A G T G A C A G A G A A G --- T G G T --- C A T C T
AL3G26150 ----- T A T C A A A C C A G A G G A A A A G A G T G A C A G A G A A G --- T G G T --- C A T C T
Bostr.28625s030 ----- G A T C A A A T T A T A A A G A G G C C A A A A G T G A C A G A G A G G --- T G G T C T --- T C T
Bol040427      G A G A A A G A G A G A A A A T A T C A A A C A A G A G G C A A A G A G T G A C A G A G A G A G T G T T G G T --- C T T C T
Brara.E02725    G C A A A A G A G A G A T A A A T A T C A A A C A A G A G G C A A A G A G T G A C A G A G A G A G T G T T G G T --- C T T C T
Cagra.0736s0034 ----- G A T A T A T C A A A T T A T T --- C A G A G G G A C A G A G A G G --- T G G T C T T T T C T
Thhalv10020873m ----- T C A A A C C A G A G G C A A A A A G T G A C A G A G A A A G --- T G G T --- C T T C T
Carubv10013860m ----- G A T A T A T C A A A T T A T T --- C A G A G G G A C A G A G A G G --- T G G T C T T T T C T
```

```

cons          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
AT3G13960|Chr3_ TTGTCGTCTCTGTCGAAACTCAGGAGCCCTA----ATCTCTGAATCCATCAAGAAAGCTCT
Araha.4235s0002 TTGTCGTCTCTGTCGAAACTCAGGAGCCCTA----ATCTCTGAATCCATCAAGAAAGCTCT
AL3G26150      TTGTCGTCTCTGTCGAAACTCAGGAGCCCTA----ATCTCTGGATCCATCAAGAAAGCTCT
Bostr.28625s030 TTGTCATCTCTGTCGAAACTCAGGAACCCTA----ATCTCTGAATCCATCAAGAAAGCTCT
Bol040427      TTGTCGTCTCTGTCCTAAACTCAGGAACCCTAGATTACCTCTGAAGCTATCAAGAAAGCTCT
Brara.E02725   TTGTCGTCTCTGTCCTAAACTCAGGAACCCTATATTTTCTCTGAAGCTATCAAGAAAGCTCT
Cagra.0736s0034 TTGTCGTCTCTGTCCTAAACTCAGGAACCCTA----ATCTCTGAATCCATCAAGAAAGCTCT
Thhalv10020873m TTGTCGTCTCTGTCCTAAACTCAGGAACCCTAGCTAAATCTCTGAATCTATCAAGAAAGTTCT
Carubv10013860m TTGTCGTCTCTGTCCTAAACTCAGGAACCCTA----ATCTCTGAATCCATCAAGAAAGCTCT

cons          ***** *  *****  ***** * *  ***** * *  ***** * *  ***** **
  
```

```

AT3G13960|Chr3_ TTCTCTTCCTCTTTATGCTTCTGAATTTGCTACATATATAA---ACATATCTGAAGAAAGC
Araha.4235s0002 TATCT-TCCTTCTTTATGCTTCTGATTTTGCTATATATATAA---ACCTCTGAGGAAAGC
AL3G26150      TATCT-TCCTTCTTTATGTTTCTGATTTTGCTACATATATAAATAAAACCTCTGAGGAAAGC
Bostr.28625s030 TATCA----TTTTTTATGCTTTTGCTTTTGCTACATATATAA----ACCTTTGAGGGAAGC
Bol040427      TATTTCTTCTTTTATCTTTGATTTT---CTATATAAAA-----CCCTTTGAGGAAAGC
Brara.E02725   TATTTCTTCTTTTATCTTTGATTTT---CTACATAAAA-----CCCTTTGAGGAAAGC
Cagra.0736s0034 TTTATCTTCTTCTTTTCTGCTTTTCTTTGCTACATATATAA----ACCTTTGAGTGAAGC
Thhalv10020873m TG-----TTTTTATACTCTTCTGATTTTGCTACA---TAA-----CCATTTGAGGAAAGC
Carubv10013860m TTTATCTTCTTCTTTTCTGCTTTTCTTTGCTACATATATAA----ACCTTTGAGTGAAGC

cons          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
  
```

ATG

```

AT3G13960|Chr3_ TAG-----AGAAATAGATGATGAGTCTAAGTGGAGTAGCGG
Araha.4235s0002 TAG-----AGAAGAGATGATGATGAGTCTAAGTGGAGTAGTGG
AL3G26150      TAG-----AGAAGAGATGATGATGAGTCTAAGTGGAGTAGTGG
Bostr.28625s030 TAGAGAGAAGAAAAAGAGAAAGGTACATAGATAAATATGATGAGTCTATCTGGAAGTAGTGG
Bol040427      TAGAAATAAAGAA-----AGATGATGAGTCTAAGTGGAAATGGTGG
Brara.E02725   TAGAGAATAAGAA-----AGATGATGAGTCTAAGTGGAAATGGTGG
Cagra.0736s0034 TAGAGAGAAGAAGAAAGAGAAGAG-----ATGATGAGCCTAAGTGGAAATAGTGG
Thhalv10020873m TAGAGAAGAAGAA-----GA-----AGATGATGAGCTAAGTGGAAATAGTGA
Carubv10013860m TAGAGAGAAGAAGAAAGAGAAGAG-----ATGATGAGCCTAAGTGGAAATAGTGG

cons          ***  ***** **  ***** * *  *****
  
```

```

AT3G13960|Chr3_ GAGAACAATAGGAAGGCTCCATTTACACCAACACAATGGGAAGAAGCTGGAACATCAAGCCCT
Araha.4235s0002 GAGAACAATAGGAAGGCTCCATTTACACCAACACAATGGGAAGAAGCTGGAACATCAAGCCCT
AL3G26150      GAGAACAATAGGAAGGCTCCATTTACACCAACACAATGGGAAGAAGCTGGAACATCAAGCCCT
Bostr.28625s030 GAGAACAATAGAGAGGCTCCATTTACACCAACACAATGGCAAGAAGCTGGAACACCAAGCCCT
Bol040427      GAGAACAATAGAGAGGCTCCATTTACACCAACACAATGGCAAGAAGCTGGAAGATCAAGCCCT
Brara.E02725   GAGAACAATAGAGAGGCTCCATTTACACCAACACAATGGCAAGAAGCTGGAAGATCAAGCCCT
Cagra.0736s0034 GAGAACAATAGAGAGGCTCCATTTACACCAACACAATGGCAAGAAGCTGGAACACCAAGCCCT
Thhalv10020873m GAGATCAATAGAGAGGCTCCATTTACACCAACACAATGGAAAGAAGCTGGAGCATCAAGCCCT
Carubv10013860m AAGAACAATAGAGAGGCTCCATTTACACCAACACAATGGCAAGAAGCTGGAACACCAAGCCCT

