

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

**“Estudio de los mecanismos moleculares de acción de
factores de transcripción de la familia TCP de
Arabidopsis thaliana”**

Lic. Antonela Lucía Alem

Director de Tesis: Dra. Ivana L. Viola

Co-director de Tesis: Dr. Daniel H. Gonzalez

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

-2024-

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, gracias a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado, de manera gratuita, en una carrera con la máxima acreditación otorgada por la CONEAU; donde además tuve la posibilidad de formarme como profesional durante mi carrera de grado y, actualmente, puedo desempeñarme como docente.

Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar este posgrado habiéndome otorgado una beca doctoral y, junto a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), por financiar los proyectos en los cuales se enmarca este trabajo.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral y sus directivos, por cederme un espacio de trabajo y permitirme ser partícipe de esta gran comunidad científica.

Sigamos defendiendo la EDUCACIÓN PÚBLICA y la CIENCIA ARGENTINA.

Gracias a la Dra. Ivana Viola y el Dr. Daniel Gonzalez por guiarme y acompañarme en este trayecto de pasante a Licenciada y ahora, a futura Doctora. Son un ejemplo a seguir y me han transmitido su pasión y amor por la investigación y la docencia.

Este camino lleno de momentos lindos y otros un poco estresantes, fue más ameno gracias a hermosas personas que aparecieron en mi vida, amigos que me ha dado la facultad y el instituto. Me acompañaron en situaciones personales y laborales, momentos buenos y difíciles, y compartieron todas mis alegrías.

*A mamá y papá,
gracias por dar todo por mí, enseñarme a dar lo mejor de mí y ayudarme a
convertirme en la persona que soy hoy.*

Este nuevo logro es tanto mío como de ustedes,

Los amo

APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS

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

Alem, A.L., Ariel, F.D., Cho, Y., Hong, J.C., Gonzalez, D.H. and Viola, I.L. (2022). TCP15 interacts with GOLDEN2-LIKE 1 to control cotyledon opening in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/tpj.15701>

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA	7
1.1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	7
1.2. NOMENCLATURA.....	9
2. RESUMEN	10
3. ABSTRACT.....	13
4. INTRODUCCIÓN	16
4.1. ARABIDOPSIS THALIANA: UN ORGANISMO MODELO	17
4.1.1. <i>El ciclo de vida de Arabidopsis thaliana</i>	18
4.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EUCARIOTAS.....	20
4.3. FOTOMORFOGÉNESIS	22
4.3.1. <i>Señalización retrógrada cloroplasto-núcleo</i>	25
4.3.2. <i>Brasinoesteroides</i>	26
4.4. FAMILIA DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN GLK	29
4.5. FAMILIA DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCP	33
4.5.1. <i>Interacción con el ADN</i>	35
4.5.2. <i>Regulación de la actividad de las proteínas TCP</i>	37
4.5.3. <i>Funciones de los factores de transcripción TCP</i>	38
5. OBJETIVOS.....	43
5.1. OBJETIVO GENERAL	43
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
6. MATERIALES Y MÉTODOS	45
6.1. MATERIAL VEGETAL	45
6.2. CEPAS.....	47
6.3. VECTORES UTILIZADOS	47
6.4. MEDIOS DE CULTIVOS PARA ESCHERICHIA COLI Y AGROBACTERIUM TUMEFACIENS	48
6.5. MEDIOS DE CULTIVO PARA SACCHAROMYCES CEREVISIAE	49
6.6. MEDIOS DE CULTIVOS PARA ARABIDOPSIS THALIANA.....	49
6.7. SOLUCIONES	49
6.8. ANÁLISIS DE SECUENCIAS	50
6.9. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN POR PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA).....	50
6.10. ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA	51
6.11. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN.....	51
6.12. DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN	51

6.13.	LIGACIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN	52
6.14.	GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES GÉNICAS.....	52
6.15.	DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE MOLÉCULAS DE ADN.....	54
6.16.	TRANSFORMACIÓN DE ESCHERICHIA COLI CON ADN PLASMÍDICO POR ELECTROPORACIÓN	54
6.17.	TRANSFORMACIÓN DE AGROBACTERIUM TUMEFACIENS CON ADN PLASMÍDICO POR ELECTROPORACIÓN	55
6.18.	TRANSFORMACIÓN DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN PRESENCIA DE ACETATO DE LITIO.....	55
6.19.	PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO	56
6.20.	PREPARACIÓN DE ADN GENÓMICO DE ARABIDOPSIS THALIANA	56
6.21.	EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	57
6.22.	ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA EN LEVADURAS	57
6.23.	ENSAYO DE LA ACTIVIDAD B-GALACTOSIDASA.....	58
6.24.	ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS.....	59
6.25.	CONDICIONES GENERALES DE CRECIMIENTO EN CÁMARA DE CULTIVO	59
6.26.	CONDICIONES DE CRECIMIENTO EN TIERRA	59
6.27.	TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE NICOTIANA BENTHAMIANA	60
6.28.	ENSAYO DE COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR DE LA FLUORESCENCIA (BiFC)	60
6.29.	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DEL REPORTERO LUCIFERASA	61
6.30.	TRANSFORMACIÓN ESTABLE DE ARABIDOPSIS THALIANA.....	61
6.31.	SELECCIÓN DE PLANTAS TRANSFORMADAS	62
6.32.	ANÁLISIS DE PLANTAS TRANSFORMADAS.....	63
6.33.	ANÁLISIS HISTOQUÍMICO DE LA ACTIVIDAD B-GLUCURONIDASA	63
6.34.	ENSAYOS FENOTÍPICOS	63
6.35.	EXTRACCIÓN DE ARN Y ANÁLISIS DE RT-QPCR	64
6.36.	INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (CHIP).....	65
6.37.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE ARABIDOPSIS THALIANA	65
6.38.	SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS Y ANÁLISIS POR WESTERN BLOT (WB).....	66
7.	RESULTADOS.....	68
7.1.	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS TCP Y EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN GLK1 DE ARABIDOPSIS THALIANA.....	68
7.1.1.	<i>Las proteínas TCP de clase I interactúan físicamente con el factor de transcripción GLK1</i>	68
7.1.2.	<i>TCP15 interactúa con GLK1 in vivo en plantas.....</i>	70
7.1.3.	<i>TCP15 interactúa con el dominio GCT de GLK1</i>	71
7.2.	ESTUDIOS DEL PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCP DE CLASE I Y GLK1 DURANTE LA DE-ETIOLACIÓN EN ARABIDOPSIS THALIANA	73
7.2.1.	<i>GLK1 y las proteínas TCP de clase I son necesarios para la apertura y expansión de los cotiledones.....</i>	73

7.2.2.	<i>TCP15 y GLK1 actúan en la misma vía molecular que regula la apertura de los cotiledones.....</i>	76
7.2.3.	<i>Los niveles de expresión de genes involucrados en la expansión y el greening de cotiledones están alterados en plantas mutantes tcp y glk1</i>	79
7.2.4.	<i>TCP15 requiere de GLK1 para inducir la expresión de los genes SAUR, EXPB1 y LHCB.....</i>	84
7.2.5.	<i>TCP15 y GLK1 se unen a los promotores de los genes SAUR y LHCB y la unión de TCP15 se ve afectada por la deficiencia de GLK1</i>	88
7.3.	ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCP DE CLASE II Y SU RELACIÓN CON GLK1 DURANTE LA DE-ETIOLACIÓN EN ARABIDOPSIS THALIANA	92
7.3.1.	<i>TCP10 es requerido para la apertura y expansión de los cotiledones durante la de-etiolación</i>	92
7.3.2.	<i>Estudio de la interacción genética entre TCP10 y GLK1.....</i>	94
7.3.3.	<i>TCP10 requiere de GLK1 para inducir la expresión de genes involucrados en la expansión de cotiledones y la fotosíntesis</i>	96
7.3.4.	<i>Regulaciones transcripcionales entre TCP10 y GLK1</i>	98
7.3.5.	<i>GLK2 está bajo el control directo de TCP10 y GLK1</i>	100
7.3.6.	<i>La expresión de TCP10 es reprimida por señales retrógradas de los cloroplastos</i>	104
7.3.7.	<i>Las señales retrógradas desde los plástidos previenen la apertura de los cotiledones y la regulación de la expresión génica inducidos por TCP10</i>	105
7.3.8.	<i>Las señales retrógradas desde los plástidos afectan la estabilidad de TCP10.....</i>	107
7.4.	ESTUDIOS DE LA RELACIÓN ENTRE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCP Y LA VÍA HORMONAL DE BRASINOESTEROIDES DURANTE LA DE-ETIOLACIÓN EN ARABIDOPSIS THALIANA.....	109
7.4.1.	<i>Los genes TCP y GLK son necesarios para la apertura de cotiledones inducida por una deficiencia en los niveles de brasinoesteroides.....</i>	109
7.4.2.	<i>La expresión de los factores de transcripción TCP y GLK es reprimida por BR a través de BZR1</i>	111
7.4.3.	<i>BZR1 afecta la función de TCP15 en la apertura de los cotiledones</i>	113
7.4.4.	<i>TCP15 interactúa con BZR1 in vivo en plantas.....</i>	116
7.4.5.	<i>BZR1 modula negativamente la actividad transcripcional de TCP15</i>	118
8.	DISCUSIÓN	121
8.1.	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS TCP Y EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN GLK1 DE ARABIDOPSIS THALIANA	121
8.2.	ESTUDIOS DEL ROL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCP DE CLASE I Y GLK1 DURANTE LA DE-ETIOLACIÓN EN ARABIDOPSIS THALIANA.....	121
8.3.	ESTUDIOS DEL ROL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCP DE CLASE II DURANTE LA DE-ETIOLACIÓN EN ARABIDOPSIS THALIANA.....	124

8.4.	ESTUDIOS DE LA RELACIÓN ENTRE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCP Y LA VÍA HORMONAL DE BRASINOESTEROIDES DURANTE LA DE-ETIOLACIÓN EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	128
9.	CONCLUSIONES	133
10.	BIBLIOGRAFÍA	136
11.	ANEXOS	163
11.1.	ANEXO 1: LISTA DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS	163
11.2.	ANEXO 2: NIVELES DE EXPRESIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS Y MUTANTES UTILIZADAS.	169

1. ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA

1.1. Abreviaturas y símbolos

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
CK	citoquinas
cm	centímetros
col.	colaboradores
dATP	desoxiadenosina 5' trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5' trifosfato
dGTP	desoxiguanosina 5' trifosfato
dNTP	mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP
DO	densidad óptica
dTTP	desoxitimidina 5' trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
g	gravedad
g/l	gramos/litro
GA	giberelinas
GUS	β -glucuronidasa
h	hora
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mA	miliamper/s
min	minuto

ml	mililitro/s
mM	milimolar
mm	milímetros
mmol	milimoles
MS	medio de cultivo Murashige-Skoog
ng	nanogramos
p/v	peso en volumen
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PM	peso molecular
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SAM	meristema apical del tallo
SDS	dodecil sulfato de sodio
T-DNA	ADN de transferencia
U	unidad/es
UV	ultravioleta
UTR	regiones no traducidas de un gen
v/v	volumen en volumen
vol	volumen/es
W	watt/s
X-gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-glucurónido
μE	microeinstein
μg	microgramos

μl	microlitros
μm	micrómetros
μM	micromolar
°C	grados centígrados

1.2. Nomenclatura

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

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

2. RESUMEN

Siendo organismos sésiles, las plantas deben adaptarse a los estímulos ambientales, especialmente a la radiación solar, esencial para la fotosíntesis y el crecimiento autotrófico. La de-etiolación es la transición de un desarrollo de escotomorfogénesis a fotomorfogénesis que se desencadena una vez que la plántula se expone a la luz, es decir, cuando emerge del suelo. Implica cambios morfológicos y moleculares, modulados por fotorreceptores y fitohormonas, que generan la apertura y expansión de los cotiledones y el desarrollo del aparato fotosintético. Múltiples vías moleculares se interconectan con la vía lumínica, una de ellas es la vía de señalización retrógrada, un conjunto de señales enviadas desde los plástidos hacia el núcleo para coordinar la expresión de genes nucleares según su estado metabólico. Estas señales, impactan en el desarrollo regulado por luz y pueden reprimir aspectos del desarrollo fotomorfogénico, además de afectar la biogénesis de cloroplastos. Otro regulador negativo de la fotomorfogénesis son las hormonas brasinoesteroides, las cuales contribuyen a mantener el desarrollo etiolado en oscuridad. Existen múltiples puntos de conexión entre las señales activadas por luz y la vía de señalización de brasinoesteroides, uno de ellos es la represión que ejerce esta vía sobre la expresión y actividad de GLK1.

Los factores de transcripción *GLK (GOLDEN2-LIKE)* son una familia de factores de transcripción exclusiva de plantas, esenciales para la coordinación de la biogénesis y el desarrollo de los cloroplastos. Se ha observado que GLK1 es inducido por luz, y las señales retrógradas antagonizan dicha activación. Esta conexión es crucial para la regulación fina de la fotosíntesis durante la de-etiolación.

Las proteínas de la familia TCP (*TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA y PROLIFERATING CELL FACTORS*) son factores de transcripción específicos de plantas. Esta familia se divide en dos clases, denominadas I y II, y sus miembros participan en múltiples aspectos del desarrollo vegetal, desde la germinación a la formación de flores y frutos, modulando la respuesta a estímulos tanto internos como externos. En general, estas proteínas actúan a través de la regulación del crecimiento y la diferenciación celular, y se interconectan con diversas vías hormonales y con el ritmo circadiano.

Dado que las proteínas TCP son parte de una extensa familia con múltiples miembros, los cuales podrían actuar de manera redundante en algunas vías y de forma específica en otras, y considerando que existen diversos mecanismos a través de los cuales estas proteínas llevan a cabo sus funciones, este estudio de tesis se enfoca en la identificación

de proteínas que interactúen con los factores de transcripción TCP. El objetivo es ampliar la comprensión sobre las funciones que desempeña esta familia en la determinación de la morfología y la arquitectura de las plantas, así como dilucidar los mecanismos moleculares implicados en su actividad. A partir de la identificación de GLK1 como interactor proteico de proteínas TCP de clase I, surge la idea de que las proteínas TCP podrían estar involucradas en modular la respuesta de las plantas a la luz, aspectos del desarrollo vegetal no relacionados hasta el momento con esta familia de factores de transcripción.

Durante el presente trabajo de tesis, encontramos que TCP15, proteína TCP de clase I, y GLK1 se requieren mutuamente para promover la apertura de los cotiledones y la inducción de genes implicados en la expansión celular y genes asociados a la fotosíntesis. Postulamos que durante la de-etiolación GLK1 reclutaría a TCP15 para modular la expresión de genes de expansión celular y fotosíntesis en cotiledones y que la interacción funcional entre estos factores de transcripción serviría para coordinar la ejecución de dos procesos distintos requeridos para la correcta de-etiolación: la expansión celular y la biogénesis del aparato fotosintético.

A su vez, también exploramos la conexión entre GLK1 y las proteínas TCP de clase II durante la de-etiolación. Encontramos que TCP10, cuya expresión se induce en luz, promueve la expresión de los genes *GLK* y, a través de ellos, la expresión de genes de fotosíntesis y expansión celular, mientras que regula directamente la expresión de genes *SAUR* para promover la apertura y expansión de los cotiledones en respuesta a la luz. Describimos la existencia de un mecanismo de retroalimentación transcripcional entre los genes *TCP10* y *GLK*. Adicionalmente, incorporamos a las proteínas TCP de clase II como componentes de la comunicación retrógrada cloroplastídica.

Por último, descubrimos que la vía hormonal de brasinoesteroides inhibe el accionar de TCP15. El factor de transcripción de respuesta a brasinoesteroides, BZR1, reprime la expresión de genes *TCP* y *GLK*, y en el caso de TCP15 existe un mecanismo de control postraducciona, debido a que BZR1 afecta negativamente su actividad transcripcional mediante interacción proteína-proteína. En oscuridad esto permitiría la inhibición de la fotomorfogénesis en cotiledones, mientras que en luz disminuyen los niveles de BZR1 y aumenta la expresión de GLK1, permitiendo la rápida formación del complejo TCP15-GLK1 que, finalmente, promueve el desarrollo fotomorfogénico en los cotiledones durante la de-etiolación.

En conjunto, los estudios presentados en esta tesis permitieron obtener nuevas evidencias sobre los procesos que son regulados por las proteínas TCP. Describimos

su accionar como reguladores positivos de la de-etiolación en plántulas de *Arabidopsis*, actuando sobre la familia de factores de transcripción GLK a través de diferentes mecanismos, mediante interacciones proteína-proteína o regulaciones transcripcionales. Adicionalmente, establecimos conexiones entre miembros de la familia TCP y otras vías que modulan el desarrollo fotomorfogénico, como la comunicación retrógrada de cloroplasto a núcleo y la vía hormonal de brasinoesteroides.

3. ABSTRACT

As sessile organisms, plants must adapt to environmental factors, especially solar radiation, essential for photosynthesis and autotrophic growth. De-etiolation is the transition from scotomorphogenesis to photomorphogenesis development that is triggered once the seedling is exposed to light, i.e. when it emerges from the soil. It involves morphological and molecular changes, modulated by photoreceptors and phytohormones, which generate the opening and expansion of the cotyledons and the development of the photosynthetic apparatus. Multiple molecular pathways are interconnected with the light pathway, one of which is the retrograde signaling pathway, a set of signals sent from the plastids to the nucleus to coordinate the expression of nuclear genes according to their metabolic state. These signals impact light-regulated development and can repress aspects of photomorphogenic development, as well as affect chloroplast biogenesis. Another negative regulator of photomorphogenesis is brassinosteroid hormones, which contribute to maintaining etiolated development in darkness. There are multiple points of connection between light-activated signals and the brassinosteroid signaling pathway, one of which is the repression of *GLK1* expression and activity by BR.

GLK (*GOLDEN2-LIKE*) transcription factors are a family of plant-exclusive transcription factors essential for the coordination of biogenesis and chloroplast development. It has been observed that *GLK1* is induced by light, and retrograde signals antagonize such activation. This connection is crucial for the fine regulation of photosynthesis during de-etiolation.

TCP family proteins (*TEOSINTE BRANCHED 1*, *CYCLOIDEA* and *PROLIFERATING CELL FACTORS*) are plant-specific transcription factors. This family is divided into two classes, named I and II, and its members are involved in multiple aspects of plant development, from germination to flower and fruit formation, modulating the response to both internal and external cues. In general, these proteins act through the regulation of cell growth and differentiation and are interconnected with several hormonal pathways and the circadian rhythm.

Given that TCP proteins are an extensive family with multiple members, which may act redundantly in some pathways and specifically in others, and considering that there are several mechanisms through which these proteins carry out their functions, this thesis study focuses on the identification of proteins that interact with TCP transcription factors. The aim is to broaden the understanding of the roles played by this family in determining plant morphology and architecture, as well as to elucidate the molecular mechanisms

involved in their activity. Following the identification of GLK1 as a protein interactor of class I TCP proteins, the idea arises that TCP proteins could be involved in modulating the response of plants to light, aspects of plant development not related so far to this family of transcription factors.

During the present thesis work, we found that TCP15, a class I TCP protein, and GLK1 require each other to promote cotyledon opening and the induction of genes involved in cell expansion and photosynthesis-associated genes. We postulated that during de-etiolation GLK1 would recruit TCP15 to modulate the expression of cell expansion and photosynthesis genes in cotyledons and that the functional interaction between these transcription factors would serve to coordinate the execution of two distinct processes required for proper de-etiolation: cell expansion and biogenesis of the photosynthetic apparatus.

We also explored the connection between GLK1 and class II TCP proteins during de-etiolation. We found that TCP10, whose expression is induced in light, promotes the expression of *GLK* genes and, through them, the expression of photosynthesis and cell expansion genes, while directly regulating the expression of *SAUR* genes to promote the opening and expansion of cotyledons in response to light. We describe the existence of a mechanism of transcriptional feedback regulation between *TCP10* and *GLK* genes. In addition, we incorporated class II TCP proteins as components of chloroplastidic retrograde communication.

Finally, we found that the brassinosteroid hormone pathway inhibits the action of TCP15. The brassinosteroid response transcription factor, BZR1, represses the expression of *TCP* and *GLK* genes, and in the case of TCP15, there is a post-translational control mechanism, because BZR1 negatively affects its transcriptional activity by protein-protein interaction. In darkness this would allow the inhibition of photomorphogenesis in cotyledons, while in light BZR1 levels decrease and *GLK1* expression increases, allowing the rapid formation of the TCP15-GLK1 complex that ultimately promotes photomorphogenic development in cotyledons during de-etiolation.

Taken together, the studies presented in this thesis provided new evidence on the processes that are regulated by TCP proteins. We describe their actions as positive regulators of de-etiolation in *Arabidopsis* seedlings, acting on the GLK family of transcription factors through different mechanisms, by protein-protein interactions or transcriptional regulations. Additionally, we established connections between TCP family members and other pathways that modulate photomorphogenic development, such as chloroplast-to-nucleus retrograde communication and the brassinosteroid hormone pathway.

INTRODUCCIÓN

4. INTRODUCCIÓN

La forma y la arquitectura de las plantas están definidas por diversos procesos que modulan el crecimiento y la diferenciación de los órganos. El tamaño y la forma de estos órganos, a su vez, depende del número, tamaño y tipo de células que los constituyen. En otras palabras, dependen de los procesos de división, crecimiento y diferenciación celular (Ingram & Waites, 2006), por lo que mantener una delicada regulación de estos procesos es esencial para producir la correcta estructura de las plantas. A diferencia de la mayoría de los organismos vivos, las plantas no poseen la capacidad de desplazarse. Por esta razón es que presentan una gran plasticidad, como seres vivos inmóviles o sésiles tienen que desarrollar estrategias para aclimatarse y/o adaptarse a cualquier cambio en el ambiente en que se encuentran. Así, el número, tamaño, forma y funcionalidad de los órganos de la planta adulta estarán supeditados en gran medida a las condiciones ambientales prevalentes. La supervivencia y el éxito reproductivo de la planta dependerán fuertemente de la precisa percepción de las condiciones externas, y de los mecanismos moleculares, fisiológicos y morfogénicos que éstas desencadenen. El ambiente lumínico y la temperatura no sólo son dos de las variables ambientales que más impacto tienen sobre el desarrollo vegetal, sino también dos de las condiciones más variables del ambiente.

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

El presente trabajo de tesis está dedicado al estudio de los mecanismos moleculares de acción de los factores de transcripción de la familia TCP (*TEOSINTE BRANCHED 1*, *CYCLOIDEA* y *PROLIFERATING CELL FACTORS*) y su relación con el factor de transcripción GLK1 (*GOLDEN2-LIKE 1*) en respuesta a la iluminación, utilizando como modelo a *Arabidopsis thaliana*. En esta sección se exponen en una primera parte las características morfológicas de esta planta, así como las razones que nos han llevado a elegirla como especie modelo de estudio. Luego, se detallan los aspectos del proceso de fotomorfogénesis en los que se enfoca esta tesis y se realiza una descripción a nivel estructural y funcional de las proteínas de las familias GLK y TCP.

4.1. *Arabidopsis thaliana*: Un organismo modelo

Arabidopsis es un género de plantas herbáceas de la familia de las brasicáceas o crucíferas que ha sido objeto de intenso estudio como modelo para la investigación en biología vegetal. Actualmente cuenta con 9 especies y 8 subespecies, entre las que se encuentra *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana* o *Arabidopsis*, Figura 1). Esta especie puede medir entre diez y treinta centímetros de altura sin incluir la raíz. Las flores son muy pequeñas y hermafroditas (con órganos reproductores masculinos y femeninos), de color blanco, y se agrupan formando pequeños grupos, llamados inflorescencias. El fruto es una silicua de un par de centímetros de largo y dos milímetros de ancho, que puede llegar a contener más de treinta semillas. Éstas se dispersan a través del viento al abrirse la silicua madura. Si bien *Arabidopsis* no es una planta de interés agronómico, ofrece importantes ventajas que la han convertido en la especie más utilizada para la investigación en genética y biología molecular vegetal. Avances significativos en el entendimiento del crecimiento y el desarrollo de plantas se han realizado basándose en la genética molecular de esta simple angiosperma (Meinke et al., 1998).



Figura 1: Planta de *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis fue sugerida por primera vez como un modelo adecuado para estudios biológicos de plantas, especialmente genéticos, a principios de la década de 1940 (Friedrich Laibach, 1943). Las razones para esto eran que es un verdadero diploide con un ciclo de vida muy corto (6-8 semanas), de fecundación autógama, y que produce numerosas semillas que permanecen viables durante muchos años. Su rápido crecimiento permite el análisis de un gran número de individuos en un mínimo espacio y, por lo tanto, la consiguiente amplificación rápida de los genotipos útiles para

posteriores estudios (Taiz & Zeiger, 2010). Estos factores, sumados a la facilidad de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y, por lo tanto, la posibilidad de introducir genes de interés y mantenerlos de forma estable, la han convertido en la planta modelo favorita. Además, presenta un genoma pequeño (de aproximadamente 125 Mpb) con relativamente escasas secuencias repetidas, el cual fue secuenciado completamente en el año 2000 (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). Asimismo, un gran número de líneas mutantes se encuentran disponibles en centros de almacenamiento en EEUU y en el Reino Unido. Para integrar todo el conocimiento que se genera en miles de laboratorios de todo el planeta se han creado varias herramientas que permiten a los investigadores explorar nuevas conexiones. *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR) es uno de los mayores repositorios online de datos y recursos y el *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) y el *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) son los principales centros de conservación, producción y distribución de plantas de *Arabidopsis* (ecotipos y mutantes) a nivel mundial. Debido a todas las características enunciadas y a la gran cantidad de estudios genéticos y moleculares que se han publicado sobre diversos aspectos del desarrollo de *Arabidopsis*, como germinación, floración o la respuesta ante diferentes tipos de estrés, el potencial para su uso en la investigación básica de dicotiledóneas resulta evidente y es por esto que la hemos elegido como modelo de estudio en nuestro laboratorio.

4.1.1. El ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*

El ciclo de vida de *Arabidopsis* puede dividirse en cuatro etapas discretas de desarrollo: fase embrionaria, fase vegetativa juvenil, fase vegetativa adulta y fase reproductiva que culmina con la senescencia (Figura 2). Durante la embriogénesis se establece el plan de desarrollo general. Sin embargo, gran parte de la arquitectura final de la planta se define durante su crecimiento y es altamente dependiente de las condiciones ambientales. En la fase embrionaria se define el patrón apical-basal establecido en los meristemas apicales del tallo (SAM: *Shoot Apical Meristem*) y de la raíz (RAM: *Root Apical Meristem*). Estos meristemas son centros de células madre no diferenciadas en continua división celular. A partir del SAM se generan prácticamente todos los órganos aéreos de las plantas, mientras que a partir del RAM se generan los tejidos correspondientes a las raíces (Koornneef & Scheres, 2001). El hipocotilo constituye el primer órgano de expansión de la plántula. Durante la germinación, luego de la salida de la radícula, el hipocotilo emerge elevando el ápice y los cotiledones para separarlos del suelo y elevarlos hacia la luz. Luego de la germinación, el SAM da lugar al comienzo de la fase vegetativa juvenil. Durante esta etapa las plántulas desarrollan un par de hojas

verdaderas, las cuales presentan tricomas (pelos epidermales) sólo en la superficie adaxial de las hojas. En la fase vegetativa adulta comienzan a desarrollarse hojas verdaderas, que parecen estar ubicadas en un solo plano, en torno al eje central de la planta. Estas hojas desarrollan tricomas en ambas superficies de la lámina (Araki, 2001) y son, en general, ovaladas, con un pecíolo largo y un borde marginal continuo. El número de las hojas de roseta está determinado por una serie de factores que incluyen el genotipo, las condiciones ambientales y el tiempo transcurrido desde la germinación hasta el pasaje a floración (Blümel et al., 2015).

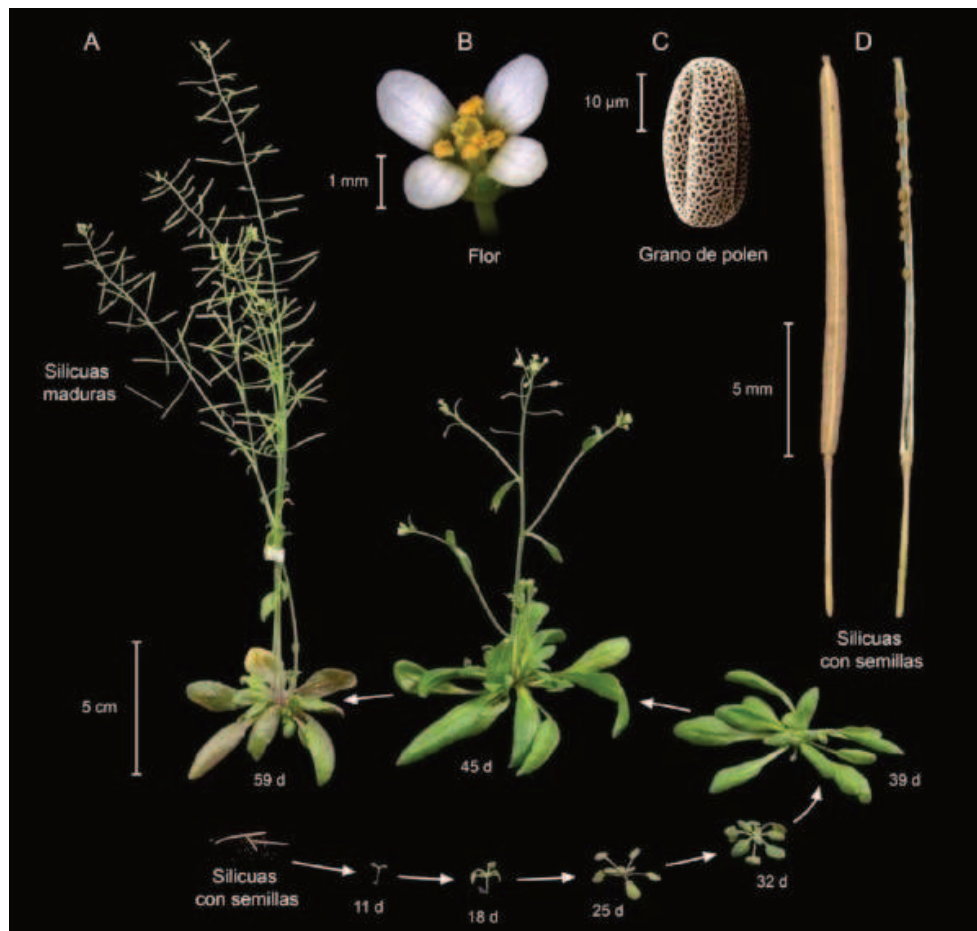


Figura 2: Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. (a) Estadios de desarrollo de *A. thaliana* Columbia (Col), desde las semillas (abajo a la izquierda) estableciéndose como plántula (11 días), en estadio vegetativo (39 días) y reproductivo (45 días). (b-d) Fotografías de una flor (b), un grano de polen (imagen de microscopía electrónica) (c) y silicuas maduras (izquierda: cerrada, derecha: abierta con semillas adheridas) (d). Adaptado de Krämer U, 2015. (Krämer, 2015)

El pasaje a estadio reproductivo está determinado por la aparición del botón floral, conocido como “bolting”. La transición del meristema vegetativo a meristema reproductivo está regulada por señales específicas del desarrollo y del medio ambiente como el fotoperiodo, la vernalización o diferentes factores ambientales como el estado nutricional, la temperatura y la disponibilidad de agua. La etapa reproductiva se divide

en dos fases: en la primera, denominada “fase reproductiva temprana”, se desarrollan la inflorescencia principal y las hojas caulinares (u hojas reproductivas). En la base de cada hoja, tanto de roseta como caulinar, existe una yema axilar. Algunas de estas yemas se desarrollan dando lugar a ramas, pero la mayoría permanecen durmientes, determinando de esta manera el patrón de ramificación de la planta. Esto depende de numerosos factores tanto endógenos como exógenos, entre los que podemos mencionar las hormonas, los nutrientes y la calidad lumínica. Durante la “fase reproductiva tardía” tendrá lugar la aparición de las inflorescencias secundarias a partir de estas yemas axilares tanto de las hojas caulinares como de las hojas de roseta (Boyes et al., 2001). En relación a las flores de *Arabidopsis*, las mismas son radialmente simétricas y se componen de cuatro sépalos, cuatro pétalos bilateralmente simétricos, cuatro o seis estambres y dos carpelos fusionados que forman el gineceo central (Smyth et al., 1990). La autofecundación resulta en el desarrollo de embriones, que luego se convierten en las semillas de la planta, que serán más tarde dispersadas.

4.2. Regulación de la expresión génica en eucariotas

Todas las células somáticas de un organismo provienen de una única célula original, el cigoto, y como consecuencia de esto todas poseen idéntica información genética. La clave para conseguir el crecimiento y la especialización estructural y funcional es la división celular y la expresión diferencial de ciertos genes. Esta especialización estructural y funcional, o diferenciación, se logra a través de una regulación célula-específica de la expresión génica (Lodish et al., 2005). El control a nivel transcripcional es uno de los mecanismos principales en dicha regulación y requiere de la presencia de ciertos elementos. Elementos en *cis*, secuencias cortas de ADN presentes en las regiones reguladoras de los genes que funcionan como sitios de reconocimiento, y elementos en *trans*, proteínas reguladoras codificadas en otra región del genoma que reconocen y unen específicamente los elementos en *cis*, inhibiendo o activando la transcripción de un determinado gen. Estas proteínas son denominadas factores de transcripción (Gonzalez, 2015). Los factores de transcripción (FT) se dividen en dos categorías: generales y específicos. Los primeros participan en la formación de la maquinaria de transcripción basal en conjunto con la ARN polimerasa II y dirigen la transcripción constitutiva de todos los genes mediante la unión a un promotor mínimo, que se extiende generalmente desde el sitio de inicio de la transcripción hasta -40 pb corriente arriba, formado por secuencias altamente conservadas de ADN como la caja TATA, la secuencia iniciadora y/o las islas CpG (Butler & Kadonaga, 2002). Por otra parte, los FT específicos, también conocidos como activadores o represores

transcripcionales, constituyen un grupo de proteínas capaces de estimular (activadores) o inhibir (represores) la transcripción de determinados genes, mediante la unión a secuencias reguladoras específicas y conservadas de ADN presentes en las regiones promotoras de dichos genes (Yi Sun & Oberley, 1996). Desde el punto de vista funcional, y en forma muy general, los FT activadores se unen a los elementos en *cis*, cerca del sitio de inicio de la transcripción de un gen o a kilobases de distancia, e interactúan con estructuras co-activadoras multiproteicas para promover la descondensación de la cromatina y la apropiada unión de la maquinaria transcripcional sobre el promotor mínimo. Por el contrario, los FT represores se unen a elementos de control alternativos causando la condensación de la cromatina e inhibiendo la correcta unión de la polimerasa al promotor mínimo, por interacción con complejos co-represores multiproteicos. En conclusión, el control de la expresión génica a nivel transcripcional es el resultado de una compleja interacción entre los activadores/represores transcripcionales y la maquinaria de transcripción basal (Lodish et al., 2005). De esta manera, cada tipo celular es definido por la expresión diferencial de su información genética regulada, en parte, por una cascada de factores de transcripción interactuantes.

A nivel estructural, los factores de transcripción son proteínas modulares que contienen un dominio de reconocimiento y unión al ADN y dominios que les permiten interactuar con otras proteínas. La formación de estos complejos proteicos hace más compleja aún las redes de regulación de la transcripción debido a que pueden modificarse las especificidades de unión al ADN y la capacidad de estos complejos para activar o reprimir la expresión de los genes blanco (Lodish et al., 2005). Existe una gran variedad de motivos a través de los cuales los factores de transcripción interactúan con secuencias específicas de ADN y se clasifican en distintas familias y subfamilias de acuerdo al tipo de dominio de unión a ADN que contienen. Algunas de estas familias se encuentran conservadas tanto en animales como vegetales y otras son exclusivas de cada reino (Lodish et al., 2005). Por otra parte, las familias se subdividen en subfamilias en función de la presencia de otros dominios conservados, rasgos estructurales de los genes, los procesos biológicos en los que están involucrados y las vías de transducción de señales a las cuales están asociados (Ribichich et al., 2013; Riechmann, 2002). Entre las familias exclusivas de plantas se encuentran TCP, GARP, AP2/ERF, WRKY, NAC, SBP, ARF (Ariel et al., 2007; Du et al., 2009; Ribichich et al., 2013; Riechmann, 2002; Uberti Manassero et al., 2013). Debido a que los factores de transcripción GLK y TCP son objeto de estudio de este trabajo de tesis, más adelante se describirán en detalle estas familias de proteínas.

4.3. Fotomorfogénesis

Las plantas deben optimizar su morfología para interpretar y adaptarse a los estímulos ambientales, y así prosperar como organismos sésiles. La radiación (energía lumínica) emitida por el sol es esencial para la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas y afecta todo su ciclo de vida (Figura 3) (Jiao et al., 2007; Kami et al., 2010). La calidad (longitud de onda), la duración y/o la intensidad de esta radiación afectan de manera diferente el desarrollo de las plantas, llegando incluso a ser dañinas en ciertas condiciones. Por lo que las plantas han desarrollado mecanismos que les permiten detectar la intensidad y las longitudes de onda de la radiación para responder de forma dinámica, optimizar su crecimiento y desarrollo y minimizar un eventual daño por exceso o falta de radiación. Las plantas perciben las señales luminosas del ambiente mediante receptores fotosensibles, denominados fotorreceptores. En general, estos receptores son proteínas unidas a una molécula orgánica, denominada cromóforo, que cambia su configuración electrónica al absorber fotones de determinadas longitudes de onda. Este cambio repercute en la proteína causando cambios en su actividad biológica. De esta forma estos receptores participan en vías de transducción de señales y permiten que las plantas respondan a los estímulos lumínicos. En base a sus características estructurales y a las longitudes de onda que perciben, se han descrito cinco familias de fotorreceptores en plantas: los criptocromos, las fototropinas y los miembros de la familia ZEITLUPE que perciben la luz azul y UV-A; el receptor UVR8 que percibe la luz UV-B; y los fitocromos que perciben la luz roja y rojo-lejana (Galvão & Fankhauser, 2015).

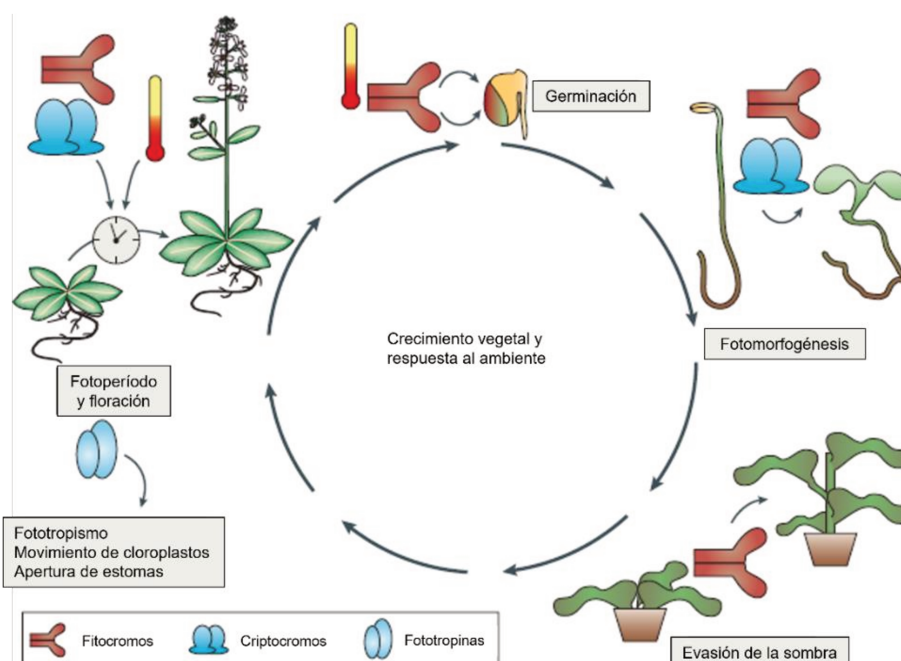


Figura 3: Desarrollo vegetal regulado por la luz. La luz controla el crecimiento y el desarrollo a lo largo de todo el ciclo de vida de las plantas. *Adaptado de Jiao et al., 2007.* (Jiao et al., 2007)

La de-etiolación es el cambio de un desarrollo de escotomorfogénesis a fotomorfogénesis que se desencadena una vez que la plántula se expone a la luz, es decir, cuando emerge del suelo. Se caracteriza por una reprogramación transcripcional que involucra cambios morfológicos que son necesarios para el establecimiento de una plántula fotosintéticamente activa (Gommers & Monte, 2018; Jiao et al., 2007). Durante el crecimiento en oscuridad, las plántulas crecen elongando el hipocotilo para alcanzar la superficie y exponerse a la luz (Figura 4a). Este proceso, denominado desarrollo escotomorfogénico o etiolado, está acompañado por la formación de un gancho apical que protege al meristema apical de tallo, los cotiledones y los primordios de hojas en desarrollo. Durante el crecimiento escotomorfogénico los cotiledones se encuentran cerrados y sin desarrollo de cloroplastos (Josse & Halliday, 2008). Una vez que la plántula se expone a la luz, ésta inhibe la elongación del hipocotilo y estimula la apertura y expansión de los cotiledones así como el desarrollo de cloroplastos funcionales que permiten la captura de luz para la fotosíntesis (Cackett et al., 2021; Martin et al., 2016) (Figura 4b,c).

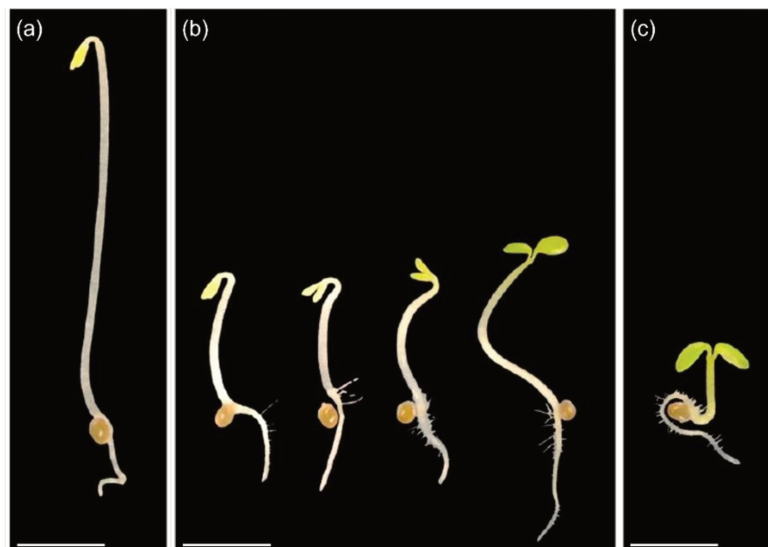


Figura 4: Desarrollo de plántulas de *Arabidopsis* durante la transición de oscuridad a luz. **(a-c)** Imágenes representativas de plántulas cultivadas 3 días en oscuridad (a), 2 días en oscuridad y expuestas a luz por 0, 2, 6 o 24 h (izquierda a derecha) (b) y 3 días en luz (c). Escala: 2 mm. Adaptado de Gommers y Monte, 2018. (Gommers & Monte, 2018)

El crecimiento etiolado y su transición a un desarrollo fotomorfogénico está finamente modulado a nivel molecular, no solo por las vías de señalización activadas por fotoreceptores, sino también por fitohormonas, sus vías de señalización y la interconexión entre los componentes de cada vía molecular (Kusnetsov et al., 2020) (Figura 5).

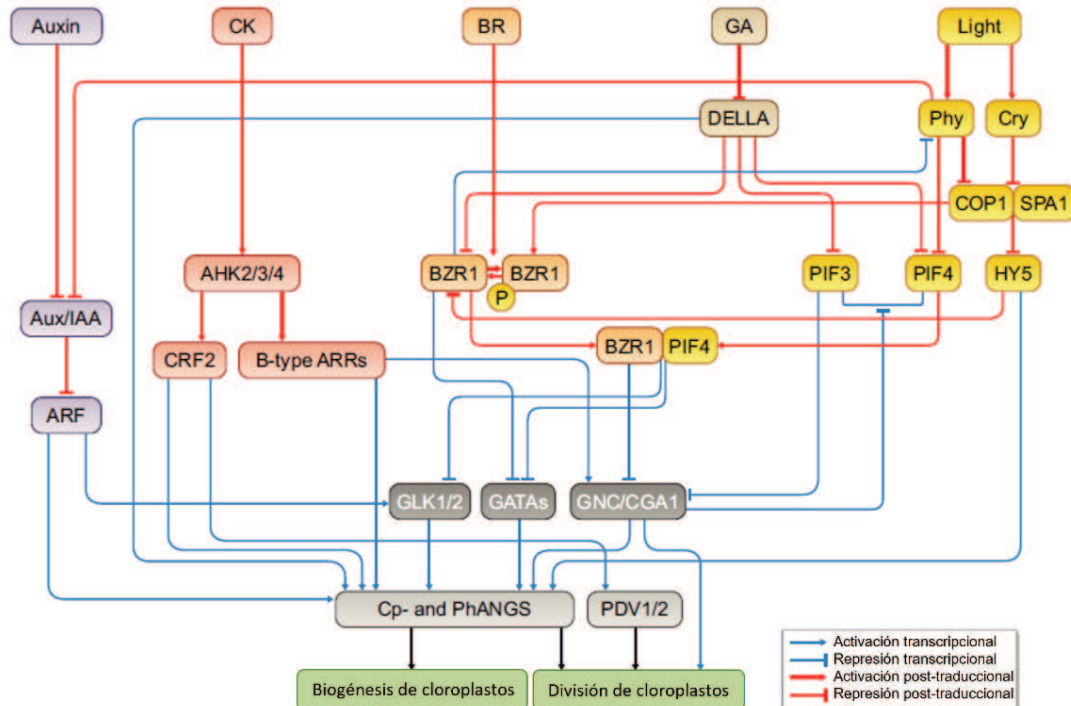


Figura 5: Esquema de las vías de señalización hormonal y de luz que participan en la regulación del desarrollo de los cloroplastos durante la de-etilación. Las hormonas de crecimiento auxinas, citoquininas, brasinoesteroides y giberelinas forman una red regulatoria junto con la luz para regular la biogénesis y la división de los cloroplastos mediante la regulación de la expresión génica y/o la modificación postraduccional de proteínas. Las flechas y barras azules indican activación y represión transcripcional, respectivamente. Las flechas y barras rojas indican activación y represión postraduccional de proteínas, respectivamente. *Adaptado de Cackett et al., 2021. (Cackett et al., 2021)*

Las fitohormonas brasinoesteroides (BR), giberelinas (GA), auxinas y etileno, y factores de transcripción, como COP1 (*CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1*) y las proteínas PIF (*PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS*) juegan un rol importante en el desarrollo de las plántulas en oscuridad (Alabadi et al., 2008; Bai et al., 2012; X. Liu et al., 2017). Estos reguladores inducen el crecimiento etiolado mientras suprimen la actividad de proteínas promotoras de la fotomorfogénesis (Kusnetsov et al., 2020). Las proteínas PIF, que pertenecen a la familia de factores de transcripción bHLH, se acumulan en oscuridad y promueven la escotomorfogénesis, inhibiendo la fotomorfogénesis (Leivar & Monte, 2014). Así, las plantas de *Arabidopsis* mutantes en *PIF1*, *PIF3*, *PIF4* y *PIF5* (*pifq*) presentan un fenotipo de fotomorfogénesis constitutiva, es decir, que al crecer en oscuridad se desarrollan como las plantas salvajes cultivadas en luz (Leivar et al., 2008, 2009). La exposición a la luz provoca la activación de la familia de fitocromos, fotoreceptores de respuesta a luz roja y rojo lejano, que interactúan directamente con las proteínas PIF desencadenando su degradación proteolítica y, por lo tanto, redireccionando la expresión génica con el fin de promover la de-etilación o desreprimir la fotomorfogénesis (Ni et al., 2014; Rockwell et al., 2006).

En luz, la actividad de los reguladores negativos de la de-etiolación se ve suprimida (Jaillais & Vert, 2012) y comienzan a participar los fotoreceptores, y reguladores positivos como las hormonas citoquininas (CK), las proteínas DELLA y FT como HY5, GNC, CGA1/GNL y GLK (Cackett et al., 2021). Dado que los factores de transcripción GLK son protagonistas de esta tesis, más adelante se hará una descripción de esta familia. Corriente abajo de estos FT se activan distintos grupos de genes con el fin de lograr un óptimo desarrollo fotomorfogénico. En esta tesis, analizamos la modulación de tres grupos de genes de respuesta a luz: (1) *lirSAUR* (*light-induced in cotyledons and/or repressed in hypocotyls SAUR*), un grupo de genes *SAUR* (*Small Auxin Up Rna*) cuya expresión se reprime en hipocotilos y se induce en cotiledones frente a la luz (Sun et al., 2016; Wang et al., 2020), y están involucrados en promover la apertura y expansión de los cotiledones (Dong et al., 2019; Sun et al., 2016); (2) *EXPANSINA*, genes que codifican proteínas de la pared celular involucradas en la expansión celular en la mayoría de las fases de crecimiento vegetal (Choi et al., 2006). De esta familia, los genes *EXPB1* y *EXPB3* son inducidos por luz en cotiledones (Sun et al., 2016), mientras que *EXP16* se expresa fuertemente en estos órganos (Klepikova et al., 2016); y (3) *LHCB* (*light-harvesting chlorophyll A/B binding protein*), genes nucleares que codifican para componentes del aparato fotosintético (Waters et al., 2009).

4.3.1. Señalización retrógrada cloroplasto-núcleo

Durante su funcionamiento, los plástidos envían señales hacia el núcleo que permiten coordinar la expresión de genes nucleares en función del estado metabólico de los mismos. Así, el núcleo regula la biogénesis de los cloroplastos a través de señales anterógradas mientras que los plástidos comunican su estado al núcleo, a través de señales retrógradas. Estas señales se activan frente a condiciones de estrés como calor, alta intensidad lumínica o la generación de especies reactivas de oxígeno durante la fotosíntesis, y también tienen un papel importante durante los primeros estadios de desarrollo de las hojas cuando en los cloroplastos se construyen los aparatos fotosintéticos (Gommers & Monte, 2018). En base a eso se ha clasificado a estas señales en “operacionales”, es decir aquellas que derivan de cloroplastos completamente activos con el fin de ajustar su funcionamiento en respuesta a condiciones ambientales, y “biogénicas” que provienen de plástidos atravesando las primeras etapas de la biogénesis del aparato fotosintético (Grübler et al., 2021). Estas señales impactan en el desarrollo normal regulado por luz (Larkin, 2014; Ruckle et al., 2007, 2012; Ruckle & Larkin, 2009) y se han reportado evidencias que indican que la señalización retrógrada (SR) puede reprimir aspectos del desarrollo fotomorfogénico en

plántulas, además de afectar la biogénesis de cloroplastos (Larkin, 2014; Ruckle et al., 2007, 2012; Ruckle & Larkin, 2009), sugiriendo que existe una conexión entre la vía activada por luz y la SR. Sin embargo, la naturaleza de estas señales y el mecanismo por el cual se transmiten plástido-a-núcleo no está claro aún. La principal consecuencia de la activación de la señalización retrógrada es la disminución de los niveles de expresión de genes nucleares relaciones con fotosíntesis (*PhANG: Photosynthesis-Associated Nuclear Gene*), como los genes *LHCB* (*light-harvesting chlorophyll A/B binding protein*) y *RBCS* (*rubisco small subunit*) (Sajib et al., 2023; Zhao et al., 2018). Una forma de estudiar las señales retrógradas biogénicas es con tratamientos con norflurazon (NF), inhibidor de la biosíntesis de carotenoides, o con lincomicina (LIN), que inhibe la traducción de proteínas en plástidos y, por lo tanto, el ensamblado correcto del aparato fotosintético (Grübler et al., 2021; Sullivan & Gray, 1999). Si bien actúan en sitios diferentes del cloroplasto, generan fenotipos similares. Este conocimiento se utilizó para la identificación de mutantes que presentan defectos en la comunicación plástido-a-núcleo, denominadas *genomes uncoupled (gun)* (Susek et al., 1993). Entre ellas, las mutantes *gun1* presentan hipersensibilidad a NF y LIN (Zhao et al., 2018), indicando que *GUN1* es requerido para la SR (Hernández-verdeja et al., 2020; Koussevitzky et al., 2007). *GUN1* cumple un papel protector en plántulas cultivadas en oscuridad, donde regularía la expresión de los factores de transcripción PIFs, BZR1, BES1 y GLK1 (Sajib et al., 2023). Reportes indican que se encontraría presente en proplastidos y etioplastos, mientras que se degradaría con el avance del desarrollo de los cloroplastos, cuando el potencial riesgo de daño oxidativo decrece (Hernández-Verdeja et al., 2022; Sajib et al., 2023; G. Z. Wu et al., 2018), permitiendo la correcta expresión de los genes asociados a la fotosíntesis. Además de *GUN1*, se ha descrito como mediador de la SR a *GUN5* (Griffin & Toledo-Ortiz, 2022; Wu et al., 2018, 2019; Wu & Bock, 2021).

4.3.2. *Brasinoesteroides*

Los brasinoesteroides (BR) son hormonas promotoras del crecimiento que regulan diversos procesos de crecimiento y desarrollo, como la elongación celular, la germinación de semillas, la formación de estomas, la diferenciación vascular, la arquitectura de las plantas, la floración, la resistencia al estrés y la senescencia (Guo et al., 2013; Wang et al., 2012; Yang et al., 2011). En particular, las plantas con defectos en la biosíntesis o señalización de BR muestran un fenotipo enano típico, lo que sugiere que los BR juegan un papel esencial en el crecimiento y el desarrollo normal de la planta. Además, cuando plantas deficientes en brasinoesteroides, o insensibles a esta

hormona, son cultivadas en oscuridad poseen cotiledones abiertos, hipocotilos más cortos (Li et al., 1996), y una elevada expresión de genes relacionados con la fotosíntesis (Chory et al., 1991).