cons          ***  ***** ***** ***** ***** ***** * *  *****
  
```

```

AT3G13960|Chr3_ AATCTACAAGTACATGGTCTCTGGTGTCTGTCTCCACCTGAGCTCATCTTCTCCATTAGAAG
Araha.4235s0002 AATCTACAAGTACATGGTCTCTGGTGTCTGTCTCCACCTGAGCTCATCTTCTCCATTAGAAG
AL3G26150      AATCTACAAGTACATGGTCTCTGGTGTCTGTCTCCACCTGAGCTCATCTTCTCCATTAGAAG
Bostr.28625s030 AATTTACAAGTACATGGTCTCTGGTGTCTGTCTCCACCTGAGCTCATCTTCTCCATTAGAAG
Bol040427      AATTTACAAGTACATGGTCTCAGGAGTCTCCTGTCTCCACCTGAGCTCATCTTCTCCATTAGAAG
Brara.E02725   AATTTACAAGTACATGGTCTCAGGAGTCTCCTGTCTCCACCTGAGCTCATCTTCTCCATTAGAAG
Cagra.0736s0034 AATTTACAAGTACATGGTCTCTGGTGTCTGTCTCCACCTGAGCTCATCTTCTCCATTAGAAG
Thhalv10020873m AATTTACAAGTACATGGTCTCTGGTGTCTGTCTCCACCTGAGCTCATCTTCTCCATTAGAAG
Carubv10013860m AATTTACAAGTACATGGTCTCTGGTGTCTGTCTCCACCTGAGCTCATCTTCTCCATTAGAAG

cons          *** ***** ***** ***** ***** ***** *****
  
```

```

AT3G13960|Chr3_ AAGCTTGGACTCTCCTTGGTCTCTAGACTCCTTCCCTCACCAATCCC
Araha.4235s0002 AAGCTTGGACTCTCCTTGGTCTCTAGACTCCTTCCCTCACCAATCCC
AL3G26150      AAGCTTGGACTCTCCTTGGTCTCTAGACTCCTTCCCTCACCAATCCC
Bostr.28625s030 AAGCTTGGACTCTACCTTGGTGTCTAGACTCCTCCCTCACCAATCCC
Bol040427      AAGCTTGGACTCTCCTTGGTCTCTAGACTCCTCCCTCACCAATCCA
Brara.E02725   AAGCTTGGACTCTCCTTGGTCTCTAGACTCCTCCCTCACCAATCCA
Cagra.0736s0034 AAGCTTGGACTCTACCTTGGTCTCTAGACTCCTCCCTCATCAGTCCC
Thhalv10020873m AAGCTTGGACTCTCCTTGGTCTCTAGACTCCTCCCTCACCAATCCC
Carubv10013860m AAGCTTGGACTCTACCTTGGTCTCTAGACTCCTCCCTCATCAATCCC
  
```

CONS ***** ** ***** ***** ***** ** **

BIBLIOGRAFÍA.

10. Bibliografía

Aguirrezabal L, Bouchier-Combaud S, Radziejwoski A, Dauzat M, Cookson SJ, Granier C (2006) Plasticity to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana*: dissection of leaf development into underlying growth dynamic and cellular variables reveals invisible phenotypes. *Plant Cell Environ* **29**: 2216-2227

Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R, Scheres B (2004) The PLETHORA genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* **119**: 109-120

Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M (1997) Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *The Plant cell* **9**: 841-857

Aida M, Ishida T, Tasaka M (1999) Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development (Cambridge, England)* **126**: 1563-1570

Allen E, Howell MD (2010) miRNAs in the biogenesis of trans-acting siRNAs in higher plants. *Seminars in cell & developmental biology* **21**: 798-804

Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC (2005) microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* **121**: 207-221

Andriankaja M, Dhondt S, De Bodt S, Vanhaeren H, Coppens F, De Milde L, Muhlenbock P, Skirycz A, Gonzalez N, Beemster GT, Inze D (2012) Exit from proliferation during leaf development in *Arabidopsis thaliana*: a not-so-gradual process. *Developmental cell* **22**: 64-78

Arvidsson S, Perez-Rodriguez P, Mueller-Roeber B (2011) A growth phenotyping pipeline for *Arabidopsis thaliana* integrating image analysis and rosette area modeling for robust quantification of genotype effects. *The New phytologist* **191**: 895-907

Axtell MJ (2013) Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual review of plant biology* **64**: 137-159

Bargmann BO, Vanneste S, Krouk G, Nawy T, Efroni I, Shani E, Choe G, Friml J, Bergmann DC, Estelle M, Birnbaum KD (2013) A map of cell type-specific auxin responses. *Mol Syst Biol* **9**: 688

Barton MK (2010) Twenty years on: the inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. *Developmental biology* **341**: 95-113

Bazin J, Khan GA, Combier JP, Bustos-Sanmamed P, Debernardi JM, Rodriguez R, Sorin C, Palatnik J, Hartmann C, Crespi M, Lelandais-Briere C (2013) miR396 affects mycorrhization and root meristem activity in the legume *Medicago truncatula*. *Plant J* **74**: 920-934

Beemster GT, De Veylder L, Vercruyssen S, West G, Rombaut D, Van Hummelen P, Galichet A, Grissem W, Inze D, Vuylsteke M (2005) Genome-wide analysis of gene expression profiles associated with cell cycle transitions in growing organs of *Arabidopsis*. *Plant physiology* **138**: 734-743

- Beemster GT, Fiorani F, Inze D (2003) Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends in plant science* **8**: 154-158
- Bertolini E, Verelst W, Horner DS, Gianfranceschi L, Piccolo V, Inze D, Pe ME, Mica E (2013) Addressing the role of microRNAs in reprogramming leaf growth during drought stress in *Brachypodium distachyon*. *Molecular plant* **6**: 423-443
- Boer DR, Freire-Rios A, van den Berg WA, Saaki T, Manfield IW, Kepinski S, Lopez-Vidrieo I, Franco-Zorrilla JM, de Vries SC, Solano R, Weijers D, Coll M (2014) Structural basis for DNA binding specificity by the auxin-dependent ARF transcription factors. *Cell* **156**: 577-589
- Bologna NG, Voinnet O (2014) The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annual review of plant biology* **65**: 473-503
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D (2003) The molecular analysis of leaf senescence--a genomics approach. *Plant biotechnology journal* **1**: 3-22
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. *Plant J* **42**: 567-585
- Byrne ME, Barley R, Curtis M, Arroyo JM, Dunham M, Hudson A, Martienssen RA (2000) *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature* **408**: 967-971
- Byrne ME, Simorowski J, Martienssen RA (2002) *ASYMMETRIC LEAVES1* reveals *knox* gene redundancy in Arabidopsis. *Development (Cambridge, England)* **129**: 1957-1965
- Candaele J, Demuyneck K, Mosoti D, Beemster GT, Inze D, Nelissen H (2014) Differential methylation during maize leaf growth targets developmentally regulated genes. *Plant physiology* **164**: 1350-1364
- Cao D, Wang J, Ju Z, Liu Q, Li S, Tian H, Fu D, Zhu H, Luo Y, Zhu B (2016) Regulations on growth and development in tomato cotyledon, flower and fruit via destruction of miR396 with short tandem target mimic. *Plant Sci* **247**: 1-12
- Casadevall R, Rodriguez RE, Debernardi JM, Palatnik JF, Casati P (2013) Repression of growth regulating factors by the microRNA396 inhibits cell proliferation by UV-B radiation in Arabidopsis leaves. *The Plant cell* **25**: 3570-3583
- Claeys H, Inze D (2013) The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant physiology* **162**: 1768-1779
- Clauw P, Coppens F, De Beuf K, Dhondt S, Van Daele T, Maleux K, Storme V, Clement L, Gonzalez N, Inze D (2015) Leaf responses to mild drought stress in natural variants of Arabidopsis. *Plant physiology* **167**: 800-816
- Cuperus JT, Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, Burke RT, Takeda A, Sullivan CM, Gilbert SD, Montgomery TA, Carrington JC (2010) Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering

RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in Arabidopsis. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 997-1003

Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC (2011) Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *The Plant cell* **23**: 431-442

Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant physiology* **139**: 5-17

Chapman EJ, Carrington JC (2007) Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature reviews* **8**: 884-896

Chapman EJ, Estelle M (2009) Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu Rev Genet* **43**: 265-285