El compuesto esteroide brasinólido (BL) fue identificado en extractos de polen de *Brassica* y purificado, en 1979, como un compuesto promotor del crecimiento. Éste y otras hormonas esteroides vegetales se denominaron colectivamente brasinoesteroides debido a su caracterización inicial en *Brassica*, aunque están presentes en todas las plantas y también en algunas especies de algas. La biosíntesis de BR es muy compleja y tiene muchas vías de intersección (Chung & Choe, 2013; Z. Wei & Li, 2020). La señalización de BR es una de las vías de transducción de señales más caracterizadas en plantas (Figura 6). Comienza con la unión de la hormona al dominio extracelular de un receptor conformado por las proteínas BRI1 y BAK1, las cuales forman un bolsillo donde se une la hormona. BRI1 forma heterodímeros con una pequeña familia de correceptores que incluye a BAK1 (también conocido como SERK3), SERK1 y SERK4 (Li & Chory, 1997; Nam & Li, 2002; Z. Wang et al., 2001). La unión de la hormona al receptor genera un cambio conformacional en los dominios citosólicos de BRI1 y las proteínas SERK y la fosforilación de BRI1, activándolo y promoviendo la disociación del regulador negativo BKI1 (Nam & Li, 2002). BRI1 activado desencadena una serie de eventos de fosforilación, incluida la fosforilación y activación de dos quinasas ubicadas corriente abajo: BSK1 y CDG1, que activan sucesivamente las fosfatasa de la familia BRI1-SUPPRESSOR 1 (BSU1) (Kim et al., 2011; Tang et al., 2008). A su vez, BSU1 activada desfosforila e inactiva a BIN2, que es el regulador negativo maestro de la vía de señalización de BR (Kim et al., 2009), que posteriormente es secuestrado por KIB1, una proteína F-box E3 ubiquitin ligasa que termina facilitando su ubiquitinación y degradación (Zhu et al., 2017). Esto evita que se fosforilen e inactiven los factores de transcripción BZR1 y BZR2/BES1, dos sustratos de BIN2 y FT clave que median positivamente las respuestas de BR. Mientras tanto, BZR1 y BES1 son desfosforiladas y activadas por PP2A (Tang et al., 2011), lo que permite que se transloquen desde el citoplasma hasta el núcleo. Allí regulan la expresión de sus genes blanco uniéndose, en forma de homo o heterodímeros, directamente a elementos de respuesta a BR (BRRE, CGTG^T/cG), motivos E-box (CANNTG) o G-box (CACGTG, una caja E específica formada por dos copias del núcleo del elemento BRRE) en los promotores, iniciando así una serie de respuestas celulares (He et al., 2005; Wang et al., 2012; Yin et al., 2005).

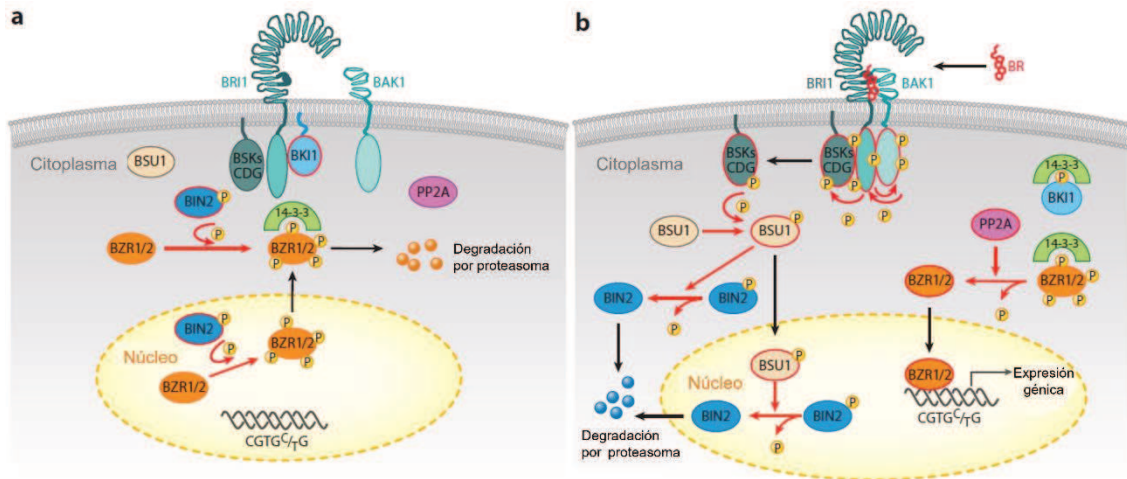


Figura 6: Vía de transducción de señales de brasinoesteroides. Los componentes de señalización en estado activo están marcados con contornos rojos. Los pequeños círculos que contienen la letra P indican residuos de fosfato. Las flechas rojas indican procesos de fosforilación y desfosforilación; las flechas negras indican el movimiento de las proteínas. **(a)** En ausencia de brasinoesteroides (BR), BRI1 está inactivo y se asocia con BKI1 y BSKs/CDG1. BIN2 activo fosforila a BZR1/2 inhibiendo su actividad de unión al ADN y provocando el transporte fuera del núcleo al citoplasma, donde es retenido por la proteína 14-3-3. **(b)** En presencia de BR, la unión de BR a BRI1 induce la disociación de BKI1 y la asociación de BAK1. La transfosforilación secuencial entre BRI1 y BAK1 activa a BRI1, que a su vez fosforila a BSKs/CDG1. BSKs/CDG1 activadas se liberan del complejo receptor y activan a BSU1 por fosforilación. A continuación, BSU1 activada desfosforila e inactiva a BIN2. BZR1/2 es entonces desfosforilada por PP2A y liberada de las proteínas 14-3-3. A continuación se desplaza al núcleo de la célula donde puede unirse a los promotores de los genes de respuesta a BR para regular su expresión. *Adaptado de Wang et al., 2012.* (Wang et al., 2012)

En este trabajo de tesis nos enfocamos en el rol de los BR como reguladores negativos de la fotomorfogénesis. Se ha reportado que, en oscuridad, BZR1 y su homólogo BZR2/BES1, reprimen la expresión de genes involucrados en las vías de señalización por luz, como *fitocromo B (PHYB)*, *fototropina1*, *GATA2/4* y *GLK* (Cackett et al., 2021; Luo et al., 2010; Sun et al., 2010; Yu et al., 2011), éstos últimos siendo regulados por el complejo proteico BZR1-PIF4 (Oh et al., 2012). Adicionalmente, COP1 se encarga de mediar la degradación de la forma fosforilada (inactiva) de BZR1 en oscuridad, lo que aumenta la proporción de BZR1 desfosforilado (activo) y promueve la escotomorfogénesis (Kim et al., 2014). Por el contrario, en luz, la fracción de BZR1 que aún se mantiene en su forma desfosforilada interacciona con HY5, esto evita que BZR1 se una a sus genes blancos y continúe inhibiendo la de-etiolación (Li & He, 2016). Estos son algunos de los componentes claves que conectan las señales activadas por luz y la vía de señalización de brasinoesteroides, y aquello por lo que nos interesa estudiar esta fitohormona y su relación con los FT en estudio.

4.4. Familia de factores de transcripción GLK

Los factores de transcripción GLK (*Golden2-like*) son una familia exclusiva de plantas perteneciente a la superfamilia GARP (Chen et al., 2016). Su nombre se debe a *Golden2*, un factor de transcripción que participa en el control de la diferenciación celular en hojas de maíz (Chen et al., 2016; Hall et al., 1998).

En *Arabidopsis* existen dos genes *GLK* codificados en el genoma nuclear, denominados *GLK1* y *GLK2* (Fitter et al., 2002). Estos contienen tres regiones altamente conservadas: una región N-terminal rica en residuos ácidos, un dominio de unión al ADN en la región central que contiene el dominio GARP (DBD) y el dominio GCT (GLK/caja C-terminal). Dentro del dominio GCT existen dos regiones ricas en prolina (denominadas PRR1 y PRR2) y una región hacia el extremo C-terminal muy conservada en las proteínas GLK (caja C-terminal) (Hosoda et al., 2002; Rossini et al., 2001). Particularmente, el dominio GCT y un motivo AREAEAA, encontrado al final del DBD, han sido propuestos como características definitorias de los miembros de la familia GLK (Fitter et al., 2002; Rossini et al., 2001; Tamai et al., 2002; Wang et al., 2013). A su vez, se ha visto que el dominio GCT está involucrado en la interacción proteína-proteína con otros FT como ser SIGMA FACTOR BINDING PROTEIN1 (SIB1), LESION SIMULATING DISEASE 1 (LSD1) y BPG4 (Li et al., 2021; Lv et al., 2019; Ni et al., 2017; Tachibana et al., 2024).

Los miembros de la familia GLK se encargan de coordinar la biogénesis y el desarrollo de los cloroplastos. El aparato fotosintético, que recibe y colecta la luz para fijar carbono inorgánico, incluye una serie de complejos multiproteicos que residen en las membranas internas de los cloroplastos o tilacoides. Entre ellos, el fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII) están compuestos por un centro de reacción rodeado por complejos periféricos llamados LHCI y LHCII (LHC, *light harvesting chlorophyll*), respectivamente (Waters et al., 2009), que poseen clorofila unida a proteínas para la absorción de luz (Green & Durnford, 1996). Los genes *LHC* y los genes de biosíntesis de clorofila se encuentran en el genoma nuclear (Waters et al., 2009) y se estima que existen aproximadamente unas 3000 proteínas que están codificadas en el núcleo y se localizan en cloroplastos (Chen et al., 2016). Por lo tanto, la expresión de estos genes debe estar regulada de manera coordinada para que ocurra un desarrollo fotosintético eficiente y además debe existir una coordinación entre el genoma nuclear y el de cloroplastos. En este contexto, los factores de transcripción GLK son los encargados de regular la expresión de muchos de estos genes, siendo sus blancos directos los genes *LHC* y de biosíntesis de clorofila (Chen et al., 2016). Esto se ve reflejado en los fenotipos que presentan plantas mutantes en los genes *GLK*: las plantas doble mutantes *glk1-1 glk2-1* de *Arabidopsis* presentan

hojas pálidas, las células del mesófilo contienen cloroplastos rudimentarios con membranas tilacoides escasas que no forman la grana, y los genes fotosintéticos codificados en el núcleo exhiben niveles reducidos de transcripto y de proteína, especialmente aquellos asociados con la biosíntesis de clorofila y absorción de luz (Fitter et al., 2002). Por otra parte, las plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan *GLK1* o *GLK2* presentan niveles elevados de clorofila y un retraso en el tiempo de floración en comparación con plantas salvajes (Waters et al., 2008). A su vez, la sobreexpresión de *GLK1* en líneas mutantes dobles *glk1-1 glk2-1* restaura completamente los niveles de transcripto de genes *LHCB6* y de clorofila (Waters et al., 2008). Las proteínas GLK de maíz (*Zea mays*), del musgo *Physcomitrella patens*, de tomate (*Solanum lycopersicum*), y de arroz (*Oryza sativa*) también han sido implicadas en la regulación del desarrollo de cloroplastos y se ha demostrado que afectan la expresión de genes nucleares que codifican proteínas con localización en el cloroplasto y genes relacionados con la fotosíntesis (Chen et al., 2016; Fitter et al., 2002; Ohama & Yanagisawa, 2024; Rossini et al., 2001; Yasumura et al., 2005). En la mayoría de los genomas diploides de angiospermas que han sido secuenciados hasta el momento, los genes *GLK* aparecen de a pares y se ha propuesto que funcionalmente serían redundantes (Fitter et al., 2002; Tu et al., 2022; Waters et al., 2009), aunque análisis filogenéticos indican que en algunas especies existen más copias de los genes *GLK*, originadas a partir de eventos de duplicaciones de genoma y de genes (Hernández-Verdeja & Lundgren, 2023).

En *Arabidopsis*, se ha descrito que las plantas mutantes en *GLK1* y *GLK2* presentan un fenotipo alterado con respecto a las plantas salvajes, pero no así las mutantes simples en estos genes (Waters et al., 2008; Yasumura et al., 2005). Sin embargo, la expresión de *GLK1* y *GLK2* está regulada de manera diferente: la expresión de *GLK1* es inducida por luz mientras que *GLK2* es regulado por luz y por mecanismos endógenos (Fitter et al., 2002). A su vez, existen diferencias en los patrones de expresión, ya que *GLK2* se expresa en silicuas, pero no así *GLK1*, observándose silicuas pálidas en la mutante simple *glk2-1* pero no en *glk1-1* (Yasumura et al., 2005). Sin embargo, la sobreexpresión de *GLK1* en las plantas *glk1-1 glk2-1* rescata el fenotipo de silicuas pálidas. Esto indica que *GLK1* puede sustituir funcionalmente a *GLK2* y que las diferencias de fenotipo observadas en las silicuas de las plantas mutantes simples se deben a las diferencias en los patrones de expresión (Waters et al., 2008).

Teniendo en cuenta su rol predominante en la regulación del desarrollo de los cloroplastos, es evidente que los cambios en el estado de los plástidos afectarán la actividad GLK. Así, se ha reportado que la señal retrógrada antagoniza la activación por luz de los genes *GLK* (Duan et al., 2020; Martin et al., 2016). Se ha reportado que la

activación de la señalización retrógrada inhibe la expresión de *GLK1* y *GLK2*, e induce la disminución de los niveles proteicos de *GLK1* por degradación dependiente de proteasoma, lo cual en conjunto conduce a una disminución de la expresión de genes relacionados a la fotosíntesis y afecta la biogénesis de los cloroplastos (Kakizaki et al., 2009; Tokumaru et al., 2017). Se ha propuesto que *GLK1* tendría la función de potenciar la capacidad fotosintética, integrando las respuestas a factores internos y ambientales en los tejidos de mayor actividad fotosintética donde la acumulación de transcripto de *GLK1* es mayor que la de *GLK2* (Fitter et al., 2002; Waters et al., 2009). En este sentido, Martín y colaboradores (2016) han demostrado que en *Arabidopsis* las vías de fitocromos y SR dependiente de *GUN1* actúan de forma antagónica en el control de la expresión de *GLK1*: frente a un daño en los cloroplastos, se activa la señalización retrógrada que reprime la expresión de *GLK1* a través de una vía independiente de los factores de transcripción *PIF*, dando como resultado una atenuación en el proceso de fotomorfogénesis y protegiendo a la plántula (Figura 7).

Como se describió previamente, las vías activadas por luz se interconectan con vías hormonales para modular finamente la respuesta a la iluminación. Varios estudios señalan que la expresión de los genes *GLK* estaría regulada por las fitohormonas auxinas (Sagar et al., 2013), ABA (Ahmad et al., 2019; Lee et al., 2021; Wang et al., 2018), CK (Kobayashi et al., 2013) y BR (Tachibana et al., 2024; Yu et al., 2011; Zhang et al., 2021). En cuanto a la vía de señalización de BR, se ha reportado que en oscuridad *BES1* reprime la expresión de los genes *GLK* (Yu et al., 2011) y que se promueve la degradación proteica de *GLK1* vía desfosforilación por *BIN2* (Zhang et al., 2021). En luz, cuando la vía de BR es inhibida, *BIN2* se encarga de fosforilar y estabilizar a *GLK1* (Zhang et al., 2021). Recientemente, se identificó a *BGP4* como un regulador del desarrollo de cloroplastos corriente abajo de la vía de señalización de BR. *BGP4* es inducido por luz y por deficiencia de BR, y se reportó que interacciona con *GLK1* e inhibe su actividad transcripcional actuando como un factor de homeostasis de los cloroplastos (Tachibana et al., 2024).

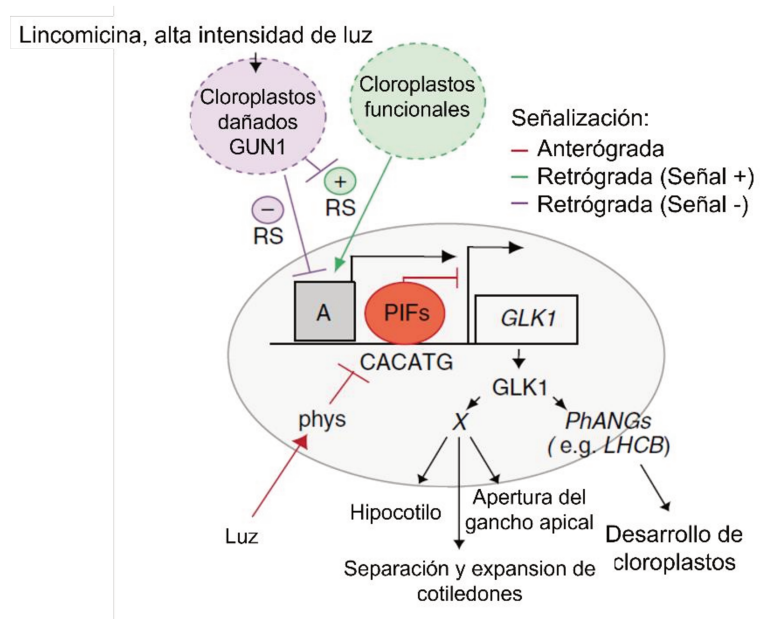


Figura 7: Acciones antagónicas de la señalización por luz mediada por PIF y SR plastídica mediada por GUN1 en la regulación de la fotomorfogénesis. Los FT PIF se unen al promotor de *GLK1* a través de un motivo PBE (CACATG) para reprimir directamente su expresión en oscuridad. Activador(es) transcripcional(es) desconocido(s) representado con A activa la expresión de *GLK1*. En respuesta a las señales luminosas, los fitocromos activados inducen la degradación de PIF, desencadenando la desrepresión de *GLK1*, impulsada por A. A su vez, *GLK1* induce directamente la expresión de genes nucleares asociados a la fotosíntesis (*PhANGs*), y de uno o más genes "X" putativos que promueven otros aspectos de la fotomorfogénesis. Si la integridad del cloroplasto se ve alterada por lincomicina o luz de alta intensidad, se produce una señal retrógrada negativa (SR-) emitida por cloroplastos disfuncionales que reprime la expresión de *GLK1* a través de GUN1 y la represión de A. Alternativamente, los cloroplastos funcionalmente intactos podrían producir una SR positiva (SR+) necesaria para la expresión y/o actividad de A, que se interrumpe de forma mediada por GUN1 cuando se altera la función del cloroplasto. *Adaptado de Martin et al., 2016.* (Martin et al., 2016)

Si bien las proteínas GLK son conocidas por su rol clave en el desarrollo de los cloroplastos y del aparato fotosintético, se ha descubierto que participan de la regulación de otros aspectos de la fotomorfogénesis, y también en el control de la floración, el desarrollo del fruto, respuestas de defensa, senescencia, estrés hídrico y la señalización de hormonas como ABA, auxinas, SA y BR (Ahmad et al., 2019; Choi et al., 2024; Garapati et al., 2015; Hernández-Verdeja & Lundgren, 2023; Kakizaki et al., 2009; Kobayashi et al., 2013; Leister & Kleine, 2016; Murmu et al., 2014; Nagatoshi et al., 2016; Rauf et al., 2013; Savitch et al., 2007; Waters et al., 2009) (Figura 8). En esta tesis, nos enfocaremos en su rol como inductor de la fotomorfogénesis y su relación con los factores de transcripción de la familia TCP.

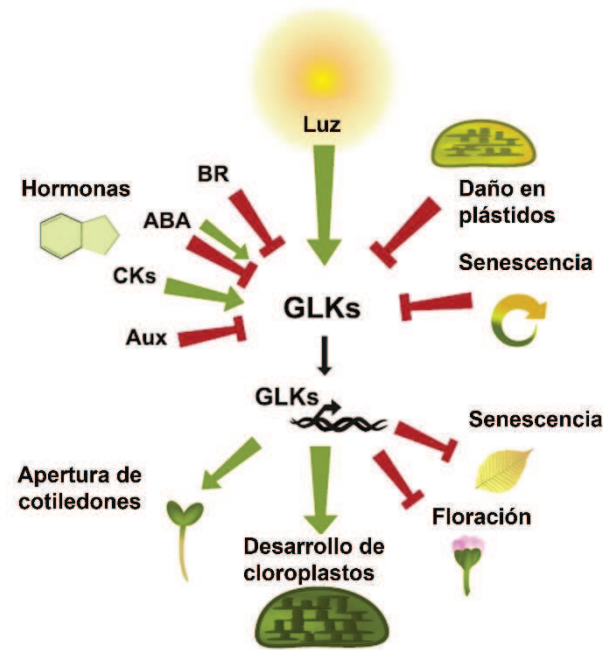


Figura 8: Los factores de transcripción *GOLDEN2-LIKE* (GLK) son un eje central del desarrollo vegetal. Los componentes de las vías de señalización por luz, de señalización retrógrada de los plástidos, hormonales y la senescencia desencadenada por la oscuridad o la edad convergen para regular antagónicamente la transcripción y los niveles de proteína GLK. En respuesta, las proteínas GLK activan la expresión de genes nucleares asociados a la fotosíntesis promoviendo el desarrollo del cloroplasto e interactúan con otros factores de transcripción para promover el crecimiento de las plántulas en la luz y prevenir la floración y la senescencia. Las líneas con puntas de flecha y las líneas finales indican regulación positiva y negativa, respectivamente (BR, brasinoesteroides; ABA, ácido abscísico; CKs, citocininas; Aux, auxinas). Adaptado de Hernández-Verdeja y Lundgren, 2023. (Hernández-Verdeja & Lundgren, 2023)

4.5. Familia de factores de transcripción TCP

La familia de genes *TCP* codifica para una familia de factores de transcripción específicos de plantas que recibe su nombre de los primeros miembros descritos: *TEOSINTE BRANCHED1* (*TB1*) del maíz (*Zea mays*), *CYCLOIDEA* (*CYC*) de *Antirrhinum majus* (boca de dragón), y *PCF1* y *PCF2* del arroz (*Oryza sativa*) (Cubas et al., 1999). *TB1* participa en el control del desarrollo de los meristemas axilares en maíz (Doebley et al., 1997), *CYC* afecta la morfología de la flor de *Antirrhinum majus* (Luo et al., 1996), y *PCF1/2* se une al promotor del gen *proliferating cell nuclear antigen* (*PCNA*) en arroz (Kosugi & Ohashi, 1997). En 1999, Cubas y col. determinaron que estas proteínas comparten un dominio conservado, denominado TCP, implicado en la interacción con el ADN y la formación de dímeros, y las dividieron en dos clases principales, I (o PCF) y II (o CYC/TB1) (Figura 9).

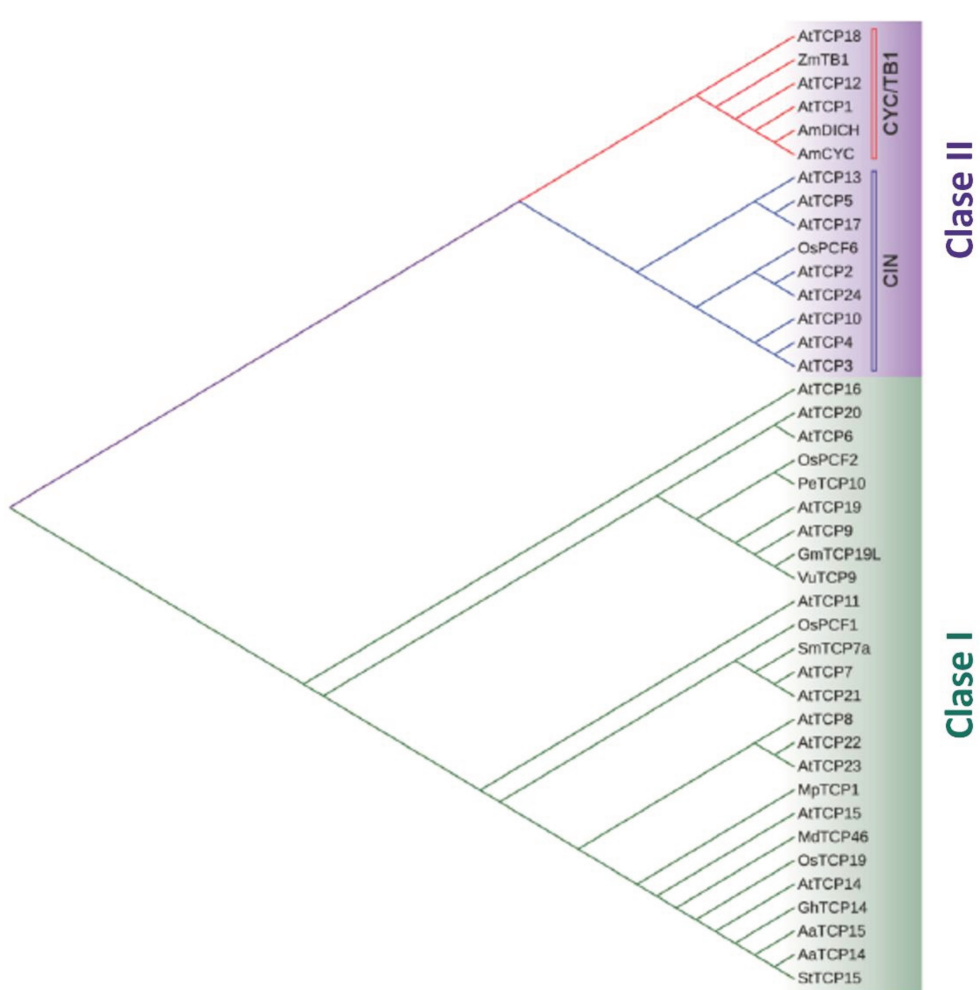


Figura 9: Árbol filogenético de la familia TCP mostrando las diferentes clases (I y II) y clados (CYC/TB1 y CIN). Las secuencias de aminoácidos de las proteínas TCP de *Arabidopsis thaliana*, los cuatro miembros fundadores de la familia TCP (ZmTB1, AmCYC, OsPCF1 y OsPCF2) y otras TCP se alinearon con Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, consultado el 10 de febrero de 2023) y se utilizaron para construir el árbol mediante el método Neighbor-Joining (https://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/simple_phylogeny/, consultado el 10 de febrero de 2023). El árbol se visualizó con iTOL (<https://itol.embl.de/itol.cgi>, consultado el 10 de febrero de 2023). At, *Arabidopsis thaliana*; Am, *Antirrhinum majus*; Zm, *Zea mays*; Os, *Oryza sativa*; Gh, *Gossypium hirsutum*; Aa, *Artemisia annua*; Gm, *Glycine max*; Sm, *Solanum melongena*; Pe, *Phyllostachys heterocycle*; St, *Solanum tuberosum*; Vu, *Vigna unguiculata*; Mp, *Marchantia polymorpha*. Adaptado de Viola et al., 2023. (Viola et al., 2023)

El dominio TCP contiene una región básica seguida de dos hélices alfa conectadas con un bucle, asemejándose al dominio bHLH presente en otra familia de factores de transcripción. Sin embargo, la presencia de aminoácidos que rompen la hélice en la región básica indica que el dominio TCP es un dominio de unión al ADN distinto y exclusivo de plantas. La diferencia entre ambas clases radica en características dentro y fuera del dominio TCP. Dentro del dominio TCP, cada subfamilia difiere en la longitud de la región básica, la composición de su señal de localización nuclear (SLN) bipartita, la composición de residuos del bucle y las caras hidrofílicas de las hélices, y la longitud

de la hélice II (Cubas et al., 1999). Fuera del dominio TCP, las TCP de clase I tienen regiones cortas que flanquean el dominio, mientras que la mayoría de las TCP de clase II tienen un dominio rico en arginina o dominio R (Cubas et al., 1999) y un motivo ECE (ácido glutámico-cisteína-ácido glutámico) entre los dominios TCP y R (Howarth & Donoghue, 2006). Las proteínas TCP de clase II se dividen a su vez en dos clados: CYC/TB1 (o ECE) y CIN (CINCINNATA-like) (Martín-Trillo & Cubas, 2010). El clado CIN está formado por los genes *jaw-TCP*, regulados post-transcripcionalmente por el microARN *miR319* (Palatnik et al., 2003) y los genes *TCP5-like* que no presentan esta regulación (Danisman et al., 2013) (Figura 9). Dentro de la clase II, se ha propuesto que el clado CIN es más ancestral que el clado CYC/TB1, que está ausente en las plantas no vasculares (Zhou et al., 2022). No obstante, dado que las plantas inferiores poseen ambas clases de TCP, el antepasado de la familia TCP sigue siendo desconocido (Navaud et al., 2007). A lo largo de los años, se han identificado miembros de la familia TCP en varias especies, pero se han caracterizado principalmente en *Arabidopsis* (Busch et al., 2019; Chen et al., 2016; Fan et al., 2022; Koyama et al., 2010; Liu et al., 2020; Martín-Trillo & Cubas, 2010; Mukhopadhyay & Tyagi, 2015; Shang et al., 2022; Shi et al., 2016; Song et al., 2018; Wei et al., 2016; Wen et al., 2020; Xie et al., 2020; Yu et al., 2022). El genoma de *Arabidopsis* codifica 24 miembros distribuidos en todos los cromosomas, 13 de la clase I: TCP6, TCP7, TCP8, TCP9, TCP11, TCP14, TCP15, TCP16, TCP19, TCP20, TCP21, TCP22, TCP23, y 11 de la clase II: TCP2, TCP3, TCP4, TCP5, TCP10, TCP13, TCP17, TCP24 del clado CIN y TCP1, TCP12/BRC2, TCP18/BRC1 del clado CYC/TB1 (Cubas et al., 1999; Navaud et al., 2007) (Figura 9). Para el lector interesado, Zhou y col. (Zhou et al., 2022) han publicado recientemente un análisis exhaustivo de la filogenia y la evolución de la familia TCP en 37 especies de plantas, desde las inferiores hasta las superiores.

4.5.1. Interacción con el ADN

Las proteínas TCP forman dímeros en solución que son esenciales para la unión del ADN (Danisman, 2016; Danisman et al., 2013; Kosugi & Ohashi, 2002). Las proteínas TCP de clase I reconocen la secuencia de unión consenso GTGGNCC, mientras que las proteínas de clase II prefieren la secuencia GTGGNCCC (Kosugi & Ohashi, 2002; Schommer et al., 2008; Viola et al., 2011; Viola et al., 2012). Estas preferencias están determinadas por un residuo (Gly en clase I o Asp en clase II) ubicado en la región básica N-terminal del dominio TCP (Viola et al., 2012). En cuanto a la estructura del dominio TCP, Sun y col. (Sun et al., 2020) determinaron que OsPCF6, de la clase II de *Oryza sativa*, adopta una estructura básica-hélice-bucle-hélice no canónica con tres

láminas β cortas consecutivas seguidas de un motivo de hélice-bucle-hélice. Más recientemente, las estructuras cristalinas de los complejos con el ADN de ambas clases de dominio TCP revelaron que presentan un tipo de reconocimiento de ADN distinto con un mecanismo de unión único (Zhang et al., 2023). Los homodímeros de dominio TCP adoptan un modo de reconocimiento de tres sitios de ADN, principalmente a través de un par de láminas β cortas formadas en la interfaz del dímero y bucles básicos flexibles localizados en el extremo N-terminal de cada monómero (Zhang et al., 2023) (Figura 10). Este mecanismo de unión al ADN explica por qué un único residuo de aminoácido determina las distintas preferencias de unión de las dos clases de proteínas TCP. Además, el dominio TCP posee una amplia especificidad para secuencias de ADN más cortas que el consenso (Zhang et al., 2023), añadiendo mayor complejidad a la red reguladora de los factores de transcripción TCP. Por fuera del motivo TCP, las proteínas TCP parecen contener grandes regiones con residuos desordenados consecutivos distribuidos a lo largo de su secuencia, presentando los miembros de la clase I mayor desorden que los de clase II (Thieulin-Pardo et al., 2015; Valsecchi et al., 2013). Por ejemplo, se predice que TCP8, TCP de clase I, de *Arabidopsis* tiene tres regiones intrínsecamente desordenadas (IDR) a lo largo de su secuencia (Valsecchi et al., 2013).

Dado que las secuencias consenso reportadas para las proteínas TCP de clase I y II son distintas, pero se superponen, se ha planteado la hipótesis de que proteínas de ambas clases podrían compartir genes blancos, regulando la expresión de los mismos en forma antagónica (Kosugi & Ohashi, 2002; Li et al., 2005). Sin embargo, estudios utilizando plantas mutantes o que expresan de manera constitutiva formas nativas o modificadas de estos factores de transcripción sugieren que una redundancia parcial en las funciones de diversas proteínas TCP se superpone con funciones específicas para cada una de ellas. Hasta el momento, la existencia de funciones solapadas entre las proteínas TCP de clase I y II ha sido demostrada en algunos trabajos (Danisman et al., 2012; Schommer et al., 2008). También se ha observado la existencia de procesos que son regulados de manera conjunta por proteínas TCP de clase I y del clado CIN de clase II (Rath et al., 2022; Sarvepalli & Nath, 2018), así como procesos regulados de manera específica por TCP de cada clase (Viola et al., 2023).

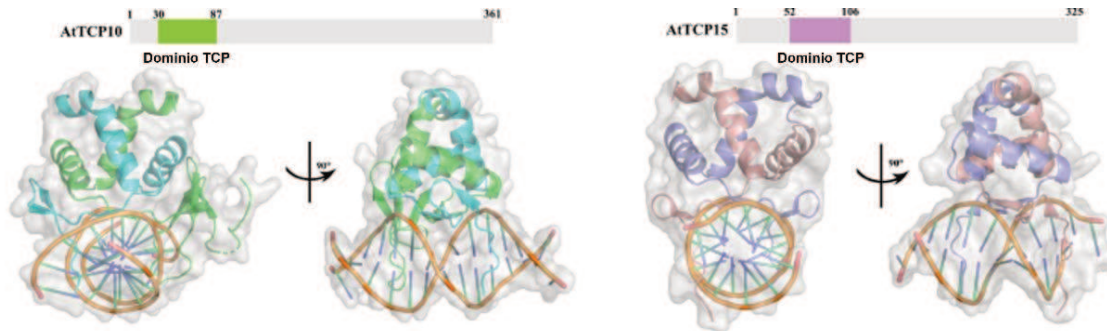


Figura 10: Estructuras de los dominios TCP de AtTCP10 y AtTCP15 unidos al ADN. (Panel izquierdo) Estructura global del dominio TCP de AtTCP10 en complejo con ADN en dos orientaciones (girado 90° a lo largo del eje indicado). Cadena A (verde) contiene los residuos 3-87, mientras que la cadena B (cian) contiene sólo los residuos 30-87, cubriendo todo el dominio TCP. (Panel derecho) Estructura del dominio TCP de AtTCP15 con ADN en dos orientaciones (girado 90° a lo largo del eje indicado). La cadena A (rosa) y la cadena B (azul) contienen los residuos 52-110, que abarcan todo el dominio TCP. *Adaptado de Zhang et al., 2022. (Zhang et al., 2023)*

4.5.2. Regulación de la actividad de las proteínas TCP

Los estudios realizados hasta la fecha señalan que las proteínas TCP pueden funcionar tanto como activadores o represores transcripcionales y actúan a través del reclutamiento de proteínas de otras familias mediante interacciones proteína-proteína. La formación de estos complejos puede conducir a un aumento en la actividad transcripcional de las proteínas TCP o bien ejercer un efecto inhibitorio o antagónico, dependiendo de las proteínas específicas con las que interactúan. En algunos casos se ha observado un efecto sinérgico o cooperativo en la actividad transcripcional de las proteínas interactuantes (Chu et al., 2021; Li et al., 2018; Ma et al., 2018; Mo et al., 2022; Zhang et al., 2018; Zhang et al., 2019), en otros, la unión a los promotores de los genes blanco es posible o mejorada por la formación de los complejos proteína-proteína (Li et al., 2018; Mo et al., 2022; Zhang et al., 2018) o, si bien las proteínas TCP pueden unirse a los promotores de sus genes blanco, funcionan como activadores transcripcionales solo si interactúan con otro factor (Mo et al., 2022). Por otro lado, existen proteínas que inhiben la actividad transcripcional de las proteínas TCP, como por ejemplo ORANGE, ERF4 y DELLA (Ding et al., 2022; Resentini et al., 2015; Sun et al., 2019). Si bien la mayoría de las proteínas TCP de clase I se han descrito como activadores de la transcripción, algunos informes indican que también pueden actuar como represores. Por ejemplo, TCP16 y TCP21 de *Arabidopsis*, PpTCP20 de melocotón y GhTCP19 de algodón reprimen la expresión de sus genes blanco (Masuda et al., 2008; Pruneda-Paz et al., 2009; Wang et al., 2020; Wu et al., 2019), MdTCP46 de manzana bloquea la unión de un activador transcripcional a sus genes blanco, regulando así negativamente su expresión (Liu et al., 2022), y algunas proteínas TCP de esta clase interactúan con

represores transcripcionales (Chen et al., 2014). Más aún, diferentes miembros podrían actuar como activadores o represores del mismo gen blanco, como es el caso de *CCA1*, que es activado por TCP20 y TCP22 y reprimido por TCP21 en *Arabidopsis* (Mo et al., 2022; Pruneda-Paz et al., 2009). Todo esto evidencia que la capacidad de las proteínas TCP para formar complejos con diferentes tipos de proteínas les proporciona un mecanismo flexible para modular el crecimiento y desarrollo de las plantas. Además, se ha observado la existencia de una regulación precisa de la actividad de las proteínas TCP a través de la regulación por miRNA, modulación de la estabilidad proteica, la capacidad de unión al ADN y la localización subcelular, entre otras. Por ejemplo, algunos miembros del clado CIN de la clase II son regulados postranscripcionalmente por el microARN *miR319*, mientras que los niveles de proteínas TCP de clase I se ven afectados por mecanismos de degradación dependientes del proteasoma (Dong et al., 2017; Palatnik et al., 2003; Peng et al., 2015; Steiner et al., 2012, 2016; Yang et al., 2017). Además, se ha observado que su ubicación subnuclear varía según las proteínas con las que interactúan (Ferrero et al., 2019; Viola et al., 2023).

4.5.3. Funciones de los factores de transcripción TCP

En cuanto a su función durante el ciclo de vida de las plantas, se ha observado que las proteínas TCP influyen distintos aspectos relacionados con el crecimiento de los órganos, como la proliferación celular, la endorreplicación y la expansión celular. Controlan el desarrollo y la senescencia de las hojas, la formación de ramificaciones laterales, la morfogénesis floral, el desarrollo de gametofitos, la germinación, el ritmo circadiano y la regulación de diversas vías hormonales, como auxinas, giberelinas y citokininas (Bresso et al., 2018; Dhaka et al., 2017; Li, 2015; Palatnik et al., 2003; Rath et al., 2022; Schommer et al., 2014; Uberti Manassero et al., 2013; Viola et al., 2023). Además de regular procesos de desarrollo, la evidencia experimental acumulada indica que las proteínas TCP desempeñan funciones clave en la inmunidad de las plantas contra patógenos de diferentes reinos y a través de diferentes redes de señalización (Kim et al., 2014; Lopez et al., 2015; Mukhtar et al., 2011; Weßling et al., 2014). Además, son blanco de diversos efectores secretados por patógenos como bacterias, hongos y artrópodos herbívoros (González-Fuente et al., 2020). De manera que las proteínas TCP actuarían como puente para conectar los procesos de desarrollo con la inmunidad de las plantas y esto sería aprovechado por los efectores para facilitar la proliferación de patógenos.

Para TCP14 y TCP15 de *Arabidopsis* se ha descrito que actúan en forma redundante regulando la estatura de la planta a través de la estimulación de la proliferación celular

en los internodos jóvenes (Kieffer et al., 2011). Además, en estudios realizados en nuestro laboratorio se encontró que influyen la expansión celular en diversos órganos como hipocotilos, y el filamento de los estambres de las flores (Ferrero et al., 2021; Ferrero et al., 2019; Gastaldi et al., 2022; Gastaldi et al., 2020). En la mayoría de estos procesos se vio que actúan a través del control de la expresión de genes *SAUR* (Gastaldi et al., 2020) y como mediadores del efecto de giberelinas, ya que su actividad es inhibida mediante interacciones proteína-proteína con los represores DELLA (Ferrero et al., 2019; Resentini et al., 2015), moduladores negativos de la respuesta a giberelinas. Junto con TCP15, TCP14 ha sido reportado como un regulador importante de la germinación (Resentini et al., 2015; Tatematsu et al., 2008; Zhang et al., 2019) y en estudios realizados en nuestro laboratorio se encontró que TCP8/14/15 promueven la floración a través de la regulación de *SOC1* (Camoirano et al., 2023; Lucero et al., 2017) mientras que TCP23, también de clase I, la reprime (Camoirano et al., 2023). Además, TCP14 y TCP15 tienen un papel crucial en la formación de cutículas y el desarrollo de tricomas, dos estructuras especializadas de la epidermis aérea que son importantes para el desarrollo de los órganos de las plantas y para la interacción con el medio ambiente. A través de diversos estudios moleculares y genéticos realizados en nuestro laboratorio se determinó que TCP14 y TCP15 modulan la síntesis de cutícula a través de la activación directa de la expresión de genes que codifican los factores de transcripción *SHN1* y *SHN2* (de la familia AP2/EREBP) necesarios para la biosíntesis de cutina y ceras, *MYB16* y *MYB106* (de la familia MIXTA), involucrados en el desarrollo de tricomas y cutícula, así como de las enzimas de biosíntesis de cutícula *CYP86A4*, *GPAT6* y *CUS2* (Camoirano et al., 2020, 2021). Por otra parte, hemos descubierto que TCP14 y TCP15 participan en la respuesta termomorfogénica a través de estimular la elongación del hipocotilo y de los pecíolos de las hojas frente a altas temperaturas. Su accionar ocurre a través de la inducción directa de la expresión de genes involucrados en la síntesis de giberelinas y la expansión celular frente a alta temperatura mediante su interacción con PIF4 (Ferrero et al., 2021; Ferrero et al., 2019). Y varios de nuestros estudios indican que las proteínas TCP de clase I son tanto blanco como moduladores de los cambios en la homeostasis redox celular (Viola et al., 2013, 2016). Lo que sugiere que podrían actuar como sensores durante la respuesta a condiciones internas o ambientales que afecten el estado redox celular.

En cuanto a la respuesta a la luz, al momento de inicio de este trabajo de tesis se había reportado que la proteína TCP de clase II TCP4 se expresa fuertemente en cotiledones y hojas jóvenes donde regula su morfogénesis (Koyama et al., 2010; Palatnik et al., 2003). Más recientemente, Dong y col. (Dong et al., 2019) describieron un mecanismo

mediante el cual TCP4 induce la expresión de genes *SAUR* en cotiledones expuestos a la luz, contribuyendo a los cambios en la morfología del cotiledón durante la de-etiolación. Este rol de TCP4 estaría reprimido en oscuridad, a pesar de que el gen TCP4 se expresa igual en ambas condiciones, debido a que PIF3 compete e interfiere con su unión a los genes blancos (Dong et al., 2019). Además, se observó que la expresión de TCP2 se induce por luz azul y se detectó interacción entre TCP2 y CRY1, participando de esta manera en la fotomorfogénesis inducida por luz azul (He et al., 2016). Con respecto a las proteínas de clase I, se vio que TCP14 induce la expresión de los genes *ELIP*, involucrados en proteger el aparato fotosintético frente al daño foto-oxidativo que ocurre por un exceso de precursores de clorofila en plantas etioladas expuestas a la luz; su función sería inhibida en oscuridad por interacción con la proteína ORANGE (Sun et al., 2019). TCP22 estaría involucrada en la respuesta a luz azul, ya que interacciona con el fotoreceptor CRY2, formando cuerpos nucleares (*photobodies*) donde modularía la expresión de genes del reloj circadiano, como *CCA1* (Mo et al., 2022).

En general se ha asumido que las proteínas TCP actúan de forma semi-redundante, pero en los últimos años se ha acumulado evidencia que indica que diferentes miembros actúan a diferentes niveles de las rutas moleculares. Más aún, se han reportado efectos opuestos en ciertos procesos, como en el control del ciclo celular y la floración, lo que explicaría el mantenimiento de múltiples miembros de la familia TCP en las diferentes especies. Para un mayor detalle, el lector puede consultar revisiones recientes que describen en detalle el papel de los factores de transcripción TCP en diversos procesos de desarrollo y las redes moleculares de acción (Viola et al., 2023; Viola & Gonzalez, 2023) y una revisión publicada por Nicolas y Cubas (Nicolas & Cubas, 2016) que analiza las interacciones entre los genes *TCP* y las vías de síntesis y señalización de distintas hormonas.

En función de lo descrito hasta aquí puede evidenciarse que las proteínas de la familia TCP participan en múltiples aspectos del desarrollo vegetal, tanto a nivel de los meristemas como del desarrollo de órganos laterales y estructuras reproductivas y que varios de estos procesos están regulados no sólo a través del control del crecimiento y proliferación celular, sino de la modulación de las vías de señalización de hormonas y del ritmo circadiano. También sabemos que las proteínas TCP no sólo modulan el crecimiento interno, sino que participan de la respuesta a señales ambientales como temperatura, intensidad de luz, patógenos y que su actividad está modulada tanto a nivel transcripcional como postranscripcional a través de la regulación por miRNA, oxidación

y degradación proteica, entre otras. Considerando entonces que las proteínas TCP forman parte de una familia con numerosos miembros que participarían tanto de manera redundante en vías solapadas como en vías específicas y que evidentemente existen diversos mecanismos a través de los cuales estas proteínas ejercen su función, en este trabajo de Tesis nos abocamos a identificar proteínas que interaccionen con factores de transcripción TCP con el fin de ampliar el conocimiento acerca de las funciones que las proteínas TCP cumplen en la determinación de la morfología y la arquitectura vegetal y dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en su acción.

*O*BJETIVOS

5. OBJETIVOS

5.1. *Objetivo general*

El Objetivo General del presente trabajo de tesis es realizar estudios estructurales y funcionales de factores de transcripción de la familia TCP de *Arabidopsis thaliana* con el fin de dilucidar los procesos que son regulados por estas proteínas, las redes de interacciones proteína-ADN y proteína-proteína mediante las cuales cumplen su función y los mecanismos moleculares a través de los cuales modulan el desarrollo y la arquitectura vegetal.

5.2. *Objetivos específicos*

- 1) Analizar la interacción entre las proteínas TCP y el factor de transcripción GLK1 de *Arabidopsis in vivo*.
- 2) Determinar cuáles son las regiones proteicas involucradas en la formación de los complejos TCP-GLK1.
- 3) Estudiar el efecto de estas interacciones sobre las propiedades de unión a ADN de las especies formadas.
- 4) Analizar en forma comparativa los patrones de expresión conferidos por las regiones promotoras de los genes en estudio.
- 5) Evaluar el significado funcional de estas interacciones mediante el estudio a nivel morfológico y molecular de plantas con niveles alterados de las proteínas TCP y GLK1.
- 6) Dilucidar los mecanismos moleculares por los que las proteínas TCP y GLK1 participan de la apertura de cotiledones durante la fotomorfogénesis.
- 7) Determinar si la capacidad de interacción de GLK1 y las proteínas TCP está relacionada con este proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material vegetal

Los ensayos realizados durante la etapa experimental de este trabajo se llevaron a cabo utilizando *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) como planta salvaje que fue provista por Lehle Seeds (Tucson, AZ, USA). El origen de otras líneas se describe a continuación:

- *tcp14-1*, *tcp14-3*, *tcp14-4*, *tcp14-6*, *tcp15-1*, *tcp15-3*, *tcp15-4*, *tcp14-4 tcp15-3*, *pTCP14::TCP14-GUS*: Cedidas gentilmente por el Dr. Martin Kieffer (University of Leeds, UK).
- *tcp10-1* (Koyama et al., 2010), *glk1-1* (Fitter et al., 2002), *glk2-1* (Fitter et al., 2002), *35S::GLK1 glk1-1 glk2-1* (Waters et al., 2008), *bzr1-1D* (Wang et al., 2002), *det2* (Chory et al., 1991), *pBZR1::BZR1-1D-CFP* (Zhang et al., 2013): Solicitadas al Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) de la Ohio State University.
- *35S::TCP15-RFP* (Viola et al., 2016): Expresan bajo el control del promotor constitutivo *35SCaMV* a *TCP15* fusionada a la proteína fluorescente roja RFP, resistentes a higromicina, fue generada previamente en el laboratorio.
- *pTCP15::TCP15-GFP-GUS* (Ferrero et al., 2021): Posee una construcción que contiene una región de aproximadamente 1500 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción del gen *TCP15* fusionada a la región codificante de *TCP15* seguido de la región codificante de los genes *GFP* y *GUS*. Se utilizó el vector *pKGWFS7* que provee resistencia a kanamicina, fueron generadas previamente en el laboratorio.
- *pTCP10::GUS*: Posee una construcción que contiene una región de aproximadamente 1100 pb ubicada entre -10 y -1087 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de *TCP10* fusionada a la región codificante para el gen reportero *GUS*, clonada en el vector binario *pBI101.3*. Fue obtenida previamente en nuestro laboratorio.
- *pSAUR63::SAUR63-GUS*, *35S::SAUR63-GFP*, *35S::SAUR63-GFP tcp14-4 tcp15-3* (Gastaldi et al., 2020): Expresan el gen *SAUR63* bajo el control de su propio promotor o el promotor *35SCaMV* (para sobreexpresar) en los fondos WT

- o *tcp14-4 tcp15-3*. Resistentes a BASTA, fueron generadas previamente en el laboratorio.
- *35S::TCP15 glk1-1* (Alem et al., 2022): Generadas en este trabajo de tesis, mediante transformación de plantas mutantes *glk1-1* a través de la técnica *floral dip* descrita en la sección 6.30, con una construcción que permite sobreexpresar TCP15 bajo el control del promotor constitutivo 35SCaMV. Las plantas se seleccionaron mediante la resistencia a kanamicina y BASTA.
 - *35S::TCP15-GFP_i*, *35S::TCP15-GFP_i tcp15-3*, *35S::TCP15-GFP_i glk1-1*, *35S::TCP15-GFP_i 35S::GLK1* (Alem et al., 2022): Generadas en este trabajo de tesis, mediante transformación de plantas a través de la técnica *floral dip*, con una construcción que permite sobreexpresar TCP15, de manera inducible por β -estradiol, fusionada a la proteína fluorescente verde GFP. La construcción génica para expresar *TCP15-GFP_i* fue cedida gentilmente por Pilar Cubas (Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, España). Las plantas se seleccionaron mediante la resistencia a higromicina.
 - *35S::GLK1-GFP* (Alem et al., 2022), *35S::GLK1-GFP tcp15-3* (Alem et al., 2022), *35S::GLK1-GFP tcp10-1*: Generadas en este trabajo de tesis, mediante transformación de plantas a través de la técnica *floral dip*, con una construcción que permite sobreexpresar GLK1, bajo el control del promotor constitutivo 35SCaMV, fusionada a la proteína fluorescente verde GFP (sección 6.14). Las plantas se seleccionaron mediante la resistencia a BASTA.
 - *35S::mTCP10-GFP*, *35S::mTCP10-GFP glk1-1*: Generadas en este trabajo de tesis, mediante transformación de plantas a través de la técnica *floral dip*, con la construcción que sobreexpresa *TCP10* insensible al microARN319a (por mutación de las secuencias de unión del microARN), fusionada a la proteína fluorescente verde GFP (sección 6.14). Las plantas se seleccionaron mediante la resistencia a BASTA.
 - *glk1-1 glk2-1*, *tcp15-3 glk1-1*, *tcp10-1 glk1-1*, *det2 tcp15-3*, *det2 glk1-1*, *det2 tcp10-1*: Generadas en este trabajo de tesis, mediante cruce y posterior análisis genotípico. Para verificar la presencia de los fragmentos de T-DNA y la homocigosis de cada mutación, se realizaron reacciones de amplificación (PCR, descrita en la sección 6.9), utilizando los oligonucleótidos detallados en el Anexo 1, a partir de ADN genómico (sección 6.20).

- *pBZR1::BZR1-1D-CFP 35S::TCP15-RFP*: Generadas en este trabajo de tesis, mediante cruza genética y posterior análisis genotípico.

6.2. Cepas

- *Escherichia coli* DH5 α : supE44 Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 (Na1r) thi-1 relA1 (Hanahan, 1983).
- *Agrobacterium tumefaciens* LB4404: esta cepa presenta resistencia al antibiótico rifampicina y posee los plásmidos pTi/pRi pAL4404 (cuyo agente de selección es el antibiótico estreptomycin) y pTi/pRi pTiAch5 (Ooms et al., 1982).
- *Saccharomyces cerevisiae* Mav203 (Invitrogen): MAT α ; leu2-3,112; trp1-901; his3 Δ 200; ade2-101; cyh2R; can1R; gal4 Δ ; gal80 Δ ; GAL1::lacZ; HIS3UASGAL1::HIS3@LYS2; SPAL10::URA3 (Vidal et al., 1996).

6.3. Vectores utilizados

- *pGADT7*: Es un vector de expresión para levaduras, diseñado para expresar una proteína de interés fusionada al dominio de activación de GAL4 (AD). La transcripción de la fusión a GAL4 AD está dirigida por el promotor constitutivo *pADH1*. Además, contiene una señal de localización nuclear (*SV40 NLS*) que dirige la proteína al núcleo de la levadura. Este vector se replica tanto en *E. coli* como en *S. cerevisiae* a partir de los orígenes de replicación pUC y 2 μ , respectivamente. A su vez, este vector contiene un gen de resistencia a ampicilina para su selección en *E. coli* y un marcador nutricional, *LEU2*, para su selección en levaduras. Este vector se ha utilizado para los ensayos de doble híbrido en levaduras.
- *pGBKT7*: Es un vector de expresión para levaduras, diseñado para expresar una proteína de interés fusionada al dominio de unión de ADN de GAL4 (DNA-BD). En levaduras, estas proteínas de fusión son expresadas en altos niveles a partir del promotor constitutivo *pADH1*. Este vector se replica tanto en *E. coli* como en *S. cerevisiae* a partir de los orígenes de replicación pUC y 2 μ , respectivamente. A su vez, este vector contiene un gen de resistencia a kanamicina para su selección en *E. coli* y un marcador nutricional *TRP1* para su selección en levaduras. Este vector se ha utilizado para los ensayos de doble híbrido en levaduras.