Che R, Tong H, Shi B, Liu Y, Fang S, Liu D, Xiao Y, Hu B, Liu L, Wang H, Zhao M, Chu C (2015) Control of grain size and rice yield by GL2-mediated brassinosteroid responses. *Nature plants* **2**: 15195

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research* **33**: e179

Chen L, Wang T, Zhao M, Tian Q, Zhang WH (2012) Identification of aluminum-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *Planta* **235**: 375-386

Chitwood DH, Guo M, Nogueira FT, Timmermans MC (2007) Establishing leaf polarity: the role of small RNAs and positional signals in the shoot apex. *Development (Cambridge, England)* **134**: 813-823

Choi D, Kim JH, Kende H (2004) Whole genome analysis of the OsGRF gene family encoding plant-specific putative transcription activators in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant & cell physiology* **45**: 897-904

D. Weigel JG. (2002) Arabidopsis : a laboratory manual. In press CSHI (ed.).

Debernardi JM, Mecchia MA, Vercruyssen L, Smaczniak C, Kaufmann K, Inze D, Rodriguez RE, Palatnik JF (2014) Post-transcriptional control of GRF transcription factors by microRNA miR396 and GIF co-activator affects leaf size and longevity. *Plant J* **79**: 413-426

Debernardi JM, Rodriguez RE, Mecchia MA, Palatnik JF (2012) Functional specialization of the plant miR396 regulatory network through distinct microRNA-target interactions. *PLoS genetics* **8**: e1002419

Ding Y, Chen Z, Zhu C (2011) Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*). *Journal of experimental botany* **62**: 3563-3573

Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B (1993) Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development (Cambridge, England)* **119**: 71-84

- Donnelly PM, Bonetta D, Tsukaya H, Dengler RE, Dengler NG (1999) Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of Arabidopsis. *Developmental biology* **215**: 407-419
- Duan P, Ni S, Wang J, Zhang B, Xu R, Wang Y, Chen H, Zhu X, Li Y (2015) Regulation of OsGRF4 by OsmiR396 controls grain size and yield in rice. *Nature plants* **2**: 15203
- Dubois M, Claeys H, Van den Broeck L, Inze D (2017) Time of day determines Arabidopsis transcriptome and growth dynamics under mild drought. *Plant Cell Environ* **40**: 180-189
- Efroni I, Blum E, Goldshmidt A, Eshed Y (2008) A protracted and dynamic maturation schedule underlies Arabidopsis leaf development. *The Plant cell* **20**: 2293-2306
- Efroni I, Han SK, Kim HJ, Wu MF, Steiner E, Birnbaum KD, Hong JC, Eshed Y, Wagner D (2013) Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses. *Developmental cell* **24**: 438-445
- Ellis CM, Nagpal P, Young JC, Hagen G, Guilfoyle TJ, Reed JW (2005) AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in Arabidopsis thaliana. *Development (Cambridge, England)* **132**: 4563-4574
- Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL (2003) Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol* **13**: 1768-1774
- Ercoli MF, Ferela A, Debernardi JM, Perrone AP, Rodriguez RE, Palatnik JF (2018) GIF Transcriptional Coregulators Control Root Meristem Homeostasis. *The Plant cell* **30**: 347-359
- Ercoli MF, Rojas AM, Debernardi JM, Palatnik JF, Rodriguez RE (2016) Control of cell proliferation and elongation by miR396. *Plant signaling & behavior* **11**: e1184809
- Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangl JL, Carrington JC (2007) High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PloS one* **2**: e219
- Ferjani A, Horiguchi G, Yano S, Tsukaya H (2007) Analysis of leaf development in fugu mutants of Arabidopsis reveals three compensation modes that modulate cell expansion in determinate organs. *Plant physiology* **144**: 988-999
- Fina J, Casadevall R, AbdElgawad H, Prinsen E, Markakis MN, Beemster GTS, Casati P (2017) UV-B Inhibits Leaf Growth through Changes in Growth Regulating Factors and Gibberellin Levels. *Plant physiology* **174**: 1110-1126
- Finet C, Berne-Dedieu A, Scutt CP, Marletaz F (2013) Evolution of the ARF gene family in land plants: old domains, new tricks. *Molecular biology and evolution* **30**: 45-56
- Franco-Zorrilla JM, Lopez-Vidriero I, Carrasco JL, Godoy M, Vera P, Solano R (2014) DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 2367-2372
- Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, Garcia JA, Paz-Ares J (2007) Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature genetics* **39**: 1033-1037

- Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, Willemsen V, Blilou I, Heidstra R, Scheres B (2007) PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* **449**: 1053-1057
- Gao F, Wang K, Liu Y, Chen Y, Chen P, Shi Z, Luo J, Jiang D, Fan F, Zhu Y, Li S (2015) Blocking miR396 increases rice yield by shaping inflorescence architecture. *Nature plants* **2**: 15196
- Gao P, Bai X, Yang L, Lv D, Li Y, Cai H, Ji W, Guo D, Zhu Y (2010) Over-expression of osa-MIR396c decreases salt and alkali stress tolerance. *Planta* **231**: 991-1001
- Gascioli V, Mallory AC, Bartel DP, Vaucheret H (2005) Partially redundant functions of Arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Curr Biol* **15**: 1494-1500
- Gepstein S, Sabehi G, Carp MJ, Hajouj T, Neshor MF, Yariv I, Dor C, Bassani M (2003) Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant J* **36**: 629-642
- Gonzalez N, Beemster GT, Inze D (2009) David and Goliath: what can the tiny weed Arabidopsis teach us to improve biomass production in crops? *Current opinion in plant biology* **12**: 157-164
- Gonzalez N, De Bodt S, Sulpice R, Jikumaru Y, Chae E, Dhondt S, Van Daele T, De Milde L, Weigel D, Kamiya Y, Stitt M, Beemster GT, Inze D (2010) Increased leaf size: different means to an end. *Plant physiology* **153**: 1261-1279
- Gonzalez N, Vanhaeren H, Inze D (2012) Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. *Trends in plant science* **17**: 332-340
- Grant CE, Bailey TL, Noble WS (2011) FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics (Oxford, England)* **27**: 1017-1018
- Guan C, Wu B, Yu T, Wang Q, Krogan NT, Liu X, Jiao Y (2017) Spatial Auxin Signaling Controls Leaf Flattening in Arabidopsis. *Curr Biol* **27**: 2940-2950 e2944
- Guilfoyle TJ, Hagen G (2007) Auxin response factors. *Current opinion in plant biology* **10**: 453-460
- Guilfoyle TJ, Ulmasov T, Hagen G (1998) The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. *Cell Mol Life Sci* **54**: 619-627
- Guo M, Thomas J, Collins G, Timmermans MC (2008) Direct repression of KNOX loci by the ASYMMETRIC LEAVES1 complex of Arabidopsis. *The Plant cell* **20**: 48-58
- Hall BG (2013) Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular biology and evolution* **30**: 1229-1235
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Hasson A, Plessis A, Blein T, Adroher B, Grigg S, Tsiantis M, Boudaoud A, Damerval C, Laufs P (2011) Evolution and diverse roles of the CUP-SHAPED COTYLEDON genes in Arabidopsis leaf development. *The Plant cell* **23**: 54-68

- Hay A, Tsiantis M (2010) KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity. *Development (Cambridge, England)* **137**: 3153-3165
- Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy GV, Long JA, Meyerowitz EM (2005) Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Curr Biol* **15**: 1899-1911
- Hewezi T, Baum TJ (2012) Complex feedback regulations govern the expression of miRNA396 and its GRF target genes. *Plant signaling & behavior* **7**: 749-751
- Hibara K, Karim MR, Takada S, Taoka K, Furutani M, Aida M, Tasaka M (2006) Arabidopsis CUP-SHAPED COTYLEDON3 regulates postembryonic shoot meristem and organ boundary formation. *The Plant cell* **18**: 2946-2957
- Hill K (2015) Post-translational modifications of hormone-responsive transcription factors: the next level of regulation. *Journal of experimental botany* **66**: 4933-4945
- Holt AL, van Haperen JM, Groot EP, Laux T (2014) Signaling in shoot and flower meristems of Arabidopsis thaliana. *Current opinion in plant biology* **17**: 96-102
- Honkanen S, Thamm A, Arteaga-Vazquez MA, Dolan L (2018) Negative regulation of conserved RSL class I bHLH transcription factors evolved independently among land plants. *eLife* **7**
- Horiguchi G, Kim GT, Tsukaya H (2005) The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **43**: 68-78
- Hortensteiner S, Feller U (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of experimental botany* **53**: 927-937
- Horward Thomas JLS (1980) Leaf senescence. *Ann Rev Plant Physiol* **31**: 83-111
- Hu J, Wang Y, Fang Y, Zeng L, Xu J, Yu H, Shi Z, Pan J, Zhang D, Kang S, Zhu L, Dong G, Guo L, Zeng D, Zhang G, Xie L, Xiong G, Li J, Qian Q (2015) A Rare Allele of GS2 Enhances Grain Size and Grain Yield in Rice. *Molecular plant* **8**: 1455-1465
- Husbands AY, Chitwood DH, Plavskin Y, Timmermans MC (2009) Signals and prepatterns: new insights into organ polarity in plants. *Genes & development* **23**: 1986-1997
- Inze D, De Veylder L (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* **40**: 77-105
- J. Sambrook DWR. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In Press CSHL (ed.).
- Jarvis P, Chen LJ, Li H, Peto CA, Fankhauser C, Chory J (1998) An Arabidopsis mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science (New York, NY)* **282**: 100-103
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular cell* **14**: 787-799

- Juarez MT, Kui JS, Thomas J, Heller BA, Timmermans MC (2004) microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature* **428**: 84-88
- Kende H, van der Knaap E, Cho HT (1998) Deepwater rice: A model plant to study stem elongation. *Plant physiology* **118**: 1105-1110
- Kerstetter RA, Bollman K, Taylor RA, Bomblies K, Poethig RS (2001) KANADI regulates organ polarity in Arabidopsis. *Nature* **411**: 706-709
- Kidner CA, Martienssen RA (2004) Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature* **428**: 81-84
- Kim J, Lee, B., (2006) GROWTH-REGULATING FACTOR4 of Arabidopsis thaliana is required for development of leaves, cotyledons, and shoot apical meristem. *J Plant Biol* **49**: 463-468
- Kim JH, Choi D, Kende H (2003) The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in Arabidopsis. *Plant J* **36**: 94-104
- Kim JH, Kende H (2004) A transcriptional coactivator, AtGIF1, is involved in regulating leaf growth and morphology in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 13374-13379
- Kim JH, Kim J, Jun SE, Park S, Timilsina R, Kwon DS, Kim Y, Park SJ, Hwang JY, Nam HG, Kim GT, Woo HR (2018) ORESARA15, a PLATZ transcription factor, mediates leaf growth and senescence in Arabidopsis. *The New phytologist* **220**: 609-623
- Kim JH, Woo HR, Kim J, Lim PO, Lee IC, Choi SH, Hwang D, Nam HG (2009) Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in Arabidopsis. *Science (New York, NY)* **323**: 1053-1057
- Kim JS, Mizoi J, Kidokoro S, Maruyama K, Nakajima J, Nakashima K, Mitsuda N, Takiguchi Y, Ohme-Takagi M, Kondou Y, Yoshizumi T, Matsui M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) Arabidopsis growth-regulating factor7 functions as a transcriptional repressor of abscisic acid- and osmotic stress-responsive genes, including DREB2A. *The Plant cell* **24**: 3393-3405
- Koyama T, Furutani M, Tasaka M, Ohme-Takagi M (2007) TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in Arabidopsis. *The Plant cell* **19**: 473-484
- Koyama T, Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M (2010) TCP transcription factors regulate the activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in Arabidopsis. *The Plant cell* **22**: 3574-3588
- Kozomara A, Griffiths-Jones S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research* **42**: D68-73
- Kozuka T, Horiguchi G, Kim GT, Ohgishi M, Sakai T, Tsukaya H (2005) The different growth responses of the Arabidopsis thaliana leaf blade and the petiole during shade avoidance are regulated by photoreceptors and sugar. *Plant & cell physiology* **46**: 213-223
- Kuijt SJ, Greco R, Agalou A, Shao J, t Hoen CC, Overnas E, Osnato M, Curiale S, Meynard D, van Gulik R, de Faria Maraschin S, Atallah M, de Kam RJ, Lamers GE, Guiderdoni E, Rossini L, Meijer

- AH, Ouwerkerk PB (2014) Interaction between the GROWTH-REGULATING FACTOR and KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN families of transcription factors. *Plant physiology* **164**: 1952-1966
- Lee BH, Kim JH (2014) Spatio-temporal distribution patterns of GRF-INTERACTING FACTOR expression and leaf size control. *Plant signaling & behavior* **9**: e29697
- Lee BH, Ko JH, Lee S, Lee Y, Pak JH, Kim JH (2009) The Arabidopsis GRF-INTERACTING FACTOR Gene Family Performs an Overlapping Function in Determining Organ Size as well as Multiple Developmental Properties. *Plant physiology*
- Lee BH, Wynn AN, Franks RG, Hwang YS, Lim J, Kim JH (2014) The Arabidopsis thaliana GRF-INTERACTING FACTOR gene family plays an essential role in control of male and female reproductive development. *Developmental biology* **386**: 12-24
- Lemon B, Tjian R (2000) Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes & development* **14**: 2551-2569