- pBluescript SK-: es un fagémido derivado del pUC19. Posee el gen *lacZ α* , y un gen de resistencia al antibiótico ampicilina (*Stratagene Cloning Systems*). Este vector se ha utilizado en el clonado de la región amino terminal de TCP15 para los ensayos de doble híbrido en levaduras.
- pENTR-3C: Vector de entrada (*Entry vector*) para el sistema de clonado Gateway (*Life Technologies*). Este vector permite el clonado de una secuencia de ADN de interés entre los sitios denominados *attL*. La secuencia clonada entre estos sitios puede recombinarse entre los sitios *attR* del vector de destino (*Destination Vector*). Este vector genera resistencia a kanamicina (100 $\mu\text{g/ml}$) en bacterias.
- pAS054: Vector de destino para el sistema Gateway. Este vector permite expresar en plantas el gen de interés fusionado a la secuencia N-terminal de mCitrina, bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV). Este vector confiere resistencia a espectinomicina (100 $\mu\text{g/ml}$).
- pAS059: Vector de destino para el sistema Gateway. Este vector permite expresar en plantas el gen de interés fusionado al dominio C-terminal de mCitrina, bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV). Este vector confiere resistencia a espectinomicina (100 $\mu\text{g/ml}$).
- pFK-248: Vector de destino para el sistema Gateway. Permite expresar en plantas el gen de interés fusionado a la proteína fluorescente verde, GFP, en el extremo C-terminal bajo el control del promotor 35SCaMV. Confiere resistencia a espectinomicina (100 $\mu\text{g/ml}$) en bacterias y a BASTA (10 $\mu\text{g/ml}$) en plantas.
- pPM056: Vector que permite expresar una región promotora de interés corriente arriba del gen que codifica para la enzima luciferasa, capaz de metabolizar el sustrato luciferina. Confiere resistencia a espectinomicina (100 $\mu\text{g/ml}$) en bacterias y a BASTA (10 $\mu\text{g/ml}$) en plantas.
- pSoup: Vector requerido para la transformación eficiente de *Agrobacterium tumefaciens* al utilizar los vectores pAS y pFK mencionados.

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

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

6.5. Medios de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae*

- Medio YPAD: peptona de carne 20 g/l; extracto de levadura 10 g/l; glucosa 20 g/l; adenina (sulfato) 0,02 g/l.
- Medio mínimo: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/l; glucosa 20 g/l; K_2HPO_4 1 g/l; MgSO_4 0,5 g/l; NaCl 0,1 g/l; CaCl_2 0,1 g/l; inositol 0,1 g/l; piridoxina-HCl 1mg/l; ácido nicotínico 1 mg/l; tiamina-HCl 10 mg/l. En función de la cepa de *S. cerevisiae* empleada y las transformantes a seleccionar, el medio mínimo fue suplementado con las siguientes concentraciones finales de aminoácidos y bases: uracilo 20 mg/l; adenina (sulfato) 40 mg/l; L-histidina 20 mg/l.

En los medios sólidos se adicionó agar-agar como agente solidificante a una concentración final de 15 g/l (1,5 % p/v).

6.6. Medios de cultivos para *Arabidopsis thaliana*

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

6.7. Soluciones

- Solución amortiguadora de extracción de ADN de *A. thaliana*: Tris-HCl 200 mM (pH 8,0); NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5%.
- Solución de Miniprep I: Tris-HCl 25 mM (pH 8,0); glucosa 50 mM y EDTA 10 mM.
- Solución de Miniprep II: NaOH 0,2 N y SDS 0,1% (p/v).
- Solución de Miniprep III: Acetato de potasio 5M pH4,8; Ácido acético glacial.
- Solución de siembra de ADN en geles de agarosa: Azul de bromofenol 0,25% (p/v); xilencianol FF 0,25% (p/v); glicerol 30% (v/v).
- Solución amortiguadora 2X citrato-HCL pH 7: citrato de sodio 0,1 M, llevada a pH con HCl 0,2 N.
- Solución madre de X-gluc: X-Gluc 50 mM en metanol.

- TAE 1X: Tris-acetato 40 mM (pH 8,0); EDTA 1 mM. TBE 1X: Tris-HCl 89 mM (pH 8,0); ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM (pH 8,0).
- TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7,5).
- Solución Hoagland 50X: KNO₃ 1M; Ca(NO₃)₂.4H₂O 1M; EDTA-Fe 20 mM; MgSO₄.7H₂O 1M; NH₄H₂PO₄ 1M; H₃BO₃ 2,86 g/L; MnCl₂.4H₂O 0,22 g/L; ZnSO₄.7H₂O 0,22 g/L; CuSO₄.5H₂O 0,08 g/L; H₃MoO₄.H₂O.
- Solución de extracción de proteínas: 0,5 vol de buffer 6X (Tris-HCl 375 mM (pH 6,8), SDS 9% p/v), Azul de bromofenol 0,03% p/v), β-mercaptoetanol 9% (v/v)), inhibidor de proteasa complete 1X, PMSF 1X, Glicerol 50 % (v/v).
- Solución de corrida (WB) 1X: Tris-Base 25 mM; glicina 250 mM; SDS 0,1% (p/v).
- Solución de transferencia 1X: Tris-Base 2,5 mM; glicina 19,2 mM; metanol 5% (v/v).
- Solución TBS-T 1X: Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween-20 0,1% (v/v).
- Solución de bloqueo: leche en polvo 5% (p/v) en TBS-T 1X.

6.8. Análisis de secuencias

Todas las secuencias nucleotídicas analizadas en este trabajo se obtuvieron de la base de datos proporcionada por *The Arabidopsis Information Resource (TAIR)*. Los estudios de alineamientos de secuencias nucleotídicas y proteicas se realizaron utilizando el programa BLAST (blastn o blastp, respectivamente, (Altschul et al., 1990).

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

En las reacciones de amplificación por PCR se usaron volúmenes de reacción de 50 µl, empleándose 1,5 U de la enzima TaqADN polimerasa (Promega) por reacción. Se utilizó la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima, a la cual se agregó: MgCl₂ 2 mM; dNTP 0,2 mM de cada uno y 500 ng de cada oligonucleótido específico. A esta mezcla de reacción se le incorporó el ADN molde y la enzima. Las reacciones se llevaron a cabo en los termocicladores TC-30006 (*Techne*) y PxE 0,2 Thermal Cycler (*Thermo Electron Corporation*) utilizando los programas apropiados para

cada caso y en donde la temperatura de hibridización se estableció de acuerdo a la secuencia de los oligonucleótidos utilizados [$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$].

Para realizar las reacciones de PCR de colonia se usaron como moldes pequeñas cantidades de bacterias extraídas directamente de la placa de transformación. Todas las reacciones de amplificación utilizadas en estos casos se realizaron en volúmenes de reacción de 20 μ l, manteniendo las proporciones descriptas.

Los productos de las reacciones de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa (sección 6.10). Los oligonucleótidos utilizados en cada caso se describen en el Anexo 1.

6.10. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se utilizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa de tipo submarino de acuerdo a lo descrito por Sambrook y col. (Sambrook et al., 1989). La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,7 y 2% (p/v) de acuerdo con el tamaño de los fragmentos analizados. Los geles fueron preparados en solución TAE 1X (Sección 6.7). El ADN se sembró con 1/10 vol. de solución de siembra (Sección 6.7) y fue visualizado por tinción con Gel Red en concentraciones especificadas por el fabricante. Las corridas electroforéticas se realizaron en solución TAE 1X a una intensidad de corriente constante de 70 mA y se utilizó como marcador de tamaño de los fragmentos ADN del bacteriófago λ (Promega) digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* (21266, 5148/4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564 y 125 pb). Para la visualización de los geles se utilizó un transiluminador de luz UV ($\lambda=310$ nm).

6.11. Purificación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN se purificaron a partir de geles de agarosa, empleándose el *kit* comercial *GeneJET Gel Extraction Kit* de Thermo Fisher Scientific.

6.12. Digestión con endonucleasas de restricción

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones de reacción recomendadas por los proveedores de cada enzima en particular. En todos los casos fueron utilizadas entre 1 y 5 U de enzima por cada μ g de ADN a digerir en un volumen final que varió entre 20 y 50 μ l, dependiendo de la cantidad de ADN.

6.13. Ligación de moléculas de ADN

La ligación de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 U de T4 ADN ligasa (Promega) en un volumen de reacción de 10 µl, empleando la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima. Se utilizaron cantidades de inserto y vector tales que la relación molar entre ambos fuera de 5 a 1, respectivamente. La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C.

6.14. Generación de construcciones génicas

Con el fin de obtener las construcciones para expresar las distintas versiones de la proteína GLK1 en *S. cerevisiae* para los ensayos de doble híbrido se realizaron deleciones a partir del ADNc GLK1, que fueron fusionadas a la región codificante del dominio de unión al ADN (BD) del activador transcripcional GAL4 de levadura, en el vector binario pGBKT7 (Clontech). Las características de este plásmido para expresión en levadura están descritas en la sección 6.3. Las distintas regiones del gen GLK1 fueron amplificadas empleando los oligonucleótidos adecuados (Anexo 1) y, como molde, ADN del clon GLK1-pGBKT7. Los productos de amplificación fueron purificados con un kit comercial a partir de gel de agarosa y luego de ser digeridos con enzimas de restricción, se ligaron con el vector pGBKT7 digeridos de la misma manera, siguiendo las técnicas descritas en las secciones 6.12 y 6.13. En la Tabla 1 se detallan los tamaños de insertos obtenidos, las enzimas de restricción utilizadas y el vector empleado para cada clonado.

Tabla 1: Fragmentos generados para los diferentes clonados. Para cada uno se indica el tamaño (en pb), los sitios de restricción incorporados durante la PCR, el plásmido en el cual fue clonado y las enzimas de restricción con las cuales se digirió dicho vector.

Construcción	Tamaño del inserto (pb)	Sitios de restricción (Inserto)	Vector de clonado	Sitios de restricción (Vector)
GLK1	1310	BamHI/XhoI	pENTR 3C	BamHI/XhoI
GLK1 _{D1}	1180	BamHI/Sall	pGBKT7	BamHI/Sall
GLK1 _{D2}	770	BamHI/Sall	pGBKT7	BamHI/Sall
GLK1 _{D3}	400	BamHI/Sall	pGBKT7	BamHI/Sall
GLK1 _{D4}	920	BamHI/XhoI	pGBKT7	BamHI/Sall
GLK1 _{D5}	580	BamHI/XhoI	pGBKT7	BamHI/Sall

Para obtener las construcciones utilizadas en el ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC), se amplificó la región codificante del gen *GLK1* a partir de ADNc, obviando el codón de detención, utilizando oligonucleótidos específicos *GLK1-MBP* y *pENTR-GLK1-R* (Anexo 1). Estos amplicones fueron clonados en el vector *pENTR 3C* utilizando los sitios *BamHI/XhoI*. La recombinación se realizó utilizando los vectores de destino *pAS054* y *pAS059* de la serie *pGREEN IIS*, para lograr la fusión a los fragmentos de YFP necesarios en el ensayo BiFC (*35S::GLK1-YFP_N* y *35S::GLK1-YFP_C*).

El clon *GLK1-pENTR 3C* también se utilizó para recombinar con el vector de destino *pFK-248* de la serie *pGREEN IIS* con el fin de obtener la construcción que permita sobreexpresar *GLK1* en plantas, *35S::GLK1-GFP*.

Por otro lado, se amplificó la región codificante del gen *TCP10* a partir de ADNc, obviando el codón de detención, utilizando oligonucleótidos específicos (Anexo 1), y mediante técnica de mutagénesis dirigida se mutó la secuencia de unión al microARN319a con el fin de obtener una versión de *TCP10* insensible al microARN. Estos amplicones fueron clonados en el vector *pENTR 3C* utilizando los sitios *EcoRI/XhoI*. Se realizó una recombinación utilizando el vector de destino *pFK-248* para su sobreexpresión como fusión a GFP (*35S::mTCP10-GFP*).

Para llevar a cabo los ensayos transitorios en hojas de *Nicotiana benthamina* con el reportero *LUCIFERASA*, se amplificaron las regiones promotoras de los genes *LHCB2.2* y *SAUR14*. En el caso de *LHCB2.2* se amplificó una región de aproximadamente 1000 pb antes del inicio de la traducción, el producto fue purificado y digerido con las enzimas de restricción *KpnI/HindIII*. Mientras que para el gen *SAUR14* se tomó una región de aproximadamente 800 pb corriente arriba del inicio de la traducción, el producto de amplificación purificado fue digerido con las enzimas *KpnI/BamHI*. Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR se detallan en el Anexo 1. Ambos fragmentos se ligaron con el vector *pPM056* de la serie *pGREEN IIS*, digerido con las enzimas adecuadas en cada caso, para obtener las fusiones a la región codificante del gen *LUCIFERASA* (*pLHCB2.2::LUC* y *pSAUR14::LUC*).

Por último, se obtuvieron construcciones para expresar dos versiones de *BZR1* en *S. cerevisiae* para ensayos de doble híbrido y en plantas para ensayos de BiFC. Se amplificaron por separado una región N-terminal (327 pb) y una región C-terminal (681 pb) del gen correspondiente, empleando los oligonucleótidos adecuados (Anexo 1) y como molde, ADN del clon *BZR1-pENTR3C*. Los productos de amplificación purificados fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI/BamHI*. Para los ensayos de Y2H,

estos los fragmentos fueron ligados con los vectores pGBKT7 y pGADT7 digeridos de igual manera, para su fusión a la región codificante del dominio de unión al ADN (BD) (BZR1_N-BD y BZR1_C-BD) o del dominio de activación (AD) de GAL4, respectivamente (BZR1_N-AD y BZR1_C-AD). Para los ensayos transitorios en plantas de *N. benthamiana*, el fragmento C-terminal de BZR1 se clonó además en el vector pENTR 3C para su posterior recombinación con los vectores de destino pAS054 y pAS059 obteniéndose los clones 35S::BZR1_C-YFP_N y 35S::BZR1_C-YFP_C, respectivamente.

6.15. Determinación de la secuencia de moléculas de ADN

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

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

La preparación de las células competentes y las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo (Micro Pulser™, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,1 cm de separación entre los electrodos (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB (Sección 6.4) a la suspensión de células y se las incubó durante 1 h a 37°C. Después de centrifugar a 5000 rpm durante 5 min, el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de medio LB y se sembró en placas de Petri con medio LB-agar suplementado con el antibiótico adecuado. Éstas fueron incubadas a 37 °C toda la noche.

Luego de crecidas las colonias, se identificaron aquellos clones positivos, primero, por PCR de colonia descrita en la sección 6.9 y luego a través de mini-preparaciones de plásmidos como se detalla en la sección 6.19. Los plásmidos obtenidos en este caso se analizaron por digestión con enzimas de restricción y/o PCR. Los clones positivos se guardaron en medio LB líquido con el agregado de los antibióticos a -80°C en glicerol 50%.

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

La preparación de las células competentes y las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo (Micro Pulser™, Bio-Rad). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,25 cm (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB a la suspensión de células y la mezcla se incubó durante 3 horas a 28°C. Después de centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos, el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de medio LB y se sembró en placas de Petri conteniendo medio LB-agar suplementado con los antibióticos adecuados. Las placas fueron incubadas a 28°C hasta la aparición de colonias (aproximadamente 48 horas). Luego de crecidas las colonias, se identificaron aquellos clones positivos primero por PCR de colonia y luego a través de mini-preparaciones de plásmidos. Los plásmidos obtenidos se analizaron por digestión con enzimas de restricción y/o PCR. Los clones positivos se guardaron en medio LB líquido con el agregado de los antibióticos a -80°C en glicerol 50%.

6.18. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de Acetato de Litio

Las transformaciones de levaduras se realizaron según el método descrito por Gietz y col. (Gietz et al., 1992) con algunas modificaciones tomadas de Ausubel y col. (Ausubel et al., 2010).

Con el fin de obtener células competentes las levaduras se cultivaron en 20 ml de medio líquido de cultivo YPAD (Sección 6.5) durante toda la noche (ON) a 30°C con agitación. Posteriormente se diluyó el cultivo en 200 ml de medio fresco y se dejó crecer en las mismas condiciones hasta $DO_{600}=0,25-0,5$ (aproximadamente 3 h). Las células se cosecharon por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min a 20°C, el precipitado celular se lavó con 50 ml de agua estéril. Luego de centrifugar las células nuevamente, se las resuspendió en 1 ml de una solución de TE/LiAc [TE 1X, LiAc 100 mM (pH 7,5)], preparada a partir de soluciones madres 10X. A continuación, se realizó una centrifugación a 12000 rpm, por 30 segundos y el precipitado se resuspendió en 250 µl de solución TE/LiAc.

Para la transformación se emplearon 50 µl de células competentes que se incubaron con un volumen no mayor a 10 µl del ADN correspondiente (5 µl de cada construcción para los ensayos Doble Híbrido en Levaduras, Y2H) y 300 µl de solución PEG 40%/TE

1X/LiAc 100 mM, durante 30 min a 30°C con agitación. Posteriormente las células se sometieron a un shock térmico: 42°C durante 15 min e inmediatamente se las centrifugó a 12000 rpm durante 30 segundos. El sedimento celular se lavó con 200 µl de solución TE 1X estéril y se resuspendió en 100 µl de TE para ser sembrado en placas de Petri que contenían el medio de cultivo mínimo (Sección 6.5) suplementado con los aminoácidos y bases correspondientes.

6.19. Preparación de ADN plasmídico

Las preparaciones de plásmidos a partir de células de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* transformadas se realizaron según el protocolo de Birnboim y Dolly (1979). Se centrifugaron 1,5 ml de un cultivo saturado de células cultivadas en medio LB con el antibiótico adecuado, a 5000 rpm durante 5 min. El sedimento celular fue resuspendido en 100 µl de Solución de Miniprep I (Sección 6.7). Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente se agregaron 200 µl de Solución de Miniprep II (Sección 6.7). Se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Se agregaron 150 µl de acetato de potasio 5 M (pH 5,2) y se incubó nuevamente en hielo durante 15 min. Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se trató con 400 µl de una mezcla de fenol saturado en Tris-HCl (pH 8,0) y cloroformo (1:1), a fin de remover las proteínas de la muestra. Se centrifugó durante 5 min a 8000 rpm a temperatura ambiente y el ADN de la fase acuosa se precipitó durante 2 h a -20°C con 2 vol. de etanol absoluto frío en medio acetato de sodio 0,3 M (pH 5,2). El ADN plasmídico se recuperó por centrifugación a 12000 rpm durante 10 min a 4°C y se lavó con etanol 70% (v/v) para eliminar sales. Se centrifugó, se secó el precipitado y se resuspendió en 20 µl de ARNasa (Promega) en concentración final de 100 ng/ml.

Cuando se necesitó preparar ADN plasmídico de alta calidad se utilizó el *kit* comercial *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* de Thermo Fisher Scientific, siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.20. Preparación de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*

El ADN de hojas de *A. thaliana* se preparó siguiendo la técnica de Li y Chory (1998). Una o 2 hojas de la planta se disgregaron con un pilón plástico en tubo *Eppendorf* a temperatura ambiente durante 15 segundos. Se agregaron 700 µl de solución amortiguadora de extracción (Sección 6.7) y se mezcló en vórtex durante 5 segundos. Se centrifugó durante 1 min a 12000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron

600 µl de isopropanol frío, se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y luego, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. El precipitado de ADN se lavó con etanol 70 % (v/v), se centrifugó, se secó el precipitado y se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril. Las preparaciones de ADN genómico de *A. thaliana* se guardaron hasta su uso a -20°C.

6.21. Expresión de las proteínas de fusión en *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa reportera fue transformada con los plásmidos contruidos para expresar las proteínas estudiadas fusionadas al dominio AD o BD de GAL4 (Detallados en la sección 6.14) de acuerdo a la metodología descrita en la sección 6.18. Para determinar la presencia de los plásmidos en las transformantes, las células fueron crecidas en los medios de cultivo adecuados para seleccionar los plásmidos pGADT7 o pGBKT7, adicionando los antibióticos ampicilina o kanamicina respectivamente.

6.22. Ensayos de interacción proteína-proteína en levaduras

El sistema de doble híbrido en levaduras (Y2H), desarrollado por Fields y colaboradores (Fields & Song, 1989), es una técnica de biología molecular muy utilizada para analizar interacciones entre proteínas. Una de las proteínas que regula transcripcionalmente las enzimas del metabolismo de la galactosa en levaduras es GAL4. Esta proteína juega un rol central y, como otros activadores transcripcionales, es una proteína modular, que requiere tanto un dominio de unión al ADN (BD) como un dominio de activación (AD). La técnica de doble híbrido explota el hecho de que GAL4 necesita ambos dominios para funcionar.

De esta manera, se expresan dos proteínas de fusión, una de las cuales está fusionada al dominio de activación de GAL4 (AD) mientras la otra está fusionada al dominio de unión al ADN de GAL4 (BD). Las construcciones con el AD y el BD se usan para co-transformar una cepa apropiada que contenga una secuencia de activación corriente arriba del gen reportero *LacZ*. De esta manera, si hay interacción entre las proteínas, ésta se puede cuantificar mediante la medición de la actividad del gen reportero *LacZ* como se describe en la sección 6.23. (Figura 11).

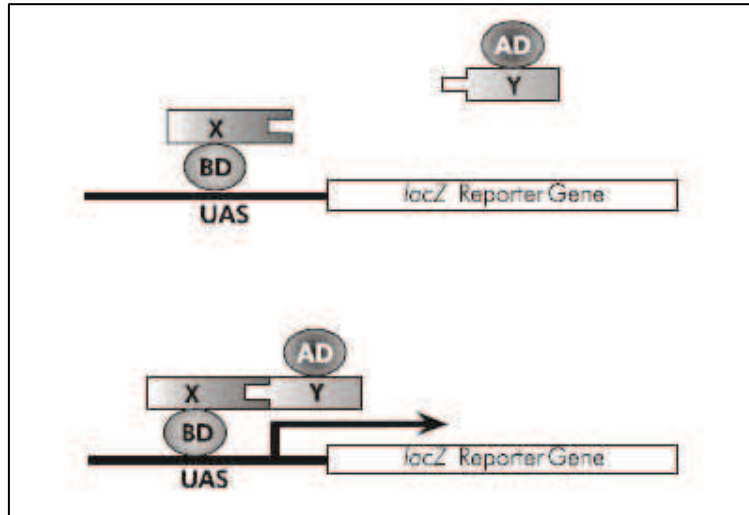


Figura 11: Sistema de doble híbrido en levaduras (*Adaptado de GAL4 Two-Hybrid Phagemid Vector Kits®, Instruction Manual, Stratagene*). BD: dominio de unión al ADN. AD: dominio de activación transcripcional. X e Y: proteínas en estudio.

6.23. Ensayo de la actividad β -galactosidasa

La actividad de la enzima β -galactosidasa en las cepas reporteras se determinó mediante ensayos en medio líquido debido a que, por su naturaleza cuantitativa, permiten comparar en forma relativa la fuerza de las interacciones proteína-proteína en los estudios de Y2H. Se empleó el sustrato ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido), que si bien es menos sensible que el CPRG (clorofenol- β -D-galactopiranosido) y no permite detectar las interacciones débiles, presenta ensayos muy reproducibles.

Los experimentos se llevaron a cabo empleando la metodología descrita por Ausubel y col. (Ausubel et al., 2010) con algunas modificaciones. Para cada ensayo se inocularon 10 ml de medio selectivo SD/-Leu-Trp con 8 colonias de levadura, y se incubaron a 30°C, con agitación de 200 rpm, hasta una DO_{600} de 0,5 a 1. A continuación, 1 ml de cultivo se utilizó para determinar la DO_{600} y un volumen similar se centrifugó a 12000 rpm durante 15 segundos. Luego de eliminar el sobrenadante, el precipitado celular fue congelado en N_2 líquido y resuspendido en 665 μ l de solución Z ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 16,1 g/l; $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 5,5 g/l; KCl 0,75 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25 g/l; β -mercaptoetanol 50 mM). Después, se adicionaron 55 μ l de cloroformo y 55 μ l de SDS al 0,1 % y la suspensión se sometió a agitación en vortex durante 60 segundos. Posteriormente se adicionaron 200 μ l de ONPG 8 mg/ml (disuelto en solución Z) y se incubó a 30°C hasta la aparición de color amarillo. La reacción se detuvo por agregado de 400 μ l de Na_2CO_3 1 M y se centrifugó a 12000 rpm, durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se midió la DO_{420} .

Las unidades de β -galactosidasa se definen como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ mol de ONPG a o-nitrofenol y D-galactosa por minuto y se calcularon utilizando la siguiente fórmula (Miller, 1972):

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

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

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

6.24. Esterilización de semillas

Cuando fue necesario sembrar las semillas en placa de cultivo, las mismas fueron esterilizadas previamente. La esterilización de las semillas consistió en realizar un primer lavado con etanol 70% (v/v) (1 min) y luego con una solución de lavandina 5% y SDS 1% (15 min). Luego de este paso de desinfección, las semillas se lavaron 5 veces con agua destilada estéril y finalmente se resuspendieron en agar 0,1 % estéril. A continuación, se colocaron a 4°C durante 5 días en oscuridad para sincronizar la germinación.

6.25. Condiciones generales de crecimiento en cámara de cultivo

Las plantas fueron cultivadas en cámara de cultivo simulando un fotoperiodo de día largo, el cual consiste en 16 horas de luz a una temperatura aproximada de 23°C y 8 horas de oscuridad. La humedad se mantuvo en un rango variable entre 40-70%. Las condiciones de iluminación fueron logradas con una combinación de lámparas fluorescentes blancas frías y de tipo GroLux (Sylvania, Vinhedo, SP, Brasil), con una densidad de flujo de fotones fotosintética de 100 μ E m⁻² s⁻¹.

6.26. Condiciones de crecimiento en tierra

Las plantas de *A. thaliana* fueron cultivadas sobre un sustrato a base de turba rubia TS1. Las macetas fueron subirrigadas con agua para mantener la humedad del sustrato, y suplementadas una vez por semana con solución Hoagland 1X. (Sección 6.7).

6.27. Transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana*

La transformación transitoria, se realizó adaptando el protocolo de Waadt y col. (Waadt et al., 2014). Para ello se crecieron, en 10 ml de medio LB, a 28°C, toda la noche las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con las construcciones deseadas (incluyendo un clon para expresar la proteína viral p19). Con estos cultivos se inocularon 30 ml de medio LB que crecieron en las mismas condiciones toda la noche. Luego se centrifugaron los cultivos a 6000 rpm, 15 min y las células precipitadas fueron resuspendidas en solución amortiguadora de infiltración (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM pH 5,7, acetosiringona 150 µM) e incubadas por 3 h a temperatura ambiente. Seguido a esto se llevaron todos los cultivos a un DO₆₀₀=0.5 y se realizaron las diferentes combinaciones en una relación 2:2:1 (Construcción A:Construcción B:p19).

Finalmente se infiltró, con jeringas sin agujas, la cara abaxial de hojas de plantas de 15 a 20 días de *Nicotiana benthamiana*.

6.28. Ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC)

Con el objetivo de analizar interacciones entre proteínas *in vivo* en planta se realizó el ensayo de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC, *Bimolecular Fluorescence Complementation*). Este ensayo permite la visualización simple y directa de interacciones proteicas y su localización subcelular en células vivas. Se basa en la formación de un complejo fluorescente cuando dos proteínas, fusionadas a los fragmentos no-fluorescentes de YFP (*yellow fluorescent protein*), interaccionan entre sí (Kerppola, 2008; Kudla & Bock, 2016). (Figura 12).

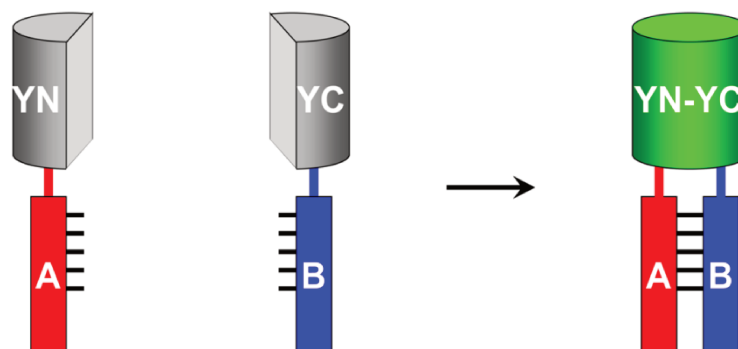


Figura 12: Representación esquemática del ensayo BiFC. Dos fragmentos no-fluorescentes (YN e YC) de YFP son fusionados a las proteínas en estudio (A y B). La interacción entre A y B permite la formación de un complejo bimolecular fluorescente. *Adaptado de Kerppola, 2008*(Kerppola, 2008)

Para este fin, se realizaron fusiones de las proteínas en estudio a los fragmentos no fluorescentes N- y C-terminal de YFP o mCitrina (Sección 6.14), se transformó con estas construcciones células de *Agrobacterium tumefaciens* (Sección 6.17) y, luego de obtener los clones positivos, se transformó de manera transitoria plantas de *Nicotiana benthamiana* (tabaco) (Sección 6.27). En caso de que las proteínas a analizar interaccionen entre sí *in vivo* en la planta, los fragmentos N- y C-terminal de YFP se aproximan resultando en la restauración de la fluorescencia (Kudla & Bock, 2016). Esto se analizó por microscopía de escaneo laser confocal (CLSM), donde se tomaron al menos 15 imágenes de distintas hojas de *N. benthamiana* infiltradas con las distintas construcciones. Las imágenes fueron tomadas usando un microscopio Leica SP8, se adquirieron con el software *Leica Application Suite Advanced Fluorescence* (LAS AF) usando configuraciones idénticas para todas las muestras. Las muestras fueron excitadas con el láser de 514 nm (intensidad 50%) y los detectores fueron colocados en 524-560 nm con una ganancia de 653 (para Citrina) y 640-670 nm con una ganancia de 627 (para clorofila). El procesamiento y cuantificación de las imágenes se realizó en el software Fiji (Schindelin et al., 2009). Se procesaron al menos 50 imágenes para cada combinación.

6.29. Análisis de la actividad del reportero LUCIFERASA

Para analizar la actividad del gen reportero *LUCIFERASA*, se utilizaron 8 discos de 5 mm de diámetro cortados de diferentes hojas de tabaco transformadas de forma transitoria. Los discos fueron colocados de forma individual en una placa *multi-well* específica para el equipo a utilizar en la cuantificación y embebidos en una solución de D-Luciferina, sal monopotásica, 100 mM. Se cuantificó la bioluminiscencia para cada disco, durante 35 ciclos de 1 segundo/disco, usando el equipo Fluoroskan Ascent FL plate luminometer (Thermo Scientific). Finalmente, los valores de bioluminiscencia cuantificados fueron referidos al nivel de transcripto del gen *BAR* (gen que confiere resistencia a BASTA, presente en el mismo vector donde se codifica el gen reportero *LUCIFERASA*, pPM056) cuantificado en las mismas muestras biológicas.

6.30. Transformación estable de *Arabidopsis thaliana*

El método utilizado para transformar de manera estable plantas de *A. thaliana* fue el de inmersión floral (*floral dip*) descrito por Clough y Bent (1998). Se prepararon, aproximadamente, 8 macetas con tierra para cada una de las construcciones a introducir en las plantas. Se sembraron alrededor de 10 semillas por maceta, lo que permitió luego

seleccionar las que mostraban un aspecto más saludable y reducir el número de plantas por maceta a 5. Las plantas se cultivaron en una cámara de temperatura, humedad y fotoperíodo controlados, según las condiciones de cultivo antes descritas, hasta la floración (aproximadamente 4 semanas). A partir de este momento, se empezaron a cortar las inflorescencias para aumentar el número de flores por planta a ser sometida al evento de transformación.

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

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

6.31. Selección de plantas transformadas

Las semillas lavadas, una vez resuspendidas y vernalizadas por una semana a 4 °C, se sembraron en placas de Petri con medio MS 1X 0,8% agar y el antibiótico correspondiente como agente selectivo. Las placas fueron pasadas a cámara de cultivo, manteniéndose de esta forma durante 12-15 días. En ese período sólo las plantas transformadas generaron hojas verdaderas muy verdes y raíces suficientemente largas.

Las plantas se dejaron crecer hasta la aparición de hojas y se transplantaron a macetas con tierra. Cuando las semillas estuvieron maduras, éstas se recolectaron, rotularon y guardaron a 4°C.

6.32. Análisis de plantas transformadas

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

6.33. Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa

Para analizar la actividad β -glucuronidasa en forma histoquímica, las plántulas cultivadas en distintas condiciones fueron transferidas a una solución de citrato-HCL (pH 7), Tritón X-100 0,1% y X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucurónido) 2 mM. A continuación, se sometieron a vacío 5 min y se incubaron a 37°C en oscuridad durante 24 h (Jefferson et al., 1987). Luego de la incubación se agregó etanol 70% para decolorar los tejidos y se guardaron en solución etanólica a 4°C hasta ser fotografiadas. Las imágenes digitalizadas se tomaron con cámara LUMIX DMC-FZ35 (Panasonic) y Lupa Leica MZ10F.

El análisis histoquímico se realizó en plántulas de 1 a 6 días, cultivadas en placas de Petri con medio MS 1X 0,8% agar.

6.34. Ensayos fenotípicos

Para los ensayos fenotípicos en plántulas las semillas de los genotipos a analizar fueron esterilizadas y luego vernalizadas a 4 °C durante 4 días en oscuridad. A continuación, fueron sembradas en placas de cultivo conteniendo medio MS 1X 0,8% agar (Sección 6.6). En el caso de las plántulas cultivadas en condiciones de oscuridad, la germinación

de las semillas fue inducida colocando previamente las placas bajo luz blanca ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 5 h a $22 \text{ }^\circ\text{C}$. Luego, las placas fueron envueltas en varias capas de papel aluminio y mantenidas en oscuridad a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ según la duración del ensayo. Para analizar la apertura de cotiledones en la transición de oscuridad a luz, las plántulas se mantuvieron en oscuridad por 2 días y luego fueron colocadas bajo luz blanca ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por el tiempo indicado en cada ensayo.

Para medir el ángulo de apertura y el área de expansión de cotiledones, las plántulas fueron colocadas en placas con agar y fotografiadas. Las medidas se realizaron digitalmente usando el software ImageJ. El ángulo medido corresponde al ángulo interno entre líneas longitudinales dibujadas a través de cada uno de los cotiledones, en el caso de cotiledones completamente cerrados fue definido como $7 \text{ }^\circ\text{C}$.

En los ensayos donde se realizaron tratamientos con el agregado de distintos compuestos al medio de cultivo, se utilizaron las concentraciones detalladas en la tabla 2. Los controles se realizaron agregando el solvente correspondiente (H_2O o DMSO) al medio de cultivo.

Tabla 2: Concentraciones utilizadas para los diferentes ensayos fenotípicos.

Tratamiento	Concentración (μM)
B-estradiol	50
Lincomicina (LIN)	1000
MG-132	20
Brasinólido (BL)	0.1
Brasinazol (BRZ)	1

6.35. Extracción de ARN y análisis de RT-qPCR

La preparación de ARN de plantas cultivadas en luz se realizó a partir de plantas aisladas utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen) seguido de precipitación con LiCl. Mientras que para plántulas cultivadas en oscuridad o transferidas de oscuridad a luz se utilizó el protocolo descrito previamente por Chang y col. (Chang et al., 1993). La retrotranscripción (RT) se realizó con un cebador oligo $(\text{dT})_{18}$ y la enzima MMLV transcriptasa reversa (Promega) utilizando 1-2 μg de ARN total. La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se realizó en un aparato StepOne (Applied Biosystems) usando los

cebadores específicos enumerados en el Anexo 1 y SYBR Green. La expresión de los genes se calculó en relación con *ACTINA* (*ACT2* y *ACT8*; (Charrier et al., 2002), utilizando el método $\Delta\Delta Ct$. Los resultados presentados son de tres réplicas biológicas, cada una de las cuales consta de un conjunto de 15 plántulas. El *software* GraphPad Prism se utilizó para analizar los datos y producir los gráficos. Se compararon todas las combinaciones de tratamientos y genotipos utilizando ANOVA de dos vías seguido de la prueba *post-hoc* de Tukey para analizar si las diferencias eran estadísticamente significativas.

6.36. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Los experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se realizaron como se describe en Ariel y col. (Ariel et al., 2014) utilizando anticuerpos anti-GFP (Abcam, Cambridge, UK, ab6556) o anti-IgG (Abcam, ab6702). Se extrajeron muestras de cromatina de plántulas de 6 días cultivadas en las condiciones indicadas para cada ensayo. Después del entrecruzamiento y la extracción y lisis de los núcleos, la cromatina se sonicó en un baño de agua Bioruptor Pico (Diagenode; 10 ciclos de: 30 s prendido / 30 s apagado, pulsos de baja intensidad, en microtubos Bioruptor). Para la inmunoprecipitación, las muestras se incubaron durante 12 h a 4°C con Proteína A Dynabeads (Invitrogen) recubiertas con los anticuerpos correspondientes. El ADN inmunoprecipitado se recuperó mediante extracción con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitación con etanol. La cuantificación de las regiones genómicas inmunoprecipitadas se realizó mediante qPCR usando los cebadores enumerados en el Anexo 1 y el kit comercial iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Una fracción de cromatina sonicada sin inmunoprecipitar se procesó en paralelo y se consideró como la muestra de entrada (*input*).

6.37. Extracción de proteínas totales de *Arabidopsis thaliana*

Para la extracción de proteínas totales, las plántulas se cosecharon y pulverizaron en un mortero enfriado previamente con nitrógeno líquido. Luego se agregaron 150 μ l de solución de extracción de proteínas (Sección 6.7) por cada 100 mg de tejido molido. Se centrifugó durante 10 min a 12.000 rpm, y finalmente se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL donde se incubó a 95 °C por 5 min, con el fin de desnaturalizar las proteínas de las muestras, teniendo así los extractos proteicos listos para continuar con los ensayos de *western blot*.

6.38. Separación de proteínas y análisis por western blot (WB)

La separación de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) se llevó a cabo en geles verticales según lo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Las proteínas se resolvieron en geles de separación con una concentración final de acrilamida del 12% (p/v), con geles superiores de concentración del 6% (p/v). La corrida electroforética se llevó a cabo en solución de corrida 1X (Sección 6.7). A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Roche), pre-activada con metanol 100%, por el método estándar de transferencia húmeda en tanque, con solución de transferencia 1X. Para determinar el peso molecular de las bandas y para confirmar la eficiencia de transferencia se utilizó el marcador de peso molecular proteico PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Luego de la transferencia, se incubó la membrana en solución de bloqueo durante 1 h. Las transferencias se hibridaron con anticuerpos policlonales de conejo contra GFP (Agrisera, dilución 1:5000), durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Después de 2 lavados de 10 min con solución TBS-T 1X (Sección 6.7), la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario anti-IgG policlonal conjugado con HBR (Agrisera AS09602; dilución 1:10.000) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente, se realizaron 6 lavados de 10 min con solución TBS-T 1X, se transfirió la membrana a un folio de plástico transparente, se le agregó por arriba 1 mL del sustrato ECL™ Prime Western Blotting System (GE Healthcare), y finalmente se realizó la exposición a temperatura ambiente durante tiempos variables en películas radiográficas ECL Hyperfilm (Amersham) según la intensidad de la señal deseada.

*R*ESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1. Estudio de la interacción entre las proteínas TCP y el factor de transcripción GLK1 de *Arabidopsis thaliana*

Como se describió, existen diversos mecanismos a través de los cuales los miembros de la familia TCP ejercen su función. Así, la complejidad de acción que reviste esta familia estaría basada no sólo en las diferencias en sus propiedades de interacción con el ADN o en la existencia de distintos patrones de expresión, sino también en la formación de distintos complejos reguladores a través de la interacción con otras proteínas. En base a esto consideramos que la identificación y caracterización de proteínas que interaccionan con los factores de transcripción TCP constituye una estrategia importante para establecer nuevas hipótesis acerca de las funciones que estas proteínas cumplen en la determinación de la morfología y la arquitectura vegetal y dilucidar así los mecanismos moleculares involucrados en su acción.

7.1.1. Las proteínas TCP de clase I interactúan físicamente con el factor de transcripción GLK1

Con el fin de obtener nuevas evidencias sobre el papel que las proteínas TCP cumplen en el desarrollo de *Arabidopsis*, realizamos una búsqueda de factores de transcripción que sean capaces de establecer interacciones proteína-proteína con las proteínas TCP. Para esto se recurrió a la estrategia de *screening* de doble-híbrido en levaduras (Y2H) utilizando una biblioteca de ADNc de más de 1500 factores de transcripción de *Arabidopsis* clonados en el vector pDEST22 (Invitrogen) que permite expresar las proteínas como fusiones al dominio de activación de la transcripción (AD) del factor de transcripción de levaduras GAL4. Dado nuestro interés por encontrar factores de transcripción que interaccionen con las proteínas TCP, pero no pertenecientes a dicha familia, en esta biblioteca no se encontraban representados clones correspondientes a proteínas de la familia TCP. Esta biblioteca se enfrentó a TCP11, una proteína TCP de clase I de *Arabidopsis*, que se expresó en levaduras fusionada al dominio de unión al ADN (BD) de GAL4 a partir del vector pGBKT7 (Clontech). Este experimento fue realizado en colaboración con el grupo de investigación que dirige del Dr. Jong Chan Hong (Gyeongsang National University, Corea). Como resultado encontramos que TCP11 es capaz de interaccionar con GLK1, un factor de transcripción de la familia GARP. Este hallazgo nos resultó interesante dado que hasta el momento no se había relacionado a las proteínas TCP de clase I con procesos que son regulados por GLK1,

como el desarrollo de cloroplastos y la señalización retrógrada desde cloroplastos a núcleo (Andriankaja et al., 2014; Fitter et al., 2002).

Debido a los numerosos reportes que indican que diferentes proteínas TCP afectan procesos relacionados, puede decirse que existe un alto grado de redundancia funcional dentro de la familia. Frente a este escenario nos preguntamos si GLK1 también podría interactuar con otros miembros de la familia TCP, además de TCP11. Para analizar si GLK1 es capaz de interactuar con otras proteínas TCP de clase I, y evaluar si esto se extiende también a proteínas de la clase II, se realizaron ensayos de interacción proteína-proteína en levaduras siguiendo la metodología descrita en la sección 6.22. Se utilizaron construcciones que contienen las regiones codificantes de GLK1 y de proteínas TCP de Arabidopsis de ambas clases fusionadas a los dominios de activación (AD) y unión al ADN (BD) de GAL4, como TCP11, TCP15, TCP16, TCP20 y TCP21 (de clase I), y TCP4, TCP10 y TCP24 (de clase II). Con estos clones se transformaron células de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* MaV203 (Invitrogen) (Sección 6.18) que posee las secuencias de ADN reconocidas por GAL4 en promotores que se encuentran fusionados a tres genes reporteros distintos: *LacZ*, *HIS3* y *URA3*. El gen *LacZ* codifica para la enzima β -galactosidasa, por lo que la medición de la expresión de este reportero en los distintos clones obtenidos se realizó a través de la determinación de la actividad de esta enzima (Sección 6.23). En estos ensayos observamos que la co-expresión de los dominios AD y BD de GAL4 o la expresión de las proteínas TCP de clase I y GLK1 por separado no produjeron activación del gen reportero *LacZ* (Figura 13). Sin embargo, cuando se analizó la expresión de *LacZ* en las células de levadura que expresan TCP11-AD, TCP15-AD, TCP20-AD o TCP21-AD junto a GLK1-BD se observó un incremento notorio en la actividad β -galactosidasa (Figura 13a), lo que sugiere que GLK1 es capaz de interactuar con estas proteínas TCP de clase I. A continuación, analizamos la posible interacción de GLK1 con miembros TCP de clase II, como TCP4, TCP10 y TCP24. Sin embargo, no se observó activación del gen reportero con estas proteínas (Figura 13b). Estos resultados sugieren que GLK1 es capaz de interactuar con proteínas TCP de clase I, pero no con miembros de la clase II de esta familia. Cabe destacar que tampoco se detectó interacción entre GLK1 y TCP16, un miembro divergente de la clase I que presenta propiedades de unión al ADN similares a las de las proteínas TCP de clase II (Viola et al., 2012), lo que sugiere que esta peculiaridad podría extenderse también a la interacción con GLK1.

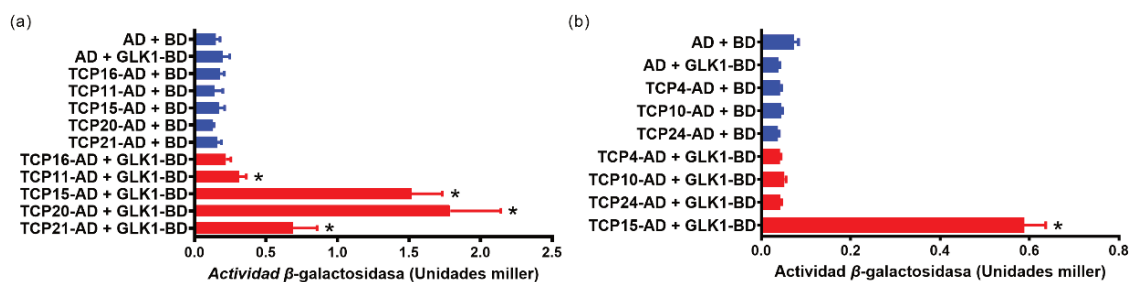


Figura 13: Análisis de doble híbrido en levaduras (Y2H) de la interacción entre GLK1 y TCPs de clase I (a) y clase II (b). En (b), se incluyó TCP15 (TCP de clase I) como control positivo. AD y BD indican fusiones al dominio de activación o de unión al ADN de GAL4, respectivamente.

Las construcciones que expresan únicamente AD o BD se utilizaron como controles. Se muestran los valores promedios de actividad β -galactosidasa obtenidos en tres ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control AD + BD ($p < 0,05$; análisis de la varianza).

7.1.2. TCP15 interactúa con GLK1 in vivo en plantas

Para dilucidar la relevancia funcional de la interacción entre las proteínas TCP de clase I y GLK1, elegimos como miembro representativo a TCP15, que ha sido ampliamente estudiada en nuestro grupo (Camoirano et al., 2020, 2021; Ferrero et al., 2021; Gastaldi et al., 2020, 2022; Lucero et al., 2015; Uberti-Manassero et al., 2012; Viola et al., 2011, 2013, 2016) y mostró una fuerte activación del gen reportero en el ensayo de Y2H. En primer lugar, decidimos validar la interacción física entre TCP15 y GLK1 en células vegetales a través de ensayos de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC por sus siglas en inglés, *bimolecular fluorescence complementation*; sección 6.28) en hojas de *Nicotiana benthamiana* (tabaco). Para ello, se fusionaron las secuencias codificantes completas de TCP15 y GLK1 con las secuencias que codifican los fragmentos N-terminal y C-terminal de mCitrina o YFP: TCP15 N-mCitrina, TCP15 C-mCitrina, GLK1 N-mCitrina y GLK1 C-mCitrina (Sección 6.14). Como control negativo de este experimento se utilizó a HB11 (Cabello et al., 2016), un factor de transcripción de la familia HD-Zip de *Helianthus annuus* (girasol) que es capaz de formar homodímeros pero no se encuentra relacionado funcionalmente a TCP15 o GLK1. Cuando las construcciones que permiten expresar TCP15 o GLK1 fueron co-expresadas con HB11 se observó una leve fluorescencia (Figura 14a). Sin embargo, se observó una señal intensa de fluorescencia, principalmente en los núcleos de las células vegetales, cuando TCP15 y GLK1 se co-expresaron en ambas combinaciones (Figura 14a), lo que indicó una reconstitución de la fluorescencia de mCitrina y, por lo tanto, la existencia de interacción entre las proteínas en estudio. Además, observamos que TCP15 y GLK1 formaron homodímeros que se localizaron en el núcleo de las células vegetales (Figura 14a). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia en plantas transformadas con

las distintas combinaciones confirmó que la señal observada tras la co-expresión de GLK1 y TCP15 fue significativamente mayor a la de los controles negativos (Figura 14b). Los resultados muestran que, además de formar homodímeros, TCP15 y GLK1 interactúan físicamente entre sí en el núcleo de las células vegetales.

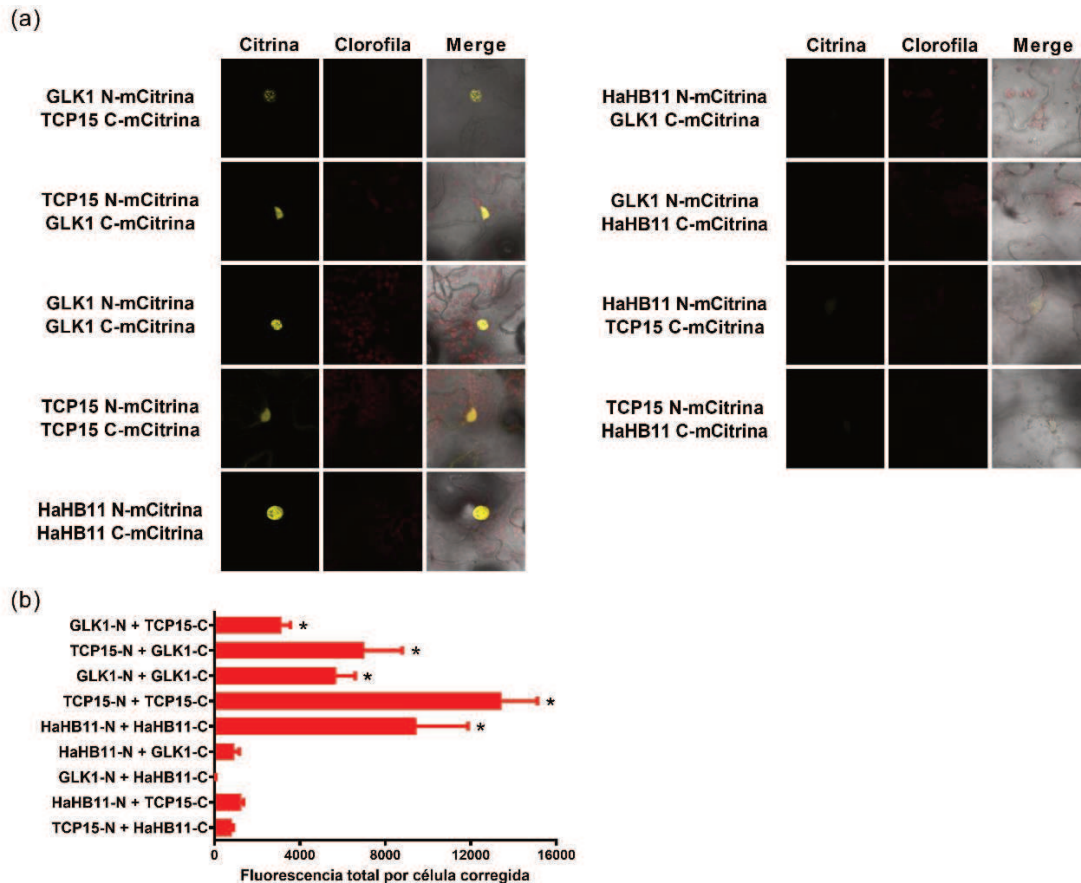


Figura 14: Interacción entre TCP15 y GLK1 *in vivo* en plantas mediante ensayo de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC). Se co-infiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* (sección 6.27) con las construcciones indicadas y luego de 3 días, se analizó la fluorescencia de la mCitrina mediante microscopía confocal. (a) Imágenes de la fluorescencia de mCitrina (Citrina), fluorescencia de clorofila (Clorofila) y superposición de fluorescencia de mCitrina, fluorescencia de clorofila y luz transmitida (Merge). Las imágenes mostradas son representativas de 50 imágenes analizadas en cinco a seis hojas diferentes. (b) Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia de mCitrina. La intensidad de la fluorescencia fue medida en 40-50 imágenes por construcción utilizando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Las barras indican el promedio \pm SEM y los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$; prueba t de *Student*) en relación con el control negativo respectivo, aquel en el cual una fusión con HaHB11 sustituye a TCP15 o GLK1.

7.1.3. TCP15 interactúa con el dominio GCT de GLK1

Una vez que determinamos que la formación de complejos proteicos entre TCP15 y GLK1 ocurre *in vivo* en plantas nos preguntamos qué región de GLK1 estaba involucrada en la interacción. Para responder a este interrogante, decidimos efectuar

ensayos de doble híbrido en levaduras enfrentando la versión completa de TCP15 a distintas porciones de GLK1.

Las proteínas GLK contienen tres regiones conservadas: una región ácida N-terminal, un dominio de unión al ADN GARP (DBD) en la región central, y el dominio GLK/caja C-terminal (GCT) en la región C-terminal. El dominio GCT es específico de las proteínas GLK y contiene dos regiones ricas en prolina (PRR1 y PRR2) y la caja C-terminal (Rossini et al., 2001). Teniendo en cuenta estos dominios proteicos conservados, versiones truncas de GLK1 (GLK1_{D1}-GLK1_{D5}) se clonaron en el vector pGBKT7 para su expresión como fusiones al dominio BD de GAL4. (Figura 15; Sección 6.14). Cuando TCP15-AD se co-expresó con diferentes porciones de GLK1-BD, observamos una activación significativa del reportero *LacZ* en relación a los controles para GLK1_{D4}, que carece de la región N-terminal, y GLK1_{D5}, que carece de la región N-terminal y el DBD (Figura 15), lo que sugiere que el dominio GCT es suficiente para la interacción con TCP15. Además, observamos que la eliminación de la región que contiene el dominio PRR2 y la caja C-terminal (GLK1_{D1}) no afectó en gran medida la interacción con TCP15 (Figura 15). Sin embargo, dado que se observó actividad β -galactosida con la construcción GLK1_{D1}-BD (auto-activación), el aumento relativo de la actividad del reportero *LacZ* ejercido por el complejo GLK1_{D1}-BD - TCP15-AD sería menor que con las otras construcciones, lo que indicaría que el dominio PRR2 y la caja C-terminal de GLK1 también contribuyen a la interacción con TCP15. En el caso de GLK1_{D2}-BD, la co-expresión con el vector vacío AD generó una fuerte activación del gen reportero *LacZ*; por lo que, esta construcción no se utilizó para el análisis de la interacción con TCP15. En conjunto, los resultados sugieren que el dominio GCT está involucrado en la interacción con TCP15, aunque no se pueden descartar interacciones adicionales con otras porciones de GLK1.

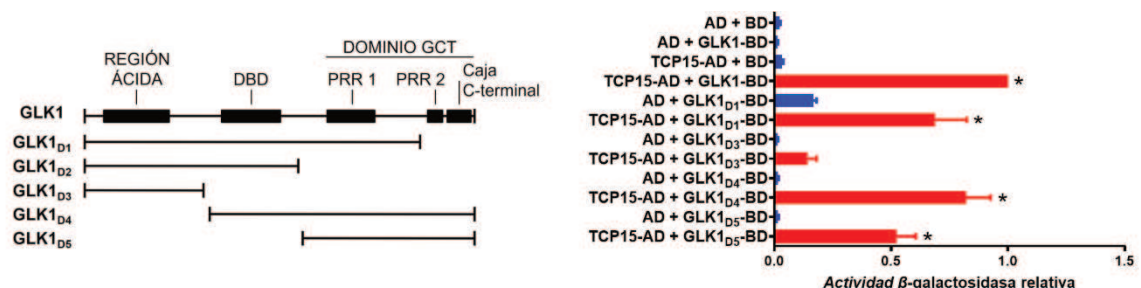


Figura 15: Ensayo de doble híbrido en levaduras de la interacción proteína-proteína entre TCP15 completa y diferentes regiones de GLK1. Los valores se expresan en relación al control positivo TCP15-AD + GLK1-BD. Se muestran los valores promedios de actividad β -galactosidasa obtenidos a partir de tres ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control AD + BD ($p < 0,05$; análisis de la varianza). A la izquierda se muestra un esquema de las diferentes construcciones empleadas para expresar distintas versiones de GLK1 en los ensayos de Y2H. DBD, dominio de unión al ADN; PRR1 y PRR2, regiones ricas en prolina.

7.2. Estudios del papel de los factores de transcripción TCP de clase I y GLK1 durante la de-etiolación en *Arabidopsis thaliana*

La de-etiolación es la respuesta de la planta ante la exposición a la luz e implica el cambio de un desarrollo de escotomorfogénesis a fotomorfogénesis (Jiao et al., 2007). Este proceso se caracteriza por la inhibición del crecimiento del hipocotilo, el desarrollo de los cloroplastos y la apertura y expansión de los cotiledones (Gommers & Monte, 2018). Por el contrario, cuando las plántulas crecen en oscuridad presentan un fenotipo etiolado: hipocotilos más elongados, cotiledones cerrados y sin desarrollo de cloroplastos. Como se ha descrito en la introducción, GLK1 se reportó inicialmente como un regulador clave de genes nucleares que codifican proteínas involucradas en la fotosíntesis (Fitter et al., 2002; Waters et al., 2009). Posteriormente, se propuso que GLK1 tiene un papel más amplio durante la fotomorfogénesis, actuando como un regulador positivo en las transiciones de desarrollo de las plántulas relacionadas con este proceso (Martin et al., 2016). En base a esto nos preguntamos si TCP15 y otras proteínas TCP de clase I tendrían un papel durante el desarrollo de las plántulas durante la fotomorfogénesis.

7.2.1. *GLK1 y las proteínas TCP de clase I son necesarios para la apertura y expansión de los cotiledones*

Comenzamos nuestros estudios de fotomorfogénesis analizando los patrones de expresión conferidos por las regiones promotoras de *TCP15* (Ferrero et al., 2021) y del gen relacionado *TCP14* (Kieffer et al., 2011) en líneas de plantas que expresan la región promotora de estos genes dirigiendo la expresión del gen *TCP15* o *TCP14*, respectivamente, fusionado al gen reportero *GUS*, cultivadas durante 6 días en oscuridad o luz. Observamos que ambos genes *TCP* se expresan en cotiledones de plántulas cultivadas tanto en oscuridad como en luz (Figura 16a). Un análisis de niveles de transcripto mediante RT-qPCR (sección 6.35) mostró un aumento moderado, aunque significativo en la expresión de ambos genes en cotiledones de plántulas etioladas expuestas a la luz (Figura 16b). Un aumento similar fue observado para la expresión de *GLK1* en los cotiledones durante la transición de oscuridad a luz (Figura 16b).

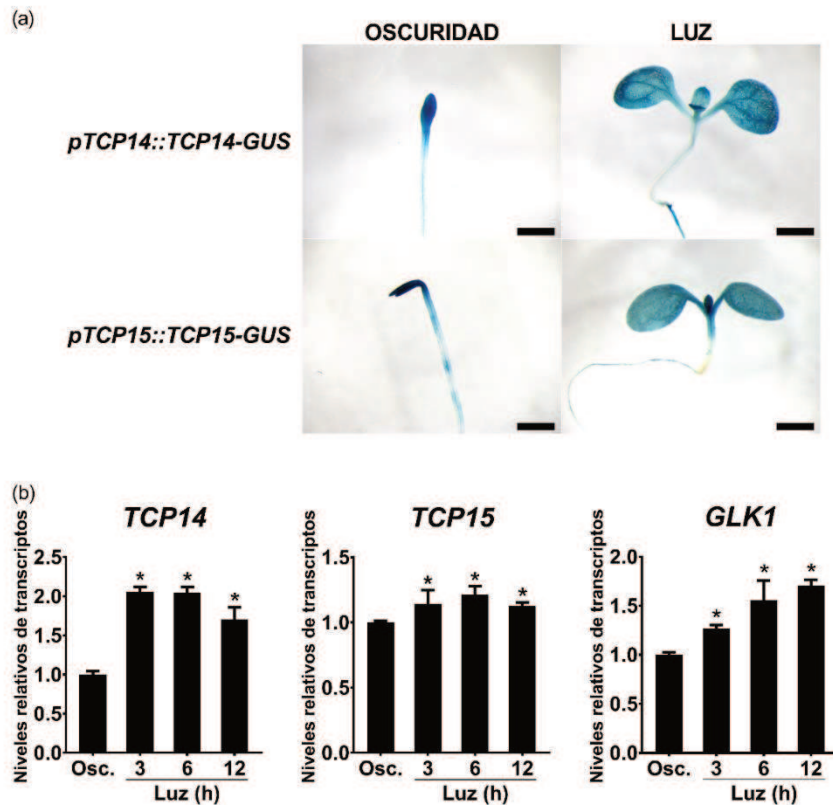


Figura 16: Expresión de *TCP14*, *TCP15* y *GLK1* en respuesta a la luz. **(a)** Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa (sección 6.33) en plántulas *pTCP14::TCP14-GUS* y *pTCP15::TCP15-GUS* cultivadas en condiciones de oscuridad o luz durante 6 días (barras de escala: 1 mm). **(b)** Análisis cuantitativo de los niveles de transcritos de *TCP14*, *TCP15* y *GLK1* en cotiledones de plántulas salvajes cultivadas durante 48 horas en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante los tiempos indicados. Los valores se expresan relativizados a los de las plantas cultivadas en oscuridad. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$; prueba t de Student). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

Teniendo en cuenta estas observaciones y nuestro hallazgo de que *TCP15* interacciona con *GLK1*, comenzamos a explorar la posible interacción funcional entre *GLK1* y las proteínas *TCP* de clase I. Para ello, analizamos fenotipos característicos de deficiencia de *GLK1* en plantas mutantes simples y dobles de *TCP15* y *TCP14* para (Sección 6.34). Como comparación, utilizamos plantas mutantes *glk1-1* ya descritas, que contienen una inserción *dSpm* 112 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de *GLK1* y presentan niveles muy disminuidos de transcritos de *GLK1* (Fitter et al., 2002) (Figura 60 en el Anexo 2). Como se muestra en la Figura 17a-c, plántulas mutantes simples en *TCP14* y *TCP15*, *tcp14-6* y *tcp15-3* (Kieffer et al., 2011), al igual que las mutantes *glk1-1* (Martin et al., 2016), presentaron un retraso significativo en la apertura de los cotiledones al ser expuestas a la luz en comparación con las plantas salvajes (WT, *wild type*). Cuatro mutantes *tcp* individuales adicionales, *tcp14-1*, *tcp14-3*, *tcp15-1* y *tcp15-4* (Kieffer et al., 2011), también mostraron defectos en la apertura de cotiledones (Figura

17d). Estos resultados sugieren que, al igual que *GLK1*, *TCP14* y *TCP15* son necesarios para la apertura óptima de los cotiledones durante la de-etiolación en *Arabidopsis*. Además, observamos que plantas mutantes dobles *tcp14-4 tcp15-3* (Kieffer et al., 2011) mostraron una deficiencia en la apertura de los cotiledones similar a las mutantes simples correspondientes (Figura 17e), lo que sugiere que *TCP14* y *TCP15* no actuarían en forma redundante en este proceso.

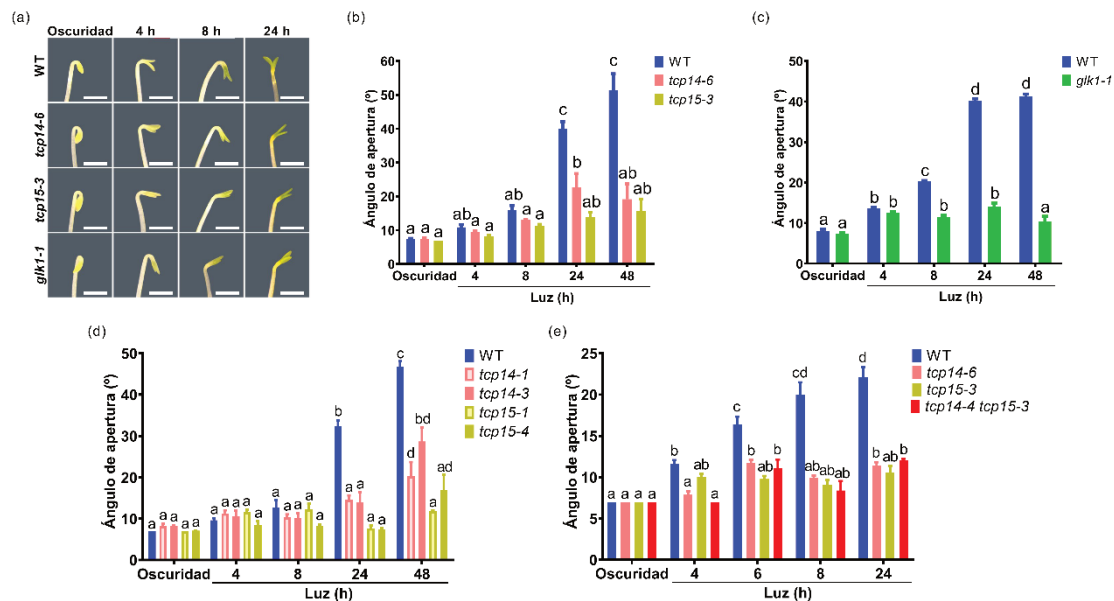


Figura 17: Ensayos fenotípicos de transición de oscuridad a luz. **(a)** Imágenes representativas de la parte apical de plántulas salvajes (WT), *tcp14-6*, *tcp15-3* y *glk1-1* cultivadas durante 48 h en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante el tiempo indicado. Barras de escala: 1 mm. **(b-e)** Ángulos de apertura de cotiledones de las plántulas *tcp14-6* y *tcp15-3* (a), *glk1-1* (b) y *tcp14-1*, *tcp14-3*, *tcp15-1* y *tcp15-4* (c), y *tcp14-4 tcp15-3* (d) en comparación con las plantas salvajes correspondientes, cultivadas 48 h en oscuridad y transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por los tiempos indicados en cada gráfico. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas con aproximadamente 30 plántulas cada una. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; análisis de la varianza). Todos los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

Por otra parte, encontramos que plantas que sobreexpresan TCP15 fusionada a la proteína fluorescente roja RFP (Viola et al., 2016) (denominadas *35S::TCP15* en adelante) abrieron sus cotiledones más rápido que las plantas salvajes en respuesta a la luz (Figura 18a) y mostraron cotiledones abiertos cuando fueron cultivadas durante 5 días en oscuridad (Figura 18b). Lo que indica que TCP15, al igual que GLK1, tiene un papel positivo en la apertura de cotiledones durante la de-etiolación.

La luz no sólo promueve la apertura, sino también la expansión de los cotiledones. Observamos que la expansión de los cotiledones luego de la iluminación se vio retrasada en las plántulas mutantes *glk1-1* y *tcp14-4 tcp15-3* en comparación con las

plantas salvajes (Figura 18c), lo que sugiere que estos factores de transcripción también desempeñan un papel en la expansión de los cotiledones estimulada por la luz.

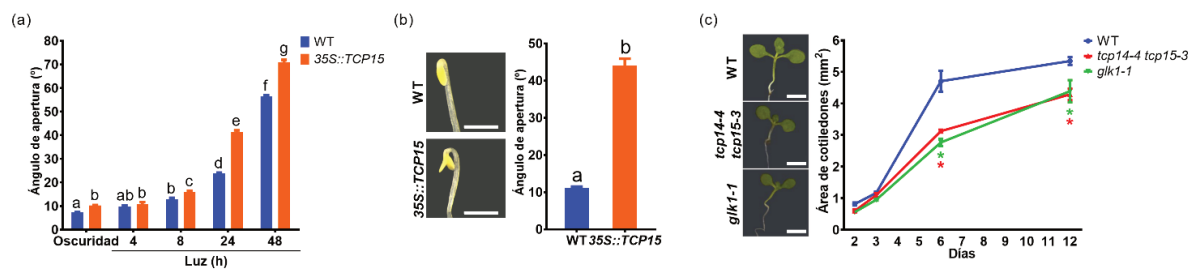


Figura 18: Ensayos fenotípicos de transición de oscuridad a luz. **(a)** Ángulos de apertura de cotiledones de las plántulas salvajes y *35S::TCP15*, cultivadas 48 h en oscuridad y transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por los tiempos indicados. **(b)** Ángulo de apertura de cotiledones de plántulas salvajes y *35S::TCP15* cultivadas durante 5 días en la oscuridad. A la izquierda se muestran imágenes representativas (barras de escala: 1 mm). **(c)** Área de cotiledones de plántulas salvajes, *tcp14-4 tcp15-3* y *glk1-1* cultivadas durante 48 h en la oscuridad y luego transferidas a luz blanca ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante el tiempo indicado. A la izquierda se muestran imágenes representativas (barras de escala: 3 mm). Las barras indican la media \pm SEM de tres muestras biológicas con aproximadamente 30 plántulas cada una. En (a,b), letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; análisis de la varianza). En (c), los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a plantas WT ($p < 0,05$; análisis de la varianza). Todos los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

7.2.2. *TCP15* y *GLK1* actúan en la misma vía molecular que regula la apertura de los cotiledones

Para determinar la relación genética entre *TCP15* y *GLK1*, generamos plantas mutantes dobles *tcp15-3 glk1-1* mediante cruza genéticas. Observamos que las plantas *tcp15-3 glk1-1* cultivadas en luz continua durante 3 días mostraron un retraso en la apertura de los cotiledones similar a las mutantes simples correspondientes (Figura 19a). A su vez, durante la transición de oscuridad a luz, el fenotipo de apertura de cotiledones de las plántulas *tcp15-3 glk1-1* también fue similar al de las respectivas líneas mutantes simples (Figura 19b), lo que sugiere que *TCP15* y *GLK1* actuarían en la misma vía molecular implicada en la apertura de cotiledones. Además, observamos que la mayor apertura de cotiledones inducida por la sobreexpresión de *TCP15* disminuyó significativamente en el fondo mutante *glk1-1* (*35S::TCP15 glk1-1*), tanto durante el crecimiento de 3 días en luz continua (Figura 19c) como durante la transición de las plántulas de oscuridad a luz (Figura 19d). Más aún, la mutación en *GLK1* suprimió el fenotipo de cotiledones abiertos de las plantas *35S::TCP15* en oscuridad (Figura 19d). Estos resultados indican que la función de *TCP15* en la apertura de cotiledones requiere de la presencia de *GLK1* funcional. Dado que los niveles de transcritos de *GLK1* no se vieron afectados en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* independientemente de las

condiciones de luz (Figura 20a), estas proteínas TCP no actuarían modulando la expresión de *GLK1* a nivel transcripcional.

También evaluamos el efecto de la sobreexpresión de *GLK1* en plantas salvajes y mutantes *tcp15-3*. Cuando sobreexpresamos *GLK1* fusionada a GFP (*35S::GLK1-GFP*) en un fondo salvaje (Figura 61 en el Anexo 2) observamos un aumento de la apertura de cotiledones luego de un crecimiento de 3 días en luz continua (Figura 19e). De igual manera, al transformar plantas mutantes *tcp15-3* con la construcción *35S::GLK1-GFP* obtuvimos un resultado similar (Figura 19e), lo que sugiere que el efecto de la sobreexpresión de *GLK1* en la apertura de cotiledones no se ve afectado significativamente por la deficiencia de *TCP15* en estas condiciones. Sin embargo, las plantas *35S::GLK1-GFP tcp15-3* mostraron un retraso significativo en la apertura de cotiledones durante las primeras 8 h de de-etiolación en comparación con las plantas *35S::GLK1-GFP* (Figura 19f). Además, la mutación de *TCP15* también afectó el fenotipo de cotiledones abiertos de las plantas *35S::GLK1-GFP* en oscuridad (Figura 19f). Estos resultados indican que la acción de *GLK1* sobre la apertura de cotiledones durante la transición de oscuridad a luz depende de *TCP15* durante las fases iniciales de este proceso. La presencia de otras proteínas TCP con roles redundantes con *TCP15* podría explicar por qué la falta de *TCP15* funciona tuvo un efecto menor sobre la acción de *GLK1* en fases posteriores del proceso de de-etiolación. Además, los niveles de transcripto de *TCP15* estaban disminuidos en plántulas *glk1-1* expuestas a la luz en comparación con plantas salvajes, mientras que no se observaron diferencias significativas en las plántulas etioladas (Figura 20b), lo que sugiere una posible regulación transcripcional de *TCP15* por parte de *GLK1* durante la de-etiolación. Sin embargo, dado que la sobreexpresión de *TCP15* rescata parcialmente el fenotipo de cotiledones cerrados de las plantas deficientes en *GLK1*, es evidente que la menor expresión de *TCP15* no es la causa principal del fenotipo de las plantas *glk1-1*. En conjunto, los resultados sugieren que *TCP15* y *GLK1* funcionarían de forma interdependiente para promover la apertura de los cotiledones frente a la iluminación.

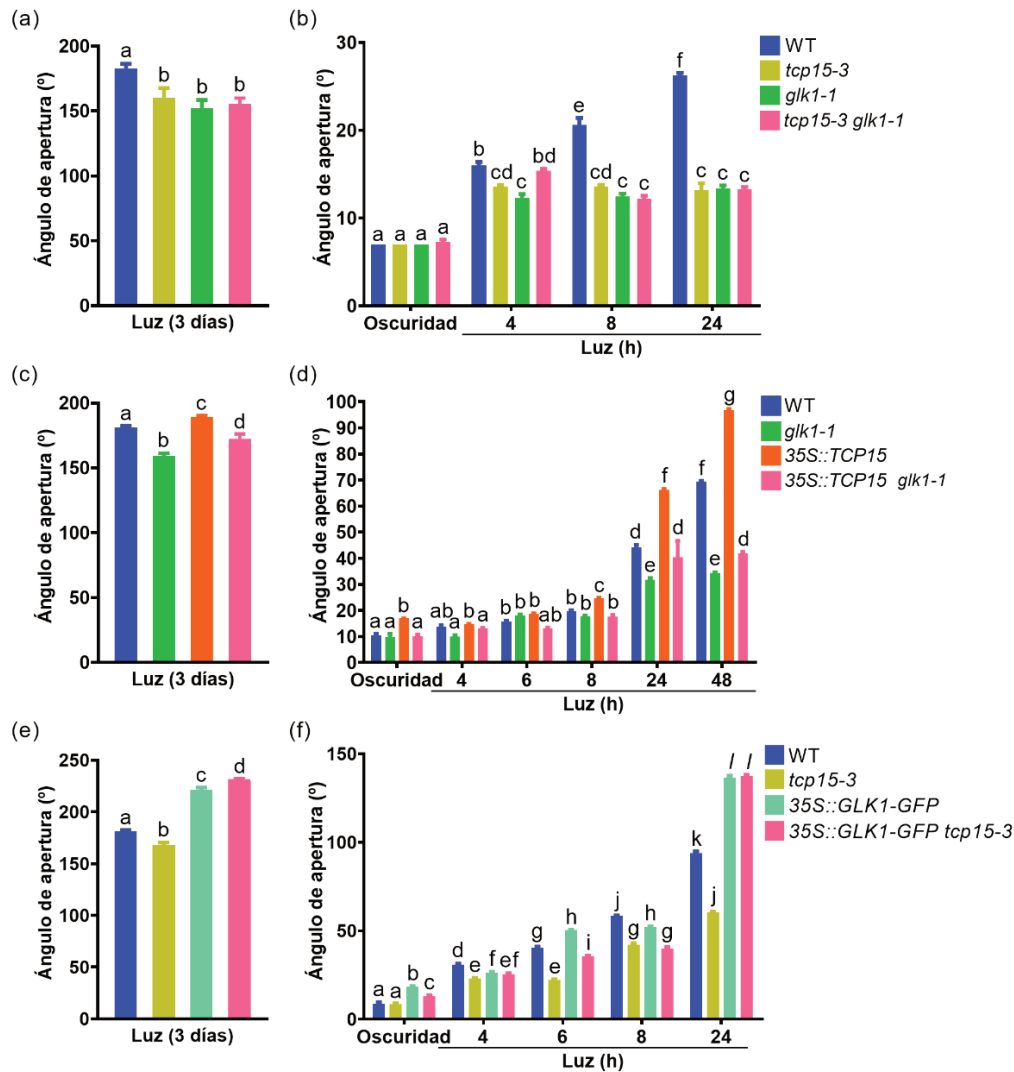


Figura 19: Interacciones genéticas entre TCP15 y GLK1. **(a, b)** Ángulos de apertura de cotiledones de las plántulas salvajes (WT), *tcp15-3*, *glk1-1* y *tcp15-3 glk1-1* cultivadas durante 3 días en luz blanca continua ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (a) o durante 48 h en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante los tiempos indicados (b). **(c, d)** Ángulos de apertura de cotiledones de las plántulas salvajes (WT), *glk1-1*, *35S::TCP15* y *35S::TCP15 glk1-1* cultivadas durante 3 días en luz blanca continua ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (c) o durante 48 h en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante el tiempo indicado (d). **(e, f)** Ángulos de apertura de cotiledones de las plántulas salvajes (WT), *tcp15-3*, *35S::GLK1-GFP* y *35S::GLK1-GFP tcp15-3* cultivadas durante 3 días en luz blanca continua ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (e) o durante 48 h en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante el tiempo indicado (f). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$; análisis de varianza). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

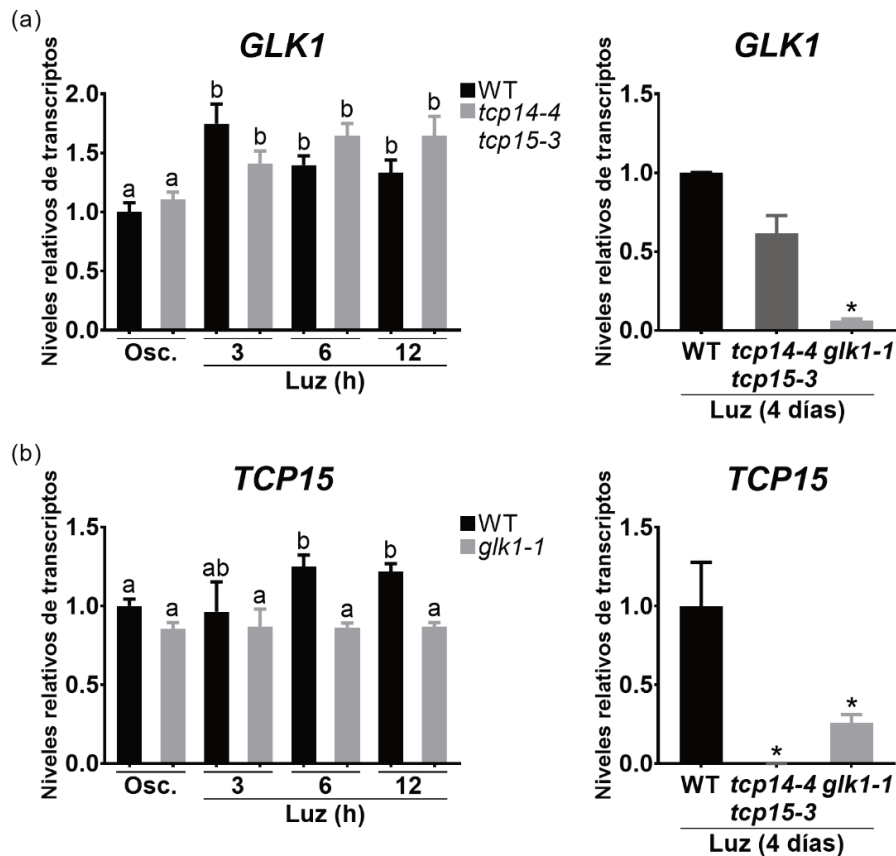


Figura 20: Expresión de *TCP15* y *GLK1* en plántulas mutantes *glk1-1* y *tcp14-4 tcp15-3*. Análisis RT-qPCR de los niveles de transcritos de *GLK1* (a) y *TCP15* (b) en plántulas salvajes (WT), *tcp14-4 tcp15-3* y *glk1-1* cultivadas durante 48 horas en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante los tiempos indicados (paneles de la izquierda), o durante cuatro días en luz blanca ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (paneles de la derecha). Los valores se expresan relativizados a los de las plantas WT. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; ANOVA). Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las plantas WT ($p < 0,05$; prueba t de Student). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

7.2.3. Los niveles de expresión de genes involucrados en la expansión y el greening de cotiledones están alterados en plantas mutantes *tcp* y *glk1*

Un grupo de genes *SAUR*, incluyendo *SAUR6*, *SAUR14*, *SAUR50* y *SAUR51*, son inducidos por la luz en los cotiledones y están involucrados en promover la apertura y expansión de los cotiledones (Sun et al., 2016; Wang et al., 2020). Por lo que decidimos examinar si la expresión de estos genes *SAUR* depende de los factores de transcripción TCP de clase I y *GLK1*. También incluimos en el análisis a *SAUR63* ya que observamos que las plántulas que expresan el reportero β -glucuronidasa (*GUS*) bajo el control del promotor y la región codificante de *SAUR63* muestran una fuerte actividad *GUS* en cotiledones bajo condiciones de iluminación (Figura 21) y ha sido reportado como un gen blanco directo de *TCP15* (Gastaldi et al., 2020). Observamos que los niveles de

transcripto de todos los genes *SAUR* analizados estaban disminuidos en las plántulas mutantes *tcp14-4 tcp15-3* y *glk1-1* luego de 6 h de iluminación en relación a las plantas salvajes (Figura 22a), lo que sugiere que *GLK1* y los genes TCP de clase I *TCP14* y/o *TCP15* son necesarios para la expresión óptima de estos genes en las primeras etapas de la de-etiolación.

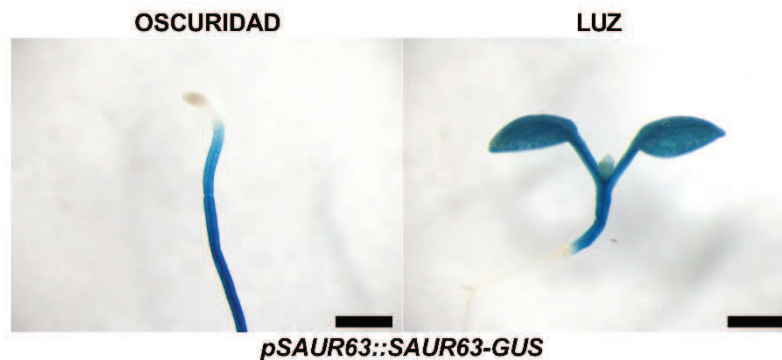


Figura 21: Patrón de expresión de SAUR63. Tinción histoquímica de la actividad β -glucuronidasa de plántulas *pSAUR63::SAUR63-GUS* cultivadas 6 días en condiciones de oscuridad y luz. Las imágenes son representativas de 10 plántulas analizadas (barras de escala: 1 mm).

Las expansinas son proteínas de la pared celular implicadas en la expansión celular en casi todas las fases de crecimiento de la planta (D. Choi et al., 2006; Cosgrove, 2000). Por lo tanto, analizamos la expresión de genes de expansinas que son inducidos por la luz en los cotiledones, *EXPB1* y *EXPB3* (Sun et al., 2016), y de *EXP16*, que está altamente expresado en cotiledones (Klepikova et al., 2016). Encontramos que la expresión de *EXPB1* se vio significativamente afectada tanto en las plántulas *tcp14-4 tcp15-3* como *glk1-1* expuestas a la luz en comparación con las plantas salvajes en las mismas condiciones (Figura 22b). Mientras que los niveles de transcripto de *EXPB3* y *EXP16* se encontraron disminuidos significativamente en las plántulas mutantes *tcp14-4 tcp15-3* y *glk1-1*, respectivamente (Figura 22b).

Finalmente, dado que *GLK1* promueve la expresión de genes nucleares asociados a la fotosíntesis, indispensables para la biogénesis de cloroplastos durante la fotomorfogénesis, examinamos la expresión de los genes *LHCB* *LHCB1.4* y *LHCB2.2* que codifican componentes del aparato fotosintético (Waters et al., 2009). Observamos que ambos genes presentaron menor expresión en las plántulas mutantes *tcp14-4 tcp15-3* y *glk1-1* en comparación con las salvajes luego de la transición de oscuridad a luz (Figura 22c), lo que sugiere que, además de la expresión de genes implicados en la expansión celular, las proteínas TCP de clase I también modulan la expresión de genes nucleares asociados a la fotosíntesis durante la de-etiolación.

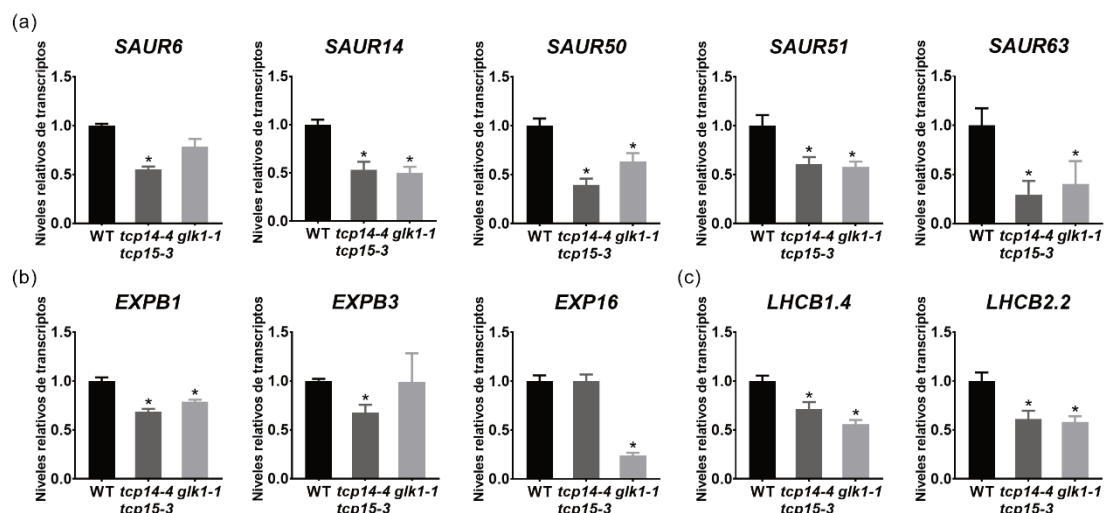


Figura 22: Niveles de expresión de genes *SAUR*, *EXPANSINA* y *LHC* en plantas mutantes *tcp14 tcp15* y *glk1* durante la de-etiolación. (a-c) Análisis cuantitativo de los niveles de transcritos de genes *SAUR* (a), *EXPANSINAS* (b), y *LHC* (c) en plántulas salvajes (WT), *tcp14-4 tcp15-3* y *glk1-1* cultivadas durante 48 h en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 6 h. Los valores están relativizados a los de las plantas WT. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las plantas WT ($p < 0,05$; prueba t de Student). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

También analizamos las mutantes simples en los genes *tcp* y encontramos que los transcritos de *SAUR14*, *SAUR50* y *SAUR51* presentaron niveles significativamente reducidos en las plántulas *tcp14-6* y *tcp15-3*, mientras que la expresión de *SAUR63* y *EXPB1* estaba significativamente afectada sólo en plantas mutantes *tcp15-3* y la expresión de *EXPB3* fue menor sólo en *tcp14-6* (Figura 23a,b). No observamos diferencias significativas en la expresión *SAUR6*, *LHCB1.4* y *LHCB2.2* en las mutantes simples en *TCP14* y *TCP15* (Figura 23a,c), a pesar de estaba significativamente reducida en la mutante doble *tcp14 tcp15* (Figura 22a,c). Estos resultados evidencian que *TCP14* y *TCP15* afectan diferencialmente la expresión de ciertos genes, mientras que parecen tener un papel redundante en la modulación de otros genes implicados en el desarrollo de cotiledones durante la de-etiolación.

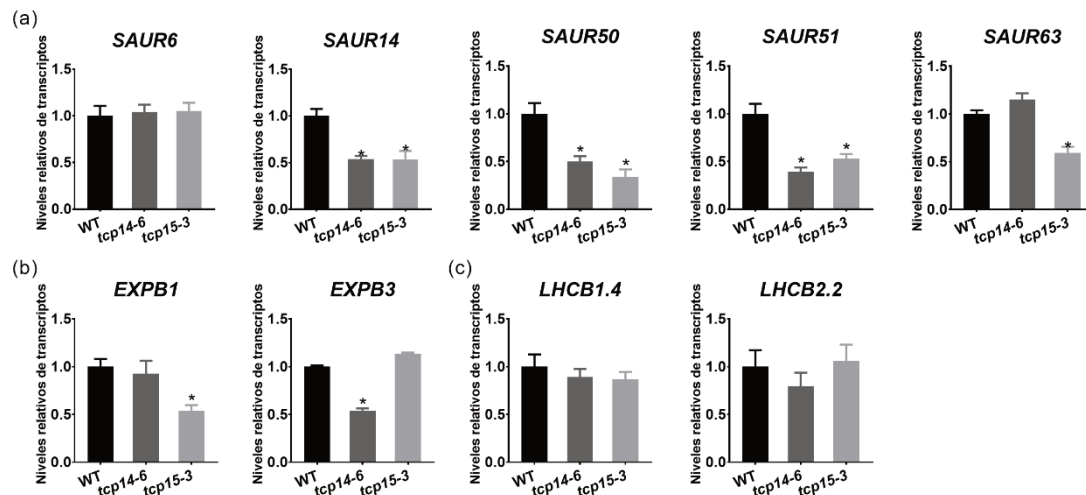


Figura 23: Niveles de expresión de genes *SAUR*, *EXPANSINA* y *LHCB* en mutantes simples *tcp14* y *tcp15* durante la de-etiolación. (a-c) Análisis cuantitativo de los niveles de transcritos de genes *SAUR* (a), *EXPANSINAS* (b), y *LHCB* (c) en plántulas salvajes (WT), *tcp14-6* y *tcp15-3* cultivadas durante 48 h en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 6 h. Los valores están relativizados a los de las plantas WT. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las plantas WT ($p < 0,05$; prueba t de *Student*). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

A su vez, evaluamos la expresión de los genes *SAUR*, *EXP* y *LHCB* en plántulas etioladas. La expresión de varios de estos genes también se encontró afectada en plántulas mutantes *tcp14-4 tcp15-3* y/o *glk1-1* durante el crecimiento en oscuridad, con la excepción de *SAUR51*, *EXPB3* y *LHCB2.2*, que mostraron niveles similares a las plantas salvajes (Figura 24). Además, la expresión de *SAUR6* y *SAUR14* no se vió afectada significativamente en las plantas *glk1-1* etioladas (Figura 24). Estos resultados sugieren que los factores de transcripción TCP de clase I y GLK1 regulan la expresión de los genes *SAUR* y *EXP* también en oscuridad, pero sus efectos son más pronunciados luego de la iluminación.

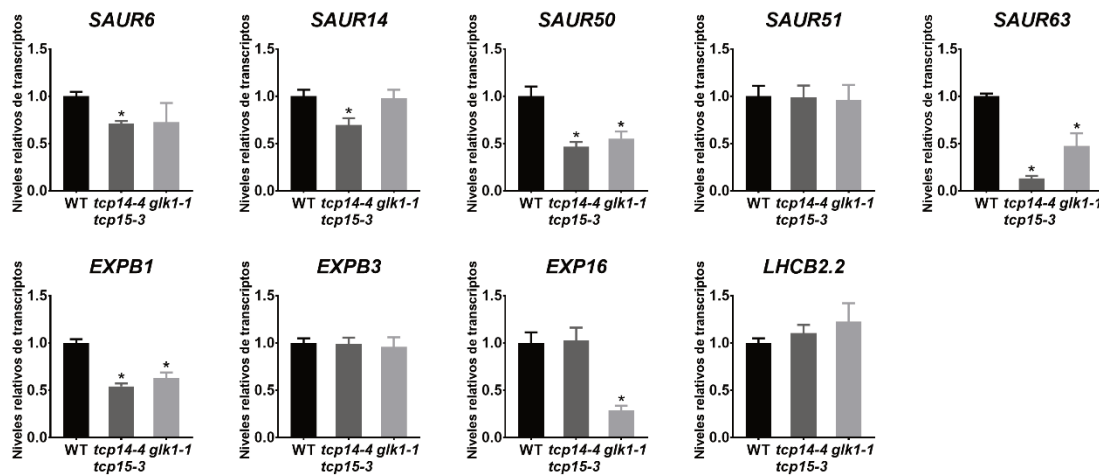


Figura 24: Niveles de expresión de genes *SAUR*, *EXPANSINA* y *LHCB* en plantas mutantes *tcp14 tcp15* y *glk1* cultivadas en oscuridad. Análisis cuantitativo de los niveles de transcritos de genes *SAUR*, *EXPANSINAS* y *LHCB* en plántulas salvajes (WT), *tcp14-4 tcp15-3* y *glk1-1* cultivadas durante 48 h en oscuridad. Los valores están relativizados a los de las plantas WT. Las barras indican la media±SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las plantas WT ($p < 0,05$; prueba t de *Student*). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

Al analizar las plantas *35S::TCP15*, observamos una inducción de la expresión de *SAUR63*, *EXPB1* y *LHCB2.2*, mientras que otros genes no mostraron cambios significativos en relación con plantas salvajes (Figura 25). Dado que las plantas *35S::TCP15* presentan un fenotipo de mayor apertura de cotiledones, puede pensarse que la inducción de *SAUR63* y/o *EXPB1* sería suficiente para conferir este fenotipo. De acuerdo con esta idea, la plántulas *35S::SAUR63-GFP* presentaron cotiledones abiertos en oscuridad y una mayor velocidad de apertura de cotiledones que las plantas salvajes frente a la exposición a la luz (Figura 26). Observamos un resultado similar al sobreexpresar *SAUR63-GFP* en el fondo mutante *tcp14-4 tcp15-3* (*35S::SAUR63-GFP tcp14-4 tcp15-3*) (Figura 26), lo que sugiere que la apertura de los cotiledones alterada en plantas mutantes *tcp14-4 tcp15-3* se debe en gran medida a una menor expresión de genes *SAUR*, aunque también es posible un papel relevante de los genes *EXP*.

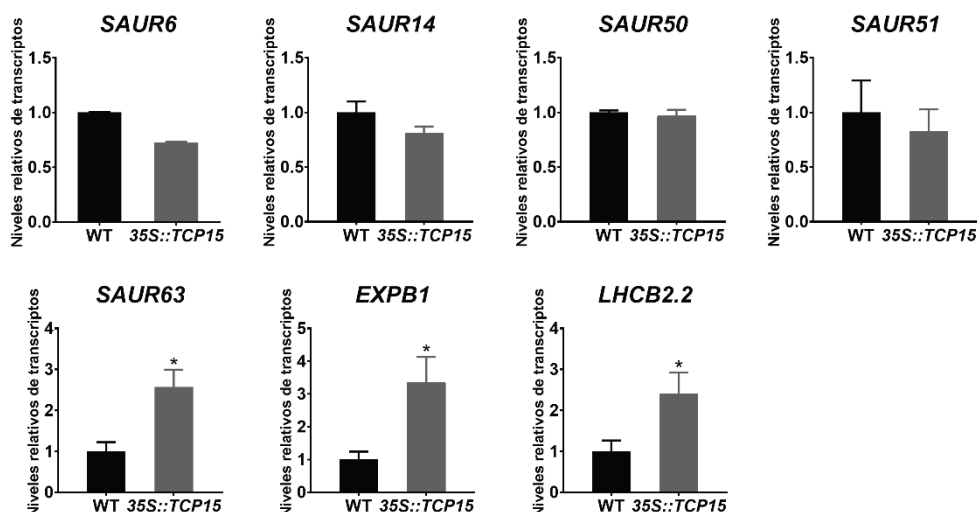


Figura 25: Análisis cuantitativo de los niveles de transcritos de genes *SAUR*, *EXPANSINAS* y *LHCB* en plántulas salvajes (WT) y *35S::TCP15* cultivadas durante 48 h en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 6 h. Los valores están relativizados a los de las plantas WT. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las plantas WT ($p < 0,05$; prueba t de Student). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

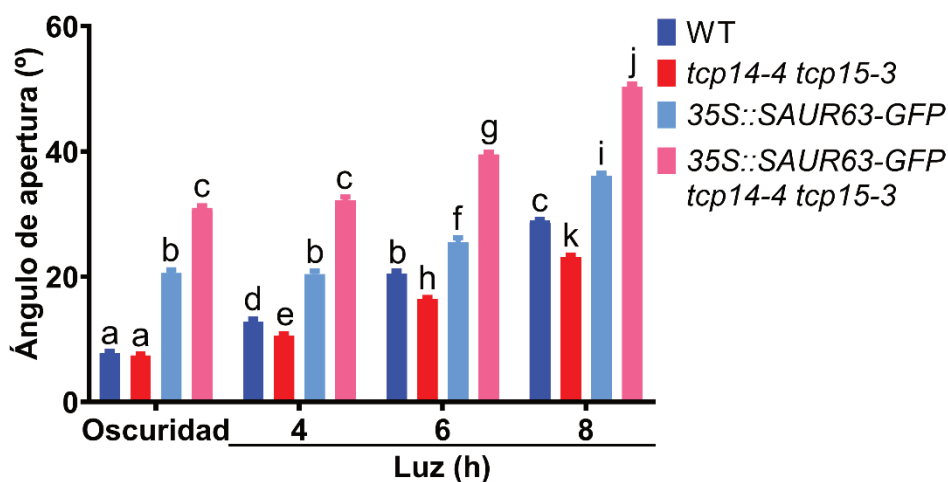


Figura 26: Análisis de la capacidad de apertura de cotiledones de plántulas salvajes (WT), *tcp14-4 tcp15-3* y plantas que sobreexpresan *SAUR63-GFP* en un fondo salvaje o mutante *tcp14-4 tcp15-3* cultivadas durante 48 h en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante los tiempos indicados. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$; ANOVA).

7.2.4. *TCP15* requiere de *GLK1* para inducir la expresión de los genes *SAUR*, *EXPB1* y *LHCB*

Hasta aquí nuestros análisis genéticos sugieren que *TCP15* y *GLK1* participan en una vía común relacionada con la apertura de cotiledones durante la de-etiolación. Por lo que analizamos la expresión de genes afectados en las correspondientes mutantes

simples ahora en plantas mutantes dobles *tcp15-3 glk1-1*. Observamos que los niveles de expresión de la mayoría de los genes analizados fueron similares en las mutantes simples y doble, con la excepción de *EXPB1*, para el que parece existir un efecto aditivo con la mutación de ambos genes (Figura 27). Estos resultados sugieren que TCP15 y GLK1 actúan en gran medida en la misma vía molecular durante la de-etiolación, aunque existirían diferencias en su modo de acción para genes específicos. Esto concuerda con el hecho de que la expresión de ciertos genes se ve afectada en el fondo mutante *tcp* pero no en el mutante *glk1*, o viceversa.

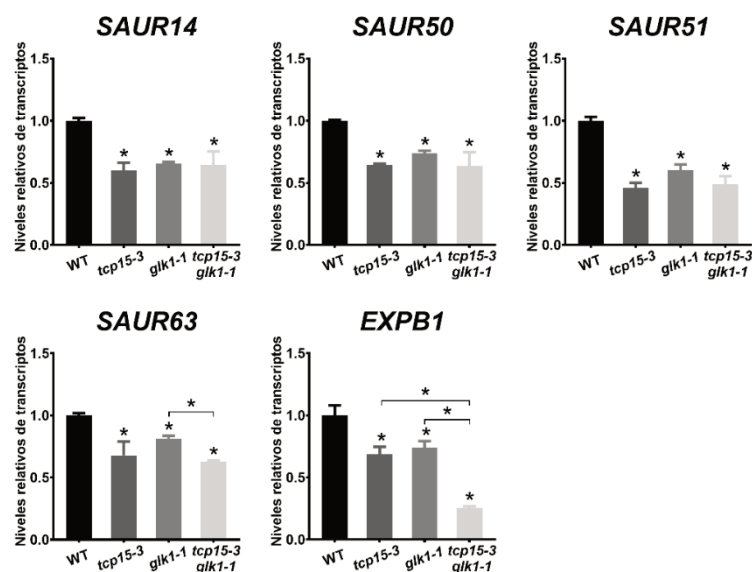


Figura 27: Análisis cuantitativo de los niveles de transcritos de los genes *SAUR14*, *SAUR50*, *SAUR51*, *SAUR63* y *EXPB1* en plántulas salvajes (WT) y *tcp15-3 glk1-1* cultivadas durante 48 h en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante seis horas. Los valores están relativizados a los de las plantas WT. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$; prueba t de Student). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

Para seguir explorando la interdependencia entre TCP15 y GLK1, generamos líneas transgénicas estables que expresan *TCP15-GFP* de forma inducible por β -estradiol en los genotipos salvajes, *glk1-1* y *35S::GLK1* (*35S::TCP15-GFP_i*, *35S::TCP15-GFP_i glk1-1* y *35S::TCP15-GFP_i 35S::GLK1*, respectivamente). En plántulas de 6 días, *TCP15-GFP* se indujo significativamente en respuesta a un tratamiento de 24 horas con $50 \mu\text{M}$ de β -estradiol. Entre las líneas obtenidas, se seleccionaron para posterior análisis aquellas con niveles similares de expresión de TCP15 tras la inducción con β -estradiol en los distintos fondos genéticos (Figura 28a,b). De modo similar a lo observado al sobreexpresar de forma constitutiva *TCP15* (Figura 19c,d), cuando las plántulas *35S::TCP15-GFP_i* se cultivaron en $50 \mu\text{M}$ de β -estradiol observamos una mayor apertura de los cotiledones durante la transición de oscuridad a luz en relación con las plantas

salvajes y este efecto fue suprimido en el fondo *glk1-1* (Figura 28c). Con respecto a las líneas en el fondo sobreexpresante de GLK1 (*35S::GLK1*; (Waters et al., 2008)), observamos un alto grado de letalidad al transferir plántulas etioladas a luz. Esto puede deberse al daño foto-oxidativo causado por la acumulación de precursores de clorofila como consecuencia de un aumento en la expresión de los genes de síntesis de clorofila inducido por GLK1 (Waters et al., 2009). Por lo que analizamos el efecto de inducir la expresión de *TCP15-GFP* en plantas con diferentes niveles de expresión de *GLK1* (fondo *glk1-1* y/o *35S::GLK1*) cultivadas en condiciones normales de iluminación durante 6 días. Notoriamente, la sobreexpresión de GLK1 no causó cambios significativos en los niveles de transcripto de *SAUR6*, *SAUR14*, *SAUR50* y *EXPB1* en relación con las plántulas salvajes en estas condiciones (Figura 29a,b). De modo similar, la inducción de *TCP15-GFP* por β -estradiol no afectó la expresión de estos genes en plántulas salvajes o mutantes *glk1-1* (Figura 29a,b). Sin embargo, se observó un aumento significativo de los niveles de transcripto de los cuatro genes tras la inducción de *TCP15-GFP* en el fondo *35S::GLK1* (Figura 29a,b). Este resultado indica que *TCP15* y *GLK1* participan conjuntamente en la inducción de la expresión de *SAUR6*, *SAUR14*, *SAUR50* y *EXPB1*. Para otros genes analizados, se observaron algunos comportamientos diferentes. Los niveles de transcripto de *SAUR51* aumentaron con la sobreexpresión de GLK1 sola y también con luego de la inducción de *TCP15-GFP* en el fondo salvaje, pero se incrementaron significativamente más al inducir *TCP15-GFP* en plántulas sobreexpresantes de GLK1 (Figura 29a). Más aún, no se observó inducción de *SAUR51* por *TCP15-GFP* en el fondo *glk1-1* (Figura 29a). En el caso de *LHCB1.4* y *LHCB2.2*, se observó un incremento en los niveles de transcripto en las plántulas que sobreexpresan GLK1 en relación con las plantas salvajes, mientras que no se observó efecto en la expresión de estos genes por la inducción de *TCP15-GFP* en ninguno de los fondos genéticos analizados (Figura 29c). Notoriamente, la expresión de ambos genes *LHCB* estaba disminuida en las mutantes dobles *tcp14-4 tcp15-3* (Figura 22c) y el aumento de su expresión causado por la sobreexpresión de GLK1 en el fondo salvaje se vio suprimido por la mutación en *TCP15*, al menos para *LHCB2.2* (Figura 29d), lo que sugiere que *TCP15* tiene un papel en la modulación de la expresión de estos genes. Para analizar esto en profundidad, utilizamos una línea que expresaba *TCP15-GFP* en niveles más altos en el fondo sobreexpresante de *GLK1* (Figura 28b). En esta línea, el tratamiento con β -estradiol provocó un aumento significativo en la expresión de ambos genes *LHCB* en relación al tratamiento sin β -estradiol (Figura 29e). Estos resultados indican que *TCP15* participa en la regulación de los genes *LHCB*, aunque su papel no sería tan relevante como el observado para la regulación de los genes *SAUR*.

En conjunto, todos estos resultados indican que la acción conjunta de TCP15 y GLK1 induce eficazmente varios genes implicados en la expansión celular durante la apertura de cotiledones en respuesta a la iluminación. Aunque la relevancia de esta acción mutua difiere gen a gen. En el caso de los genes implicados en el ensamblaje del aparato fotosintético, se observó un papel principal para GLK1 con un requerimiento menos estricto de TCP15. Especulamos que los diferentes comportamientos observados entre los genes seleccionados podrían estar relacionados con la naturaleza de las regiones promotoras particulares de cada uno de estos genes.

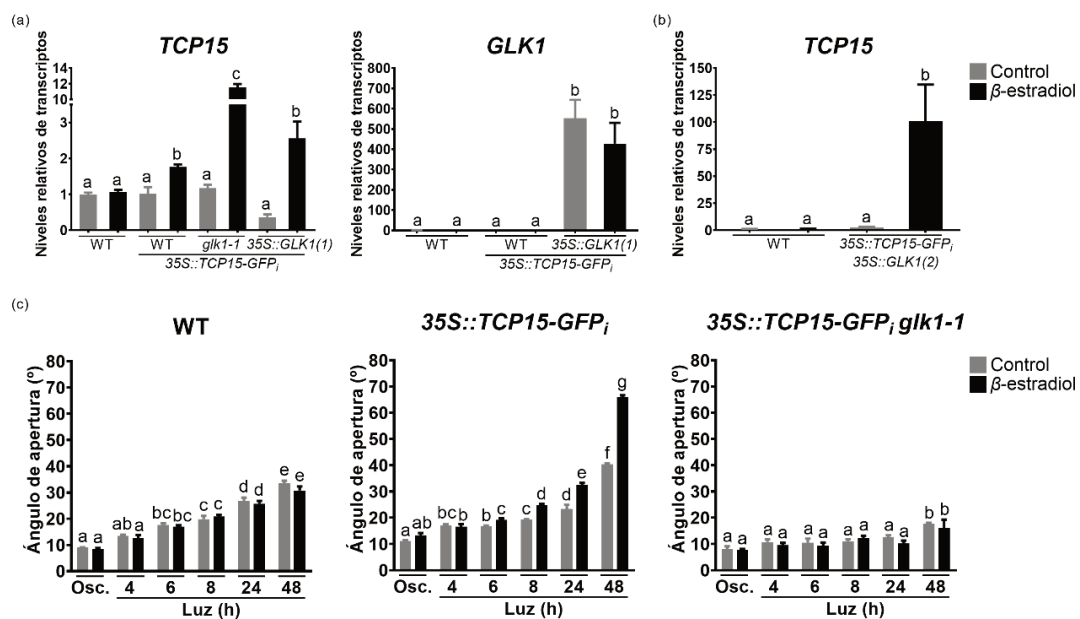


Figura 28: (a) Análisis de RT-qPCR de la expresión de *TCP15* y *GLK1* en plántulas salvajes (WT), *glk1-1* y sobreexpresante en *GLK1* cultivadas 5 días en condiciones normales de iluminación que expresan la construcción *TCP15-GFP* inducible por β-estradiol tratada con 50 μM de β-estradiol (barras negras) o DMSO (control, barras grises) durante 24 horas. (b) Niveles de transcritos de *TCP15* en la línea *TCP15-GFPi*; *35S::GLK1* (2) utilizada en el experimento mostrado en la Figura 29e y tratada como en (a). Los valores se expresan de forma relativa a las plantas WT tratadas con DMSO. Las barras indican la media ± SEM de tres réplicas biológicas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$; ANOVA). (c) Ángulo de apertura de cotiledones de plántulas salvajes (WT), *35S::TCP15-GFPi* y *35S::TCP15-GFPi glk1-1* cultivadas con 50 μM de β-estradiol (barras negras) o DMSO (control, barras grises) durante 48 horas en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante los tiempos indicados. Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; ANOVA). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

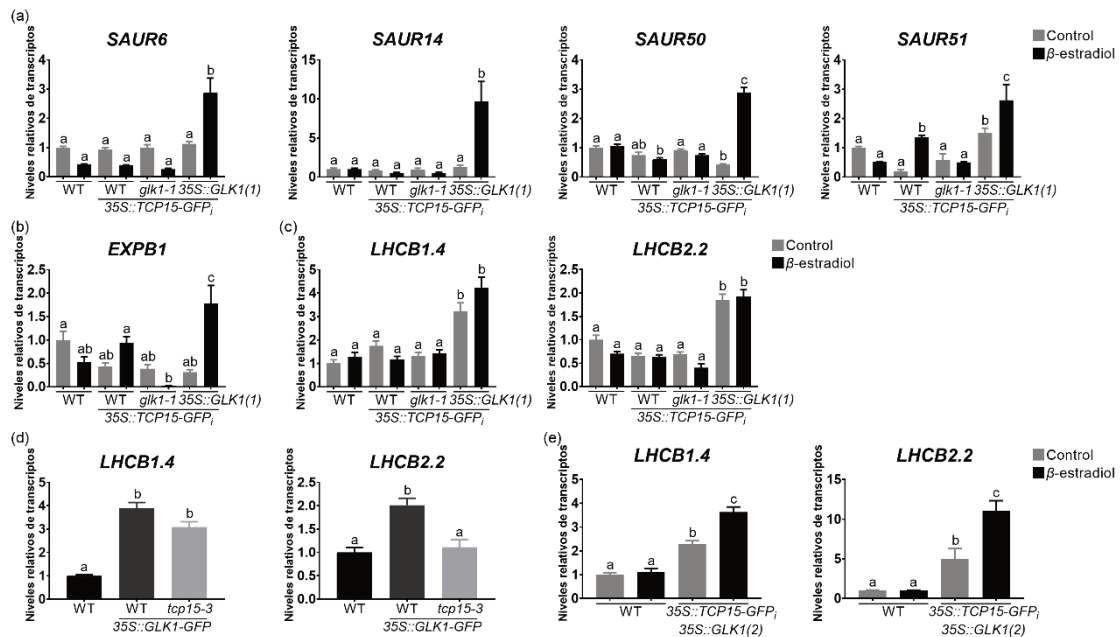


Figura 29: Niveles de expresión de genes *SAUR*, *EXPANSINA* y *LHC* en plantas con niveles alterados de *TCP15* y/o *GLK1* durante la de-etiolación. **(a-c)** Análisis por RT-qPCR de la expresión de genes implicados en la expansión celular y la de-etiolación en plántulas WT, *glk1-1* y *35S::GLK1* que expresan la construcción *TCP15-GFP_i* cultivadas 5 días en medio líquido en condiciones normales de iluminación y tratadas con 50 μ M de estradiol (barras negras) o DMSO (control, barras grises) durante 24 horas. Los valores se expresan de forma relativa a los de las plantas salvajes tratadas con DMSO. **(d)** Niveles de transcritos de *LHC1.4* y *LHC2.2* en plantas WT, *35S::GLK1-GFP* y *35S::GLK1-GFP tcp15-3* cultivadas 4 días en medio líquido en condiciones normales de iluminación. Los valores se expresan de forma relativa a los de las plantas WT. **(e)** Análisis por RT-qPCR de *LHC1.4* y *LHC2.2* en plántulas *35S::GLK1* que expresan *TCP15-GFP* en altos niveles tras la inducción con β -estradiol. Los valores se expresan de forma relativa a los de las plantas salvajes tratadas con DMSO. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; análisis de varianza). Todos los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

7.2.5. *TCP15* y *GLK1* se unen a los promotores de los genes *SAUR* y *LHC* y la unión de *TCP15* se ve afectada por la deficiencia de *GLK1*

Un análisis de los promotores de los genes cuya expresión se vio afectada en las plántulas mutantes *tcp14-4 tcp15-3* y *glk1-1* indicó que el promotor de *EXPB1* contiene motivos de unión putativos tanto para factores de transcripción TCP (*GGGNCC*; (Viola et al., 2011, 2012) como GLK (*CCAATC*; (Ahmad et al., 2019) (Tabla 3). Mientras que las regiones promotoras de *SAUR14*, *SAUR50*, *SAUR51* y *SAUR63* solo contienen motivos TCP, y los promotores de *SAUR6*, *LHC1.4* y *LHC2.2* solo contienen cajas GLK (Tabla 3).