- Li H, Johnson P, Stepanova A, Alonso JM, Ecker JR (2004) Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in Arabidopsis. *Developmental cell* **7**: 193-204
- Li S (2015) The Arabidopsis thaliana TCP transcription factors: A broadening horizon beyond development. *Plant signaling & behavior* **10**: e1044192
- Li S, Gao F, Xie K, Zeng X, Cao Y, Zeng J, He Z, Ren Y, Li W, Deng Q, Wang S, Zheng A, Zhu J, Liu H, Wang L, Li P (2016) The OsmiR396c-OsGRF4-OsGIF1 regulatory module determines grain size and yield in rice. *Plant biotechnology journal* **14**: 2134-2146
- Liang G, He H, Li Y, Wang F, Yu D (2014) Molecular mechanism of microRNA396 mediating pistil development in Arabidopsis. *Plant physiology* **164**: 249-258
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG (2007) Leaf senescence. *Annual review of plant biology* **58**: 115-136
- Lin Y, Lai Z, Tian Q, Lin L, Lai R, Yang M, Zhang D, Chen Y, Zhang Z (2015) Endogenous target mimics down-regulate miR160 mediation of ARF10, -16, and -17 cleavage during somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. *Front Plant Sci* **6**: 956
- Liu D, Song Y, Chen Z, Yu D (2009) Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in Arabidopsis. *Physiologia plantarum* **136**: 223-236
- Liu H, Guo S, Xu Y, Li C, Zhang Z, Zhang D, Xu S, Zhang C, Chong K (2014) OsmiR396d-regulated OsGRFs function in floral organogenesis in rice through binding to their targets OsJM1706 and OsCR4. *Plant physiology* **165**: 160-174
- Liu J, Hua W, Yang HL, Zhan GM, Li RJ, Deng LB, Wang XF, Liu GH, Wang HZ (2012) The BnGRF2 gene (GRF2-like gene from *Brassica napus*) enhances seed oil production through regulating cell number and plant photosynthesis. *Journal of experimental botany* **63**: 3727-3740
- Lloyd AM, Schena M, Walbot V, Davis RW (1994) Epidermal cell fate determination in Arabidopsis: patterns defined by a steroid-inducible regulator. *Science (New York, NY)* **266**: 436-439

Mallory AC, Dugas DV, Bartel DP, Bartel B (2004a) MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr Biol* **14**: 1035-1046

Mallory AC, Elmayan T, Vaucheret H (2008) MicroRNA maturation and action--the expanding roles of ARGONAUTES. *Current opinion in plant biology* **11**: 560-566

Mallory AC, Reinhart BJ, Jones-Rhoades MW, Tang G, Zamore PD, Barton MK, Bartel DP (2004b) MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *The EMBO journal* **23**: 3356-3364

Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *Journal of experimental botany* **51**: 659-668

McConnell JR, Emery J, Eshed Y, Bao N, Bowman J, Barton MK (2001) Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature* **411**: 709-713

Meyers BC, Axtell MJ, Bartel B, Bartel DP, Baulcombe D, Bowman JL, Cao X, Carrington JC, Chen X, Green PJ, Griffiths-Jones S, Jacobsen SE, Mallory AC, Martienssen RA, Poethig RS, Qi Y, Vaucheret H, Voinnet O, Watanabe Y, Weigel D, Zhu JK (2008) Criteria for annotation of plant MicroRNAs. *The Plant cell* **20**: 3186-3190

Montgomery TA, Howell MD, Cuperus JT, Li D, Hansen JE, Alexander AL, Chapman EJ, Fahlgren N, Allen E, Carrington JC (2008a) Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* **133**: 128-141

Montgomery TA, Yoo SJ, Fahlgren N, Gilbert SD, Howell MD, Sullivan CM, Alexander A, Nguyen G, Allen E, Ahn JH, Carrington JC (2008b) AGO1-miR173 complex initiates phased siRNA formation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 20055-20062

Nelissen H, Eeckhout D, Demuyne K, Persiau G, Walton A, van Bel M, Vervoort M, Candaele J, De Block J, Aesaert S, Van Lijsebettens M, Goormachtig S, Vandepoele K, Van Leene J, Muszynski M, Gevaert K, Inze D, De Jaeger G (2015) Dynamic Changes in ANGUSTIFOLIA3 Complex Composition Reveal a Growth Regulatory Mechanism in the Maize Leaf. *The Plant cell* **27**: 1605-1619

Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, Ishida T, Morin H, Aida M, Laufs P (2006) The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in Arabidopsis. *The Plant cell* **18**: 2929-2945

Nogueira FT, Madi S, Chitwood DH, Juarez MT, Timmermans MC (2007) Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes & development* **21**: 750-755

O'Malley RC, Huang SS, Song L, Lewsey MG, Bartlett A, Nery JR, Galli M, Gallavotti A, Ecker JR (2016) Cistrome and Epicistrome Features Shape the Regulatory DNA Landscape. *Cell* **165**: 1280-1292

Oh SA, Park JH, Lee GI, Paek KH, Park SK, Nam HG (1997) Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **12**: 527-535

- Okushima Y, Mitina I, Quach HL, Theologis A (2005a) AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *Plant J* **43**: 29-46
- Okushima Y, Overvoorde PJ, Arima K, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Lui A, Nguyen D, Onodera C, Quach H, Smith A, Yu G, Theologis A (2005b) Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *The Plant cell* **17**: 444-463
- Omidbakhshfard MA, Proost S, Fujikura U, Mueller-Roeber B (2015) Growth-Regulating Factors (GRFs): A Small Transcription Factor Family with Important Functions in Plant Biology. *Molecular plant* **8**: 998-1010
- Osnato M, Stile MR, Wang Y, Meynard D, Curiale S, Guiderdoni E, Liu Y, Horner DS, Ouwerkerk PB, Pozzi C, Muller KJ, Salamini F, Rossini L (2010) Cross talk between the KNOX and ethylene pathways is mediated by intron-binding transcription factors in barley. *Plant physiology* **154**: 1616-1632
- Otegui MS, Noh YS, Martinez DE, Vila Petroff MG, Staehelin LA, Amasino RM, Guiamet JJ (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *Plant J* **41**: 831-844
- Pajoro A, Madrigal P, Muino JM, Matus JT, Jin J, Mecchia MA, Debernardi JM, Palatnik JF, Balazadeh S, Arif M, O'Maoileidigh DS, Wellmer F, Krajewski P, Riechmann JL, Angenent GC, Kaufmann K (2014) Dynamics of chromatin accessibility and gene regulation by MADS-domain transcription factors in flower development. *Genome biology* **15**: R41
- Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**: 257-263
- Palatnik JF, Wollmann H, Schommer C, Schwab R, Boisbouvier J, Rodriguez R, Warthmann N, Allen E, Dezulian T, Huson D, Carrington JC, Weigel D (2007) Sequence and expression differences underlie functional specialization of *Arabidopsis* microRNAs miR159 and miR319. *Developmental cell* **13**: 115-125
- Pekker I, Alvarez JP, Eshed Y (2005) Auxin response factors mediate *Arabidopsis* organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *The Plant cell* **17**: 2899-2910
- Peragine A, Yoshikawa M, Wu G, Albrecht HL, Poethig RS (2004) SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes & development* **18**: 2368-2379