Tabla 3: Presencia de sitios de unión consenso de proteínas TCP y GLK en los promotores de genes con expresión reducida en plantas mutantes *tcp14-4 tcp15-3* y *glk1-1*. *SEQ -3000 NOORF: Secuencias localizadas 3000 pares de base corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, datos obtenidos con la herramienta Sequence de RSAT (http://rsat.eead.csic.es/plants/retrieve-seq_form.cgi).

AGI	Gen	SEQ -3000 NOORF*		TCP BOX	GLK BOX	Posición del sitio TCP		Secuencia	Posición del sitio GLK		Secuencia
		Inicio	Fin			Inicio	Fin		Inicio	Fin	
AT2G21210	SAUR6	-967	-1	0	2				-616	-611	CCAATC
									-432	-427	CCAATC
AT4G38840	SAUR14	-497	-1	1	0	-120	-115	GGGCCC			
AT4G34760	SAUR50	-1133	-1	1	0	-11	-6	GGGGCC			
AT1G75580	SAUR51	-3000	-1	1	0	-402	-397	GGGTCC			
AT1G29440	SAUR63	-444	-1	1	0	-119	-114	GGGACC			
AT4G28250	EXPB3	-2276	-1	2	1	-81	-76	GGGTCC	-454	-449	CCAATC
						-137	-132	GGGACC			
AT2G20750	EXPB1	-3000	-1	1	2	-2647	-2642	GGGTCC	-136	-131	CCAATC
									-2480	-2475	CCAATC
AT3G55500	EXP16	-2672	-1	0	2				-1663	-1658	CCAATC
									-1566	-1561	CCAATC
AT2G34430	LHCB1.4	-3000	-1	0	3				-773	-768	CCAATC
									-735	-730	CCAATC
									-955	-950	CCAATC
AT2G05070	LHCB2.2	-1038	-1	0	2				-312	-307	CCAATC
									-53	-48	CCAATC

Teniendo en cuenta el papel de TCP15 y GLK1 en la regulación de estos genes y el hecho de que son capaces de interactuar entre sí, especulamos que ambos factores de transcripción podrían unirse de forma conjunta a los promotores de estos genes en los sitios blancos de TCP15 o GLK1. Para investigar esto, realizamos un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina seguido de PCR cuantitativa (ChIP-qPCR; sección 6.36) con el fin de analizar la unión de TCP15 y GLK1 a regiones promotoras que contienen sólo motivos TCP (en *SAUR14* y *SAUR50*) o motivos GLK (en *LHCB1.4* y *LHCB2.2*) (Figura 30a). El análisis se realizó utilizando plántulas *35S::GLK1-GFP* y *35S::TCP15-GFP*, de 6 días de crecimiento en condiciones de luz normal y anticuerpos anti-GFP. Los resultados de ChIP-qPCR obtenidos con plántulas *35S::GLK1-GFP* mostraron un enriquecimiento de fragmentos genómicos que contienen motivos GLK en

los promotores de los genes *LHCB1.4* y *LHCB2.2*, así como de aquellos que contienen sólo motivos TCP en los promotores de *SAUR14* y *SAUR50* (Figura 30b). Los genes *LHCB* han sido propuestos como blancos directos de GLK1 (Waters et al., 2009), lo que está en concordancia con nuestros resultados. Además, nuestros resultados muestran que GLK1 es capaz de unirse también a los promotores de *SAUR14* y *SAUR50*, notoriamente en la región que contiene los sitios de unión reconocidos por proteínas TCP, lo que destaca un papel de GLK1 en la regulación directa de la expresión de genes implicados en la expansión celular (Figura 30b).

En el caso de TCP15, los experimentos de ChIP-qPCR mostraron un enriquecimiento de los fragmentos genómicos de todos los genes analizados cuando se ensayó TCP15-GFP en un fondo *tcp15-3* (*35S::TCP15-GFP_i tcp15-3*) (Figura 30c), lo que indica que TCP15 es capaz de asociarse a los mismos fragmentos genómicos reconocidos por GLK1. Sin embargo, observamos una reducción notoria de la unión de TCP15-GFP cuando el experimento de ChIP-qPCR se realizó en el fondo mutante *glk1-1* (*35S::TCP15-GFP_i glk1-1*) (Figura 30c), lo que sugiere que GLK1 es requerida para la unión eficiente de TCP15 a estas regiones genómicas. Esto concuerda con la observación de que la mutación en *GLK1* afecta la mayor apertura de cotiledones inducida por TCP15 en las plantas *35S::TCP15* (Figura 19c,d). Además, la expresión de *SAUR14*, *SAUR50* y *LHCB2.2* se vio afectada por la mutación *glk1-1* en un fondo *35S::TCP15* (Figura 31). En conjunto, nuestros resultados indican que TCP15 requiere a GLK1 para unirse eficazmente a los promotores de genes implicados en la expansión celular y la de-etiolación, incluso en los casos en que contienen motivos de unión reconocidos por las proteínas TCP. Además, GLK1 se une a los mismos fragmentos genómicos a los que se dirige TCP15, lo que sugiere que TCP15 y GLK1 se unen conjuntamente a genes blancos comunes involucrados en la apertura, expansión y desarrollo de los cotiledones durante la de-etiolación. En concordancia con esto, en un ensayo de actividad transcripcional realizado con las regiones promotoras de *LHCB2.2* o *SAUR14* fusionadas al gen *LUCIFERASA* (Figura 32a; Sección 6.14), encontramos que TCP15 fue capaz de inducir la expresión del gen reportero cuando se encontraba corriente abajo del promotor de *SAUR14*, que contiene sitios de unión TCP, pero no de la región promotora de *LHCB2.2*, que contiene sitios de unión GLK (Figura 32b). Mientras que, de manera inversa, GLK1 fue capaz de activar la transcripción solamente del promotor de *LHCB2.2* (Figura 32b). Esto indica que, a pesar de que la expresión de *SAUR14* y *LHCB2.2* se afectan sensiblemente en ausencia de tanto *TCP15* como *GLK1*, la sobreexpresión de TCP15 o GLK1 por separado no sería suficiente para inducir la actividad del promotor de *LHCB2.2* o *SAUR14*, respectivamente.

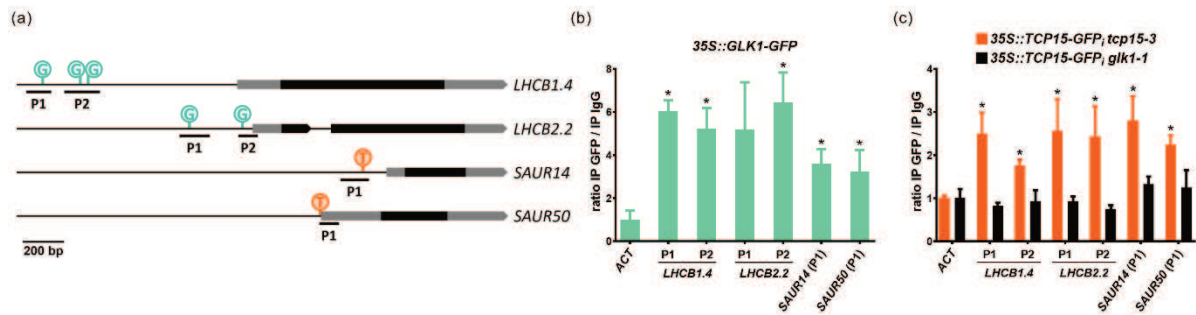


Figura 30: Ensayos de CHIP-qPCR. **(a)** Diagrama de los genes analizados con los exones y las regiones transcriptas no traducidas (UTR) representadas como recuadros negros y grises, respectivamente. Se indican la posición de los motivos de unión putativos de GLK1 (G; círculos verdes) y TCP (T; círculos naranjas) y las regiones analizadas por CHIP-qPCR (P1, P2). **(b, c)** Análisis de CHIP-qPCR de la unión de GLK1-GFP **(b)** y TCP15-GFP **(c)** a las regiones promotoras indicadas en **(a)**, realizado en plántulas que expresan *GLK1-GFP* en un fondo salvaje **(b)** o la construcción *TCP15-GFP* inducible por β -estradiol en un fondo mutante *tcp15-3* o *glk1-1* **(c)**. Se utilizó una región del gen *ACTIN2* como control negativo. Las barras muestran la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. La variación entre experimentos, debida a diferencias en los valores absolutos de enriquecimiento para todas las regiones analizadas, se eliminó mediante corrección por factor (Ruijter et al., 2015). Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con *ACTIN2* ($p < 0,05$; prueba t de Student).

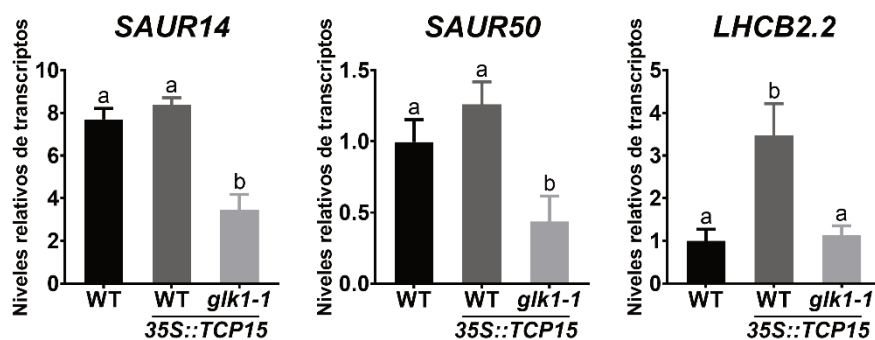


Figura 31: Niveles de expresión de los genes *SAUR14*, *SAUR50* y *LHC2.2* en plántulas WT, *35S::TCP15* y *35S::TCP15 glk1-1* cultivadas durante 48 horas en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante seis horas. Los valores (media \pm SEM) se expresan relativos a plantas WT. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; ANOVA). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

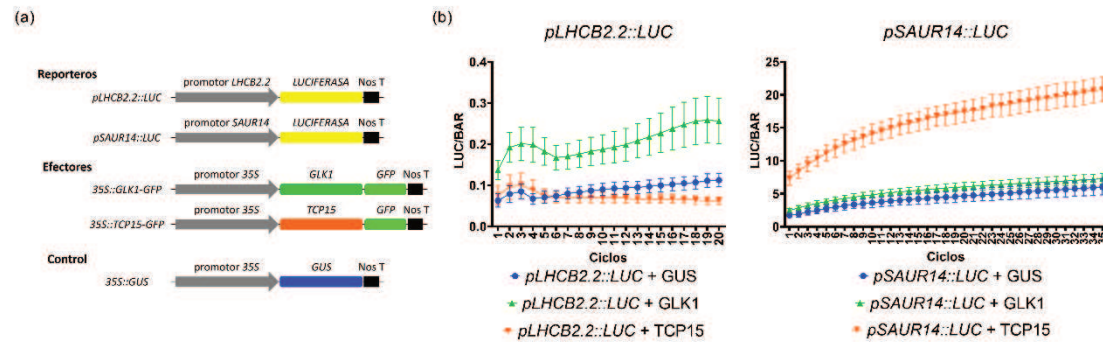


Figura 32: Ensayo de actividad transcripcional de TCP15 y GLK1 *in vivo* en plantas (a) Esquema de las construcciones reporteras, efectoras y control utilizadas en ensayos de expresión transiente. (b) Hojas de *N. benthamiana* fueron co-infiltradas con los reporteros *pLHCB2.2::LUC* o *pSAUR14::LUC* y las construcciones *35S::GUS* (GUS, control negativo), *35S::TCP15-GFP* (TCP15) y *35S::GLK1-GFP* (GLK1) en una proporción 1:1:1. La actividad transcripcional de los promotores fue determinada por luminiscencia (sección 6.29) y los valores se expresan en forma relativa al nivel de expresión del gen *BAR*, de resistencia a BASTA, presente en el vector con las construcciones *pLHCB2.2::LUC* o *pSAUR14::LUC*. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Los experimentos se repitieron 3 veces con resultados similares

7.3. Estudio del papel de los factores de transcripción TCP de clase II y su relación con GLK1 durante la de-etiolación en *Arabidopsis thaliana*

Como se ha mencionado, en este trabajo de tesis encontramos que las proteínas TCP de clase II no establecerían interacciones proteicas con GLK1, como los miembros de la clase I de esta familia (Figura 13b). Estudios previos demuestran que la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis está afectada en plantas mutantes cuádruples en genes TCP de clase II del clado CIN *tcp2 tcp3 tcp4 tcp10*, aunque no se encontraron motivos de unión reconocidos por TCP CIN en los promotores de dichos genes, indicando que la regulación no sería por unión directa (Bresso et al., 2018). Esto indica que los factores de transcripción TCP de clase II del clado CIN regularían la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis y, por lo tanto, sugiere una posible relación funcional con los factores de transcripción GLK. En base a esto, nos propusimos investigar cómo se incorporan los miembros de la clase II de la familia TCP al escenario descrito para los miembros de clase I y GLK1 en el proceso de de-etiolación.

7.3.1. TCP10 es requerido para la apertura y expansión de los cotiledones durante la de-etiolación

Con el objetivo de analizar si la expresión de las proteínas TCP de clase II es regulada a nivel transcripcional durante la fotomorfogénesis, analizamos el patrón de expresión del gen del clado CIN *TCP10* en plantas que expresan la región promotora de *TCP10* fusionada al gen reportero *GUS*. Observamos que plántulas cultivadas en condiciones

de luz mostraron una mayor actividad del promotor en diversos órganos que las plantas cultivadas en oscuridad, siendo particularmente importante en cotiledones (Figura 33a). A su vez, encontramos un aumento significativo en los niveles de transcritos de *TCP10* en los cotiledones de plantas salvajes expuestas a la luz luego de 48 h en oscuridad (Figura 33b), lo que indica que, similar a lo que ocurre con los genes *GLK* (Fitter et al., 2002; Rossini et al., 2001), la actividad de *TCP10* sería importante durante la de-etiolación. De manera que seleccionamos a *TCP10* como miembro representativo de las proteínas TCP CIN para explorar su relación con los factores de transcripción *GLK* durante este proceso.

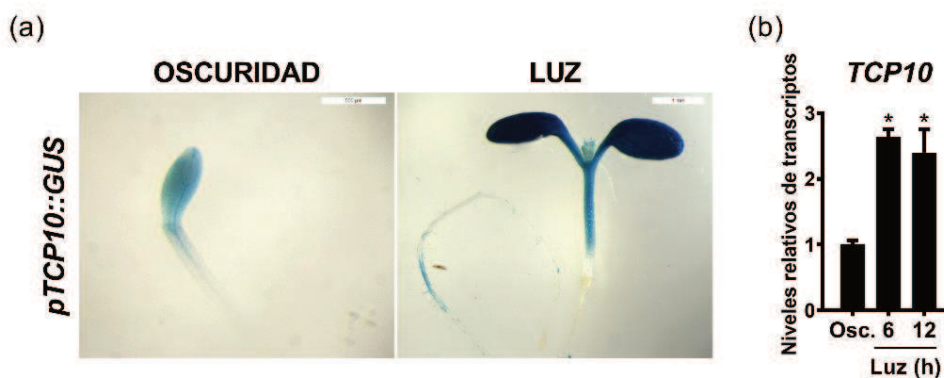


Figura 33: Expresión de *TCP10* en respuesta a la luz. **(a)** Tinción histoquímica de la actividad β -glucuronidasa en plántulas *pTCP10::GUS* cultivadas en condiciones de oscuridad o luz durante 6 días (barras de escala: 1 mm). **(b)** Análisis cuantitativo de los niveles de transcritos de *TCP10* en cotiledones de plántulas salvajes cultivadas durante 48 horas en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante los tiempos indicados. Los valores se expresan relativizados a los de las plantas cultivadas en oscuridad. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$; prueba t de *Student*). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

Comenzamos nuestro estudio con un análisis comparativo de mutantes en *TCP10* (*tcp10-1*) y *GLK1* (*glk1-1*), que presentan niveles reducidos de los transcritos de *TCP10* y *GLK1*, respectivamente (Fitter et al., 2002; Koyama et al., 2010; Figura 60 del Anexo 2). Encontramos que, de manera similar a la mutante *glk1-1*, las plántulas *tcp10-1* presentaron un retraso significativo en la apertura y expansión de los cotiledones en comparación con las plantas salvajes cuando fueron expuestas a la luz (Figura 34a-b). Estos resultados sugieren que *TCP10* es requerido para una apertura y expansión de cotiledones óptima durante la transición de oscuridad a luz en *Arabidopsis*. Además, la expresión de los genes *SAUR6/14/50* y *EXP*, involucrados en la apertura de cotiledones durante la de-etiolación se vio significativamente afectada en las plantas mutantes *tcp10-1* en relación a las plantas salvajes (Figura 34c). De manera interesante, los niveles de transcritos de varios genes relacionados con la fotosíntesis (*LHCB1.4*,

LHCB2.2, *LHCB2.4* y *LHCB4.3*) estaban significativamente afectados en las plántulas *tcp10-1* comparado con las plantas salvajes (Figura 34c). Como se ha observado previamente en este estudio, todos estos genes mostraron una expresión reducida en la mutante *glk1-1* (Figura 34c), lo que sugiere que TCP10 participaría en la regulación de genes similares que GLK1 durante la transición oscuridad a luz de las plántulas.

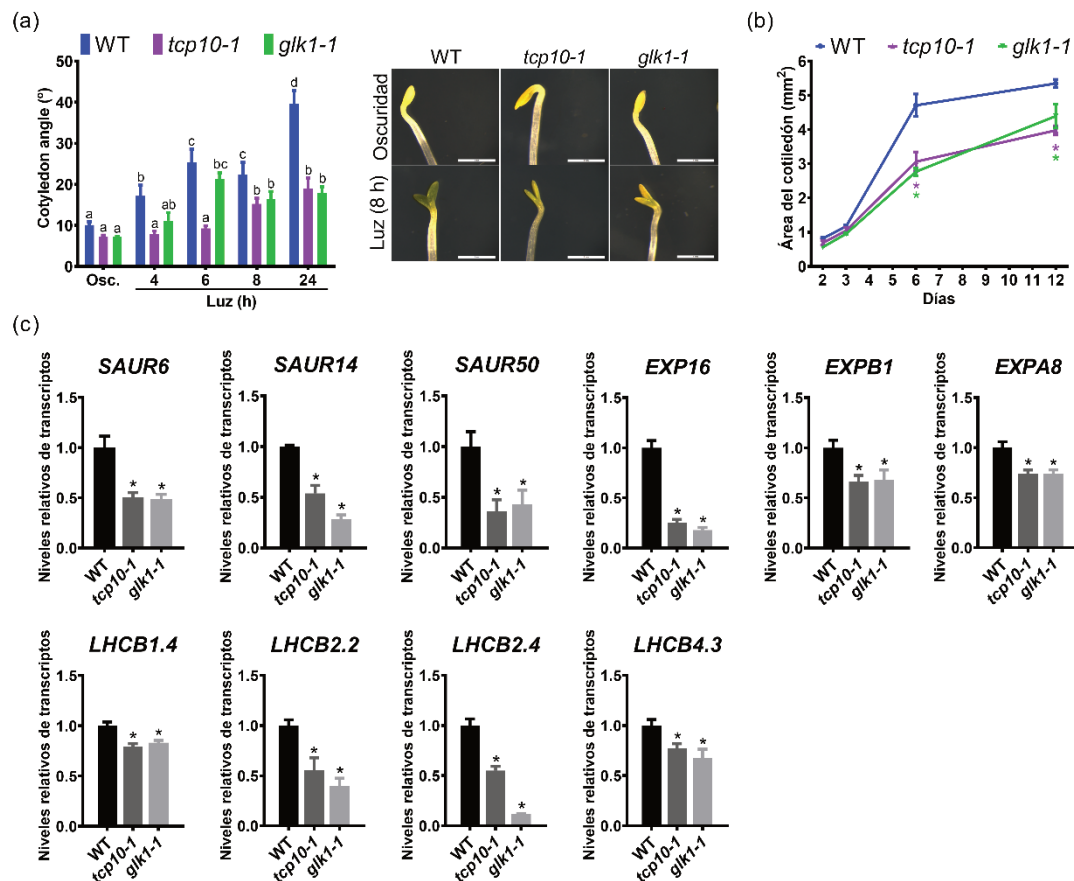


Figura 34: (a) Ángulo de apertura de cotiledones de las plántulas salvajes, *tcp10-1* y *glk1-1* cultivadas 48 h en oscuridad y transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante los tiempos indicados. A la derecha se muestran imágenes representativas (barras de escala: 1 mm). (b) Área de cotiledones de plántulas salvajes, *tcp10-1* y *glk1-1* cultivadas durante 48 h en la oscuridad y luego transferidas a luz blanca ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante el tiempo indicado. Las barras indican la media \pm SEM de tres muestras biológicas con aproximadamente 30 plántulas cada una. (c) Análisis cuantitativo de los niveles de transcritos de genes *SAUR*, *EXPANSINAS*, y *LHCB* en plántulas salvajes (WT), *tcp10-1* y *glk1-1* cultivadas 4 días en condiciones normales de iluminación. Los valores están relativizados a los de las plantas WT. En (a), letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; análisis de la varianza). En (b,c), los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a plantas WT ($p < 0,05$; prueba t de *Student*). Todos los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

7.3.2. Estudio de la interacción genética entre TCP10 y GLK1

Con el objetivo de estudiar las interacciones funcionales entre *TCP10* y *GLK1*, generamos plantas mutantes dobles *tcp10-1 glk1-1* mediante cruces genéticas.

Encontramos que estas plantas presentaron una deficiencia en la apertura de cotiledones similar a las plantas mutantes simples correspondientes al ser cultivadas por 3 días en luz (Figura 35a). Durante la transición de oscuridad a luz, el retraso en la apertura de cotiledones de las plántulas *tcp10-1 glk1-1* también fue similar al de las mutantes simples correspondientes (Figura 35b), lo que sugiere que TCP10 y GLK1 actúan en la misma vía molecular para modular la apertura de cotiledones durante la de-etiolación. Para analizar esto en profundidad, estudiamos el efecto de sobreexpresar TCP10 sobre la apertura de los cotiledones en el fondo mutante *glk1-1*. Dado que los niveles de ARNm de TCP10 se ven afectados por el microARN *miR319* (Palatnik et al., 2003), generamos plantas que expresan una versión de TCP10 insensible a *miR319* (mTCP10) fusionada a GFP bajo el control del promotor *35SCaMV* en los fondos genéticos salvaje y *glk1-1* (Sección 6.14). Observamos que las plantas que sobreexpresan mTCP10-GFP (*35S::mTCP10-GFP*) abrieron sus cotiledones más rápidamente que las plantas salvajes en respuesta a la luz (Figura 35c-d) y presentaron cotiledones abiertos en oscuridad (Figura 35d), confirmando que TCP10 contribuye en la promoción de la fotomorfogénesis jugando un papel durante la apertura de cotiledones. Sin embargo, este efecto se redujo significativamente en el fondo mutante *glk1-1* (*35S::mTCP10-GFP glk1-1*), tanto luego de 3 días de crecimiento en luz (Figura 35c) como durante la de-etiolación (Figura 35d), lo que sugiere que TCP10 promueve la apertura de los cotiledones en una manera dependiente de *GLK1*. Para obtener evidencias conclusivas de esta idea, decidimos analizar si la sobreexpresión de GLK1 es capaz de rescatar el fenotipo de cotiledones cerrados de las mutantes *tcp10-1*. Para ello obtuvimos la línea *35S::GLK1-GFP tcp10-1*. En efecto, observamos que la sobreexpresión de GLK1 rescató el defecto en la apertura de cotiledones en plántulas mutantes *tcp10-1* de 3 días (Figura 35e), indicando que GLK1 actúa corriente abajo de TCP10. Sin embargo, la mayor velocidad de apertura de cotiledones causada por la sobreexpresión de GLK1 durante la transición de oscuridad a luz, se vio significativamente afectada en ausencia de *TCP10* funcional (Figura 35f). Más aún, la mutación *tcp10-1* también suprimió el fenotipo de cotiledones abiertos de las plántulas *35S::GLK1-GFP* cultivadas en oscuridad. En conjunto, estos resultados sugieren que GLK1 es esencial para la apertura de cotiledones inducida por TCP10, pero también la función de GLK1 en este proceso depende de *TCP10* funcional, aunque en menor medida.

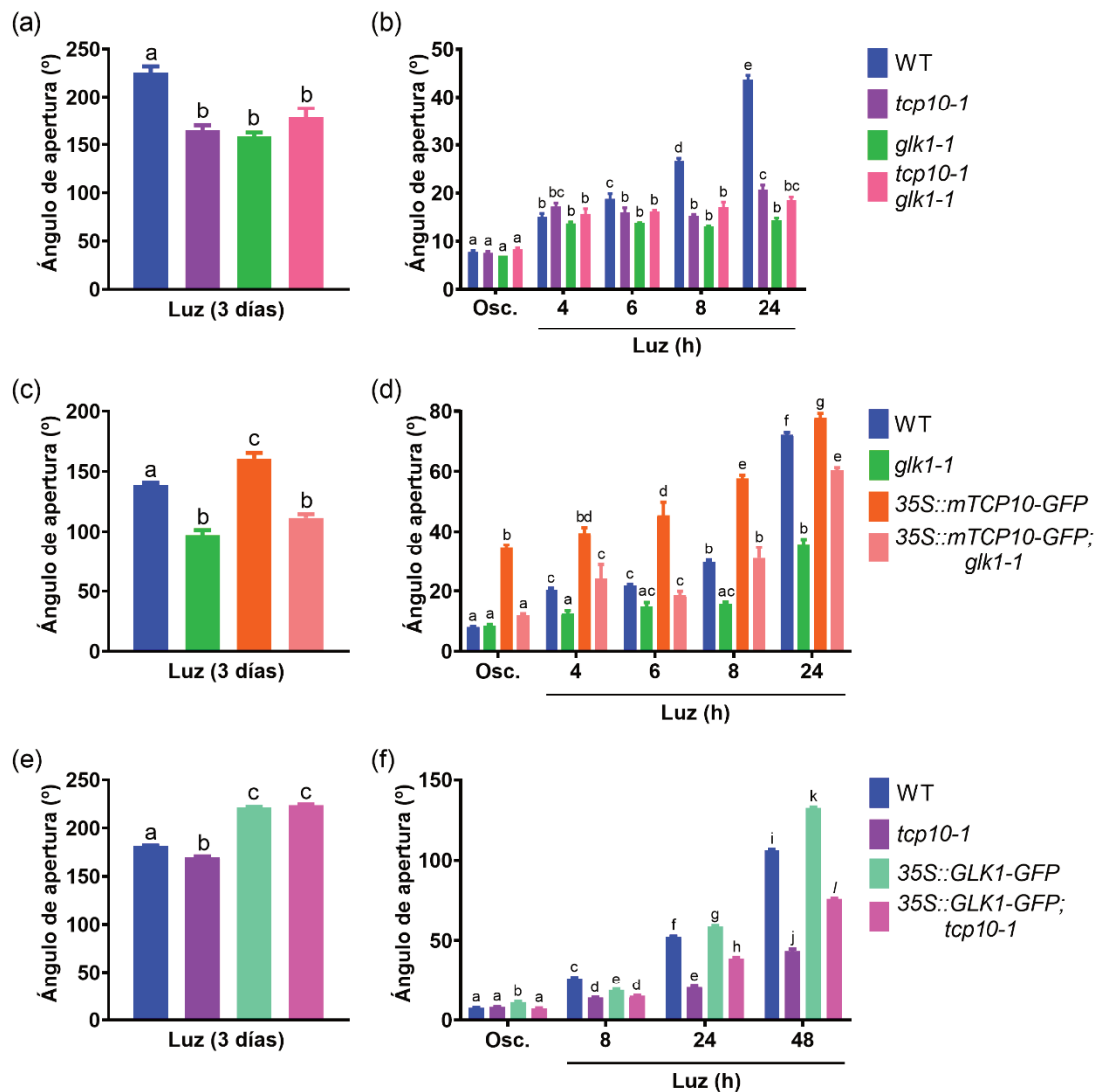


Figura 35: Interacciones genéticas entre TCP10 y GLK1. **(a, b)** Ángulos de apertura de cotiledones de las plántulas salvajes (WT), *tcp10-1*, *glk1-1* y *tcp10-1 glk1-1* cultivadas durante 3 días en luz blanca continua ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (a) o durante 48 h en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante los tiempos indicados (b). **(c, d)** Ángulos de apertura de cotiledones de las plántulas salvajes (WT), *glk1-1*, *35S::mTCP10-GFP* y *35S::mTCP10-GFP glk1-1* cultivadas durante 3 días en luz blanca continua ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (c) o durante 48 h en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante el tiempo indicado (d). **(e, f)** Ángulos de apertura de cotiledones de las plántulas salvajes (WT), *tcp10-1*, *35S::GLK1-GFP* y *35S::GLK1-GFP tcp10-1* cultivadas durante 3 días en luz blanca continua ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (e) o durante 48 h en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante el tiempo indicado (f). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$; análisis de varianza). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

7.3.3. *TCP10* requiere de *GLK1* para inducir la expresión de genes involucrados en la expansión de cotiledones y la fotosíntesis

Para explorar la importancia biológica de *GLK1* en la función de *TCP10* analizamos la expresión de genes afectados en la mutante *tcp10-1* en las líneas que expresan *mTCP10-GFP* en los fondos salvaje y *glk1-1*. Observamos que los niveles de transcritos

de genes *SAUR*, *EXP* y *LHCB* estaban significativamente aumentados en las plántulas *35S::mTCP10-GFP* en comparación con las plantas salvajes (Figura 36). Sin embargo, este aumento en la expresión se vio suprimido en el fondo mutante *glk1-1* para varios de estos genes (*SAUR6*, *EXP16* y todos los *LHCB* analizados, Figura 36), lo que sugiere que TCP10 promueve la expresión de genes involucrados en la fotomorfogénesis, y particularmente aquellos involucrados en la fotosíntesis, en una forma dependiente de *GLK1*. Un análisis de la secuencia de este grupo de genes reveló que contienen sitios de unión GLK (CCAATC, Waters et al., 2009), pero no sitios TCP (GTGGNCCC, Viola et al., 2011, 2012) en sus regiones promotoras. De manera opuesta, aquellos genes inducidos por TCP10 en forma independiente de *GLK1* (en su mayoría *SAURs*) contienen sitios TCP en sus promotores. En base a esto hipotetizamos que TCP10 podría regular la expresión de diferentes grupos de genes tanto directamente como a través de *GLK1*. Para analizar este posible escenario, seleccionamos a *LHCB2.2*, blanco directo de *GLK1* (Waters et al., 2009; este estudio) y *SAUR14*, reportado como blanco de las proteínas TCP (Dong et al., 2019; este estudio) para llevar a cabo un ensayo de actividad transcripcional *in vivo* (Figura 37a). Observamos que TCP10 fue capaz de activar la transcripción a partir del promotor de *SAUR14*, pero no de *LHCB2.2* (Figura 37b). Mientras que *GLK1* activó transcripcionalmente el promotor de *LHCB2.2* (Figura 37b), como se mostró en la sección anterior. Estas diferencias indicarían una ramificación en la señalización corriente abajo de TCP10, donde la regulación de la expresión de ciertos genes, especialmente genes asociados a la fotosíntesis, sería indirecta a través de la regulación transcripcional de *GLK1*, mientras que activaría directamente la expresión de otros genes, principalmente relacionados a la expansión celular.

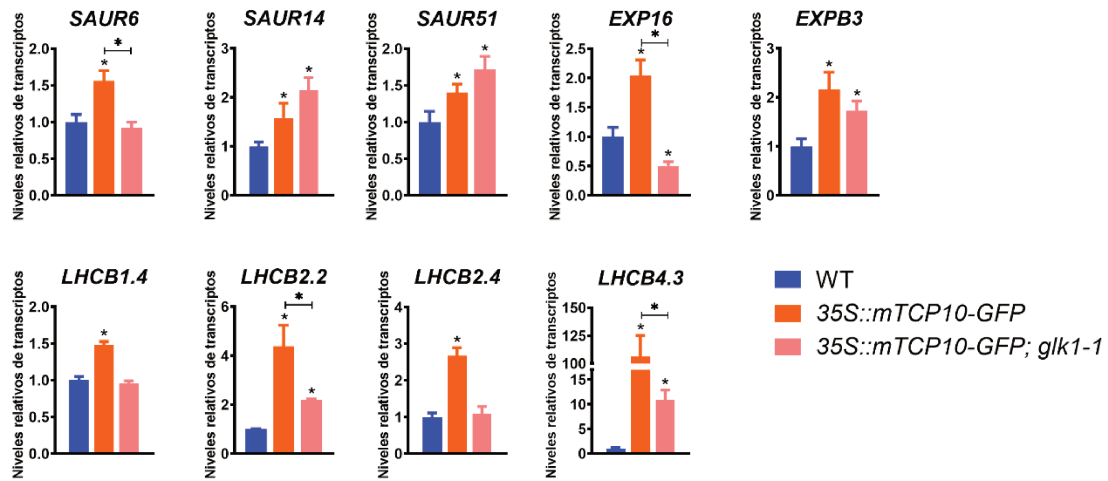


Figura 36: Niveles de expresión de los genes *SAUR*, *EXPANSINAS* y *LHCB* en plántulas salvajes (WT), *35S::mTCP10-GFP* y *35S::mTCP10-GFP glk1-1* cultivadas durante 48 horas en oscuridad y luego transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante seis horas. Los valores (media \pm SEM) se expresan relativos a plantas WT. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; ANOVA). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

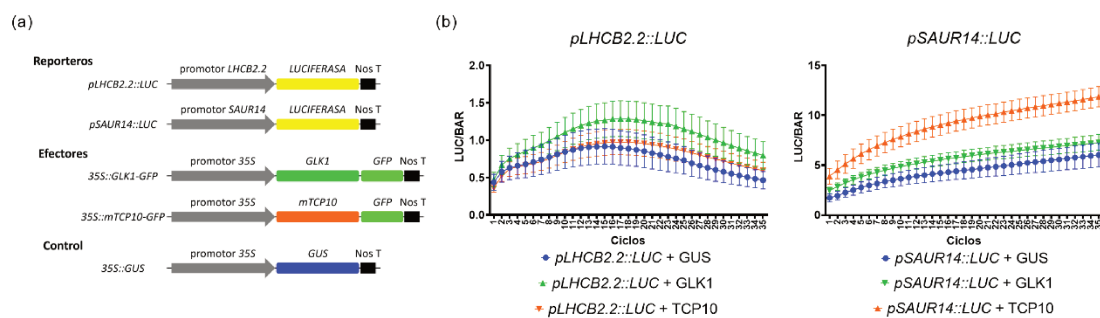


Figura 37: Ensayos de actividad transcripcional *in vivo* (a) Esquema de las construcciones utilizadas en los ensayos de actividad LUCIFERASA. (b) Ensayos de expresión transitoria en plantas de tabaco. Se co-transformaron hojas de *N. benthamiana* de forma transitoria con las construcciones *pLHCB2.2::LUC* o *pSAUR14::LUC* y *35S::GLK1-GFP* o *35S::mTCP10-GFP*. Como control negativo se transformaron hojas de tabaco con la construcción *35S::GUS* y los reporteros correspondientes. La actividad del gen reportero *LUC* fue detectada por luminiscencia y los valores relativizados al nivel de expresión del gen de resistencia a BASTA presente en el mismo vector (*BAR*). Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas.

7.3.4. Regulaciones transcripcionales entre *TCP10* y *GLK1*

Dado que *TCP10* y *GLK1* no interactúan físicamente entre sí, los análisis genéticos y de expresión realizados hasta aquí sugieren que la expresión de *GLK1* estaría regulada por *TCP10*. En concordancia con esto, observamos que los niveles de transcritos de *GLK1* estaban significativamente disminuidos en las mutantes *tcp10-1* expuestas a la luz en comparación con las plantas salvajes (Figura 38), mientras que las plantas

35S::mTCP10-GFP mostraron niveles de expresión de *GLK1* significativamente mayores que las plantas salvajes (Figura 38).

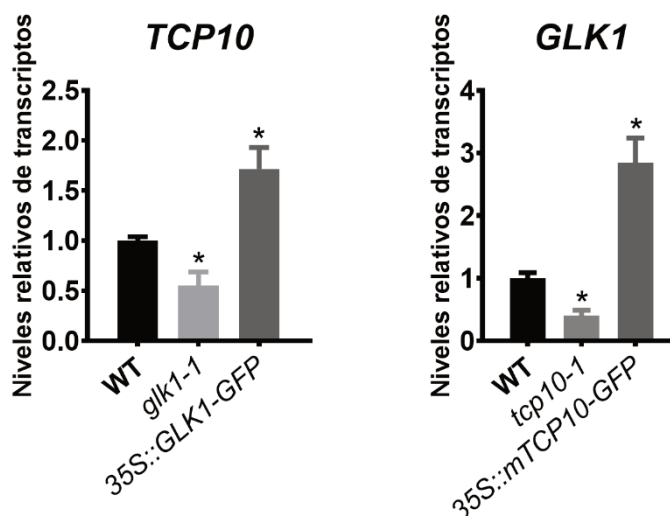


Figura 38: Expresión de *TCP10* y *GLK1* en plantas con niveles alterados de expresión de estos genes. Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de transcritos de los genes indicados en plántulas salvajes (WT) y mutantes y sobreexpresantes de *GLK1* y *TCP10* cultivadas cuatro días en luz blanca ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los valores se expresan relativizados a los de las plantas WT. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las plantas WT ($p < 0,05$; prueba t de Student). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

Cuando analizamos el promotor de *GLK1* observamos que contiene dos motivos de unión TCP localizados 1614 pb y 587 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción (Figura 39a). Esto nos animó a explorar si *GLK1* es un blanco directo de *TCP10*. Un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina seguido de qPCR (ChIP-qPCR) en plántulas *35S::mTCP10-GFP* cultivadas por 4 días en luz mostró que *TCP10* se asoció a las regiones que contienen los sitios de unión TCP en el promotor de *GLK1* (P1 y P2, Figura 39), indicando que *GLK1* es un blanco directo de *TCP10*.

Curiosamente, cuando analizamos la expresión de *TCP10* en el fondo *glk1-1* encontramos que los niveles de transcritos de *TCP10* estaban significativamente disminuidos (Figura 38). Mientras que la expresión de *TCP10* estaba significativamente inducida en las plántulas que sobreexpresan *GLK1* en comparación con plantas salvajes (Figura 38), lo que sugiere que *GLK1* regula la transcripción de *TCP10*. A continuación, buscamos la presencia de sitios de unión GLK en el promotor de *TCP10* y encontramos un motivo de unión GLK 315 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción (Figura 39a). Un ensayo de ChIP-qPCR con plántulas *35S::GLK1-GFP* de 4 días mostró un enriquecimiento significativo de fragmentos genómicos conteniendo este motivo (Figura 39b), lo que indica que *TCP10* es un blanco directo de *GLK1*. Estos resultados

explicarían el requerimiento observado de *TCP10* funcional para el fenotipo de cotiledones abiertos de las plantas que sobreexpresan *GLK1* durante la de-etiolación (Figura 35e,f).

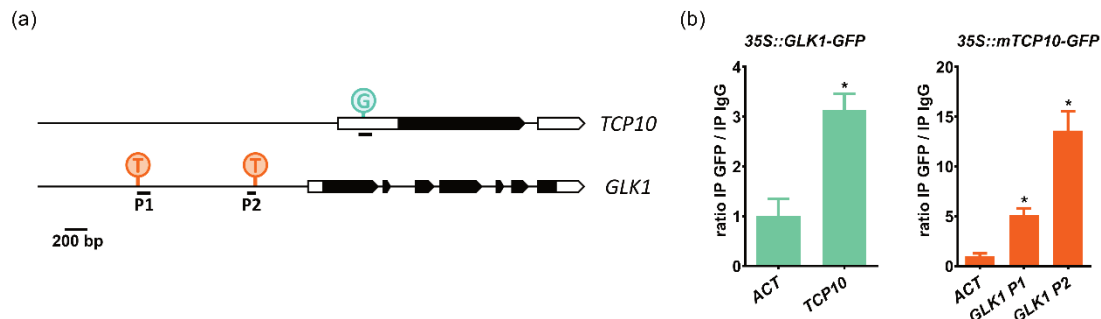


Figura 39: *GLK1* y *TCP10* se asocian directamente a los promotores de *TCP10* y *GLK1*, respectivamente. **(a)** Diagrama de los genes analizados con los exones y las regiones transcritas no traducidas (UTR) representadas como recuadros negros y blancos, respectivamente. Se indican la posición de los motivos de unión putativos de *GLK1* (G; círculos verdes) y *TCP* (T; círculos naranjas) y las regiones analizadas por ChIP-qPCR (P1, P2). **(b)** Análisis de ChIP-qPCR de la unión de *GLK1-GFP* (verde) y *mTCP10-GFP* (naranja) a las regiones promotoras indicadas en (a), realizado en plántulas que expresan *GLK1-GFP* y *mTCP10-GFP* en fondo salvaje, respectivamente. Se utilizó una región del gen *ACTIN2* como control negativo. Las barras muestran la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. La variación entre experimentos, debida a diferencias en los valores absolutos de enriquecimiento para todas las regiones analizadas, se eliminó mediante corrección por factor (Ruijter et al., 2015). Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con *ACTIN2* (p < 0,05; prueba t de Student).

7.3.5. *GLK2* está bajo el control directo de *TCP10* y *GLK1*

En esta etapa de nuestro estudio nos preguntamos acerca del papel de *GLK2*, que actúa de forma redundante con *GLK1* en el control de diversos procesos (Choi et al., 2024), durante la apertura de cotiledones inducida por la luz. Observamos que las plántulas mutantes simples en *GLK2*, *glk2-1* (Fitter et al., 2002; Figura 60 en el Anexo 2), presentaron un retraso significativo en la velocidad de apertura de cotiledones en comparación con plantas salvajes (Figura 40a). Sin embargo, plántulas mutantes dobles *glk1-1 glk2-1*, obtenidas por cruza genética, mostraron una deficiencia en la apertura de cotiledones similar a las mutantes simples correspondientes (Figura 40a), lo que sugiere que *GLK1* y *GLK2* no actuarían en forma aditiva en este proceso. Más aún, la expansión de los cotiledones no se vio afectada en las plantas *glk2-1* en relación a las plantas salvajes (Figura 40b) y observamos un efecto menor en la expresión de genes implicados en la apertura de cotiledones en la mutante *glk2-1* en relación con las plántulas *glk1-1* (Figura 40c). Estos resultados sugieren que *GLK2* participa en el desarrollo de los cotiledones durante la de-etiolación, pero en menor medida que *GLK1*.

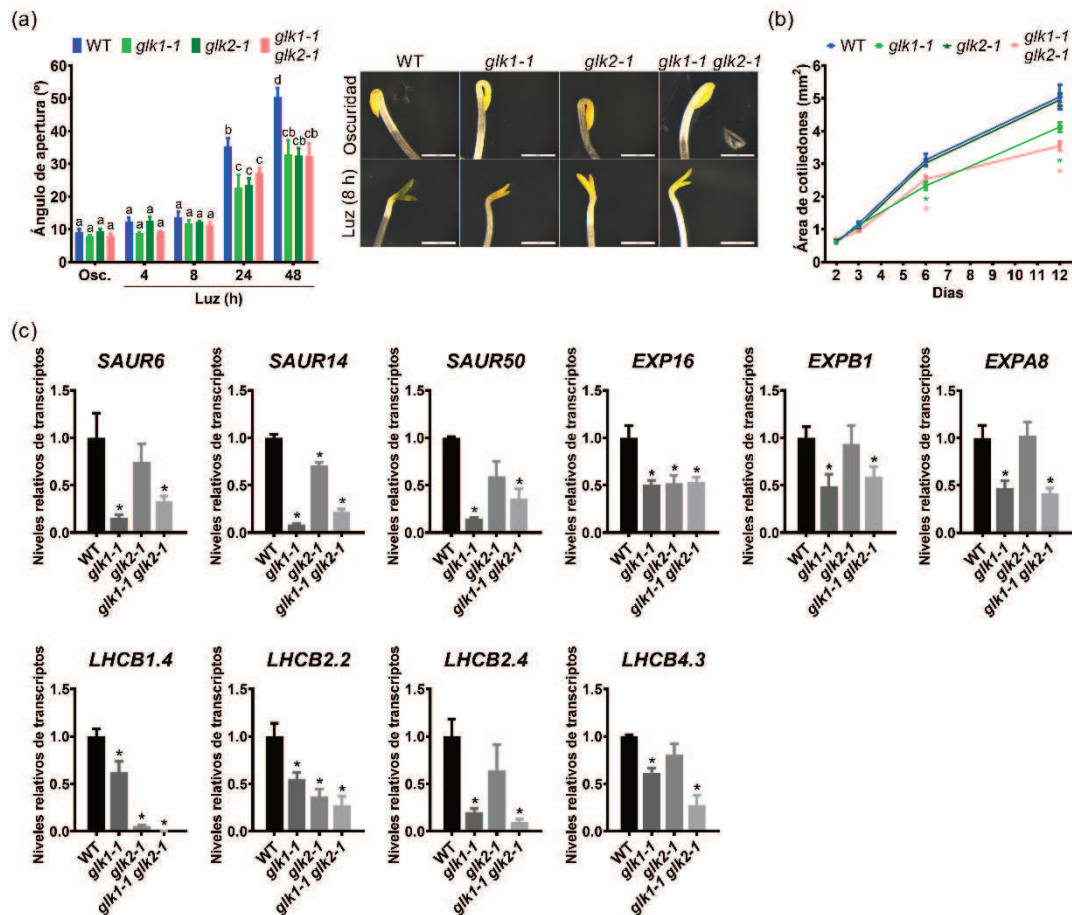


Figura 40: (a) Ángulo de apertura de cotiledones de las plántulas salvajes (WT), *glk1-1*, *glk2-1* y *glk1-1 glk2-1* cultivadas 48 h en oscuridad y transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por los tiempos indicados. A la derecha se muestran imágenes representativas (barras de escala: 1 mm). (b) Área de cotiledones de plántulas salvajes (WT), *glk1-1*, *glk2-1* y *glk1-1 glk2-1* cultivadas durante 48 h en la oscuridad y luego transferidas a luz blanca ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante el tiempo indicado. Las barras indican la media \pm SEM de tres muestras biológicas con aproximadamente 30 plántulas cada una. (c) Análisis cuantitativo de los niveles de transcritpo de genes SAUR, EXPANSINAS, y LHCb en plántulas salvajes (WT), *glk1-1*, *glk2-1* y *glk1-1 glk2-1* cultivadas 4 días en condiciones normales de iluminación. Los valores están relativizados a los de las plantas WT. En (a), letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; análisis de la varianza). En (b,c), los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a plantas WT ($p < 0,05$; prueba t de Student). Todos los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

Notablemente, la expresión de *GLK2* se vio significativamente reducida en el fondo *tcp10-1* y aumentada en plántulas que expresan mTCP10-GFP en relación a las plantas salvajes (Figura 41a). El promotor de *GLK2* contiene un sitio putativo de unión TCP 2995 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción (Figura 41b) y un ensayo de ChIP-qPCR en plántulas *35S::mTCP10-GFP* mostró que TCP10 se asoció a esta región (Figura 41c), lo que sugiere que *GLK2* es también regulado directamente a nivel transcripcional por TCP10.

Además, observamos que la expresión de *GLK2* estaba significativamente afectada en la mutante *glk1-1* y las sobreexpresantes de *GLK1* (Figura 41a), mientras que no se observaron diferencias en los niveles de transcritos de *GLK1* en la mutante *glk2-1* en relación a las plantas salvajes (Figura 41a). Por otra parte, el promotor de *GLK2*, pero no el de *GLK1*, contiene un sitio putativo para la unión de proteínas GLK (Figura 41b). El análisis por ChIP-qPCR de plántulas *35S::GLK1-GFP* mostró que *GLK1* se asoció a la región del promotor de *GLK2* que contiene el motivo de unión GLK (Figura 41c), lo que indica que *GLK2* es un blanco directo de *GLK1* y sugiere la presencia de mecanismos de regulación por retroalimentación en el control de la expresión de *TCP10* y los genes *GLK*.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que *TCP10*, junto con la inducción de los genes *SAUR*, gobierna indirectamente la expresión de los genes de expansinas y fotosíntesis a través de la regulación directa de *GLK1*, facilitando así el desarrollo de los cotiledones durante la de-etiolación. Además, existe un bucle de regulación positiva entre los factores de transcripción *GLK* y *TCP10*, permitiendo así un despliegue coordinado y robusto de programas de expresión génica relacionados con la de-etiolación de los cotiledones y la fotomorfogénesis de las plántulas.

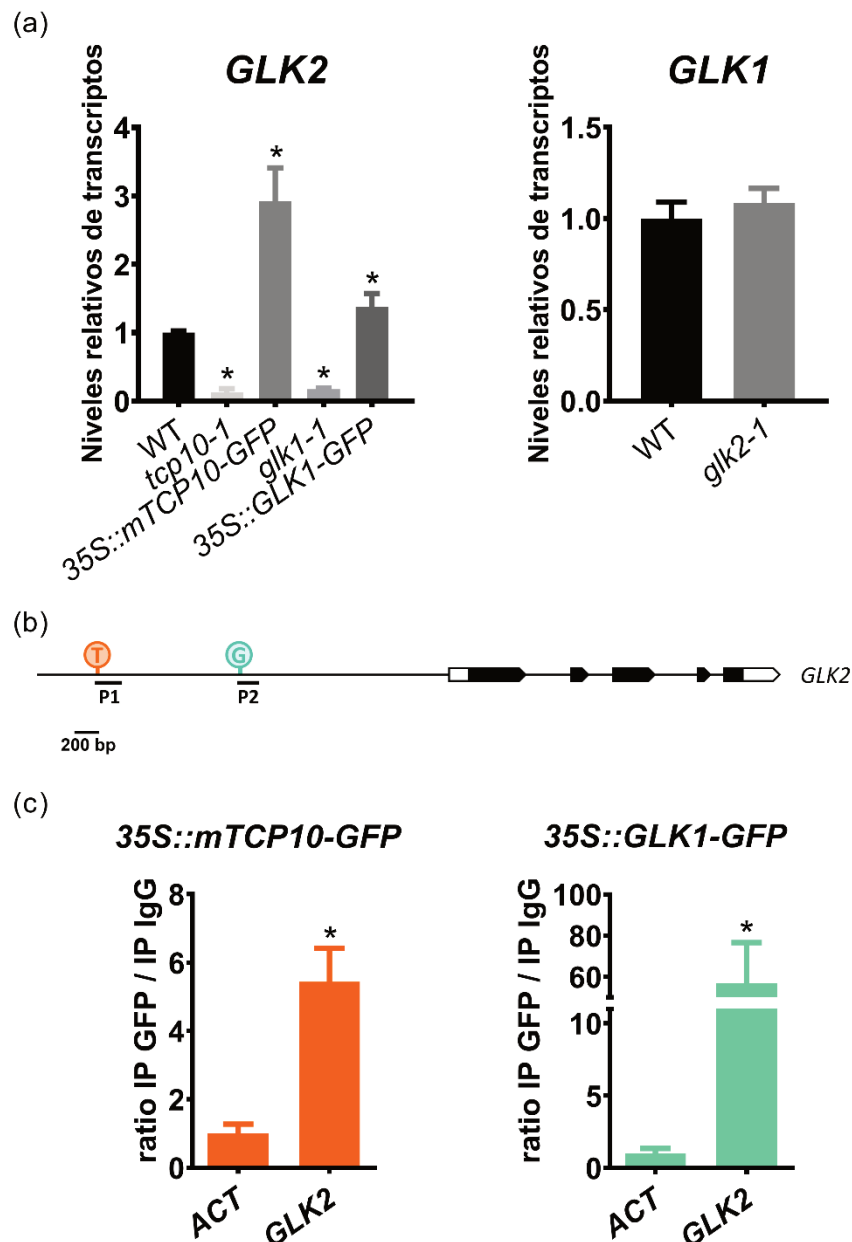


Figura 41: *GLK2* es blanco directo de TCP10 y GLK1. (a) Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de transcritos de *GLK2* y *GLK1* en las plántulas indicadas en el gráfico cultivadas cuatro días en luz blanca ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los valores se expresan relativizados a los de las plantas WT. (b,c) Ensayos de ChIP en plántulas *35S::mTCP10-GFP* y *35S::GLK1-GFP*. Diagrama de los genes analizados con los exones y las regiones transcritas no traducidas (UTR) representadas como recuadros negros y blancos, respectivamente. Se indican la posición de los motivos de unión putativos TCP (T; círculos naranjas) y GLK1 (G; círculos verdes). Las líneas negras indican las regiones analizadas por ChIP-qPCR (P1, P2) (b). Análisis de ChIP-qPCR de la unión de mTCP10-GFP y GLK1-GFP a las regiones promotoras indicadas en (b), realizado en plántulas que sobreexpresan *mTCP10-GFP* (izquierda) y *GLK1-GFP* (derecha) en fondo salvaje. Se utilizó el gen *ACTIN2* como control negativo. Las barras muestran la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. La variación entre experimentos, debida a diferencias en los valores absolutos de enriquecimiento para todas las regiones analizadas, se eliminó mediante corrección por factor (Ruijter et al., 2015). Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con *ACTIN2* ($p < 0,05$; prueba t de Student).