- Perilli S, Sabatini S (2010) Analysis of root meristem size development. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **655**: 177-187
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**: e45
- Piazza P, Jasinski S, Tsiantis M (2005) Evolution of leaf developmental mechanisms. *The New phytologist* **167**: 693-710
- Piya S, Shrestha SK, Binder B, Stewart CN, Jr., Hewezi T (2014) Protein-protein interaction and gene co-expression maps of ARFs and Aux/IAAs in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* **5**: 744

- Pogulis RJ, Vallejo AN, Pease LR (1996) In vitro recombination and mutagenesis by overlap extension PCR. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **57**: 167-176
- Powell AE, Lenhard M (2012) Control of organ size in plants. *Curr Biol* **22**: R360-367
- Promchuea S, Zhu Y, Chen Z, Zhang J, Gong Z (2017) ARF2 coordinates with PLETHORAs and PINs to orchestrate ABA-mediated root meristem activity in Arabidopsis. *Journal of integrative plant biology* **59**: 30-43
- Qin Z, Li C, Mao L, Wu L (2014) Novel insights from non-conserved microRNAs in plants. *Front Plant Sci* **5**: 586
- R. E. Rodriguez MFE, J. M. Debernardi, J. F. Palatnik. (2016) Growth-Regulating Factors, A Transcription Factor Family Regulating More than Just Plant Growth. *Plant Transcription Factors*. Academic Press, Boston, pp. 269-280.
- Raventos D, Skriver K, Schlein M, Karnahl K, Rogers SW, Rogers JC, Mundy J (1998) HRT, a novel zinc finger, transcriptional repressor from barley. *The Journal of biological chemistry* **273**: 23313-23320
- Reinhardt D, Pesce ER, Stieger P, Mandel T, Baltensperger K, Bennett M, Traas J, Friml J, Kuhlemeier C (2003) Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**: 255-260
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* **110**: 513-520
- Richter R, Behringer C, Zourelidou M, Schwechheimer C (2013) Convergence of auxin and gibberellin signaling on the regulation of the GATA transcription factors GNC and GNL in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 13192-13197
- Rodriguez RE, Debernardi JM, Palatnik JF (2014) Morphogenesis of simple leaves: regulation of leaf size and shape. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology* **3**: 41-57
- Rodriguez RE, Ercoli MF, Debernardi JM, Breakfield NW, Mecchia MA, Sabatini M, Cools T, De Veylder L, Benfey PN, Palatnik JF (2015) MicroRNA miR396 Regulates the Switch between Stem Cells and Transit-Amplifying Cells in Arabidopsis Roots. *The Plant cell* **27**: 3354-3366
- Rodriguez RE, Mecchia MA, Debernardi JM, Schommer C, Weigel D, Palatnik JF (2010) Control of cell proliferation in Arabidopsis thaliana by microRNA miR396. *Development (Cambridge, England)* **137**: 103-112
- Rogers K, Chen X (2013) Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant cell* **25**: 2383-2399
- Sarvepalli K, Nath U (2011) Hyper-activation of the TCP4 transcription factor in Arabidopsis thaliana accelerates multiple aspects of plant maturation. *Plant J* **67**: 595-607
- Schiessl K, Kausika S, Southam P, Bush M, Sablowski R (2012) JAGGED controls growth anisotropy and coordination between cell size and cell cycle during plant organogenesis. *Curr Biol* **22**: 1739-1746

- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Scholkopf B, Weigel D, Lohmann JU (2005) A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nature genetics* **37**: 501-506
- Schommer C, Debernardi JM, Bresso EG, Rodriguez RE, Palatnik JF (2014) Repression of cell proliferation by miR319-regulated TCP4. *Molecular plant* **7**: 1533-1544
- Schommer C, Palatnik JF, Aggarwal P, Chetelat A, Cubas P, Farmer EE, Nath U, Weigel D (2008) Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS biology* **6**: e230
- Schruff MC, Spielman M, Tiwari S, Adams S, Fenby N, Scott RJ (2006) The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of Arabidopsis links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development (Cambridge, England)* **133**: 251-261
- Semiarti E, Ueno Y, Tsukaya H, Iwakawa H, Machida C, Machida Y (2001) The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of Arabidopsis thaliana regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development (Cambridge, England)* **128**: 1771-1783
- Siegfried KR, Eshed Y, Baum SF, Otsuga D, Drews GN, Bowman JL (1999) Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in Arabidopsis. *Development (Cambridge, England)* **126**: 4117-4128
- Skirycz A, Vandenbroucke K, Clauw P, Maleux K, De Meyer B, Dhondt S, Pucci A, Gonzalez N, Hoerberichts F, Tognetti VB, Galbiati M, Tonelli C, Van Breusegem F, Vuylsteke M, Inze D (2011) Survival and growth of Arabidopsis plants given limited water are not equal. *Nat Biotechnol* **29**: 212-214
- Stieger PA, Reinhardt D, Kuhlemeier C (2002) The auxin influx carrier is essential for correct leaf positioning. *Plant J* **32**: 509-517
- Szemenyei H, Hannon M, Long JA (2008) TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science (New York, NY)* **319**: 1384-1386
- T. Murashige FS (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with tobacco Tissue Cultures. *Physiologia plantarum* **15**
- Takada S, Hibara K, Ishida T, Tasaka M (2001) The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of Arabidopsis regulates shoot apical meristem formation. *Development (Cambridge, England)* **128**: 1127-1135
- Thompson J, Taylor C, Wang TW (2000) Altered membrane lipase expression delays leaf senescence. *Biochem Soc Trans* **28**: 775-777
- Thompson JE, Froese CD, Madey E, Smith MD, Hong Y (1998) Lipid metabolism during plant senescence. *Progress in lipid research* **37**: 119-141
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle T (2003) The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *The Plant cell* **15**: 533-543

- Todesco M, Rubio-Somoza I, Paz-Ares J, Weigel D (2010) A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics* **6**: e1001031
- Treich I, Cairns BR, de los Santos T, Brewster E, Carlson M (1995) SNF11, a new component of the yeast SNF-SWI complex that interacts with a conserved region of SNF2. *Molecular and cellular biology* **15**: 4240-4248
- Trizenberg SJ (1995) Structure and function of transcriptional activation domains. *Current opinion in genetics & development* **5**: 190-196
- Tsukaya H (2006) Mechanism of leaf-shape determination. *Annual review of plant biology* **57**: 477-496
- Tucker MR, Laux T (2007) Connecting the paths in plant stem cell regulation. *Trends in cell biology* **17**: 403-410