7.3.6. La expresión de *TCP10* es reprimida por señales retrógradas de los cloroplastos

Como se describió en la introducción de esta tesis, la vía de señalización retrógrada consta de señales enviadas por los plástidos hacia el núcleo que permiten coordinar la expresión de genes nucleares en función del estado metabólico de los mismos. Estas señales se activan frente a condiciones de estrés como calor, alta intensidad lumínica o la generación de especies reactivas de oxígeno durante la fotosíntesis y también tienen un papel importante durante los primeros estadios de desarrollo de las hojas en los que se construyen los aparatos fotosintéticos (Gommers & Monte, 2018). A pesar de que se conoce poco sobre los mecanismos moleculares por los cuales estas señales se transmiten al núcleo, se sabe que producen una disminución de los niveles de transcripto y proteína de *GLK1*, lo cual conduce a una disminución de la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis y afecta la biogénesis de los cloroplastos (Kakizaki et al., 2009; Martin et al., 2016; Tokumaru et al., 2017). Teniendo en cuenta esto hipotetizamos que, ante estas condiciones, la expresión de *TCP10* también podría ser reprimida. En efecto, observamos que los niveles de transcripto de *TCP10* estaban significativamente reducidos en plantas salvajes cultivadas en presencia de lincomicina (LIN) (Figura 42), una droga que activa la señal retrógrada al inhibir la biogénesis de cloroplastos (Sullivan & Gray, 1999), lo que sugiere que *TCP10* es un gen reprimido por señal retrógrada. Estos resultados son similares a la inhibición observada previamente de la expresión de *GLK1* por LIN (Martin et al., 2016) (Figura 42), lo que sugiere que *TCP10* es reprimido bajo condiciones en las que la señal retrógrada se activa e inhibe la función de *GLK1*.

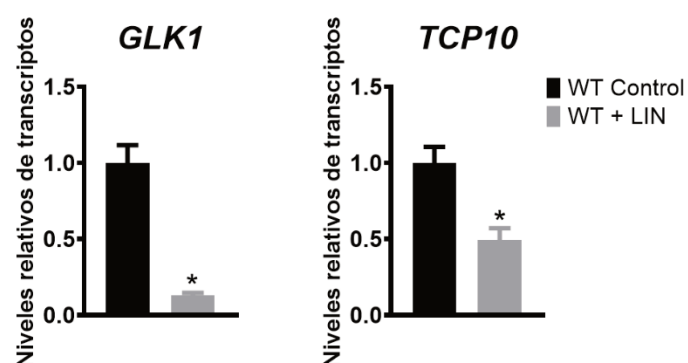


Figura 42: Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de transcripto de *GLK1* y *TCP10* en plántulas salvajes (WT) cultivadas 3 días en luz blanca ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con el agregado de lincomicina (LIN) o DMSO (Control) al medio de cultivo. Los valores se expresan relativizados a los de las plantas WT. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con la condición control ($p < 0,05$; prueba t de *Student*). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

En consecuencia, decidimos examinar la contribución de *TCP10* al fenotipo de insensibilidad a LIN reportado previamente en las plántulas *35S::GLK1* (Martin et al., 2016). Observamos que el fenotipo de cotiledones abiertos de las plántulas *35S::GLK1-GFP* cultivadas en presencia de LIN fue claramente suprimido en ausencia de *TCP10* funcional (Figura 43a,b), indicando que *GLK1* requiere de *TCP10* para contrarrestar la represión mediada por señal retrograda del desarrollo de cotiledones. De manera notoria, la expresión de *TCP10* en presencia de LIN fue mayor en las plántulas que sobreexpresan *GLK1* en relación a las plantas salvajes (Figura 43c), lo que sugiere que la señal retrógrada inhibe la expresión de *TCP10* en parte a través de la regulación negativa de *GLK1*. Sin embargo, cierto efecto de LIN en la expresión de *TCP10* se siguió observando en las plántulas sobreexpresantes de *GLK1* (Figura 43c), lo que sugiere que factores adicionales a *GLK1* estarían involucrados en la represión de *TCP10* frente a condiciones en las que los cloroplastos son dañados.

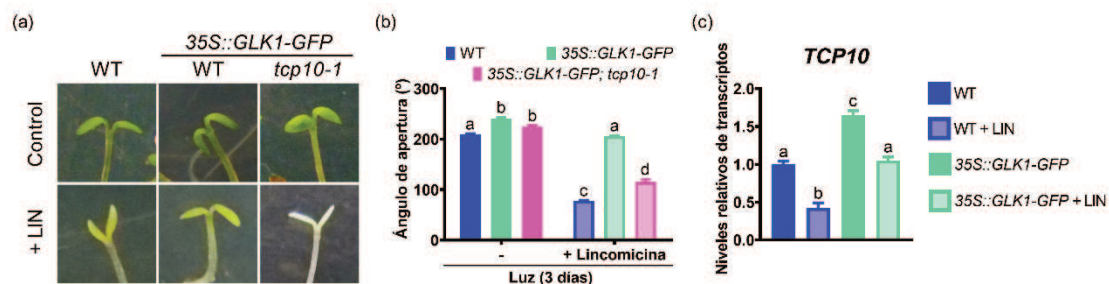


Figura 43: Estudios fenotípicos de respuesta a lincomicina en plantas que sobreexpresan *GLK1*. **(a)** Imágenes representativas de la parte apical de plántulas salvajes (WT) y sobreexpresantes de *GLK1-GFP* en fondo WT y *tcp10-1* cultivadas 3 días en luz continua ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con el agregado de DMSO (Control) o lincomicina (+LIN). **(b)** Ángulo de apertura de cotiledones de las plántulas descritas en (a). **(c)** Análisis cuantitativo de los niveles de transcritos de *TCP10* en plántulas salvajes (WT) y *35S::GLK1-GFP* cultivadas 3 días en luz continua ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con el agregado de DMSO (Control) o lincomicina (LIN). Las barras indican la media \pm SEM de tres muestras biológicas con aproximadamente 30 plántulas cada una. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; análisis de la varianza). Todos los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

7.3.7. Las señales retrógradas desde los plástidos previenen la apertura de los cotiledones y la regulación de la expresión génica inducidos por *TCP10*

A continuación, nos preguntamos si la represión de *TCP10* en respuesta a señales retrógradas podría contribuir a la inhibición de la de-etiolación tras un daño en los cloroplastos observada previamente (Martin et al., 2016). Notablemente, observamos que la expresión de m*TCP10-GFP* no impidió la inhibición de la apertura de los cotiledones por LIN en plántulas cultivadas en luz (Figura 44a,b). Más aún, el fenotipo de cotiledones abiertos que presentan las plántulas que expresan m*TCP10-GFP* en oscuridad también fue suprimido por LIN (Figura 44a,b).

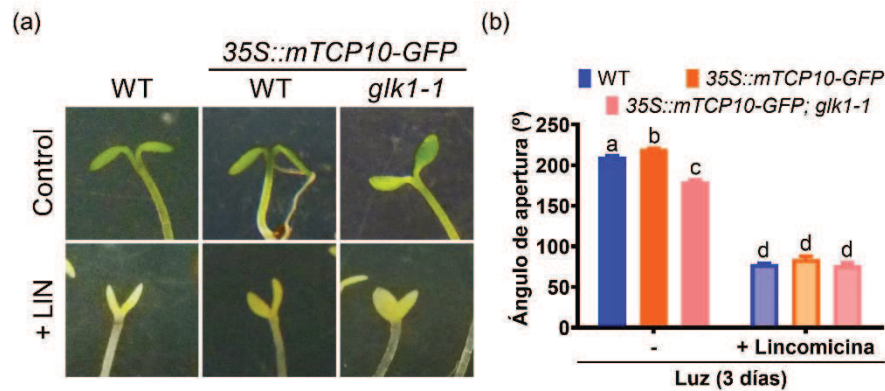


Figura 44: Ensayos fenotípicos de respuesta a lincomicina en plantas que expresan *mTCP10-GFP*. **(a)** Imágenes representativas de la parte apical de plántulas salvajes (WT) y sobreexpresantes en *mTCP10-GFP* en fondo WT y *glk1-1* cultivadas 3 días en luz continua ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con el agregado de DMSO (Control) o lincomicina (LIN). **(b)** Ángulos de apertura de cotiledones de las plántulas descritas en (a).

Para explorar esto en detalle, analizamos la expresión de genes inducidos por TCP10, que son reprimidos por SR durante la fotomorfogénesis (Oelmüller et al., 1986; Sajib et al., 2023; Wu & Bock, 2021), en plántulas que expresan *mTCP10-GFP* cultivadas en presencia de LIN. Observamos que la expresión de los blancos directos de TCP10, *GLK1* y *GLK2*, se vio significativamente afectada en estas plantas después del tratamiento con LIN (Figura 45a). Además, la expresión de *LCHB1.4*, *LCHB2.2* y *LCHB4.3* fue significativamente suprimida por LIN en las plántulas de *35S::mTCP10-GFP* (Figura 45b), lo que indica que SR antagoniza la acción de TCP10 en la regulación de la expresión de los genes *GLK* y *LHCB*. Curiosamente, las plántulas salvajes cultivadas en LIN también mostraron expresión reducida de *SAUR6* y *SAUR63* (Figura 45c), lo que muestra que la expresión de genes implicados en la apertura y expansión de los cotiledones también está bajo control de señalización retrógrada. Como se observó para los genes *GLK* y *LHCB*, la inducción de su expresión en las plántulas que expresan *mTCP10-GFP* se vio significativamente suprimida en presencia de LIN (Figura 45c). Además, la expresión de *SAUR14*, no afectada por LIN en las plántulas salvajes (Figura 45d), no fue inducida en plántulas *35S::mTCP10-GFP* en presencia de LIN (Figura 45d). En conjunto, estos resultados sugieren que la señal retrógrada afecta los niveles de transcripto de *TCP10* y su incremento luego de la iluminación. Sin embargo, el hecho de que LIN inhibe procesos regulados por TCP10 aún en plantas que expresan *mTCP10-GFP* sugiere que la señal retrógrada actúa a niveles adicionales al control transcripcional.

A diferencia de las observaciones realizadas para TCP10, la disminución en los niveles de transcripto de *GLK2*, *SAUR6/63* y *LHCBs* por LIN se alivió en las plántulas que

sobreexpresan *GLK1* en comparación con las salvajes cultivadas en la misma condición (Figura 45a-c). Esto es consistente con resultados previos que muestran que la señalización retrógrada regula negativamente a *GLK1* para reprimir la expresión de genes *LHCB* durante la fotomorfogénesis (Kakizaki et al., 2009; Martin et al., 2016; Tokumaru et al., 2017; Waters et al., 2009). Notablemente, un resultado similar se observó para el efecto de LIN en la expresión de *TCP10* (Figura 43c), lo que indica que su regulación negativa por parte de la señalización retrógrada también está relacionada con la represión de *GLK1*.

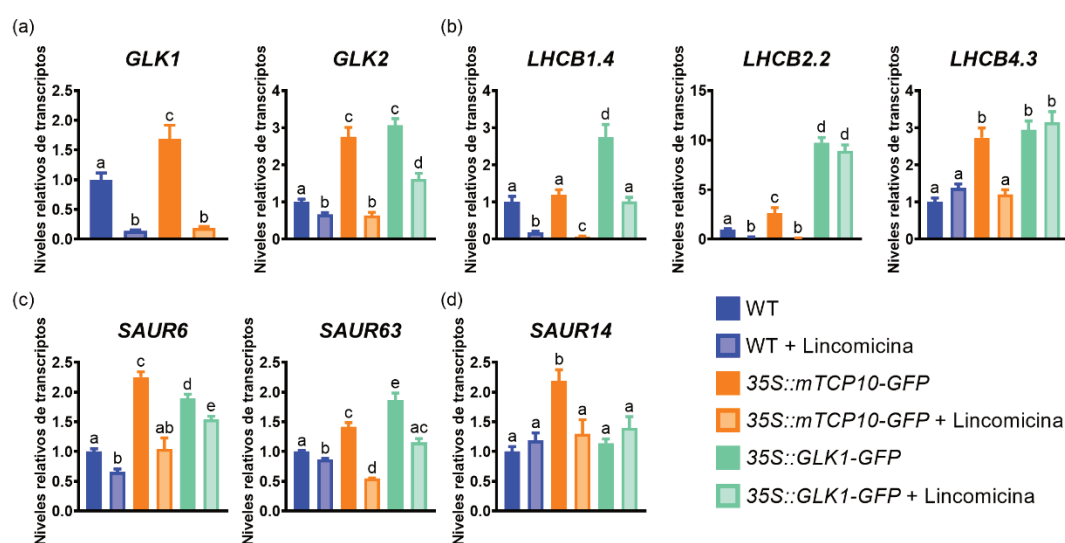


Figura 45: Niveles de expresión de los genes *GLK*, *LHCB* y *SAUR* en respuesta a lincomicina. Análisis cuantitativo de los niveles de transcritos de genes *GLK* (a), *LHCB* (b), *SAUR6/63* (c) y *SAUR14* (d) en plántulas salvajes (WT), *35S::mTCP10-GFP* y *35S::GLK1-GFP* cultivadas 3 días en luz continua ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con el agregado de DMSO (Control) o lincomicina. Los valores están relativizados a los de las plantas WT en condición control. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Letras distintas indican diferencias significativas en comparación con las plantas WT control ($p < 0,05$; prueba t de Student). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

7.3.8. Las señales retrógradas desde los plástidos afectan la estabilidad de *TCP10*

En base en los estudios fenotípicos y de expresión genética sobre el efecto de LIN en plántulas que expresan *mTCP10-GFP*, nos planteamos la hipótesis de que las señales de los plástidos podrían afectar la acumulación de *TCP10* a nivel postranscripcional o postraduccional. En consecuencia, analizamos los niveles de transcritos de *mTCP10-GFP* y de proteína en plántulas *35S::mTCP10-GFP* cultivadas en ausencia o presencia de LIN. El análisis de RT-qPCR indicó que los niveles de transcritos de *mTCP10-GFP* no se vieron afectados por LIN (Figura 62 en el Anexo 2). Por otro lado, el análisis de *western blot* con anticuerpos anti-GFP mostró que la acumulación de *mTCP10-GFP* disminuyó drásticamente cuando las plántulas fueron expuestas a LIN (Figura 46a), lo

que sugiere que un daño en los plástidos promovería la degradación de TCP10. En efecto, los niveles de mTCP10-GFP no disminuyeron en respuesta al tratamiento con LIN cuando se incluyó en el medio el inhibidor de proteasoma 26S MG-132 (Figura 46a). A su vez, imágenes de microscopía confocal de cotiledones de plántulas *35S::mTCP10-GFP* cultivadas en luz también mostraron una reducción significativa de la señal de mTCP10-GFP en presencia de LIN (Figura 46b,c), mientras que la aplicación de MG-132 revirtió esta tendencia, aumentando los niveles de mTCP10-GFP (Figura 46b,c). En base a estos resultados, concluimos que la señalización retrógrada no solo inhibe la transcripción de *TCP10*, sino que también reduce la estabilidad en el núcleo de la proteína TCP10 mediante la inducción de su degradación. El efecto inhibitorio de MG-132 en este proceso indica que la vía de proteasoma 26S estaría involucrada en la degradación de TCP10 dependiente de señalización retrógrada. De manera general, proponemos que la activación de la señalización retrógrada durante la de-etiolación reprime la expresión inducida por la luz y la estabilidad de TCP10, atenuando así la separación de los cotiledones durante la fotomorfogénesis para proteger a las plántulas en caso de una disfunción de los cloroplastos.

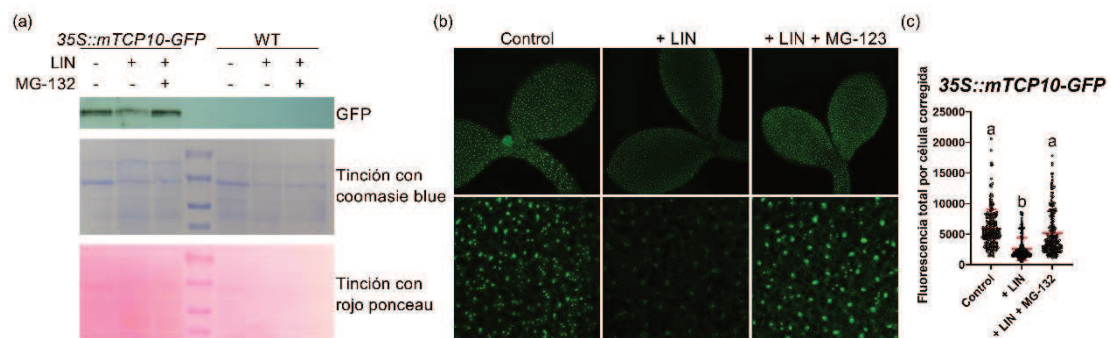


Figura 46: Análisis de los niveles de proteína TCP10 en respuesta a lincomicina. **(a)** Análisis de *western blot* con extractos de proteína total de plántulas *35S::mTCP10-GFP* cultivadas 48 h en oscuridad y transferidas a luz 24 h con el agregado de LIN o LIN+MG-132 y utilizando anticuerpos anti-GFP. Debajo se muestran tinciones con coomasie blue y con rojo ponceau como control de carga. **(b)** Imágenes representativas adquiridas mediante microscopía confocal de cotiledones de plántulas *35S::mTCP10-GFP* cultivadas como se indica en (b). Los paneles de la parte inferior muestran imágenes adquiridas con mayor acercamiento y utilizadas en la cuantificación. **(c)** Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia de mTCP10-GFP. La intensidad de la fluorescencia fue medida en aproximadamente 200 núcleos de 10 imágenes por cada tratamiento utilizando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Las barras indican el promedio \pm SEM y las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$; prueba t de *Student*) en relación con la condición control.

7.4. Estudios de la relación entre los factores de transcripción TCP y la vía hormonal de brasinoesteroides durante la de-etiolación en *Arabidopsis thaliana*

Los brasinoesteroides (BR) son hormonas esteroides implicadas en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas. Estas hormonas, junto con las señales activadas por luz, afectan de forma común en muchos procesos fisiológicos y del desarrollo como la germinación, floración y elongación del hipocotilo (Cackett et al., 2021; T. W. Kim & Wang, 2010; Z.-Y. Wang et al., 2012). Además, al igual que la luz, los BR también juegan un rol importante en la fotomorfogénesis, actuando como reguladores negativos de este proceso (Li & He, 2016). Así, cuando plantas deficientes en BR o insensibles a esta hormona, son cultivadas en oscuridad poseen cotiledones abiertos e hipocotilos más cortos (Chory et al., 1991; Li et al., 1996; Wang et al., 2012). Al realizar un análisis de los datos de expresión global disponibles en la literatura observamos que *GLK1* y algunos genes *TCP* son reprimidos por brasinoesteroides. Esto nos impulsó a analizar si los fenotipos observados en plantas con niveles alterados en los genes *GLK* y *TCP* están asociados a una alteración en la señalización de brasinoesteroides.

7.4.1. Los genes *TCP* y *GLK* son necesarios para la apertura de cotiledones inducida por una deficiencia en los niveles de brasinoesteroides

En base a lo planteado, analizamos la capacidad de apertura de cotiledones en las mutantes simples y dobles en genes *TCP* y *GLK* cultivadas en oscuridad y en presencia del inhibidor de la síntesis de brasinoesteroides Brasinazol (BRZ). Observamos que, a diferencia de las plantas salvajes que presentaron cotiledones abiertos en oscuridad frente al tratamiento con BRZ, las plántulas mutantes simples en *TCP14* (*tcp14-1*, *tcp14-4* y *tcp14-6*), *TCP15* (*tcp15-1*, *tcp15-3*, *tcp15-4*) y *TCP10* (*tcp10-1*) presentaron cotiledones significativamente más cerrados que las plantas salvajes frente al tratamiento con BRZ (Figura 47). Este efecto se vio más acentuado en las plantas mutantes dobles *tcp14-4 tcp15-3* en comparación con las mutantes simples correspondientes (Figura 47), lo que estaría de acuerdo con la función redundante de *TCP14* y *TCP15* en el proceso de apertura de cotiledones. Esta menor sensibilidad al tratamiento con BRZ también se observó en las mutantes en *GLK1* y *GLK2* (Figura 47). Estos resultados sugieren que *TCP10/14/15* y *GLK1/2* son requeridos para la apertura de cotiledones inducida por una disminución en los niveles de BR.

Para obtener más evidencias, decidimos analizar la contribución de los genes *TCP* y *GLK* en plantas deficientes en brasinoesteroides. Para ello realizamos cruza genéticas

entre mutantes simples en estos genes y la mutante en la biosíntesis de brasinoesteroides, *det2-1*. De acuerdo con lo reportado previamente en la bibliografía (Li et al., 1996), las plántulas *det2-1* presentaron cotiledones abiertos al ser cultivadas en oscuridad (Figura 48), mientras que este fenotipo fue parcialmente suprimido en ausencia de *TCP15*, *TCP10* o *GLK1* funcionales (Figura 48). En conjunto, estos resultados sugieren que los factores de transcripción *TCP* y *GLK* serían parte de la vía molecular mediante la cual los BR reprimen la apertura de cotiledones.

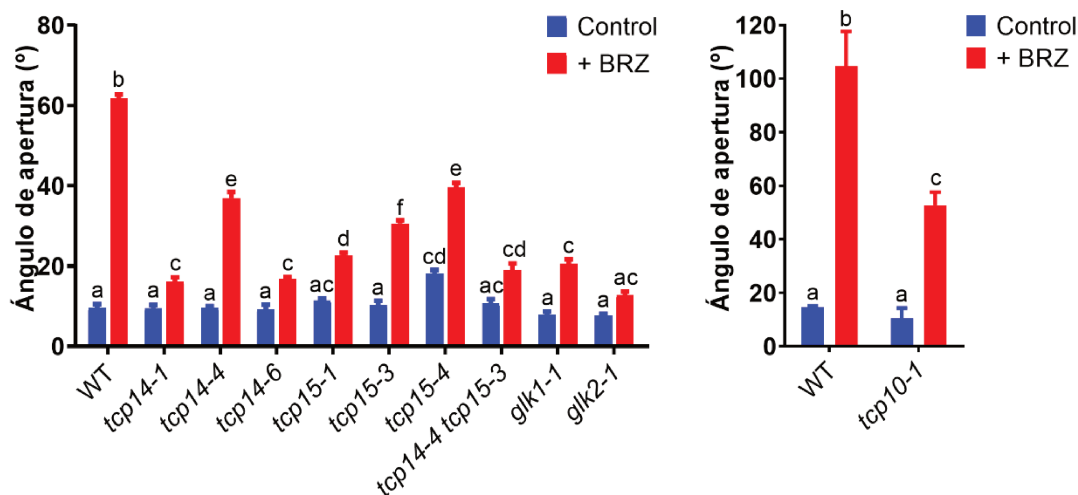


Figura 47: Ensayos fenotípicos de respuesta a brasinazol (BRZ). Ángulo de apertura de cotiledones de plántulas salvajes (WT) y líneas mutantes en genes *TCP* y *GLK* cultivadas 5 días en oscuridad con el agregado de DMSO (Control) o brasinazol (BRZ). Las barras indican la media \pm SEM de tres muestras biológicas con 30 plántulas cada una. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; análisis de la varianza). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

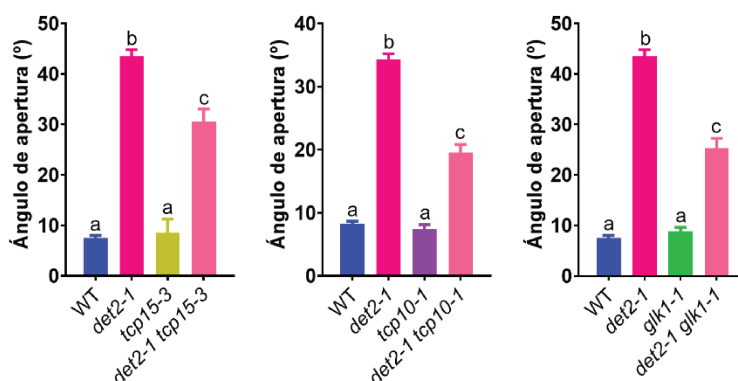


Figura 48: Ángulo de apertura de cotiledones de plántulas salvajes (WT) y las líneas mutantes *det2-1*, *tcp15-3*, *tcp10-1*, *glk1-1*, *det2-1 tcp15-3*, *det2-1 tcp10-1* y *det2-1 glk1-1* cultivadas en oscuridad durante 5 días. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas con 30 plántulas cada una. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; análisis de la varianza). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

7.4.2. La expresión de los factores de transcripción TCP y GLK es reprimida por BR a través de BZR1

Con el fin de indagar cuáles son los mecanismos moleculares que relacionan los factores de transcripción TCP y GLK con la vía de BR durante la apertura de cotiledones, analizamos el efecto de esta vía hormonal sobre su expresión a nivel transcripcional. Observamos un aumento significativo en los niveles de transcritos de *TCP14*, *TCP15*, *TCP10* y *GLK1* cuando plántulas salvajes fueron cultivadas en oscuridad en presencia del inhibidor de síntesis de BR, BRZ (Figura 49a). Un efecto similar observamos en la expresión de estos genes en las mutantes *det2-1* cultivadas en oscuridad en comparación con las plantas salvajes (Figura 49b). Estos resultados, sumados a los estudios fenotípicos, sugieren que los BR reprimirían la expresión de estos factores de transcripción en oscuridad para inhibir la apertura de cotiledones durante el crecimiento escotomorfogénico de las plántulas.

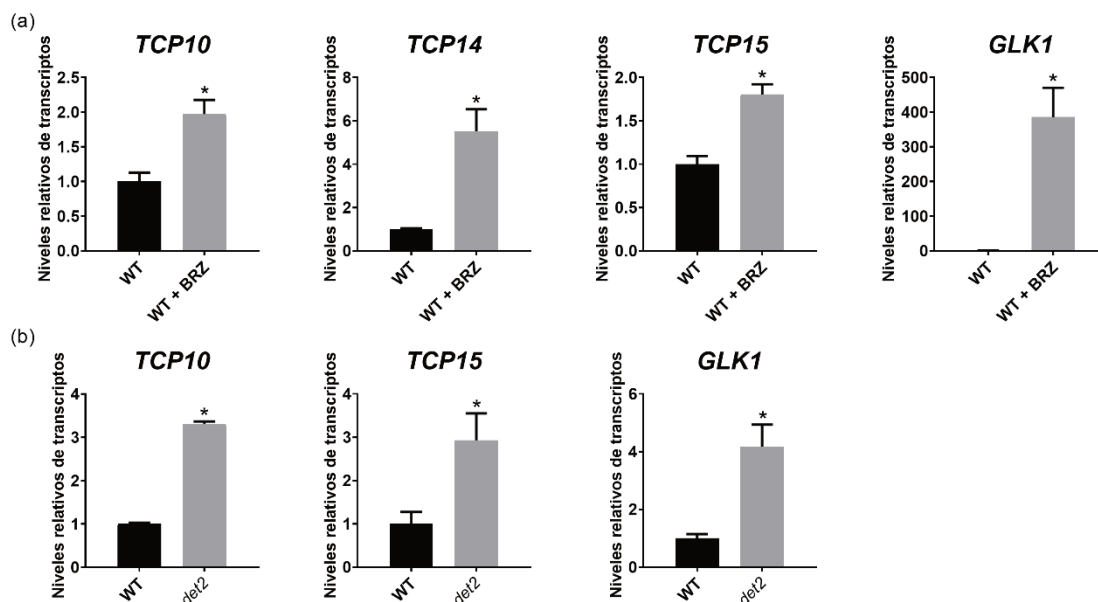


Figura 49: Análisis de la expresión de genes *TCP* y *GLK* en plantas con niveles reducidos de brasinoesteroides. **(a,b)** Análisis cuantitativo de los niveles de transcritos de los genes indicados en plántulas salvajes (WT) cultivadas en ausencia o presencia del inhibidor de síntesis de brasinoesteroides BRZ (a) y la mutante *det2-1* deficiente en brasinoesteroides (b) cultivadas 5 días en oscuridad. Los valores están relativizados a los de las plantas WT en condición control. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las plantas WT control ($p < 0,05$; prueba t de *Student*). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

BZR1 es un regulador transcripcional de respuesta a brasinoesteroides que inhibe la apertura de los cotiledones en oscuridad (Li et al., 2016; Sun et al., 2010). Así, las mutantes de ganancia de función *bzr1-1D*, que expresan una versión de BZR1 insensible al inhibidor de biosíntesis de brasinoesteroides BRZ, mantienen los

cotiledones cerrados cuando son cultivadas en oscuridad en presencia de BRZ (Wang et al., 2002). Cuando analizamos plantas mutantes *bzr1-1D* cultivadas en presencia de BRZ observamos que la expresión de genes *SAUR* involucrados en la apertura y expansión de los cotiledones se encontraba reprimida, así como la expresión de genes asociados a la fotosíntesis (Figura 50a), lo cual está de acuerdo con su papel en la inhibición de la apertura y el desarrollo de los cotiledones en oscuridad (Li & He, 2016). Además, observamos una represión en la expresión de *GLK1/2* y de *TCP10* (Figura 50a) y encontramos que el aumento en la expresión de *TCP15* observado en presencia de BRZ fue abolido en las plántulas *pBZR1::bzr1-1D-CFP*, que expresan la versión de BZR1 insensible a BRZ fusionada a la proteína CFP bajo el control de su propio promotor (Figura 50b). Estos resultados sugieren que en plántulas etioladas la expresión de las proteínas TCP y GLK sería regulada negativamente a nivel transcripcional, en parte a través de BZR1.

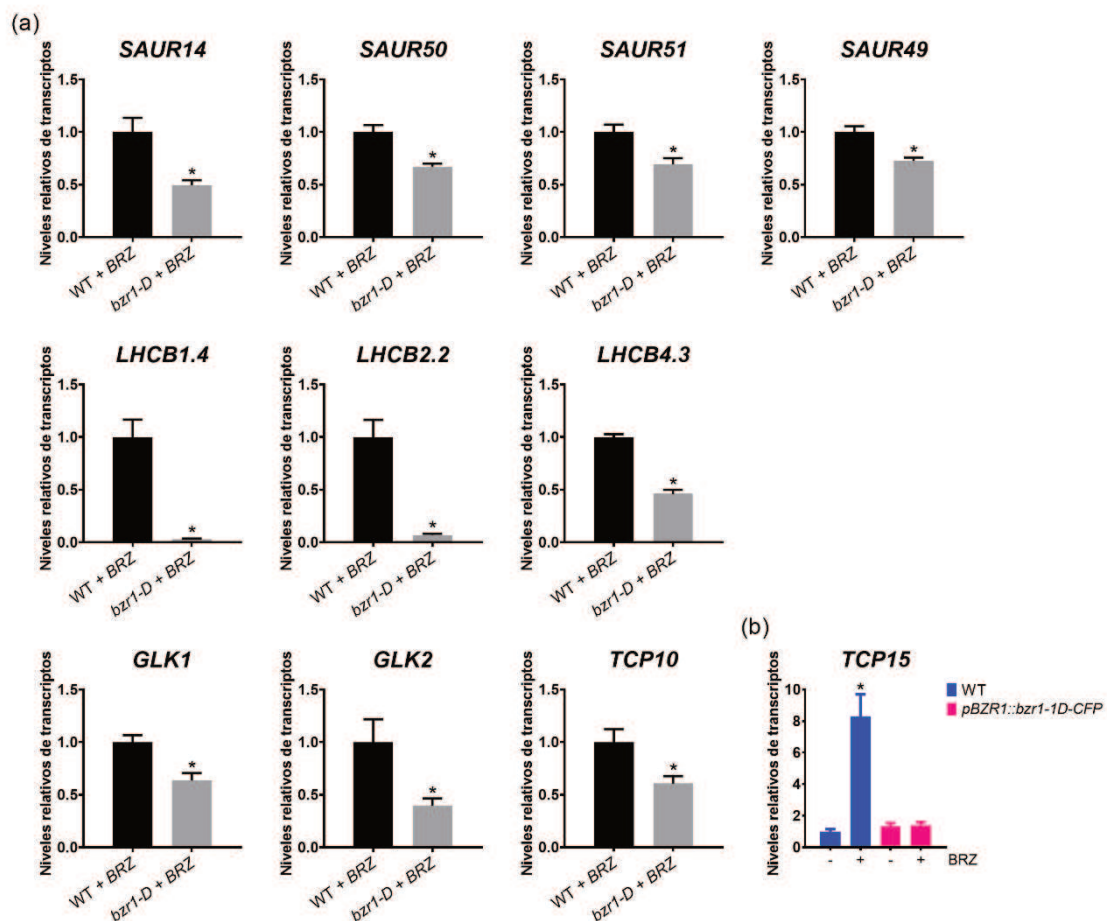


Figura 50: (a,b) Análisis de expresión génica en plantas mutantes *bzr1-1D* (a) y *pBZR1::bzr1-1D-CFP* (b) cultivadas en oscuridad durante 5 días en ausencia (-) o presencia (+) del inhibidor de síntesis de BR, BRZ. Los valores están relativizados a los de las plantas WT. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las plantas WT ($p < 0,05$; prueba t de Student). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

7.4.3. *BZR1 afecta la función de TCP15 en la apertura de los cotiledones*

Dado que nuestras evidencias indican que la vía de BR inhibe la expresión de genes *GLK* y *TCP*, decidimos explorar si el efecto del tratamiento con la hormona brasinoesteroide brasinólido (BL) sobre la apertura de cotiledones podría revertirse por la sobreexpresión de estos genes. Observamos que el agregado de BL al medio de cultivo produjo una reducción en el ángulo de apertura de los cotiledones de las plantas salvajes cultivadas en luz (Figura 51a), mientras que este efecto fue abolido, total o parcialmente, en plantas que sobreexpresan *GLK1* o *TCP15* (Figura 51a). Esto sugiere que el accionar de BR en la inhibición de la apertura de los cotiledones ocurre a través de la represión de la expresión de esos factores de transcripción. Sin embargo, mientras que las plantas que sobreexpresan *GLK1* fueron completamente insensibles al tratamiento con la hormona y presentaron cotiledones más abiertos que las plantas salvajes tanto en presencia como en ausencia de BL (Figura 51a), las plantas que sobreexpresan *TCP15* mostraron una sensibilidad parcial a BL (Figura 51a). Un efecto similar observamos durante la de-etiolación. En este caso, el retraso en la apertura de los cotiledones producido por BL fue recuperado por sobreexpresión de *TCP15* en las primeras horas de de-etiolación (4 h, Figura 51b), pero no a las 8 y 24 h donde, si bien las plantas *35S::TCP15* mostraron cotiledones más abiertos que las plantas salvajes en presencia de la hormona, el ángulo de apertura registrado fue significativamente inferior comparado con el observado en ausencia de BL (Figura 51b). Más aún, a las 24 h dicho ángulo fue significativamente menor al de las plantas salvajes en ausencia de BL. En conjunto, esto evidencia que la vía de BR modularía el accionar de *TCP15* a niveles adicionales al control transcripcional para inhibir la apertura de cotiledones.

Para profundizar el estudio de cómo *TCP15* se integra con la vía de brasinoesteroides, obtuvimos plantas que sobreexpresan *TCP15* en el fondo genético *bzr1-1D*, mediante la realización de cruza genéticas entre las líneas *pBZR1::bzr1-1D-CFP* y *35S::TCP15*, y analizamos el fenotipo de cotiledones de estas líneas en oscuridad en ausencia o presencia del inhibidor BRZ. Las plántulas *pBZR1::bzr1-1D-CFP* presentaron cotiledones más cerrados que las plantas salvajes tanto en ausencia como en presencia del inhibidor BRZ (Figura 52), en concordancia con la insensibilidad reportada de *BZR1-1D* a la reducción en los niveles de BR causado por BRZ (Wang et al., 2002). Por otra parte, observamos que el fenotipo de cotiledones más abiertos de las plantas que sobreexpresan *TCP15* fue anulado en el fondo *BZR1-1D* (Figura 52), lo que indica que *TCP15* fue incapaz de inducir la apertura de los cotiledones en presencia de *BZR1*. Dado que los niveles de transcritto de *TCP15* fueron similares en las plantas *35S::TCP15* y *35S::TCP15 pBZR1::bzr1-1D-CFP* (Figura 53), estos resultados sugieren

que BZR1 modularía postraduccionalmente a TCP15. En apoyo a esta idea, observamos que el fenotipo de cotiledones abiertos en oscuridad que genera la sobreexpresión de TCP15 fue significativamente mayor en presencia del inhibidor de síntesis de BR (Figura 52), sugiriendo que una reducción en los niveles de brasinoesteroides incrementaría la actividad o estabilidad de TCP15. Este efecto fue menor en presencia de BZR1-1D, ya que las plántulas *35S::TCP15 pBZR1::bZR1-1D-CFP* presentaron cotiledones con un ángulo de apertura similar al de las plantas *35S::TCP15* cultivadas en ausencia de BRZ (Figura 52). En conjunto, estos resultados indican que el factor de transcripción BZR1 afectaría la función de TCP15 en la apertura de cotiledones, no solo a través de una represión transcripcional, sino a través de una modulación a nivel postraduccional controlando la acumulación o actividad de TCP15

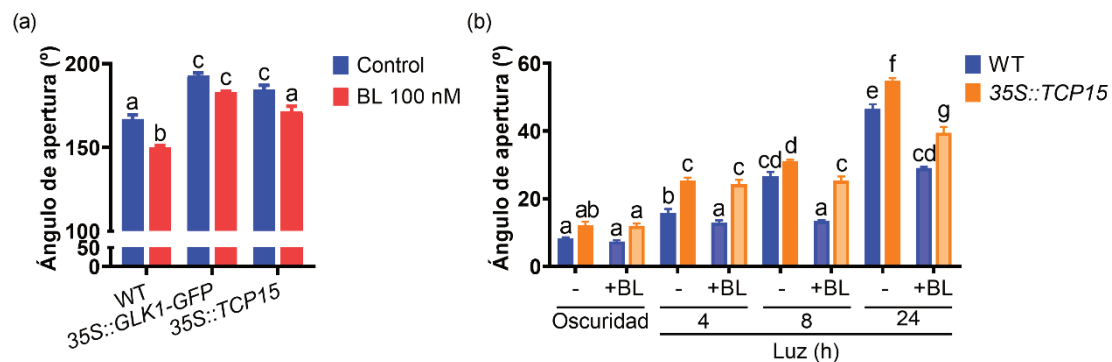


Figura 51: Análisis del fenotipo de apertura de cotiledones de plántulas tratadas con la hormona brasinoesteroide Brasinolido (BL). **(a)** Ángulo de apertura de cotiledones de plántulas salvajes (WT), *35S::GLK1-GFP* (*35S::GLK1*) y *35S::TCP15-RFP* (*35S::TCP15*) cultivadas 3 días en condiciones normales de iluminación con el agregado de DMSO (control, en azul) o BL 100 nM (en rojo). **(b)** Ángulo de apertura de cotiledones de plántulas salvajes (WT, en azul) y *35S::TCP15-RFP* (*35S::TCP15*, en naranja) cultivadas en presencia (+) o ausencia (-) de BL durante 48 h en oscuridad y transferidas a luz roja ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante los tiempos indicados. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas con 30 plántulas cada una. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; análisis de la varianza). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

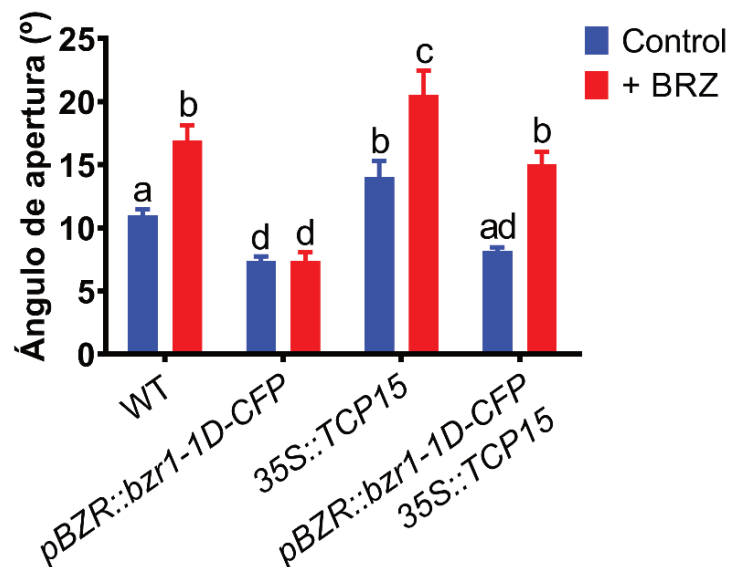


Figura 52: Ángulo de apertura de cotiledones de plántulas salvajes (WT), *pBZR1::bzip1-1D-CFP*, *35S::TCP15* y *pBZR1::bzip1-1D-CFP 35S::TCP15* cultivadas en oscuridad durante 5 días con el agregado de DMSO (control, en azul) o BRZ (+BRZ, en rojo). Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas con 30 plántulas cada una. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; análisis de la varianza). El ensayo se repitió tres veces con resultados similares.

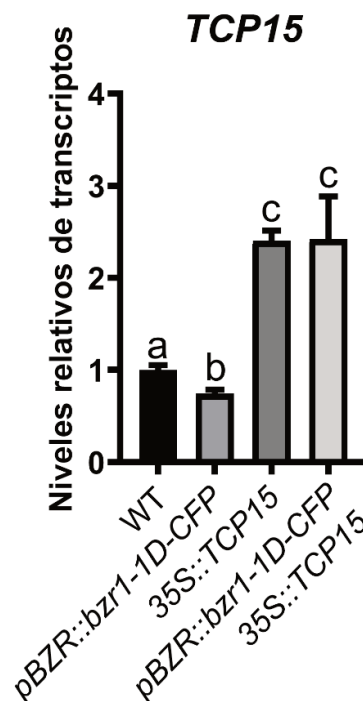


Figura 53: Análisis cuantitativo de los niveles de transcritos de *TCP15* en plántulas salvajes (WT), *pBZR1::bzip1-1D-CFP*, *35S::TCP15* y *pBZR1::bzip1-1D-CFP 35S::TCP15* cultivadas en oscuridad durante 5 días. Los valores están relativizados a los de las plantas WT. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Las letras indican diferencias significativas en comparación con las plantas WT control ($p < 0,05$; análisis de la varianza). El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

7.4.4. TCP15 interactúa con BZR1 *in vivo* en plantas

El factor de transcripción BZR1 actúa formando homodímeros y/o heterodímeros para modular la expresión de sus genes blanco y mediar la interconexión con otras vías moleculares (Bai et al., 2012; Li & He, 2016; Oh et al., 2012; Ravindran et al., 2021). Por ejemplo, se han descrito interacciones proteicas entre BZR1 y PIF4 (Oh et al., 2012), BZR1 y PIF3 (Oh et al., 2012) y BZR1-BBX32 (Ravindran et al., 2021), que modulan la expresión de diversos genes durante la escotomorfogénesis, entre ellos los genes *GLK* (Oh et al., 2012). Además, se ha reportado que HY5, regulador positivo central de la fotomorfogénesis, afectaría la vía de BR inhibiendo la acumulación de BZR1 a través de interacciones proteína-proteína (Li & He, 2016). Por lo que nos preguntamos si la regulación postraduccional de TCP15 por parte de BZR1 estaría mediada por interacciones proteína-proteína. Para responder este interrogante analizamos en primer lugar si estos factores de transcripción son capaces de interactuar físicamente entre sí. BZR1 contiene el dominio de unión al ADN en la región N-terminal (residuos 1-109) y el dominio de actividad transcripcional en la región C-terminal (residuos 110–336) (Oh et al., 2012). En ensayos de doble híbrido en levaduras realizados en nuestro laboratorio se observó que la expresión de BZR1 completa fusionada al dominio de unión al ADN de GAL4 (BD) genera una alta autoactivación del gen reportero. Por lo que, para analizar la posible interacción entre TCP15 y BZR1 realizamos un ensayo de doble híbrido en levaduras enfrentando TCP15 fusionada al dominio de activación de GAL4 (TCP15-AD) a dos porciones diferentes de BZR1, BZR1_N que contiene la región N-terminal e incluye al dominio de unión al ADN (residuos 1-109 pb), y BZR1_C que contiene la región C-terminal (residuos 110–336), fusionadas al dominio BD de GAL4 (Figura 54a; Sección 6.14). Observamos que la co-expresión de BZR1_C-BD y TCP15-AD generó una activación del gen reportero siete veces mayor en comparación con la autoactivación producida por la construcción BZR1_C-BD (Figura 54b), mientras que no se observó actividad del gen reportero cuando se co-expresó TCP15-AD y la porción C-terminal de BZR1, BZR1_C-BD (Figura 54b). Esto indica que TCP15 fue capaz de interactuar con BZR1 *in vivo* en levaduras, específicamente con la región C-terminal de la proteína.

A continuación, evaluamos si la interacción TCP15-BZR1 ocurre *in vivo* en plantas mediante ensayos de BiFC. Para ello, se transformaron de forma transitoria hojas de *N. benthamiana* con construcciones que permiten expresar las proteínas TCP15 o BZR1_C fusionadas a fragmentos no-fluorescentes de mCitrina. Observamos restablecimiento de la fluorescencia de mCitrina en los núcleos de las células cuando se co-expresaron TCP15 y BZR1_C (Figura 54c), mientras que no se detectó señal de fluorescencia cuando estas proteínas en estudio se co-expresaron con el factor de transcripción HaHB11,

usado como control negativo (Figura 54c). Además, observamos señal de fluorescencia cuando se co-expresó BZR1_c fusionada al dominio N-terminal y C-terminal de mCitrina, indicando que esta proteína es capaz de formar homodímeros a través de su porción C-terminal (Figura 54c). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia producida por las distintas construcciones confirmó que la señal observada tras la co-expresión de TCP15 y BZR1_c fue significativamente mayor a la de los controles negativos correspondientes (Figura 54d), lo que indica que TCP15 y la porción C-terminal de BZR1 interactúan físicamente entre sí en el núcleo de las células vegetales.

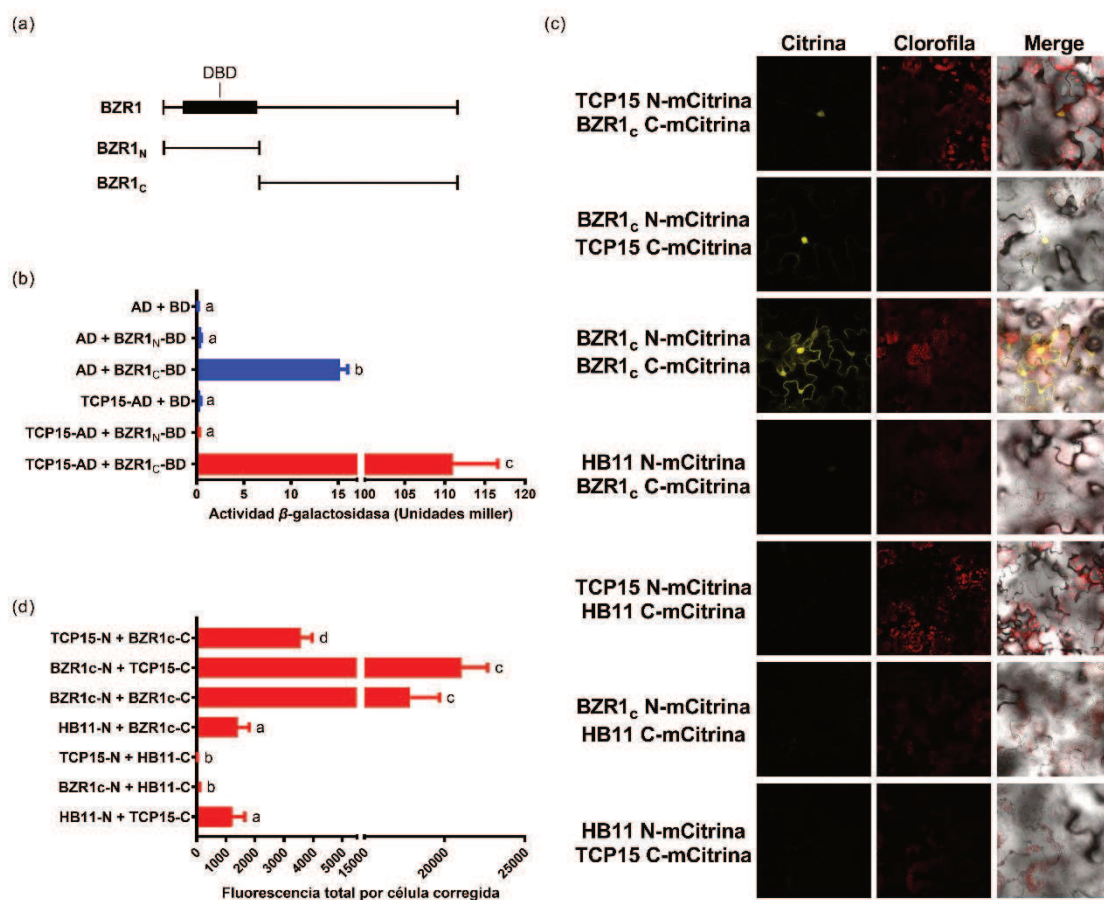


Figura 54: TCP15 y BZR1 interactúan entre sí *in vivo*. **(a,b)** Ensayos de interacción proteína-proteína entre TCP15 completa y los fragmentos de BZR1 que contienen los residuos 1 a 109 (BZR1_N) y 110-336 (BZR1_c) mediante doble híbrido en levaduras. Las porciones de BZR1 ensayadas están esquematizadas en (a). En (b) se muestran los valores promedio de actividad β -galactosidasa obtenidos a partir de tres ensayos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas con respecto al control AD + BD ($p < 0,05$; análisis de la varianza). **(c,d)** Ensayo de la interacción entre TCP15 y BZR1_c por Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC). Hojas de *Nicotiana benthamiana* fueron co-infiltradas con las construcciones indicadas y luego de 3 días, se analizó la fluorescencia de la mCitrina mediante microscopía confocal. En (c), los paneles de la derecha muestran imágenes combinadas de fluorescencia de mCitrina, fluorescencia de clorofila y luz transmitida. Las imágenes mostradas son representativas de 50 imágenes analizadas en cinco a seis hojas diferentes. En (d), análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia de mCitrina. La intensidad de la fluorescencia fue medida en 40-50 imágenes por construcción utilizando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Las barras indican el promedio \pm SEM y letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$; análisis de varianza).

7.4.5. BZR1 modula negativamente la actividad transcripcional de TCP15

Con el fin de dilucidar el significado funcional de la interacción proteica observada entre TCP15 y BZR1, decidimos evaluar el efecto de BZR1 sobre la actividad transcripcional de TCP15. Para llevar a cabo este análisis, elegimos a *SAUR14*, dado que es blanco directo de TCP15 (Figura 30c) y sería reprimido transcripcionalmente por BZR1 (mutante *bzr1-1D*, Figura 50a). Además, observamos que el incremento en los niveles de transcritos de *SAUR14* que presentan las plantas salvajes cultivadas en presencia del inhibidor BRZ no se observa en las mutantes *tcp14-4 tcp15-3* (Figura 55), lo que sugiere que los brasinoesteroides afectarían la expresión de *SAUR14* a través de *TCP15* y *TCP14*.

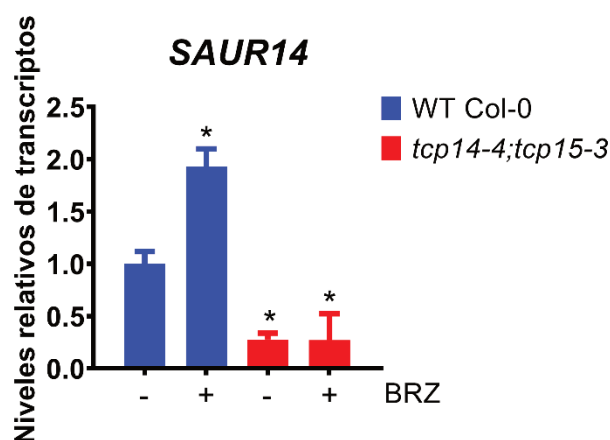


Figura 55: Análisis de los niveles de transcritos de *SAUR14* en plántulas salvajes (WT, en azul) y *tcp14-4 tcp15-3* (en rojo) cultivadas en oscuridad durante 5 días en ausencia (-) o presencia (+) del inhibidor de síntesis de BR, BRZ. Los valores están relativizados a los de las plantas WT en condición control. Las barras indican la media ± SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las plantas WT control ($p < 0,05$; prueba t de *Student*). Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares

Para analizar la actividad transcripcional de TCP15, utilizamos la construcción que contiene la secuencia codificante del gen reportero *LUCIFERASA* (*LUC*) corriente abajo de la región promotora de *SAUR14*, *pSAUR14::LUC* (Figura 56), en un ensayo de transformación transitoria de hojas de *N. benthamiana*. De modo similar a lo observado en experimentos anteriores, el promotor de *SAUR14* fue activado en forma significativa por la expresión de TCP15 (Figura 56). Sin embargo, al co-transfor las plantas con la construcción que permite expresar BZR1 (ya sea completa o el fragmento BZR1_c) este efecto inductor de TCP15 se vio suprimido en gran medida (Figura 56). Esto sugiere que BZR1 podría actuar inhibiendo la actividad transcripcional de TCP15 mediante la formación de complejos proteicos TCP15-BZR1.