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science (New York, NY)* **276**: 1865-1868
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ (1999) Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J* **19**: 309-319
- van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* **390**: 287-289
- van der Knaap E, Kim JH, Kende H (2000) A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth. *Plant physiology* **122**: 695-704
- Vercruyssen L, Tognetti VB, Gonzalez N, Van Dingenen J, De Milde L, Bielach A, De Rycke R, Van Breusegem F, Inze D (2015) GROWTH REGULATING FACTOR5 stimulates *Arabidopsis* chloroplast division, photosynthesis, and leaf longevity. *Plant physiology* **167**: 817-832
- Vercruyssen L, Verkest A, Gonzalez N, Heyndrickx KS, Eeckhout D, Han SK, Jegu T, Archacki R, Van Leene J, Andriankaja M, De Bodt S, Abeel T, Coppens F, Dhondt S, De Milde L, Vermeersch M, Maleux K, Gevaert K, Jertzmanowski A, Benhamed M, Wagner D, Vandepoele K, De Jaeger G, Inze D (2014) ANGUSTIFOLIA3 binds to SWI/SNF chromatin remodeling complexes to regulate transcription during *Arabidopsis* leaf development. *The Plant cell* **26**: 210-229
- Vernoux T, Brunoud G, Farcot E, Morin V, Van den Daele H, Legrand J, Oliva M, Das P, Larrieu A, Wells D, Guedon Y, Armitage L, Picard F, Guyomarc'h S, Cellier C, Parry G, Koumproglou R, Doonan JH, Estelle M, Godin C, Kepinski S, Bennett M, De Veylder L, Traas J (2011) The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Mol Syst Biol* **7**: 508
- Vert G, Walcher CL, Chory J, Nemhauser JL (2008) Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 9829-9834
- Viallette-Guiraud AC, Adam H, Finet C, Jasinski S, Jouannic S, Scutt CP (2011) Insights from ANA-grade angiosperms into the early evolution of CUP-SHAPED COTYLEDON genes. *Ann Bot* **107**: 1511-1519

- Vroemen CW, Mordhorst AP, Albrecht C, Kwaaitaal MA, de Vries SC (2003) The CUP-SHAPED COTYLEDON3 gene is required for boundary and shoot meristem formation in Arabidopsis. *The Plant cell* **15**: 1563-1577
- Wang F, Qiu N, Ding Q, Li J, Zhang Y, Li H, Gao J (2014) Genome-wide identification and analysis of the growth-regulating factor family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *BMC Genomics* **15**: 807
- Wang L, Gu X, Xu D, Wang W, Wang H, Zeng M, Chang Z, Huang H, Cui X (2011a) miR396-targeted AtGRF transcription factors are required for coordination of cell division and differentiation during leaf development in Arabidopsis. *Journal of experimental botany* **62**: 761-773
- Wang L, Hua D, He J, Duan Y, Chen Z, Hong X, Gong Z (2011b) Auxin Response Factor2 (ARF2) and its regulated homeodomain gene HB33 mediate abscisic acid response in Arabidopsis. *PLoS genetics* **7**: e1002172
- Wang L, Xie W, Chen Y, Tang W, Yang J, Ye R, Liu L, Lin Y, Xu C, Xiao J, Zhang Q (2010) A dynamic gene expression atlas covering the entire life cycle of rice. *Plant J* **61**: 752-766
- Wang R, Estelle M (2014) Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Current opinion in plant biology* **21**: 51-58
- Williams L, Carles CC, Osmont KS, Fletcher JC (2005) A database analysis method identifies an endogenous trans-acting short-interfering RNA that targets the Arabidopsis ARF2, ARF3, and ARF4 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 9703-9708
- Winter CM, Austin RS, Blanvillain-Baufume S, Reback MA, Monniaux M, Wu MF, Sang Y, Yamaguchi A, Yamaguchi N, Parker JE, Parcy F, Jensen ST, Li H, Wagner D (2011) LEAFY target genes reveal floral regulatory logic, cis motifs, and a link to biotic stimulus response. *Developmental cell* **20**: 430-443
- Woo HR, Kim HJ, Nam HG, Lim PO (2013) Plant leaf senescence and death - regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *J Cell Sci* **126**: 4823-4833
- Woo HR, Masclaux-Daubresse C, Lim PO (2018) Plant senescence: how plants know when and how to die. *Journal of experimental botany* **69**: 715-718
- Wu G, Park MY, Conway SR, Wang JW, Weigel D, Poethig RS (2009) The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis. *Cell* **138**: 750-759
- Wu G, Poethig RS (2006) Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by miR156 and its target SPL3. *Development (Cambridge, England)* **133**: 3539-3547
- Wu L, Zhang D, Xue M, Qian J, He Y, Wang S (2014) Overexpression of the maize GRF10, an endogenous truncated growth-regulating factor protein, leads to reduction in leaf size and plant height. *Journal of integrative plant biology* **56**: 1053-1063
- Xia R, Xu J, Meyers BC (2017) The Emergence, Evolution, and Diversification of the miR390-TAS3-ARF Pathway in Land Plants. *The Plant cell* **29**: 1232-1247

- Xie Z, Allen E, Wilken A, Carrington JC (2005) DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 12984-12989
- Xu L, Xu Y, Dong A, Sun Y, Pi L, Huang H (2003) Novel as1 and as2 defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 and ERECTA functions in specifying leaf adaxial identity. *Development (Cambridge, England)* **130**: 4097-4107
- Yant L, Mathieu J, Dinh TT, Ott F, Lanz C, Wollmann H, Chen X, Schmid M (2010) Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor APETALA2. *The Plant cell* **22**: 2156-2170
- Zemlyanskaya EV, Wiebe DS, Omelyanchuk NA, Levitsky VG, Mironova VV (2016) Meta-analysis of transcriptome data identified TGTCNN motif variants associated with the response to plant hormone auxin in *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of bioinformatics and computational biology* **14**: 1641009
- Zhang B, Pan X, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA (2006) Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Plant J* **46**: 243-259
- Zhang D-F, Li B, Jia G-Q, Zhang T-F, Dai J-R, Li J-S, Wang S-C (2008) Isolation and characterization of genes encoding GRF transcription factors and GIF transcriptional coactivators in Maize (*Zea mays* L.). *Plant Science* **175**: 809-817
- Zhang H, Jin J, Tang L, Zhao Y, Gu X, Gao G, Luo J (2011) PlantTFDB 2.0: update and improvement of the comprehensive plant transcription factor database. *Nucleic acids research* **39**: D1114-1117
- Zhao S, Zhang ML, Ma TL, Wang Y (2016) Phosphorylation of ARF2 Relieves Its Repression of Transcription of the K⁺ Transporter Gene HAK5 in Response to Low Potassium Stress. *The Plant cell* **28**: 3005-3019
- Zhou Y, Liu X, Engstrom EM, Nimchuk ZL, Pruneda-Paz JL, Tarr PT, Yan A, Kay SA, Meyerowitz EM (2015) Control of plant stem cell function by conserved interacting transcriptional regulators. *Nature* **517**: 377-380