En base a los resultados presentados en esta sección postulamos que la vía de hormonas brasinoesteroides reprimiría la apertura de los cotiledones en oscuridad a través de inhibir la expresión a nivel transcripcional de los genes promotores de este proceso *TCP* y *GLK*. Además, en el caso de *TCP15* existiría un nivel de control adicional, dado por una inhibición de la actividad transcripcional, probablemente a través de la formación de complejos *TCP15-BZR1*. Esta idea cobra sentido si consideramos que *TCP15* se expresa en cotiledones en oscuridad, condiciones en las que la apertura y el desarrollo de los cotiledones deben ser reprimidos.

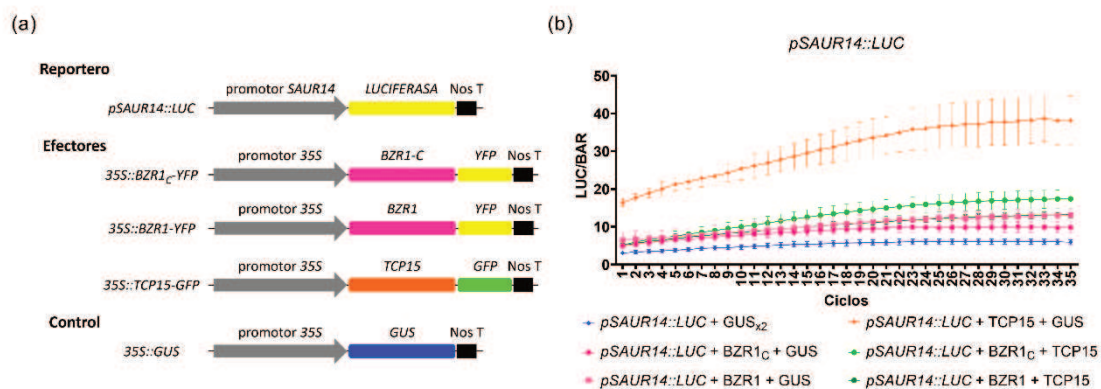


Figura 56: Análisis de la actividad transcripcional de *TCP15* *in vivo* en presencia de *BZR1*. **(a)** Esquema de las construcciones (reportero, efectores y control) utilizadas en ensayos de expresión transitoria. **(b)** Hojas de *N. benthamiana* fueron co-infiltradas con el reportero *pSAUR14::LUC* y las construcciones *35S::GUS* (*GUS*, control negativo), *35S::TCP15* (*TCP15*), *35S::BZR1* (*BZR1*) y *35S::BZR1_c* (*BZR1_c*). La actividad luciferasa fue detectada por luminiscencia y los valores fueron relativizados a la expresión del gen de resistencia a *BASTA* presente en el mismo vector (*BAR*). Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

DISCUSIÓN

8. DISCUSIÓN

8.1. Estudio de la interacción entre las proteínas TCP y el factor de transcripción GLK1 de *Arabidopsis thaliana*

Un gran número de estudios ha revelado que las interacciones proteína-proteína entre miembros de diferentes familias de FT desempeñan papeles cruciales en la regulación de vías metabólicas o de desarrollo a nivel transcripcional (Bemer et al., 2017). La familia TCP contiene 24 miembros en *Arabidopsis thaliana*, muchos de los cuales han demostrado interactuar con FT de otras familias (Bemer et al., 2017; Carrara & Dornelas, 2021), posiblemente como medio para integrarse en diferentes redes reguladoras. Una búsqueda de FT capaces de interactuar con TCP de clase I de *Arabidopsis* nos llevó a la identificación de GLK1, un FT de la familia GARP (Fitter et al., 2002), como interactador de varias TCP de clase I. Aunque las proteínas TCP han sido implicadas en varios procesos de desarrollo vegetal (Nicolas & Cubas, 2016; Uberti Manassero et al., 2013), hasta ahora no se habían relacionado funcionalmente con un FT de la familia GARP.

Por un lado, nuestros ensayos indican que la región C-terminal de GLK1, que contiene el dominio conservado GCT, es responsable de la interacción con TCP15 y probablemente con otras TCP de clase I. El dominio GCT es específico de los miembros GLK de la familia GARP (Rossini et al., 2001; Tamai et al., 2002), lo que sugiere que sólo GLK1 y la relacionada GLK2, que no analizamos en este estudio, participan en la interacción con las proteínas TCP. Estudios anteriores indicaron que el dominio GCT de las proteínas GLK de maíz (*Zea mays*) es necesario para la homo y heterodimerización (Rossini et al., 2001), y se ha reportado que GLK1 y GLK2 de *Arabidopsis* también interactúan con la proteína de virulencia P69 del virus de mosaico amarillo de nabo, así como con SIGMA FACTOR BINDING PROTEIN1 (SIB1) y LESION SIMULATING DISEASE 1 (LSD1), dos co-reguladores transcripcionales, a través del dominio GCT (Mengping Li et al., 2021; Lv et al., 2019; F. Ni et al., 2017). Estos informes y nuestros hallazgos sugieren que el dominio conservado GCT de las proteínas GLK tiene un papel relevante en la formación de complejos proteína-proteína.

8.2. Estudios del rol de los factores de transcripción TCP de clase I y GLK1 durante la de-etiolación en *Arabidopsis thaliana*

Las interacciones proteína-proteína pueden tener efectos sinérgicos o antagónicos sobre la actividad de los FT. En este estudio, encontramos que la interacción TCP15-

GLK1 muy probablemente tiene un efecto sinérgico sobre la acción de estas proteínas durante la de-etiolación. Plantas mutantes simples y dobles en *TCP14* y *TCP15* mostraron un retraso en la apertura y expansión de los cotiledones, mientras que se observó lo contrario en las plantas que sobreexpresan *TCP15*. A su vez, se observaron cambios en la expresión de un grupo de genes *SAUR* implicados en la expansión celular, como *SAUR6*, *SAUR14*, *SAUR50*, *SAUR51* y *SAUR63*, en plantas deficientes en *TCP*. Además, se observaron defectos en la expresión de genes *EXPANSINAS* y *LHCB*, relacionados con la fotosíntesis, los cuales son inducidos durante el establecimiento del crecimiento autótrofo de las plantas. La mayoría de estos genes también presentaron su expresión alterada en plantas deficientes en *GLK1*, lo que indica que este FT actúa sobre un grupo de genes similar al de *TCP15* durante la de-etiolación y que modula genes de expansión celular, además de su rol reportado en la regulación de genes relacionados con la fotosíntesis. Por otro lado, las plantas que sobreexpresan *TCP15* sólo presentaron inducción de tres de los genes analizados (*SAUR63*, *EXPB1* y *LHCB2.2*). El aumento de la expresión de *SAUR63* y *EXPB1*, junto con otros genes no analizados en este estudio, podría ser responsable de la mayor apertura de cotiledones observada en estas plantas.

Al analizar el fenotipo de plantas mutantes dobles *tcp15 glk1* y plántulas que sobreexpresan uno de los FT en el fondo mutante del otro, encontramos que *TCP15* y *GLK1* no sólo participan en la misma vía genética durante la apertura de cotiledones, sino que también se necesitan mutuamente para ejercer su acción. Además, la inducción de la expresión de los genes *SAUR* y del gen *EXPB1* fue más pronunciada tras la sobreexpresión de ambos FT, evidenciando un efecto cooperativo de *TCP15* y *GLK1* a nivel transcripcional.

Se puede especular que este efecto cooperativo está relacionado con la existencia de interacciones proteína-proteína entre ambos factores de transcripción. Hasta aquí, tres posibles mecanismos podrían ser contemplados: (1) el complejo *TCP15-GLK1* puede unirse tanto a sitios de unión de *TCP* como de *GLK* presentes en los promotores génicos; (2) el complejo *TCP15-GLK1* puede interactuar con sitios de unión de sólo una de las dos proteínas, dependiendo del gen, mientras que el otro FT es reclutado por interacciones proteína-proteína; (3) el complejo *TCP15-GLK1* puede tener una especificidad de unión al ADN diferente a la de las proteínas individuales. Hemos observado que la mayoría de los genes cuya expresión se ve afectada por ambos FT contienen sitios de unión putativos para sólo uno de ellos en sus regiones promotoras. Además, un estudio de las regiones corriente arriba de genes con expresión modificada en plantas que expresan una forma represora de *TCP15* (Lucero et al., 2015) y en

plantas mutantes *glk1 glk2* (Ni et al., 2017) no reveló un enriquecimiento significativo de genes con ambas cajas de unión. Esto sugiere que la unión específica de un FT sería suficiente para reclutar al otro FT al promotor (mecanismo 2). No se puede descartar que esto vaya acompañado de una especificidad relajada, que permita al FT reclutado interactuar con sitios de unión no canónicos en el promotor (mecanismo 3). Por último, también es posible la presencia de sitios divergentes, pero aún funcionales, para ambas proteínas en determinados genes (mecanismo 1). En consonancia con los mecanismos propuestos, los ensayos ChIP-qPCR indicaron que ambas proteínas se unen a regiones promotoras de genes que contienen cajas reconocidas por TCP o GLK1 y que la unión de TCP15 es menos eficiente en un fondo mutante *glk1*.

La iluminación causa efectos opuestos en diferentes órganos durante el desarrollo de las plántulas, ya que reprime el crecimiento del hipocótilo mientras que estimula la apertura, expansión y verdeo de los cotiledones (Gommers & Monte, 2018). Diferentes órganos utilizan diferentes redes regulatorias para mediar las respuestas a la luz (Gommers & Monte, 2018), pero los mecanismos moleculares que vinculan estas señales con las respuestas de desarrollo no se han dilucidado completamente. La mayoría de los reguladores positivos del crecimiento en un órgano son reguladores negativos en el otro. Por ejemplo, los factores de transcripción PIF son reguladores negativos de la fotomorfogénesis que estimulan el crecimiento del hipocótilo e inhiben la apertura, expansión y verdeo de los cotiledones en la oscuridad (Leivar et al., 2008). Previamente, en nuestro laboratorio se ha reportado que TCP15 estimula el crecimiento del hipocótilo en respuesta a un aumento de la temperatura ambiente estableciendo interacciones proteína-proteína con PIF4 (Ferrero et al., 2019). En este trabajo, encontramos que TCP15 también estimula la apertura y expansión de los cotiledones frente a la iluminación. Esto indica que TCP15, y probablemente otras TCP de clase I, actúan como reguladores positivos del crecimiento en ambos órganos.

Nuestros resultados también indican que TCP15 modula los procesos de crecimiento a través de la regulación de la expresión de un grupo de genes implicados en la elongación celular como son los genes *SAUR* y *EXPANSINA* y que la modulación de la actividad de las proteínas TCP en diferentes órganos y bajo diferentes condiciones se debe a la interacción con diferentes interactores proteicos. En respuesta a un aumento de la temperatura ambiente, por ejemplo, aumentan los niveles de PIF4 (Sun et al., 2012) y la interacción de TCP15 con PIF4 podría permitir la inducción de genes que estimulan la elongación del hipocótilo (Ferrero et al., 2019). Tras la iluminación, PIF4 y otros PIF se degradan y se induce la expresión de *GLK1* (Martin et al., 2016; W. Ni et al., 2014).

La interacción de TCP15 con GLK1 podría permitir una unión eficiente a los promotores de genes que inducen la apertura y expansión de los cotiledones (*lirSAUR*, *EXPANSINA*) y de ciertos genes relacionados con fotosíntesis (*LHCB*) (Figura 57). De este modo, factores promotores del crecimiento como TCP15 (y posiblemente otros TCP de clase I) se dirigirían a los promotores de diferentes genes para estimular el crecimiento en diferentes órganos en respuesta a cambios en las condiciones ambientales. La interacción funcional TCP15-GLK1 aquí descrita también podría ser importante para coordinar el crecimiento de los cotiledones con el desarrollo de la capacidad fotosintética de las plántulas mediante la modulación combinada de los genes de expansión celular y de fotosíntesis.

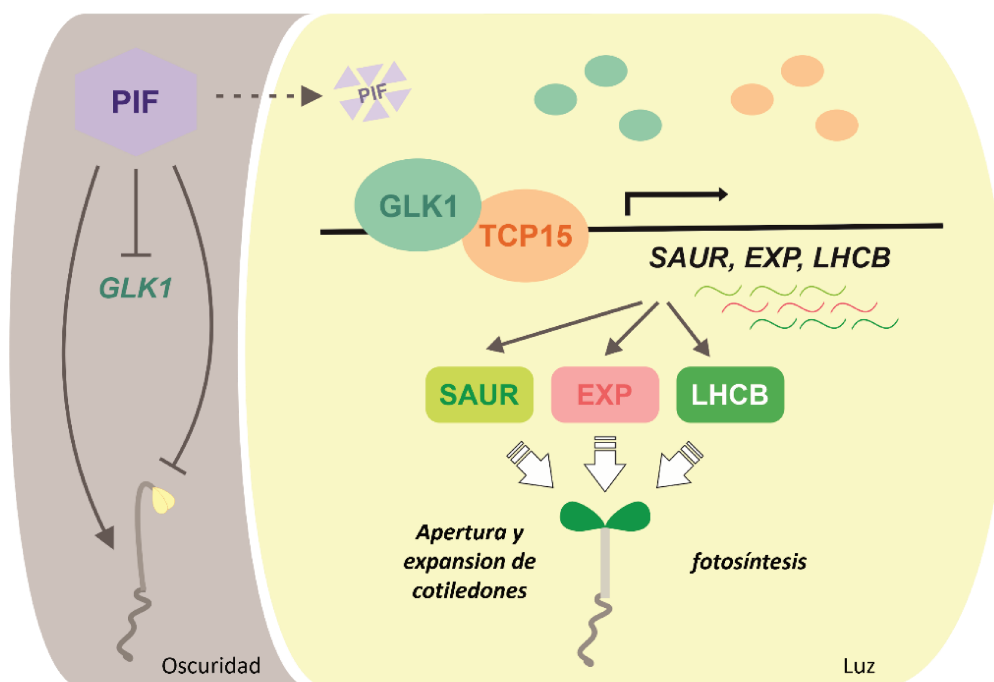


Figura 57: TCP15 y GLK1 actúan de forma interdependiente para promover el desarrollo de los cotiledones durante la de-etiolación en *Arabidopsis*. Durante el desarrollo escotomorfogénico en oscuridad (gris), los factores de transcripción PIF promueven la elongación del hipocótilo a la vez que inhiben la apertura, expansión y desarrollo de cloroplastos de los cotiledones mediante la represión de numerosos genes, entre ellos *GLK1*. Tras la iluminación (amarillo), los FT PIF se degradan y se induce la expresión de *GLK1*. En este escenario, TCP15 y GLK1 son reclutados en los promotores de genes *SAUR*, *EXPANSINA* y genes relacionados con la fotosíntesis, *LHCB*, activando así su expresión durante el desarrollo fotomorfogénico de los cotiledones. *Adaptado de Alem et al., 2022.* (Alem et al., 2022)

8.3. Estudios del rol de los factores de transcripción TCP de clase II durante la de-etiolación en *Arabidopsis thaliana*

Como se describió en la sección 8.1, los miembros de la subfamilia de proteínas TCP de clase II no son capaces de interactuar con el factor de transcripción GLK1 en ensayos de doble híbrido en levaduras, y la formación del complejo regulador TCP-

GLK1 sería específico para proteínas de la clase I. Sin embargo, se ha reportado que miembros del clado CIN de la clase II podrían regular de forma indirecta ciertos genes relacionados con fotosíntesis (Bresso et al., 2018) y que algunos miembros CIN, como TCP4, han sido involucrados en el proceso de fotomorfogénesis como inductores de la apertura de cotiledones en plántulas de *Arabidopsis* (Dong et al., 2019). Esto sugiere que los miembros de la clase II de la familia TCP podrían tener una relación funcional con los factores de transcripción GLK, pero se daría a través de mecanismos diferentes a los propuestos en este trabajo para los miembros de la clase I.

En nuestro estudio encontramos que *TCP10*, miembro del clado CIN de la clase II de la familia TCP, se expresa fuertemente en las plántulas cultivadas en luz en comparación con plántulas etioladas. Durante la transición de oscuridad a luz, vimos una considerable inducción de los niveles de transcritos de *TCP10*, similar a lo que ocurre con los genes *GLK*. En concordancia con este resultado, Dong y col., reportaron que la expresión de los genes *TCP* de clase II del clado CIN no responde significativamente a la luz, a excepción de *TCP10* que presentó un fuerte aumento de expresión 1 y 6 h luego de que las plántulas fueron transferidas a luz (Dong et al., 2019). Estos investigadores proponen un mecanismo de competencia por la unión a promotores de genes *SAUR16* y *SAUR50*, donde PIF3 interferiría con la unión de TCP4 a los promotores de estos genes en oscuridad (Dong et al., 2019). Esta inhibición de la actividad transcripcional de TCP4 se vería eliminada en luz, cuando la acumulación de PIF3 disminuye (Dong et al., 2019). Si bien este escenario probablemente se extienda a otros miembros del clado CIN, la regulación diferencial que ejerce la luz sobre la expresión de *TCP10* sugiere que podrían existir otros mecanismos que modulen el accionar de *TCP10* durante la de-etiolación.

Con el fin de responder a esta hipótesis, analizamos a nivel fenotípico y transcripcional plantas con niveles alterados de *TCP10*. Encontramos que plantas mutantes *tcp10-1* presentaron dificultades para abrir y expandir sus cotiledones, así como para expresar de forma óptima genes *SAUR*, *EXP* y *LHCB* requeridos para la fotomorfogénesis. De esta manera, *TCP10* estaría involucrado en la regulación de estos genes durante la transición de oscuridad a luz. Además, mediante el análisis de mutantes *tcp10-1 glk1-1* encontramos que *TCP10* participa en la misma vía molecular que *GLK1* durante la apertura de los cotiledones. El fenotipo de mayor ángulo apertura de cotiledones en luz y mayor velocidad de apertura durante la transición a luz, provocado por la sobreexpresión de *mTCP10*, se vio suprimido en un fondo mutante *GLK1*. Esto indica que *TCP10* actuaría corriente arriba de *GLK1* en la modulación de la apertura de los cotiledones. Curiosamente, también se observa un requerimiento de *TCP10* funcional

por parte de *GLK1*, pero esto es válido solo en las primeras horas de exposición a la luz.

El análisis de plantas con niveles alterados de *TCP10* mostró que *TCP10* regula de forma positiva la expresión de *GLK1* y *GLK2* y mediante ensayos de ChIP-qPCR observamos que esto se debería a una unión directa de *TCP10* a regiones del promotor de *estos genes* que contienen sitios de unión TCP. Además, el análisis de las plantas *35S::mTCP10-GFP glk1-1* a nivel transcripcional mostró que *TCP10* requiere de *GLK1* para inducir la expresión de genes de expansión celular (*EXP16*, *EXPB3*, *SAUR6*) y de fotosíntesis (*LHCB1.4*, *LHCB2.2*, *LHCB2.4*, *LHCB4.3*), pero no de algunos genes *SAUR*. Adicionalmente, *TCP10* fue capaz de inducir la actividad del gen reportero *LUC* bajo el control del promotor de *SAUR14*, pero no así cuando el gen reportero se encontraba corriente abajo del promotor de *LHCB2.2*. Dado que los promotores de los genes *EXP16*, *SAUR6* y *LHCB* contienen sitios de reconocimiento para *GLK1*, pero no para TCP, concluimos que *TCP10* regularía la expresión de genes involucrados en la expansión celular y genes asociados al establecimiento de la maquinaria fotosintética a través de regular la expresión de *GLK1*. A su vez, encontramos un bucle de regulación positiva en el cual el *GLK1* induce directamente la expresión de *TCP10*. La importancia de esta regulación durante la fotomorfogénesis de los cotiledones se evidencia por el requerimiento de *TCP10* durante las primeras horas de de-etiolación en las plantas que sobreexpresan *GLK1*. Este efecto sería reforzado a través de la inducción de *GLK2*, ya que los estudios fenotípicos y de expresión génica en plantas deficientes en *GLK2* mostraron que también está involucrado en la regulación de la apertura de los cotiledones durante la de-etiolación, aunque con un papel menos relevante que *GLK1*, y que *GLK2* es un blanco directo de *TCP10* y *GLK1*.

En conjunto, nuestros experimentos nos permiten plantear un modelo en el cual, ante la exposición a la luz, se induciría la expresión de *TCP10*, que a su vez activaría la expresión de los genes *GLK* para dar inicio al desarrollo fotomorfogénico de los cotiledones, activando a través de ellos la expresión de genes de expansión celular y de fotosíntesis. A su vez, *GLK1* induciría directamente la expresión de *GLK2* y *TCP10*. En este contexto, *TCP10* activaría directamente la expresión de sus genes blanco, como *SAURs*, mientras que *GLK1* en conjunto con *TCP15* inducirían la expresión de los genes de expansión celular y de fotosíntesis, coordinándose así la expresión de los genes involucrados en la apertura y desarrollo fotosintético de los cotiledones (Figura 58). Dado el papel que tienen los factores de transcripción CIN durante el desarrollo de las hojas (Bresso et al., 2018), este mecanismo de activación de la expresión de genes de expansión celular y fotosíntesis podría extenderse a estos órganos de la planta.

Durante la fotomorfogénesis, la señalización retrógrada de plástidos a núcleo juega un papel importante para el correcto desarrollo de los cotiledones a través del control de los niveles de GLK1 y en consecuencia de genes involucrados en la fotosíntesis (Hernández-verdeja et al., 2020; Martin et al., 2016). En este estudio encontramos que la activación de la señalización retrógrada, además de atenuar la actividad del aparato fotosintético (Kakizaki et al., 2009; Martin et al., 2016; Tokumaru et al., 2017), inhibe la apertura de los cotiledones a través de reprimir la expresión de *TCP10* y de genes de expansión celular *SAUR* y *EXP*. Dado que las plantas sobreexpresantes de *GLK1* presentan una desrepresión en la expresión de estos genes frente a lincomicina, la inhibición en la expresión de estos genes ocurriría en parte a través de una reducción en los niveles de GLK1.

Así, nuestros estudios señalan a *TCP10* como un nuevo componente de las vías de señalización retrógrada desde los cloroplastos al núcleo. Sin embargo, dado que las plantas sobreexpresantes de *TCP10* son tan sensibles a lincomicina como las plantas salvajes, tanto a nivel de la capacidad de apertura de los cotiledones como de la inducción de los genes involucrados en este proceso, una disfunción en los cloroplastos no solo contrarrestaría la inducción por luz de la expresión de *TCP10*, sino que también modularía su actividad. En efecto, observamos que los niveles de *TCP10* serían afectados mediante degradación vía proteasoma frente a la activación de la señalización retrógrada mediada por lincomicina. Esto es similar a lo reportado para *GLK1* (Tokumaru et al., 2017). Sin embargo, dado que a diferencia de las plantas *35S::mTCP10-GFP*, las plantas que sobreexpresan *GLK1* son completamente insensibles a lincomicina, puede postularse un escenario donde, frente a una activación de la señalización retrógrada, los niveles de *TCP10* presentes en el núcleo de las células serían disminuidos mediante degradación vía proteasoma, llevando a una reducción en la expresión de *GLK1* y los demás genes asociados a la apertura y desarrollo de los cotiledones, regulados en conjunto por *TCP10* y *GLK1*. Este efecto, a su vez, sería potenciado por una inhibición en la expresión a nivel transcripcional de *TCP10* y una reducción en los niveles de la proteína *GLK1*. Estos resultados posicionan a *TCP10* como un elemento clave en la transducción de las señales emitidas por los plástidos al núcleo.

De esta manera, hemos descrito cómo las proteínas de la familia *TCP* de clase I y clase II convergen en el accionar de los FT *GLK*, actuando a través de diferentes mecanismos moleculares que involucran interacciones proteína-proteína (*TCP* de clase I) y regulaciones transcripcionales (*TCP* de clase II) para promover el desarrollo eficiente de los cotiledones durante la de-etiolación. Adicionalmente, encontramos que *TCP10* sería un componente clave de las redes de comunicación entre cloroplastos y núcleo durante

el desarrollo de las plántulas, permitiendo atenuar el desarrollo fotomorfogénico frente a condiciones adversas en los cloroplastos.

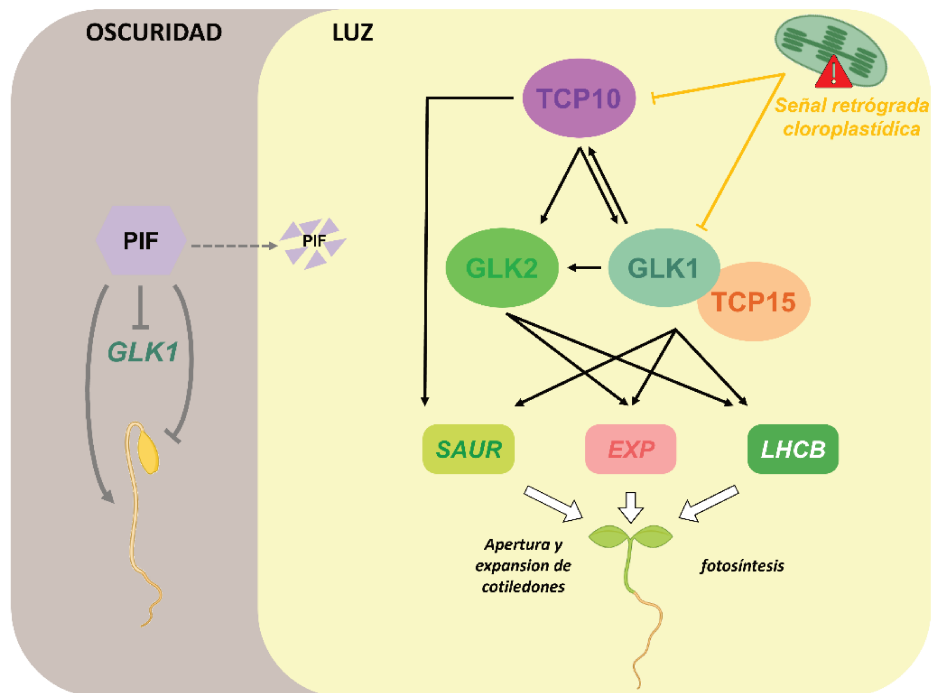


Figura 58: Modelo de acción de los factores de transcripción TCP durante la de-etiolación de las plántulas. Frente a la iluminación, el aumento en los niveles de TCP10 induce la expresión de los genes *GLK* y, a través de ellos, la expresión de genes de fotosíntesis y expansión celular, mientras que TCP10 regula directamente la expresión de genes *SAUR* para promover la apertura y la expansión de los cotiledones durante la de-etiolación de las plántulas. A su vez, *GLK1* promueve la expresión de *GLK2* y *TCP10*, generando un bucle positivo de regulación transcripcional. Una activación de la señalización retrógrada desde los cloroplastos antagoniza los efectos de la luz durante la de-etiolación a diferentes niveles: a través de la degradación proteica de *TCP10*, de la inhibición de la inducción de su expresión por la luz y del control de los niveles de *GLK1*.

8.4. Estudios de la relación entre los factores de transcripción TCP y la vía hormonal de brasinoesteroides durante la de-etiolación en *Arabidopsis thaliana*

La de-etiolación consiste en una reprogramación transcripcional que involucra cambios morfológicos necesarios para el cambio de un desarrollo escotomorfogénico a uno fotomorfogénico. Esto ocurre gracias a la interconexión de múltiples vías moleculares de señalización, entre ellas numerosas vías hormonales (Cackett et al., 2021; Lymperopoulos et al., 2018). Los brasinoesteroides (BR) han sido estudiados como reguladores negativos de la de-etiolación, actuando de forma antagónica con las vías señalizadas por luz y manteniendo el desarrollo escotomorfogénico durante un crecimiento en oscuridad (Li & He, 2016; Wang et al., 2012). Además, BR regula la actividad de *GLK1* en oscuridad para inhibir el desarrollo de los cloroplastos,

reprimiendo su expresión a través de BES1 (Yu et al., 2011) e induciendo su degradación mediante desfosforilación (Zhang et al., 2021). Considerando también que algunos genes *TCP* se encuentran reprimidos por BR en datos de expresión global analizados de la bibliografía, nos preguntamos si esta hormona regularía el desarrollo de los cotiledones a través de la modulación de la expresión o actividad de las proteínas TCP, generando una nueva interconexión entre las vías en estudio para regular finamente la de-etiolación. Nuestros experimentos indican que los genes *TCP* de clase I *TCP14* y *TCP15* y el gen *TCP10* de clase II son requeridos en forma funcional para la inducción de la apertura de cotiledones frente a una disminución en los niveles de BR, causada por agregado del inhibidor BRZ o por una mutación en un gen de síntesis de la hormona (*DET2*). Esto indica que BR regula de forma negativa la expresión, la estabilidad proteica o la actividad transcripcional de los FT TCP. En efecto, la inhibición de la vía de señalización por BR en oscuridad, por agregado de BRZ o mediante la mutación *det2*, generó un aumento de la expresión a nivel transcripcional de *TCP10*, *TCP14* y *TCP15*. Esto sugiere que BR mantendría el fenotipo etiolado de las plantas en oscuridad inhibiendo la expresión de los FT promotores de la fotomorfogénesis TCP y GLK1. La represión de la expresión de los genes *TCP* en plantas que expresan la mutante de BZR1 insensible a la inactivación, BZR1-1D, indica que la regulación negativa que ejerce la vía de BR sobre la expresión de los genes *TCP* ocurre a través de BZR1. Resta dilucidar a futuro si ésta sería una regulación directa o indirecta. En este sentido, observamos la presencia de sitios de reconocimiento putativos de BZR1 en la región promotora de *TCP15*: un elemento de respuesta a BR reportado como la secuencia de ADN óptima para la unión de BZR1 (BRRE, CGTG^T/cG, He et al., 2005), la caja E (CANNTG) donde BZR1 se uniría posiblemente como heterodímero (Wang et al., 2012), y la caja G, CACGTG (Wang et al., 2012).

Nuestros estudios indican que la sobreexpresión de *TCP15* permite contrarrestar el efecto de la hormona BR brasinólido (BL) sobre la apertura de cotiledones, consistente con la idea de que la vía de acción de BR en este proceso involucra una reducción de la expresión de *TCP15*. Sin embargo, la capacidad de *TCP15* para inducir la apertura de los cotiledones durante el crecimiento en luz, y también durante la transición de oscuridad a luz, fue afectada en cierta medida por la hormona BL. A su vez, la sobreexpresión de *TCP15* no fue suficiente para rescatar el fenotipo de plantas que expresan la versión *BZR1-1D* en presencia del inhibidor BRZ, indicando la presencia de mecanismos adicionales a la regulación transcripcional. En efecto, la mayor apertura de cotiledones provocada por la sobreexpresión de *TCP15* se anula en presencia de *BZR1-1D*. En concordancia con esto, encontramos que *TCP15* interacciona físicamente con

BZR1, particularmente con la región C-terminal de la proteína. Por otro lado, en ensayos transitorios en plantas de *N. benthamiana* observamos que el promotor de *SAUR14*, blanco directo de TCP15, dejó de ser activado por TCP15 en presencia de BZR1. Esto indicaría que la formación del complejo TCP15-BZR1 impide la unión de TCP15 a los promotores de sus genes blanco, como *SAUR14*, inhibiendo así la actividad transcripcional de TCP15. Sin embargo, si la formación de los complejos TCP15-BZR1 impide la unión eficiente al ADN de TCP15 o su actividad transcripcional, queda aún por dilucidar.

Según nuestros estudios TCP15 actúa como un regulador positivo de la apertura de cotiledones y se ha reportado que promueve la elongación del hipocotilo frente a alta temperatura (Ferrero et al., 2019), mientras que BR tienen un accionar diferencial en estos órganos, actuando como reguladores positivos de la elongación del hipocotilo frente a alta temperatura e inhibiendo la apertura de los cotiledones (Ibañez et al., 2018; Li & He, 2016). Por lo que, mientras que BR y las proteínas TCP actuarían en el mismo sentido en el control de la elongación del hipocotilo, actuarían como reguladores antagónicos de la apertura, expansión y desarrollo fotosintético de los cotiledones. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio muestran que *TCP14* y/o *TCP15* son necesarios para la elongación del hipocotilo inducida por BL tanto en condiciones normales como frente a alta temperatura. Por lo que sería interesante analizar a futuro si los complejos TCP15-BZR1 tienen un papel en la elongación de este órgano durante el desarrollo escotomorfogénico o en respuesta a temperatura y si hay una regulación diferencial de la expresión de TCP15 en estas condiciones.

Nuestros estudios indican que BR inhibe a TCP15 tanto a nivel transcripcional como de la actividad proteica a través de la formación del complejo TCP15-BZR1. Sin embargo, dado que se detecta una expresión importante de TCP15 en cotiledones en oscuridad (Figura 16) y que BZR1 afecta el accionar de TCP15 en las plantas *35S::TCP15 pBZR1::bzl1-1D-CFP* (Figura 52), el control de la actividad transcripcional de TCP15 en oscuridad sería más relevante que la regulación transcripcional. Esto aseguraría la inhibición de la fotomorfogénesis de los cotiledones (apertura y desarrollo fotosintético) en estas condiciones, pero permitiría que luego de la exposición a la luz, la formación de los complejos TCP15-GLK1 promuevan el desarrollo fotomorfogénico de las plántulas (Figura 59). De esta manera, la red molecular formada por los FT TCP y GLK para promover el desarrollo fotomorfogénico en los cotiledones frente a la iluminación parece ser cada vez más compleja. Más aún si se considera que el módulo regulador descrito entre estas proteínas se encuentra interconectado con las vías de señalización

de brasinoesteroides y las provenientes de los cloroplastos, ambas reguladoras negativas de la de-etiolación.

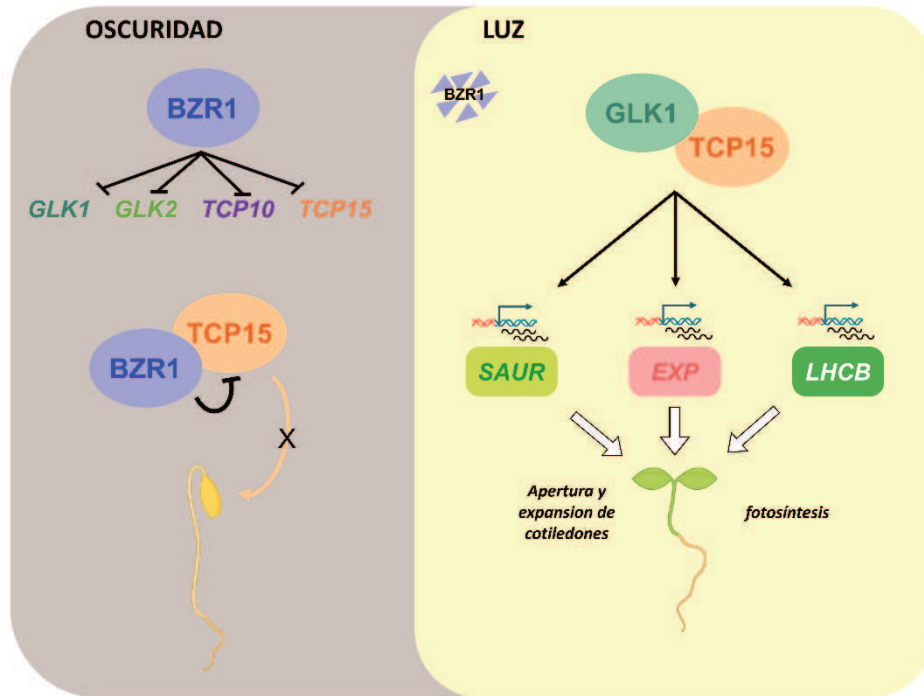


Figura 59: La vía hormonal de brasinoesteroides (BR) inhibe el accionar de TCP15. El factor de transcripción BZR1 reprime la expresión de TCP15 a nivel transcripcional y su actividad transcripcional mediante interacción proteína-proteína (BZR1-TCP15). En oscuridad, esto permitiría la inhibición de la fotomorfogénesis en cotiledones. En luz, disminuyen los niveles de BZR1 mientras que aumenta la expresión de *GLK1*, permitiendo la formación del complejo TCP15-GLK1. Finalmente, las proteínas TCP y GLK inducen conjuntamente la apertura, expansión y desarrollo fotomorfogénico en los cotiledones durante la de-etiolación.

*C*ONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis podemos enunciar las siguientes conclusiones:

- Las proteínas TCP de clase I TCP11, TCP20, TCP21 y TCP15 son capaces de interactuar con el factor de transcripción GLK1 en levaduras. Esto no ocurre con las proteínas TCP de clase II TCP4, TCP10 y TCP24.
- TCP15 y GLK1 forman complejos proteicos que se localizan en el núcleo de las células vegetales.
- El complejo TCP15-GLK1 se forma a través de la región que contiene el dominio GCT de GLK1.
- *TCP14/15* y *GLK1* actúan en la misma vía molecular y son requeridos para la apertura y expansión de los cotiledones durante la transición de oscuridad a luz y para una correcta expresión de los genes involucrados en el desarrollo fotomorfogénico de estos órganos.
- El complejo proteico TCP15-GLK1 se une a los promotores de genes blanco comunes involucrados en la apertura, expansión y desarrollo de los cotiledones durante la de-etiolación.
- La expresión de *TCP10*, TCP de clase II del clado CIN, se induce frente a la iluminación.
- *TCP10* es requerido para la apertura, expansión y desarrollo fotosintético de los cotiledones.
- TCP10 y GLK1 actúan en la misma vía molecular que regula la apertura de los cotiledones.
- TCP10 modula la expresión de genes *SAUR* de forma directa, y la expresión de genes *LHCB* y *EXP* a través de la regulación directa de *GLK1*.
- TCP10 y GLK1 promueven su expresión de forma recíproca y ambos inducen la expresión de *GLK2* durante la de-etiolación.
- TCP10 es un componente de la señalización retrógrada del cloroplasto al núcleo.
- La apertura de cotiledones generada por una reducción en los niveles de brasinoesteroides requiere de la presencia de los genes *TCP14*, *TCP15*, *TCP10*, *GLK1* y *GLK2*.
- La expresión de los genes *TCP* y *GLK* está regulada por la vía hormonal de brasinoesteroides, en parte a través de BZR1.
- TCP15 y BZR1 interactúan entre sí a través de la región C-terminal de BZR1.

- BZR1 modula la actividad transcripcional de TCP15, impidiendo la expresión de los genes blanco de la misma, como *SAUR14*.

De manera general podemos decir que, a través de la identificación del complejo que TCP15 forma con GLK1 *in vivo* hemos podido obtener nuevas evidencias sobre el papel que las proteínas TCP cumplen en el desarrollo de Arabidopsis. Puntualmente, encontramos que las proteínas TCP participan en la apertura de los cotiledones durante la de-etiolación y que este accionar estaría modulado por brasinoesteroides y por señales provenientes de los cloroplastos (señalización retrógrada). De acuerdo a nuestros estudios, las proteínas TCP y GLK1 modulan la apertura, expansión y desarrollo fotosintético de los cotiledones a través de redes regulatorias comunes. Sin embargo, mientras que el accionar de las proteínas TCP de clase I ocurre a través de la formación de complejos proteicos con GLK1, TCP10 y quizás otras proteínas TCP CIN de clase II estarían relacionadas con GLK1 a nivel transcripcional, indicando que las proteínas TCP y GLK1 serían parte de una compleja red molecular que controla el desarrollo fotomorfogénico de los cotiledones en respuesta a la iluminación. Los mecanismos moleculares o posibles intermediarios mediante los cuales las señales provenientes de los cloroplastos y la vía hormonal de brasinoesteroides afectan el accionar de las proteínas TCP durante la regulación de la de-etiolación quedan aún por ser dilucidados en mayor detalle.

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, R., Liu, Y., Wang, T.-J., Meng, Q., Yin, H., Wang, X., Wu, Y., Nan, N., Liu, B., & Xu, Z. (2019). GOLDEN2-LIKE transcription factors regulate WRKY40 expression in response to abscisic acid. *Plant Physiology*, *179*(4), 1844–1860. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01466>
- Alabadi, D., Gallego-Bartolome, J., Orlando, L., Garcia-Carcel, L., Rubio, V., Martinez, C., Frigeiro, M., Iglesias-pedraz, J. M., Espinosa, A., Deng, X. W., & Blazquez, M. A. (2008). Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. *The Plant Journal*, *1*, 324–335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03346.x>
- Alem, A. L., Ariel, F. D., Cho, Y., Hong, J. C., Gonzalez, D. H., & Viola, I. L. (2022). TCP15 interacts with GOLDEN2-LIKE 1 to control cotyledon opening in Arabidopsis. *Plant Journal*, *1*(3), 1–16. <https://doi.org/10.1111/tpj.15701>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andriankaja, M. E., Danisman, S., Mignolet-Spruyt, L. F., Claeys, H., Kochanke, I., Vermeersch, M., De Milde, L., De Bodt, S., Storme, V., Skiryecz, A., Maurer, F., Bauer, P., Mühlenbock, P., Van Breusegem, F., Angenent, G. C., Immink, R. G. H., & Inzé, D. (2014). Transcriptional coordination between leaf cell differentiation and chloroplast development established by TCP20 and the subgroup Ib bHLH transcription factors. *Plant Molecular Biology*, *85*(3), 233–245. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0180-2>
- Araki, T. (2001). Transition from vegetative to reproductive phase. *Current Opinion in Plant Biology*, *4*(1), 63–68. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00137-0)
- Ariel, F. D., Jegu, T., Latrasse, D., Romero-Barrios, N., Christ, A., Benhamed, M., & Crespi, M. (2014). Noncoding transcription by alternative rna polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. *Molecular Cell*, *55*(3), 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.011>
- Ariel, F. D., Manavella, P. A., Dezar, C. A., & Chan, R. L. (2007). The true story of the HD-Zip family. *Trends in Plant Science*, *12*(9), 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.08.003>

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., & Smith, J. A. (2010). *Current protocols in molecular biology*. Jhon Wiley and Sons.
- Bai, M. Y., Shang, J. X., Oh, E., Fan, M., Bai, Y., Zentella, R., Sun, T. P., & Wang, Z. Y. (2012). Brassinosteroid, gibberellin, and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Nature Cell Biology*, *14*(8), 810. <https://doi.org/10.1038/NCB2546>
- Bemer, M., van Dijk, A. D. J., Immink, R. G. H., & Angenent, G. C. (2017). Cross-Family Transcription Factor Interactions: An Additional Layer of Gene Regulation. *Trends in Plant Science*, *22*(1), 66–80. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2016.10.007>
- Blümel, M., Dally, N., & Jung, C. (2015). Flowering time regulation in crops-what did we learn from *Arabidopsis*? *Current Opinion in Biotechnology*, *32*, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.023>
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., & Görlach, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: A model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*, *13*(7), 1499–1510. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.7.1499>
- Bresso, E. G., Chorostecki, U., Rodriguez, R. E., Palatnik, J. F., & Schommer, C. (2018). Spatial control of gene expression by miR319-regulated TCP transcription factors in leaf development. *Plant Physiology*, *176*(2), 1694–1708. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00823>
- Busch, A., Deckena, M., Almeida-Trap, M., Kopischke, S., Kock, C., Schussler, E., Tsiantis, M., Mithofer, A., & Zachgo, S. (2019). MpTCP1 controls cell proliferation and redox processes in *Marchantia polymorpha*. *New Phytologist*, *224*, 1627–1641. <https://doi.org/10.1111/nph.16132>
- Butler, J. E. F., & Kadonaga, J. T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: A key component in the regulation of gene expression. *Genes and Development*, *16*(20), 2583–2592. <https://doi.org/10.1101/gad.1026202>
- Cabello, J. V., Giacomelli, J. I., Piattoni, C. V., Iglesias, A. A., & Chan, R. L. (2016). The sunflower transcription factor HaHB11 improves yield, biomass and tolerance to flooding in transgenic *Arabidopsis* plants. *Journal of Biotechnology*, *222*, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.015>
- Cackett, L., Luginbuehl, L. H., Schreier, T. B., Lopez-juez, E., & Hibberd, J. M. (2021).

- Tansley review Chloroplast development in green plant tissues: the interplay between light, hormone, and transcriptional regulation.*
<https://doi.org/10.1111/nph.17839>
- Camoirano, A., Alem, A. L., Gonzalez, D. H., & Viola, I. L. (2021). Arabidopsis thaliana TCP15 interacts with the MIXTA-like transcription factor MYB106/NOECK. *Plant Signaling and Behavior*, 16(10). <https://doi.org/10.1080/15592324.2021.1938432>
- Camoirano, A., Alem, A. L., Gonzalez, D. H., & Viola, I. L. (2023). The N-terminal region located upstream of the TCP domain is responsible for the antagonistic action of the Arabidopsis thaliana TCP8 and TCP23 transcription factors on flowering time. In *Plant Science* (Vol. 328). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111571>
- Camoirano, A., Arce, A. L., Ariel, F. D., Alem, A. L., Gonzalez, D. H., & Viola, I. L. (2020). Class I TCP transcription factors regulate trichome branching and cuticle development in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 71(18), 5438–5453. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa257>
- Carrara, S., & Dornelas, M. C. (2021). TCP Genes and the Orchestration of Plant Architecture. *Tropical Plant Biology*, 14(1). <https://doi.org/10.1007/s12042-020-09274-z>
- Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11, 113–116.
- Charrier, B., Champion, A., Henry, Y., & Kreis, M. (2002). Expression Profiling of the Whole Arabidopsis Shaggy-Like Kinase Multigene Family by Real-Time Reverse. *Plant Physiology*, 130, 577–590. <https://doi.org/10.1104/pp.009175>.In
- Chen, G. H., Sun, J. Y., Liu, M., Liu, J., & Yang, W. C. (2014). SPOROCTELESS Is a Novel Embryophyte-Specific Transcription Repressor that Interacts with TPL and TCP Proteins in Arabidopsis. *Journal of Genetics and Genomics*, 41(12), 617–625. <https://doi.org/10.1016/J.JGG.2014.08.009>
- Chen, L., Chen, Y. Q., Ding, A. M., Xia, F., Wang, W. F., & Sun, Y. H. (2016). Genome-wide analysis of TCP family in tobacco. *Genetics and Molecular Research*, 15(2). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15027728> ABSTRACT.
- Chen, M., Ji, M., Wen, B., Liu, L., Li, S., Chen, X., Gao, D., & Li, L. (2016). GOLDEN 2-LIKE transcription factors of plants. *Frontiers in Plant Science*, 7:1509. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01509>

- Choi, D., Cho, H. T., & Lee, Y. (2006). Expansins: Expanding importance in plant growth and development. *Physiologia Plantarum*, *126*(4), 511–518. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00612.x>
- Choi, H., Gwak, D., Kim, S., Yi, T., & Ha, S. H. (2024). Molecular Action of GOLDEN2-LIKE Transcription Factor Family with Diverse Interacting Promoters and Proteins. *Physiologia Plantarum*, *176*(1). <https://doi.org/10.1111/pp1.14164>
- Chory, J., Nagpal, P., & Petob, C. A. (1991). Phenotypic and Genetic Analysis of *det2*, a New Mutant That Affects Light-Regulated Seedling Development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *3*(5), 445. <https://doi.org/10.1105/TPC.3.5.445>
- Chu, X., Li, M., Zhang, S., Fan, M., Han, C., Xiang, F., Li, G., Wang, Y., Xiang, C. Bin, Wang, J. G., & Bai, M. Y. (2021). HBI1-TCP20 interaction positively regulates the CEPs-mediated systemic nitrate acquisition. *Journal of Integrative Plant Biology*, *63*(5), 902–912. <https://doi.org/10.1111/jipb.13035>
- Chung, Y., & Choe, S. (2013). The Regulation of Brassinosteroid Biosynthesis in Arabidopsis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *32*(6), 396–410. <https://doi.org/10.1080/07352689.2013.797856>
- Cosgrove, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, *407*, 321–326. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/35030000>
- Cubas, P., Lauter, N., Doebley, J., & Coen, E. (1999). The TCP domain: A motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant Journal*, *18*(2), 215–222. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00444.x>
- Danisman, S. (2016). TCP transcription factors at the interface between environmental challenges and the plant's growth responses. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01930>
- Danisman, S., van der Wal, F., Dhondt, S., Waites, R., de Folter, S., Bimbo, A., van Dijk, A. J., Muino, J. M., Cutri, L., Dornelas, M. C., Angenent, G. C., & Immink, R. G. H. (2012). Arabidopsis Class I and Class II TCP Transcription Factors Regulate Jasmonic Acid Metabolism and Leaf Development Antagonistically. *Plant Physiology*, *159*(4), 1511–1523. <https://doi.org/10.1104/PP.112.200303>
- Danisman, S., van Dijk, A. D. J., Bimbo, A., van der Wal, F., Hennig, L., de Folter, S., Angenent, G. C., & Immink, R. G. H. (2013). Analysis of functional redundancies within the Arabidopsis TCP transcription factor family. *Journal of Experimental*

- Botany*, 64(18), 5673–5685.
- Dhaka, N., Bhardwaj, V., Sharma, M. K., & Sharma, R. (2017). Evolving tale of TCPs: New paradigms and old lacunae. *Frontiers in Plant Science*, 8(April), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00479>
- Ding, A. M., Xu, C. T., Xie, Q., Zhang, M. J., Yan, N., Dai, C. B., Lv, J., Cui, M. M., Wang, W. F., & Sun, Y. H. (2022). ERF4 interacts with and antagonizes TCP15 in regulating endoreduplication and cell growth in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(9), 1673–1689. <https://doi.org/10.1111/jipb.13323>
- Doebley, J., Stec, A., & Hubbard, L. (1997). The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 1997 386:6624, 386(6624), 485–488. <https://doi.org/10.1038/386485a0>
- Dong, H., Dumenil, J., Lu, F. H., Na, L., Vanhaeren, H., Naumann, C., Klecker, M., Prior, R., Smith, C., McKenzie, N., Saalbach, G., Chen, L., Xia, T., Gonzalez, N., Seguela, M., Inze, D., Dissmeyer, N., Li, Y., & Bevan, M. W. (2017). Ubiquitylation activates a peptidase that promotes cleavage and destabilization of its activating E3 ligases and diverse growth regulatory proteins to limit cell proliferation in Arabidopsis. *Genes and Development*, 31(2), 197–208. <https://doi.org/10.1101/GAD.292235.116/-/DC1>
- Dong, J., Sun, N., Yang, J., Deng, Z., Lan, J., Qin, G., He, H., Deng, X. W., Irish, V. F., Chen, H., & Wei, N. (2019). The transcription factors TCP4 and PIF3 antagonistically regulate organ-specific light induction of SAUR genes to modulate cotyledon opening during de-etiolation in Arabidopsis. *Plant Cell*, 31(5), 1155–1170. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00803>
- Du, H., Zhang, L., Liu, L., Tang, X. F., Yang, W. J., Wu, Y. M., Huang, Y. B., & Tang, Y. X. (2009). Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry (Moscow)*, 74(1), 1–11. <https://doi.org/10.1134/S0006297909010015>
- Duan, L., Águila Ruiz-Sola, M., Couso, A., Veciana, N., & Monte, E. (2020). Red and blue light differentially impact retrograde signalling and photoprotection in rice. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375(1801). <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0402>
- Fan, S., Zhang, Z., Song, Y., Zhang, J., & Wang, P. (2022). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmTCP19L increasing susceptibility to Phytophthora sojae in soybean. *PLoS ONE*, 17(6), 1–17.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267502>

- Ferrero, L. V., Gastaldi, V., Ariel, F. D., Viola, I. L., & Gonzalez, D. H. (2021). Class I TCP proteins TCP14 and TCP15 are required for elongation and gene expression responses to auxin. *Plant Molecular Biology*, *105*(1–2), 147–159. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-01075-y>
- Ferrero, L. V., Viola, I. L., Ariel, F. D., & Gonzalez, D. H. (2019). Class I TCP Transcription Factors Target the Gibberellin Biosynthesis Gene GA20ox1 and the Growth-Promoting Genes HBI1 and PRE6 during Thermomorphogenic Growth in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, *60*(8), 1633–1645. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz137>
- Fields, S., & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, *340*(6230), 245–246.
- Fitter, D. W., Martin, D. J., Copley, M. J., Scotland, R. W., & Langdale, J. A. (2002). GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species. *Plant Journal*, *31*(6), 713–727. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01390.x>
- Friedrich Laibach. (1943). Arabidopsis thaliana(L.) Heyhn. als Object fur Genetische und Entwicklungs-Physiologische Untersuchungen. *Botanisches Archiv*, *44*(44), 439–455.
- Galvão, V. C., & Fankhauser, C. (2015). Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. *Current Opinion in Neurobiology*, *34*, 46–53. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2015.01.013>
- Garapati, P., Xue, G. P., Munné-Bosch, S., & Balazadeh, S. (2015). Transcription factor ATAF1 in arabidopsis promotes senescence by direct regulation of key chloroplast maintenance and senescence transcriptional cascades. *Plant Physiology*, *168*(3), 1122–1139. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00567>
- Gastaldi, V., Alem, A. L., Mansilla, N., Ariel, F. D., Viola, I. L., Lucero, L. E., & Gonzalez, D. H. (2022). BREVIPEDICELLUS/KNAT1 targets TCP15 to modulate filament elongation during Arabidopsis late stamen development. *Plant Physiology*, *63*(6), 777–782. <https://doi.org/10.7868/s0015330316060105>
- Gastaldi, V., Lucero, L. E., Ferrero, L. V., Ariel, F. D., & Gonzalez, D. H. (2020). Class-I TCP transcription factors activate the SAUR63 gene subfamily in gibberellin-dependent stamen filament elongation. *Plant Physiology*, *182*(4), 2096–2110.

<https://doi.org/10.1104/PP.19.01501>

Gietz, D., Jean, A. S., Woods, R. A., & Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research*, *20*(6), 1425. <https://doi.org/10.1093/nar/20.6.1425>

Gommers, C. M. M., & Monte, E. (2018). Seedling establishment: A dimmer switch-regulated process between dark and light signaling. *Plant Physiology*, *176*(2), 1061–1074. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01460>

González-Fuente, M., Carrère, S., Monachello, D., Marsella, B. G., Cazalé, A. C., Zischek, C., Mitra, R. M., Rezé, N., Cottret, L., Mukhtar, M. S., Lurin, C., Noël, L. D., & Peeters, N. (2020). EffectorK, a comprehensive resource to mine for *Ralstonia*, *Xanthomonas*, and other published effector interactors in the *Arabidopsis* proteome. *Molecular Plant Pathology*, *21*(10), 1257. <https://doi.org/10.1111/MPP.12965>

Gonzalez, D. H. (2015). *Plant transcription factors. Evolutionary, structural, and functional aspects*. Elsevier Inc.

Green, B., & Durnford, D. (1996). THE CHLOROPHYLL-CAROTENOID PROTEINS OF OXYGENIC PHOTOSYNTHESIS. *Annu Rev Plant Physiol Plan Mol Biol*, *47*, 685:714. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.685>. PMID: 15012305.

Griffin, J. H. C., & Toledo-Ortiz, G. (2022). Plant photoreceptors and their signalling components in chloroplastic anterograde and retrograde communication. *Journal of Experimental Botany*, *73*(21), 7126–7138. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac220>

Grübler, B., Cozzi, C., & Pfanschmidt, T. (2021). A Core Module of Nuclear Genes Regulated by Biogenic Retrograde Signals from Plastids. *Plants*, *10*(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10020296>

Guo, H., Li, L., Aluru, M., Aluru, S., & Yin, Y. (2013). Mechanisms and networks for brassinosteroid regulated gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*, *16*(5), 545–553. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2013.08.002>

Hall, L. N., Rossini, L., Cribb, L., & Langdale, J. A. (1998). GOLDEN 2: A novel transcriptional regulator of cellular differentiation in the maize leaf. *Plant Cell*, *10*(6), 925–936. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.6.925>

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal*

- of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- He, J. X., Gendron, J. M., Sun, Y., Gampala, S. S. L., Gendron, N., Sun, C. Q., & Wang, Z. Y. (2005). BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science*, 307(5715). [/pmc/articles/PMC2925132/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16111321/)
- He, Z., Zhao, X., Kong, F., Zuo, Z., & Liu, X. (2016). TCP2 positively regulates HY5/HYH and photomorphogenesis in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 67(3), 775–785. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv495>
- Hernández-Verdeja, T., & Lundgren, M. R. (2023). GOLDEN2-LIKE transcription factors: A golden ticket to improve crops? *Plants People Planet*, June, 1–15. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10412>
- Hernández-Verdeja, T., Vuorijoki, L., Jin, X., Vergara, A., Dubreuil, C., & Strand, Å. (2022). GENOMES UNCOUPLED1 plays a key role during the de-etiolation process in Arabidopsis. *New Phytologist*, 235(1), 188–203. <https://doi.org/10.1111/NPH.18115>
- Hernández-verdeja, T., Vuorijoki, L., & Strand, Å. (2020). Emerging from the darkness: interplay between light and plastid signaling during chloroplast biogenesis. *Physiologia Plantarum*, 169(3), 397–406. <https://doi.org/10.1111/ppl.13100>
- Hosoda, K., Imamura, A., Katoh, E., Hatta, T., Tachiki, M., Yamada, H., Mizuno, T., & Yamazaki, T. (2002). Molecular Structure of the GARP Family of Plant Myb-Related DNA Binding Motifs of the Arabidopsis Response Regulators. *The Plant Cell*, 14(9), 2015. <https://doi.org/10.1105/TPC.002733>
- Howarth, D. G., & Donoghue, M. J. (2006). Phylogenetic analysis of the “ECE” (CYC/TB1) clade reveals duplications predating the core eudicots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(24), 9101–9106. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602827103>
- Ibañez, C., Delker, C., Martínez, C., Bürstenbinder, K., Janitza, P., Lippmann, R., Ludwig, W., Sun, H., James, G. V., Klecker, M., Grossjohann, A., Schneeberger, K., Prat, S., & Quint, M. (2018). Brassinosteroids Dominate Hormonal Regulation of Plant Thermomorphogenesis via BZR1. *Current Biology*, 28(2), 303-310.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.077>

- Ingram, G. C., & Waites, R. (2006). Keeping it together: Co-ordinating plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(1), 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.11.007>
- Jaillais, Y., & Vert, G. (2012). Brassinosteroids, gibberellins and light-mediated signalling are the three-way controls of plant sprouting. *Nature Cell Biology* 2012 14:8, 14(8), 788–790. <https://doi.org/10.1038/ncb2551>
- Jefferson, R., Kavanagh, T., & Bevan, M. (1987). Gus fusions: β -glucuronidase a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, 6, 3901–7.
- Jiao, Y., Lau, O. S., & Deng, X. W. (2007). *Light-regulated transcriptional networks in higher plants*. 8(March), 217–230. <https://doi.org/10.1038/nrg2049>
- Josse, E.-M., & Halliday, K. J. (2008). Skotomorphogenesis: The Dark Side of Light Signalling. *Curr*, 18(24), R1144-6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.10.033>
- Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Che, F. S., Terauchi, R., & Inaba, T. (2009). Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Plant Physiology*, 151(3), 1339–1353. <https://doi.org/10.1104/pp.109.145987>
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., & Fankhauser, C. (2010). Light-Regulated Plant Growth and Development. *Current Topics in Developmental Biology*, 91(C), 29–66. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)91002-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)91002-8)
- Kerppola, T. K. (2008). Tom K. Kerppola. *Interactions*, 37, 465–487. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807>
- Kieffer, M., Master, V., Waites, R., & Davies, B. (2011). TCP14 and TCP15 affect internode length and leaf shape in. *Plant Journal*, 68(1), 147–158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04674.x>
- Kim, B., Jeong, Y. J., Corvalán, C., Fujioka, S., Cho, S., Park, T., & Choe, S. (2014). Darkness and gulliver2/phyB mutation decrease the abundance of phosphorylated BZR1 to activate brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 77(5), 737. <https://doi.org/10.1111/TPJ.12423>
- Kim, S. H., Son, G. H., Bhattacharjee, S., Kim, H. J., Nam, J. C., Nguyen, P. D. T., Hong, J. C., & Gassmann, W. (2014). The Arabidopsis immune adaptor SRRF1 interacts

- with TCP transcription factors that redundantly contribute to effector-triggered immunity. *The Plant Journal*, 78(6), 978–989. <https://doi.org/10.1111/TPJ.12527>
- Kim, T. W., Guan, S., Burlingame, A. L., & Wang, Z. Y. (2011). The CDG1 Kinase Mediates Brassinosteroid Signal Transduction from BRI1 Receptor Kinase to BSU1 Phosphatase and GSK3-like Kinase BIN2. *Molecular Cell*, 43(4), 561. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2011.05.037>
- Kim, T. W., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Shang, J. X., Sun, Y., Burlingame, A. L., & Wang, Z. Y. (2009). Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nature Cell Biology* 2009 11:10, 11(10), 1254–1260. <https://doi.org/10.1038/ncb1970>
- Kim, T. W., & Wang, Z. Y. (2010). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 681–704. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092057>
- Klepikova, A. V., Kasianov, A. S., Gerasimov, E. S., Logacheva, M. D., & Penin, A. A. (2016). A high resolution map of the Arabidopsis thaliana developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant Journal*, 88(6), 1058–1070. <https://doi.org/10.1111/tpj.13312>
- Kobayashi, K., Sasaki, D., Noguchi, K., Fujinuma, D., Komatsu, H., Kobayashi, M., Sato, M., Toyooka, K., Sugimoto, K., Niyogi, K. K., Wada, H., & Masuda, T. (2013). Photosynthesis of root chloroplasts developed in arabidopsis lines overexpressing GOLDEN2-LIKE transcription factors. *Plant and Cell Physiology*, 54(8), 1365–1377. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct086>
- Koornneef, M., & Scheres, B. (2001). Arabidopsis thaliana as an Experimental Organism . *Encyclopedia of Life Sciences*, May. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0002031>
- Kosugi, S., & Ohashi, Y. (1997). PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *Plant Cell*, 9(9), 1607–1619. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.9.1607>
- Kosugi, S., & Ohashi, Y. (2002). DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family. *The Plant Journal*, 30(3), 337–348. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2002.01294.X>
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T. C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R., & Chory, J. (2007). Signals from Chloroplasts Converge to

- Regulate Nuclear Gene Expression. *Science*, 316(5825), 715–719. <https://doi.org/10.1126/science.1140516>
- 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*. *Plant Cell*, 22(11), 3574–3588. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075598>
- Krämer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *ELife*, 2015(4), 1–13. <https://doi.org/10.7554/elife.06100>
- Kudla, J., & Bock, R. (2016). Lighting the way to protein-protein interactions: Recommendations on best practices for bimolecular fluorescence complementation analyses. *Plant Cell*, 28(5), 1002–1008. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00043>
- Kusnetsov, V. V., Doroshenko, A. S., Kudryakova, N. V., & Danilova, M. N. (2020). *Role of Phytohormones and Light in De-etiolation*. 67(6), 971–984. <https://doi.org/10.1134/S1021443720060102>
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Larkin, R. M. (2014). Influence of plastids on light signalling and development. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1640). <https://doi.org/10.1098/RSTB.2013.0232>
- Lee, J., Choi, B., Yun, A., Son, N., Ahn, G., Cha, J. Y., Kim, W. Y., & Hwang, I. (2021). Long-term abscisic acid promotes golden2-like1 degradation through constitutive photomorphogenic 1 in a light intensity-dependent manner to suppress chloroplast development. *Plant Cell and Environment*, 44(9), 3034–3048. <https://doi.org/10.1111/pce.14130>
- Leister, D., & Kleine, T. (2016). Definition of a core module for the nuclear retrograde response to altered organellar gene expression identifies GLK overexpressors as gun mutants. *Physiologia Plantarum*, 157(3), 297–309. <https://doi.org/10.1111/ppl.12431>
- Leivar, P., & Monte, E. (2014). *PIFs: Systems Integrators in Plant Development*. 26(January), 56–78. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.120857>
- Leivar, P., Monte, E., Oka, Y., Liu, T., Carle, C., Castillon, A., Huq, E., & Quail, P. H.

- (2008). Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature photomorphogenesis during early seedling development in darkness. *Current Biology: CB*, 18(23), 1815. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2008.10.058>
- Leivar, P., Tepperman, J. M., Monte, E., Calderon, R. H., Liu, T. L., & Quail, P. H. (2009). Definition of Early Transcriptional Circuitry Involved in Light-Induced Reversal of PIF-Imposed Repression of Photomorphogenesis in Young Arabidopsis Seedlings. *The Plant Cell*, 21(11), 3535. <https://doi.org/10.1105/TPC.109.070672>
- Li, C., Potuschak, T., Colón-Carmona, A., Gutiérrez, R. A., & Doerner, P. (2005). Arabidopsis TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36), 12978–12983. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504039102>
- Li, Jianming, & Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, 90(5), 929–938. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80357-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80357-8)
- Li, Jianming, Nagpal, P., Vitart, V., Mcmorris, T. C., & Chory, J. (1996). A Role for Brassinosteroids in Light-Dependent Development of Arabidopsis. *SCIENCE*, 272(April).
- Li, Jing, Wang, Y., Zhang, Y., Wang, W., Irish, V. F., & Huang, T. (2016). RABBIT EARS regulates the transcription of TCP4 during petal development in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6473–6480. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw419>
- Li, Mengping, Lee, K. P., Liu, T., Dogra, V., Duan, J., Li, M., Xing, W., & Kim, C. (2021). Antagonistic modules regulate photosynthesis-associated nuclear genes via GOLDEN2-LIKE transcription factors. *Plant Physiology*, 188(4), 2308–2324. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab600>
- Li, Min, Chen, H., Chen, J., Chang, M., Palmer, I. A., Gassmann, W., Liu, F., & Fu, Z. Q. (2018). TCP Transcription Factors Interact With NPR1 and Contribute Redundantly to Systemic Acquired Resistance. *Frontiers in Plant Science | Www.Frontiersin.Org*, 1, 1153. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01153>
- Li, Q. F., & He, J. X. (2016). BZR1 Interacts with HY5 to Mediate Brassinosteroid- and Light-Regulated Cotyledon Opening in Arabidopsis in Darkness. *Molecular Plant*, 9(1), 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.014>

- Li, S. (2015). The *Arabidopsis thaliana* TCP transcription factors: A broadening horizon beyond development. *Plant Signaling and Behavior*, 10(7). <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1044192>
- Liu, H., Gao, Y., Wu, M., Shi, Y., Wang, H., Wu, L., & Xiang, Y. (2020). TCP10, a TCP transcription factor in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*), confers drought tolerance to transgenic plants. *Environmental and Experimental Botany*, 172(April 2019), 104002. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104002>
- Liu, X., Li, Y., & Zhong, S. (2017). Interplay between light and plant hormones in the control of *Arabidopsis* seedling chlorophyll biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 8(August), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01433>
- Liu, Y. J., An, J. P., Gao, N., Wang, X., Chen, X. X., Wang, X. F., Zhang, S., & You, C. X. (2022). MdTCP46 interacts with MdABI5 to negatively regulate ABA signalling and drought response in apple. In *Plant Cell and Environment* (Vol. 45, Issue 11). <https://doi.org/10.1111/pce.14429>
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Barnell, J. (2005). *Biología celular y Molecular*. (5a. ed.). Panamericana.
- Lopez, J. A., Sun, Y., Blair, P. B., & Mukhtar, M. S. (2015). TCP three-way handshake: Linking developmental processes with plant immunity. *Trends in Plant Science*, 20(4), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.005>
- Lucero, L.E., Uberti-Manassero, N. G., Arce, A. L., Colombatti, F., Alemanno, S. G., & Gonzalez, D. H. (2015). TCP15 modulates cytokinin and auxin responses during gynoecium development in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 84(2), 267–282. <https://doi.org/10.1111/tpj.12992>
- Lucero, L.E., Manavella, P. A., Gras, D. E., Ariel, F. D., & Gonzalez, D. H. (2017). Class I and Class II TCP Transcription Factors Modulate SOC1-Dependent Flowering at Multiple Levels. *Molecular Plant*, 10(12), 1571–1574. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.09.001>
- Luo, D., Carpenter, R., Vincent, C., Copsey, L., & Coen, E. (1996). Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. *Nature* 1996 383:6603, 383(6603), 794–799. <https://doi.org/10.1038/383794a0>
- Luo, X. M., Lin, W. H., Zhu, S., Zhu, J. Y., Sun, Y., Fan, X. Y., Cheng, M., Hao, Y., Oh, E., Tian, M., Liu, L., Zhang, M., Xie, Q., Chong, K., & Wang, Z. Y. (2010). Integration

- of Light- and Brassinosteroid-Signaling Pathways by a GATA Transcription Factor in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 19(6), 872–883. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.023>
- Lv, R., Li, Z., Li, M., Dogra, V., Lv, S., Liu, R., Lee, K. P., & Kim, C. (2019). Uncoupled Expression of Nuclear and Plastid Photosynthesis-Associated Genes Contributes to Cell Death in a Lesion Mimic Mutant. *The Plant Cell*, 31(1), 210. <https://doi.org/10.1105/TPC.18.00813>
- Lymperopoulos, P., Msanne, J., & Rabara, R. (2018). *Phytochrome and Phytohormones: Working in Tandem for Plant Growth and Development*. 9(July), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01037>
- Ma, Y. N., Xu, D. B., Li, L., Zhang, F., Fu, X. Q., Shen, Q., Lyu, X. Y., Wu, Z. K., Pan, Q. F., Shi, P., Hao, X. L., Yan, T. X., Chen, M. H., Liu, P., He, Q., Xie, L. H., Zhong, Y. J., Tang, Y. L., Zhao, J. Y., ... Tang, K. X. (2018). Jasmonate promotes artemisinin biosynthesis by activating the TCP14-ORA complex in *Artemisia annua*. *Science Advances*, 4(11), 9357–9371. <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAS9357>
- Martín-Trillo, M., & Cubas, P. (2010). TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends in Plant Science*, 15(1), 31–39. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2009.11.003>
- Martin, G., Leivar, P., Ludevid, D., Tepperman, J. M., Quail, P. H., & Monte, E. (2016). Phytochrome and retrograde signalling pathways converge to antagonistically regulate a light-induced transcriptional network. *Nature Communications*, 7(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms11431>
- Masuda, H. P., Cabral, L. M., De Veylder, L., Tanurdzic, M., De Almeida Engler, J., Geelen, D., Inzé, D., Martienssen, R. A., Ferreira, P. C. G., & Hemerly, A. S. (2008). ABAP1 is a novel plant Armadillo BTB protein involved in DNA replication and transcription. *The EMBO Journal*, 27(20), 2746. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2008.191>
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., & Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389). <https://doi.org/10.1126/science.282.5389.662>
- Mo, W., Zhang, J., Zhang, L., Yang, Z., Yang, L., Yao, N., Xiao, Y., Li, T., Li, Y., Zhang, G., Bian, M., Du, X., & Zuo, Z. (2022). *Arabidopsis* cryptochrome 2 forms photobodies with TCP22 under blue light and regulates the circadian clock. *Nature*

- Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-022-30231-9>
- Mukhopadhyay, P., & Tyagi, A. K. (2015). OsTCP19 influences developmental and abiotic stress signaling by modulating ABI4-mediated pathways. *Scientific Reports*, 5, 5:9998. <https://doi.org/10.1038/srep09998>
- Mukhtar, M. S., Carvunis, A. R., Dreze, M., Epple, P., Steinbrenner, J., Moore, J., Tasan, M., Galli, M., Hao, T., Nishimura, M. T., Pevzner, S. J., Donovan, S. E., Ghamsari, L., Santhanam, B., Romero, V., Poulin, M. M., Gebreab, F., Gutierrez, B. J., Tam, S., ... Payne, T. (2011). Independently Evolved Virulence Effectors Converge onto Hubs in a Plant Immune System Network. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6042), 596. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1203659>
- Murmu, J., Wilton, M., Allard, G., Pandeya, R., Desveaux, D., Singh, J., & Subramaniam, R. (2014). Arabidopsis GOLDEN2-LIKE (GLK) transcription factors activate jasmonic acid (JA)-dependent disease susceptibility to the biotrophic pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis*, as well as JA-independent plant immunity against the necrotrophic pathogen *Botryti*. *Molecular Plant Pathology*, 15(2), 174–184. <https://doi.org/10.1111/mpp.12077>
- Nagatoshi, Y., Mitsuda, N., Hayashi, M., Inoue, S. I., Okuma, E., Kubo, A., Murata, Y., Seo, M., Saji, H., Kinoshita, T., & Ohme-Takagi, M. (2016). GOLDEN 2-LIKE transcription factors for chloroplast development affect ozone tolerance through the regulation of stomatal movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(15), 4218–4223. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513093113>
- Nam, K. H., & Li, J. (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell*, 110(2), 203–212. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00814-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00814-0)
- Navaud, O., Dabos, P., Carnus, E., Tremousaygue, D., & Hervé, C. (2007). TCP transcription factors predate the emergence of land plants. *Journal of Molecular Evolution*, 65(1), 23–33. <https://doi.org/10.1007/s00239-006-0174-z>
- Ni, F., Wu, L., Wang, Q., Hong, J., Qi, Y., & Zhou, X. (2017). Turnip Yellow Mosaic Virus P69 Interacts with and Suppresses GLK Transcription Factors to Cause Pale-Green Symptoms in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 10(5), 764–766. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.12.003>
- Ni, W., Xu, S. L., Tepperman, J. M., Stanley, D. J., Maltby, D. A., Gross, J. D., Burlingame, A. L., Wang, Z. Y., & Quail, P. H. (2014). A Mutually Assured

- Destruction Mechanism Attenuates Light Signaling in Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6188), 1160. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1250778>
- Nicolas, M., & Cubas, P. (2016). TCP factors: New kids on the signaling block. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.05.006>
- Oelmüller, R., Levitan, I., Bergfeld, R., Rajasekhar, V. K., & Mohr, H. (1986). Expression of nuclear genes as affected by treatments acting on the plastids. *Planta*, 168(4), 482–492. <https://doi.org/10.1007/BF00392267>
- Oh, E., Zhu, J.-Y., & Wang, Z.-Y. (2012). Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nature Cell Biology*, 14(8), 802–809. <https://doi.org/doi:10.1038/ncb2545>
- Ohama, N., & Yanagisawa, S. (2024). Role of GARP family transcription factors in the regulatory network for nitrogen and phosphorus acquisition. *Journal of Plant Research*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s10265-023-01513-0>
- Ooms, G., Hooykaas, P. J. J., Van Veen, R. J. M., Van Beelen, P., Regensburg-Tuïnk, T. J. G., & Schilperoort, R. A. (1982). Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid*, 7(1), 15–29. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(82\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0147-619X(82)90023-3)
- Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C., & Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 425(6955), 257–263. <https://doi.org/10.1038/nature01958>
- Peng, Y., Chen, L., Lu, Y., Wu, Y., Dumenil, J., Zhu, Z., Bevan, M. W., & Lia, Y. (2015). The Ubiquitin receptors DA1, DAR1, and DAR2 redundantly regulate endoreduplication by modulating the stability of TCP14/15 in arabidopsis. *Plant Cell*, 27(3), 649–662. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132274>
- Pruneda-Paz, J. L., Breton, G., Para, A., & Kay, S. A. (2009). A functional genomics approach reveals CHE as a novel component of the Arabidopsis circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5920), 1481. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1167206>
- Rath, M., Challa, K. R., Sarvepalli, K., & Nath, U. (2022). CINCINNATA-Like TCP Transcription Factors in Cell Growth – An Expanding Portfolio. *Frontiers in Plant Science*, 13(February), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.825341>

- Rauf, M., Arif, M., Dortay, H., Matallana-Ramírez, L. P., Waters, M. T., Gil Nam, H., Lim, P. O., Mueller-Roeber, B., & Balazadeh, S. (2013). ORE1 balances leaf senescence against maintenance by antagonizing G2-like-mediated transcription. *EMBO Reports*, *14*(4), 382–388. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.24>
- Ravindran, N., Ramachandran, H., Job, N., Yadav, A., Vaishak, K. P., & Datta, S. (2021). B-box protein BBX32 integrates light and brassinosteroid signals to inhibit cotyledon opening. *Plant Physiology*, *187*(1), 446–461. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab304>
- Resentini, F., Felipo-Benavent, A., Colombo, L., Blázquez, M. A., Alabadí, D., & Masiero, S. (2015). TCP14 and TCP15 mediate the promotion of seed germination by gibberellins in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, *8*(3), 482–485. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.018>
- Ribichich, K. F., Arce, A. L., & Chan, R. L. (2013). *Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance*. (N. Tuteja & S. Gill (eds.)). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Riechmann, J. (2002). *Transcriptional regulation: a genomic overview: The Arabidopsis Book*. (C. Somerville & E. Meyerowitz (eds.)). American Society of Plant Biologists.
- Rockwell, N. C., Su, Y. S., & Lagarias, J. C. (2006). PHYTOCHROME STRUCTURE AND SIGNALING MECHANISMS. *Annual Review of Plant Biology*, *57*, 837. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.56.032604.144208>
- Rossini, L., Cribb, L., Martin, D. J., & Langdale, J. A. (2001). The maize Golden2 gene defines a novel class of transcriptional regulators in plants. *Plant Cell*, *13*(5), 1231–1244. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.5.1231>
- Ruckle, M. E., Burgoon, L. D., Lawrence, L. A., Sinkler, C. A., & Larkin, R. M. (2012). Plastids Are Major Regulators of Light Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *159*(1), 366. <https://doi.org/10.1104/PP.112.193599>
- Ruckle, M. E., DeMarco, S. M., & Larkin, R. M. (2007). Plastid signals remodel light signaling networks and are essential for efficient chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *19*(12), 3944–3960. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.054312>
- Ruckle, M. E., & Larkin, R. M. (2009). Plastid signals that affect photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana* are dependent on GENOMES UNCOUPLED 1 and cryptochrome 1. *New Phytologist*, *182*(2), 367–379. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2008.02729.X>

- Ruijter, J. M., Ruiz Villalba, A., Hellemans, J., Untergasser, A., & van den Hoff, M. J. B. (2015). Removal of between-run variation in a multi-plate qPCR experiment. *Biomolecular Detection and Quantification*, 5, 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.07.001>
- Sagar, M., Chervin, C., Mila, I., Hao, Y., Roustan, J. P., Benichou, M., Gibon, Y., Biais, B., Maury, P., Latché, A., Pech, J. C., Bouzayen, M., & Zouin, M. (2013). SIARF4, an Auxin Response Factor Involved in the Control of Sugar Metabolism during Tomato Fruit Development. *Plant Physiology*, 161(3), 1362. <https://doi.org/10.1104/PP.113.213843>
- Sajib, S. A., Kandel, M., Prity, S. A., Oukacine, C., Gakière, B., & Merendino, L. (2023). Role of plastids and mitochondria in the early development of seedlings in dark growth conditions. *Frontiers in Plant Science*, 14(September), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1272822>
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. (2a. ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sarvepalli, K., & Nath, U. (2018). CIN-TCP transcription factors: Transiting cell proliferation in plants. *IUBMB Life*, 70(8), 718–731. <https://doi.org/10.1002/iub.1874>
- Savitch, L. V., Subramaniam, R., Allard, G. C., & Singh, J. (2007). The GLK1 'regulon' encodes disease defense related proteins and confers resistance to *Fusarium graminearum* in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359(2), 234–238. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.05.084>
- Schindelin, J., Arganda-Carrera, I., Frise, E., Verena, K., Mark, L., Tobias, P., Stephan, P., Curtis, R., Stephan, S., Benjamin, S., Jean-Yves, T., Daniel, J. W., Volker, H., Kevin, E., Pavel, T., & Albert, C. (2009). Fiji - an Open platform for biological image analysis. *Nature Methods*, 9(7). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.Fiji>
- Schommer, C., Debernardi, J. M., Bresso, E. G., Rodriguez, R. E., & Palatnik, J. F. (2014). Repression of cell proliferation by miR319-regulated TCP4. *Molecular Plant*, 7(10), 1533–1544. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu084>
- Schommer, C., Palatnik, J. F., Aggarwal, P., Chételat, A., Cubas, P., Farmer, E. E., Nath, U., & Weigel, D. (2008). Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biology*, 6(9), 1991–2001. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060230>

- Shang, X., Han, Z., Zhang, D., Wang, Y., Qin, H., Zou, Z., Zhou, L., Zhu, X., Fang, W., & Ma, Y. (2022). Genome-Wide Analysis of the TCP Gene Family and Their Expression Pattern Analysis in Tea Plant (*Camellia sinensis*). *Frontiers in Plant Science*, *13*(July), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.840350>
- Shi, P., Guy, K. M., Wu, W., Fang, B., Yang, J., Zhang, M., & Hu, Z. (2016). Genome-wide identification and expression analysis of the CITCP transcription factors in *Citrullus lanatus*. *BMC Plant Biology*, *16*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12870-016-0765-9/FIGURES/7>
- Smyth, D. R., Bowman, J. L., & Meyerowitz, E. M. (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *2*(8), 755–767. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.8.755>
- Song, C. B., Shan, W., Yang, Y. Y., Tan, X. L., Fan, Z. Q., Chen, J. Y., Lu, W. J., & Kuang, J. F. (2018). Heterodimerization of MaTCP proteins modulates the transcription of MaXTH10/11 genes during banana fruit ripening. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1861*(7), 613–622. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2018.06.005>
- Steiner, E., Efroni, I., Gopalraj, M., Saathoff, K., Tseng, T. S., Kieffer, M., Eshed, Y., Olszewski, N., & Weiss, D. (2012). The *Arabidopsis* O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase SPINDLY Interacts with Class I TCPs to Facilitate Cytokinin Responses in Leaves and Flowers. *The Plant Cell*, *24*(1), 96. <https://doi.org/10.1105/TPC.111.093518>
- Steiner, E., Livne, S., Kobinson-Katz, T., Tal, L., Pri-Tal, O., Mosquna, A., Tarkowská, D., Mueller, B., Tarkowski, P., & Weiss, D. (2016). The Putative O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase SPINDLY Inhibits Class I TCP Proteolysis to Promote Sensitivity to Cytokinin. *Plant Physiology*, *171*(2), 1485. <https://doi.org/10.1104/PP.16.00343>
- Sullivan, J. A., & Gray, J. C. (1999). Plastid Translation Is Required for the Expression of Nuclear Photosynthesis Genes in the Dark and in Roots of the Pea *lip1* Mutant. *The Plant Cell*, *11*(5). <https://doi.org/10.1105/TPC.11.5.901>
- Sun, J., Qi, L., Li, Y., Chu, J., & Li, C. (2012). PIF4-Mediated Activation of YUCCA8 Expression Integrates Temperature into the Auxin Pathway in Regulating *Arabidopsis* Hypocotyl Growth. *PLoS Genetics*, *8*(3), 1002594. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1002594>
- Sun, L., Zou, X., Jiang, M., Wu, X., Chen, Y., Wang, Q. Q., Wang, Q. Q., Chen, L., &

- Wu, Y. (2020). The crystal structure of the TCP domain of PCF6 in *Oryza sativa* L. reveals an RHH-like fold. *FEBS Letters*, 594(8), 1296–1306. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13727>
- Sun, N., Wang, J., Gao, Z., Dong, J., He, H., Terzaghi, W., Wei, N., Deng, X. W., & Chen, H. (2016). *Arabidopsis SAURs are critical for differential light regulation of the development of various organs*. 113(21), 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604782113>
- Sun, T., Li, L., Huang, X. Q., Chen, W. C., Kong, M. J., Zhou, C. F., Zhuang, Z., & Lu, S. (2019). ORANGE represses chloroplast biogenesis in etiolated arabidopsis cotyledons via interaction with TCP14[OPEN]. *Plant Cell*, 31(12), 2996–3014. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00290>
- Sun, Yi, & Oberley, L. W. (1996). Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(3), 335–348. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)00109-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00109-8)
- Sun, Yu, Fan, X. Y., Cao, D. M., Tang, W., He, K., Zhu, J. Y., He, J. X., Bai, M. Y., Zhu, S., Oh, E., Patil, S., Kim, T. W., Ji, H., Wong, W. H., Rhee, S. Y., & Wang, Z. Y. (2010). Integration of Brassinosteroid Signal Transduction with the Transcription Network for Plant Growth Regulation in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 19(5), 765–777. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.010>
- Susek, R. E., Ausubel, F. M., & Chory, J. (1993). Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell*, 74(5), 787–799. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90459-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90459-4)
- Tachibana, R., Abe, S., Marugami, M., Yamagami, A., Akema, R., Ohashi, T., Nishida, K., Nosaki, S., Miyakawa, T., Tanokura, M., Kim, J., Seki, M., Inaba, T., Matsui, M., Ifuku, K., Kushiro, T., Asami, T., & Nakano, T. (2024). BPG4 regulates chloroplast development and homeostasis by suppressing GLK transcription factors and involving light and brassinosteroid signaling. *Nature Communications*, 15:340. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44492-5>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. (5a. ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Tamai, H., Iwabuchi, M., & Meshi, T. (2002). *Arabidopsis* GARP transcriptional activators interact with the Pro-rich activation domain shared by G-box-binding bZIP factors. *Plant and Cell Physiology*, 43(1), 99–107. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf011>

- Tang, W., Kim, T. W., Osés-Prieto, J. A., Sun, Y., Deng, Z., Zhu, S., Wang, R., Burlingame, A. L., & Wang, Z. Y. (2008). BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in Arabidopsis. *Science*, 321(5888), 557–560. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1156973/SUPPL_FILE/TANG.SOM.PDF
- Tang, W., Yuan, M., Wang, R., Yang, Y., Wang, C., Osés-Prieto, J. A., Kim, T. W., Zhou, H. W., Deng, Z., Gampala, S. S., Gendron, J. M., Jonassen, E. M., Lillo, C., DeLong, A., Burlingame, A. L., Sun, Y., & Wang, Z. Y. (2011). PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nature Cell Biology* 2011 13:2, 13(2), 124–131. <https://doi.org/10.1038/ncb2151>
- Tatematsu, K., Nakabayashi, K., Kamiya, Y., & Nambara, E. (2008). Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 53(1), 42–52. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2007.03308.X>
- Thieulin-Pardo, G., Avilan, L., Kojadinovic, M., & Gontero, B. (2015). Fairy “tails”: flexibility and function of intrinsically disordered extensions in the photosynthetic world. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2(MAY), 139844. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2015.00023/BIBTEX>
- Tokumar, M., Adachi, F., Toda, M., Ito-Inaba, Y., Yazu, F., Hirosawa, Y., Sakakibara, Y., Suiko, M., Kakizaki, T., & Inaba, T. (2017). Ubiquitin-Proteasome Dependent Regulation of the GOLDEN2-LIKE 1 Transcription Factor in Response to Plastid Signals. *Plant Physiology*, 173(January), 524–535. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01546>
- Tu, X., Ren, S., Shen, W., Li, J., Li, Y., Li, C., Li, Y., Zong, Z., Xie, W., Grierson, D., Fei, Z., Giovannoni, J., Li, P., & Zhong, S. (2022). Limited conservation in cross-species comparison of GLK transcription factor binding suggested wide-spread cistrome divergence. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35438-4>
- Uberti-Manassero, N. G., Lucero, L. E., Viola, I. L., Vegetti, A. C., & Gonzalez, D. H. (2012). The class i protein AtTCP15 modulates plant development through a pathway that overlaps with the one affected by CIN-like TCP proteins. *Journal of Experimental Botany*, 63(2), 809–823. <https://doi.org/10.1093/jxb/err305>
- Uberti Manassero, N. G., Viola, I. L., Welchen, E., & Gonzalez, D. H. (2013). TCP

- transcription factors: Architectures of plant form. *Biomolecular Concepts*, 4(2), 111–127. <https://doi.org/10.1515/bmc-2012-0051>
- Valsecchi, I., Guittard-Crilat, E., Maldiney, R., Habricot, Y., Lignon, S., Lebrun, R., Miginiac, E., Ruelland, E., Jeannette, E., & Lebreton, S. (2013). The intrinsically disordered C-terminal region of *Arabidopsis thaliana* TCP8 transcription factor acts both as a transactivation and self-assembly domain. *Molecular BioSystems*, 9(9), 2282–2295. <https://doi.org/10.1039/c3mb70128j>
- Vidal, M., Brachmann, R. K., Fatarey, A., Harlow, E. D., & Boeke, J. D. (1996). Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions (URA3/negative selection/5-fluoroorotic acid). *Genetics*, 93(September), 10315–10320.
- Viola, I. L., Alem, A. L., Jure, R. M., & Gonzalez, D. H. (2023). Physiological Roles and Mechanisms of Action of Class I TCP Transcription Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5437. <https://doi.org/10.3390/ijms24065437>
- Viola, I. L., Camoirano, A., & Gonzalez, D. H. (2016). Redox-dependent modulation of anthocyanin biosynthesis by the TCP transcription factor TCP15 during exposure to high light intensity conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 170(1), 74–85. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01016>
- Viola, I. L., & Gonzalez, D. H. (2023). TCP Transcription Factors in Plant Reproductive Development: Juggling Multiple Roles. *Biomolecules*, 13(5), 1–19. <https://doi.org/10.3390/biom13050750>
- Viola, I. L., Güttlein, L. N., & Gonzalez, D. H. (2013). Redox modulation of plant developmental regulators from the class I TCP transcription factor family. *Plant Physiology*, 162(3), 1434–1447. <https://doi.org/10.1104/pp.113.216416>
- Viola, I. L., Reinheimers, R., Ripoll, R., Uberti Manassero, N. G., & Gonzalez, D. H. (2012). Determinants of the DNA binding specificity of class I and class II TCP transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 287(1), 347–356. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.256271>
- Viola, I. L., Uberti Manassero, N. G., Ripoll, R., & Gonzalez, D. H. (2011). The *Arabidopsis* class I TCP transcription factor AtTCP11 is a developmental regulator with distinct DNA-binding properties due to the presence of a threonine residue at position 15 of the TCP domain. *Biochemical Journal*, 435(1), 143–155. <https://doi.org/10.1042/BJ20101019>

- Waadt, R., Schlücking, K., Schroeder, J. I., & Kudla, J. (2014). Protein fragment bimolecular fluorescence complementation analyses for the in vivo study of protein-protein interactions and cellular protein complex localizations. *Methods in Molecular Biology*, 1062(3), 629–658. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-580-4_33
- Wang, J., Sun, N., Zhang, F., Yu, R., Chen, H., Deng, X. W., & Wei, N. (2020). SAUR17 and SAUR50 Differentially Regulate PP2C-D1 during Apical Hook Development and Cotyledon Opening. 32(December), 3792–3811. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00283>
- Wang, M., Lee, J., Choi, B., Park, Y., Sim, H. J., Kim, H., & Hwang, I. (2018). Physiological and molecular processes associated with long duration of ABA treatment. *Frontiers in Plant Science*, 9(February), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00176>
- Wang, P., Fouracre, J., Kelly, S., Karki, S., Gowik, U., Aubry, S., Shaw, M. K., Westhoff, P., Slamet-Loedin, I. H., Quick, W. P., Hibberd, J. M., & Langdale, J. A. (2013). Evolution of GOLDEN2-LIKE gene function in C3 and C4 plants. *Planta*, 237(2), 481–495. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1754-3>
- Wang, Q., Xu, G., Zhao, X., Zhang, Z., Wang, X., Liu, X., Xiao, W., Fu, X., Chen, X., Gao, D., Li, D., & Li, L. (2020). Transcription factor TCP20 regulates peach bud endodormancy by inhibiting DAM5/DAM6 and interacting with ABF2. *Journal of Experimental Botany*, 71(4), 1585. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERZ516>
- Wang, Z.-Y., Bai, M.-Y., Oh, E., & Zhu, J.-Y. (2012). Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annual Review of Genetics*, 46(1), 701–724. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163450>
- Wang, Z.-Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Asami, T., & Chory, J. (2002). Nuclear-Localized BZR1 Mediates Brassinosteroid-Induced Growth and Feedback Suppression of Brassinosteroid Biosynthesis. *Developmental Cell*, 2, 505–513.
- Wang, Z. Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., & Chory, J. (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 2001 410:6826, 410(6826), 380–383. <https://doi.org/10.1038/35066597>
- Waters, M. T., Moylan, E. C., & Langdale, J. A. (2008). GLK transcription factors regulate chloroplast development in a cell-autonomous manner. *Plant Journal*, 56(3), 432–444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03616.x>

- Waters, M. T., Wang, P., Korkaric, M., Capper, R. G., Saunders, N. J., & Langdale, J. A. (2009). GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21(4), 1109–1128. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.065250>
- Wei, W., Hu, Y., Cui, M. Y., Han, Y. T., Gao, K., & Feng, J. Y. (2016). Identification and transcript analysis of the TCP transcription factors in the diploid woodland strawberry *Fragaria vesca*. *Frontiers in Plant Science*, 7(DECEMBER2016), 229140. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.01937/BIBTEX>
- Wei, Z., & Li, J. (2020). Regulation of Brassinosteroid Homeostasis in Higher Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11(September), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.583622>
- Wen, H., Chen, Y., Du, H., Zhang, L., Zhang, K., He, H., Pan, J., Cai, R., & Wang, G. (2020). Genome-Wide Identification and Characterization of the TCP Gene Family in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) and Their Transcriptional Responses to Different Treatments. *Genes* 2020, Vol. 11, Page 1379, 11(11), 1379. <https://doi.org/10.3390/GENES11111379>
- Weßling, R., Epple, P., Altmann, S., He, Y., Yang, L., Henz, S. R., McDonald, N., Wiley, K., Bader, K. C., Gläßer, C., Mukhtar, M. S., Haigis, S., Ghamsari, L., Stephens, A. E., Ecker, J. R., Vidal, M., Jones, J. D. G., Mayer, K. F. X., Ver Loren Van Themaat, E., ... Braun, P. (2014). Convergent targeting of a common host protein-network by pathogen effectors from three kingdoms of life. *Cell Host & Microbe*, 16(3), 364. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2014.08.004>
- Wu, G. Z., & Bock, R. (2021). GUN control in retrograde signaling: How GENOMES UNCOUPLED proteins adjust nuclear gene expression to plastid biogenesis. *Plant Cell*, 33(3), 457–474. <https://doi.org/10.1093/plcell/koaa048>
- Wu, G. Z., Chalvin, C., Hoelscher, M., Meyer, E. H., Wu, X. N., & Bock, R. (2018). Control of Retrograde Signaling by Rapid Turnover of GENOMES UNCOUPLED1. *Plant Physiology*, 176(3), 2472. <https://doi.org/10.1104/PP.18.00009>
- Wu, G. Z., Meyer, E. H., Richter, A. S., Schuster, M., Ling, Q., Schöttler, M. A., Walther, D., Zoschke, R., Grimm, B., Jarvis, R. P., & Bock, R. (2019). Control of retrograde signalling by protein import and cytosolic folding stress. *Nature Plants* 2019 5:5, 5(5), 525–538. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0415-y>
- Wu, J., Wu, W., Liang, J., Jin, Y., Gazzarrini, S., He, J., & Yi, M. (2019). GhTCP19

- Transcription Factor Regulates Corm Dormancy Release by Repressing GhNCED Expression in *Gladiolus*. *Plant and Cell Physiology*, 60(1), 52–62. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCY186>
- Xie, Y. G., Ma, Y. Y., Bi, P. P., Wei, W., Liu, J., Hu, Y., Gou, Y. J., Zhu, D., Wen, Y. Q., & Feng, J. Y. (2020). Transcription factor FvTCP9 promotes strawberry fruit ripening by regulating the biosynthesis of abscisic acid and anthocyanins. *Plant Physiology and Biochemistry*, 146, 374–383. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2019.11.004>
- Yang, C. J., Zhang, C., Lu, Y. N., Jin, J. Q., & Wang, X. L. (2011). The Mechanisms of Brassinosteroids' Action: From Signal Transduction to Plant Development. *Molecular Plant*, 4(4), 588–600. <https://doi.org/10.1093/MP/SSR020>
- Yang, L., Teixeira, P. J. P. L., Biswas, S., Finkel, O. M., He, Y., Salas-Gonzalez, I., English, M. E., Epple, P., Mieczkowski, P., & Dangl, J. L. (2017). *Pseudomonas syringae* type III effector HopBB1 promotes host transcriptional repressor degradation to regulate phytohormone responses and virulence. *Cell Host & Microbe*, 21(2), 156. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2017.01.003>
- Yasumura, Y., Moylan, E. C., & Langdale, J. A. (2005). A conserved transcription factor mediates nuclear control of organelle biogenesis in anciently diverged land plants. *Plant Cell*, 17(7), 1894–1907. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033191>
- Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., & Chory, J. (2005). A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell*, 120(2), 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.044>
- Yu, X., Li, L., Zola, J., Aluru, M., Ye, H., Foudree, A., Guo, H., Anderson, S., Aluru, S., Liu, P., Rodermel, S., & Yin, Y. (2011). A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 65(4), 634–646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04449.x>
- Yu, Z., Tian, C., Guan, Y., He, J., Wang, Z., Wang, L., Lin, S., Guan, Z., Fang, W., Chen, S., Zhang, F., Jiang, J., Chen, F., & Wang, H. (2022). Expression Analysis of TCP Transcription Factor Family in Autopolyploids of *Chrysanthemum nankingense*. *Frontiers in Plant Science*, 13(June), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.860956>
- Zhang, D., Tan, W., Yang, F., Han, Q., Deng, X., Guo, H., Liu, B., Yin, Y., & Lin, H. (2021). A BIN2-GLK1 Signaling Module Integrates Brassinosteroid and Light

- Signaling to Repress Chloroplast Development in the Dark. *Developmental Cell*, 56(3), 310-324.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.12.001>
- Zhang, N., Wang, Z., Bao, Z., Yang, L., Wu, D., Shu, X., & Hua, J. (2018). MOS1 functions closely with TCP transcription factors to modulate immunity and cell cycle in Arabidopsis. *Plant Journal*, 93, 66–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.13757>
- Zhang, W., Cochet, F., Ponnaiah, M., Lebreton, S., Matheron, L., Pionneau, C., Boudsocq, M., Resentini, F., Huguet, S., Blázquez, M., Bailly, C., Puyaubert, J., & Baudouin, E. (2019). The MPK8-TCP14 pathway promotes seed germination in Arabidopsis. *Plant Journal*, 100(4), 677–692. <https://doi.org/10.1111/tpj.14461>
- Zhang, Yi, Xu, Y., Nie, J., Chen, H., Qin, G., Wang, B., & Su, X.-D. (2023). DNA–TCP complex structures reveal a unique recognition mechanism for TCP transcription factor families. *Nucleic Acids Research*, 51(1), 434–448. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1171>
- Zhang, Yuanyuan, Li, B., Xu, Y., Li, H., Li, S., Zhang, D., Mao, Z., Guo, S., Yang, C., Weng, Y., & Chong, K. (2013). The cyclophilin CYP20-2 modulates the conformation of BRASSINAZOLE-RESISTANT1, which binds the promoter of FLOWERING LOCUS D to regulate flowering in arabidopsis. *Plant Cell*, 25(7), 2504–2521. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.110296>
- Zhao, X., Huang, J., & Chory, J. (2018). *genome uncoupled1* Mutants Are Hypersensitive to Norflurazon and Lincomycin. 178(November), 960–964. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00772>
- Zhou, H., Hwarari, D., Ma, H., Xu, H., Yang, L., & Luo, Y. (2022). Genomic survey of TCP transcription factors in plants: Phylogenomics, evolution and their biology. *Frontiers in Genetics*, 13(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1060546>
- Zhu, J. Y., Li, Y., Cao, D. M., Yang, H., Oh, E., Bi, Y., Zhu, S., & Wang, Z. Y. (2017). The F-box Protein KIB1 Mediates Brassinosteroid-Induced Inactivation and Degradation of GSK3-like Kinases in Arabidopsis. *Molecular Cell*, 66(5), 648-657.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.012>

ANEXOS

11. ANEXOS

11.1. Anexo 1: Lista de oligonucleótidos utilizados

Tabla 4: Lista de oligonucleótidos utilizados durante el desarrollo de esta tesis

Oligonucleótidos usados en las reacciones de amplificación por PCR para clonados y análisis genotípicos		
Nombre	Secuencia (5'-3')	Uso
GLK1 AD	cgc <u>GGATCCT</u> GTTAGCTCTGTCTCC	Clonado de GLK1 y GLK1 _{D1-D3} en el vector pGBKT7
GLK1 D1 R	cgc <u>GTCGAC</u> tcaCTCTTTTGACGGATG TAA	Clonado de GLK1 _{D1} en el vector pGBKT7
GLK1 D2 R	cgc <u>GTCGAC</u> tcaACCGGTGTCTACTCC ATA	Clonado de GLK1 _{D2} en el vector pGBKT7
GLK1 D3 R	cgc <u>GTCGAC</u> tcaGTCACTGTCACCGTC ATA	Clonado de GLK1 _{D3} en el vector pGBKT7
GLK1 D4 F	cgc <u>GGATCC</u> ACCGGAAAAGGAAGTAT TC	Clonado de GLK1 _{D4} en el vector pGBKT7
GLK1 D5 F	cgc <u>GGATCC</u> GTGCTAATCTTAATGGT CG	Clonado de GLK1 _{D5} en el vector pGBKT7
GLK1 R	cgg <u>CTCGAG</u> TTTCAGGCACAAGACGC	Clonado de GLK1 y GLK1 _{D4-D5} en el vector pGBKT7
T15GBK-F	ggg <u>GAATTC</u> CCGGATCATAACCATCG A	Clonado de Δ TCP15 en el vector pGADT7
TCPD15-R	ggc <u>AAGCTT</u> ctaAGTCCCTGTAGCGGC TAT	Clonado de Δ TCP15 en el vector pGADT7. Análisis genotípico de mutantes <i>tcp15-3</i>
GLK1-MBP	cgc <u>GGATCC</u> ATGTTAGCTCTGTCTC	Clonado de GLK1 en el vector pENTR 3C

pENTR-GLK1-R	gggCTCGAGGGCACAAGACGCGGTC GG	Clonado de GLK1 en el vector pENTR 3C
TCP10OE-F	gcgGAATTCATGGGACTTAAAGGATAT AGC	Clonado de TCP10 en el vector pENTR 3C
TCP10OE-R	gggCTCGAGGAGGTGTGAGTTTGGAG GAG	Clonado de TCP10 en el vector pENTR 3C
mTCP10-F	GTACCTTGCAAAGTAGTTTATTCCCT CATTGTTTC	Mutagénesis dirigida de <i>TCP10</i>
mTCP10-R	TAAACTACTTTGCAAGGTACCCCTTT GTTGTTGTTG	Mutagénesis dirigida de <i>TCP10</i>
pLHCB2.2-LUC-F	cgcGGTACCGTTTAATTGAACCATTG	Clonado del promotor del gen <i>LHCB2.2</i> en el vector pPM056.
pLHCB2.2-LUC-R	cgcAAGCTTAATCGTAATCTTTGTTTA ACTAC	Clonado del promotor del gen <i>LHCB2.2</i> en el vector pPM056.
pSAUR14-LUC-F	cgcGGTACCCAAGAACTCCTCAAA	Clonado del promotor del gen <i>SAUR14</i> en el vector pPM056.
pSAUR14-LUC-R	gcgGGATCCGGATTGTCTTTAATTGTA AGTTA	Clonado del promotor del gen <i>SAUR14</i> en el vector pPM056.
BZR1-Eco-F	ggGAATTCATGACTTCGGATGGAG	Clonado de BZR1 _N en los vectores pGADT7 y pGBKT7
BZR1-N-R	gcgGGATCCGATGAATATGGAGTTAC TCG	Clonado de BZR1 _N en los vectores pGADT7 y pGBKT7
BZR1-C-F	cccGAATTCTCACAGAACCAGAGCCC TC	Clonado de BZR1 _C en los vectores pGADT7, pGBKT7 y pENTR 3C.
BZR1-BamHI-R	ggcGGATCCTCAACCACGAGCCTTCC C	Clonado de BZR1 _C en los vectores pGADT7, pGBKT7 y pENTR 3C.
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	Análisis genotípico de mutantes

TCP15 EN R	ggcCTCGAGCTAGGAATGATGACTGG T	Análisis genotípico de mutantes <i>tcp15-3</i>
TCP15 EAR F	ggcTCTAGATCATCATCATCATGG ATC	Análisis genotípico de mutantes <i>tcp15-3</i>
spm32	TACGAATAAGAGCGTCCATTTAGAG TGA	Análisis genotípico de mutantes por T-DNA
gGLK1 F	GGCGTTTGGGTATTCGGGTC	Análisis genotípico de mutantes <i>glk1-1</i>
gGLK1 R	TCATAAGTCACCGTCTCCGC	Análisis genotípico de mutantes <i>glk1-1</i>
gTCP10 F	ACGGCAAGCATTTTGAAGAGG	Análisis genotípico de mutantes <i>tcp10-1</i>
gTCP10 R	TGAGTAGCTTCTTCTCCGTGG	Análisis genotípico de mutantes <i>tcp10-1</i>
gGLK2 F	TTCTCCGGCTCCAGTACTCA	Análisis genotípico de mutantes <i>glk2-1</i>
gGLK2 R	CGCGCTAGTAGATGTTTCCG	Análisis genotípico de mutantes <i>glk2-1</i>
35SprimF	TGACGCACAATCCCCTATCC	Análisis genotípico de plantas transformadas con construcciones que contienen el promotor <i>35SCaMV</i>
GFP-F	TCAAGGAGGACGGAAACATC	Análisis genotípico de <i>35S::TCP15-GFPi</i>
GFP-R	AAAGGGCAGATTGTGTGGAC	Análisis genotípico de <i>35S::TCP15-GFPi</i>
Nterm citrin R	TCGACCAGGATGGGCACC	Validación de fusiones a proteínas fluorescentes
Cterm citrin R	TACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	Validación de fusiones a proteínas fluorescentes

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

Oligonucleótidos usados para RT-qPCR y ChIP-qPCR		
Nombre	Secuencia (5'-3')	Uso
dTv	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	RT
ACT-F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	RT-qPCR y ChIP-qPCR
ACT-R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	RT-qPCR y ChIP-qPCR
q-SAUR6-F	GGGTGGCCTCACTATTCCCT	RT-qPCR
q-SAUR6-R	ATGAAGTGCTAAGGCGAGAGG	RT-qPCR
q-SAUR14-F	CGTACTTGACCAGCCTTCAT	RT-qPCR
q-SAUR14-R	ACTGCAAGGATTGTGAGGC	RT-qPCR
q-SAUR50-F	CAATCTCTCTTACAACGAGCCG	RT-qPCR
q-SAUR50-R	GGTGAGACCCATGTCGTGAT	RT-qPCR
q-SAUR51-F	TTAGTCTCGCGGACCTAGTCA	RT-qPCR
q-SAUR51-R	ACTTTACACATTTGACTGCACGC	RT-qPCR
q-SAUR63-F	AACGGAAGGACCAATCACATTACC	RT-qPCR
q-SAUR63-R	TCGTCTTTGGATCAGTTTGACGAG	RT-qPCR
q-EXPB1-F	CTGCCTCAACTTCTCCCCT	RT-qPCR
q-EXPB1-R	TGGAGATGGCTCACTCATTGTC	RT-qPCR
q-EXPB3-F	TGGTTTTGGATGGAGGAAGTGG	RT-qPCR
q-EXPB3-R	ACAAACAACCTTCAGAGATGGGA	RT-qPCR
q-EXP16-F	ACTGTGCTGGGGAGTTATGTG	RT-qPCR
q-EXP16-R	TTTTAAGAGCTGCGGGCTGT	RT-qPCR
q-LHCB1.4-F	CAACTTCGTCCCCGAAAGT	RT-qPCR
q-LHCB1.4-R	GCAACAAACCGGATACACACAA	RT-qPCR
q-LHCB2.2-F	GACGTTTGATGTGAATTTGGCAC	RT-qPCR
q-LHCB2.2-R	TGTCATGTGATTTTACTCTTGCC	RT-qPCR
q-LHCB2.4-F	GCAGTTATAAACGTGCTTAAGTTTC	RT-qPCR
q-LHCB2.4-R	TCAGTTTTAGCATAGGGACAGTT	RT-qPCR

q-LHCB4.3-F	ACATCAATCGTTCAAACCGGC	RT-qPCR
q-LHCB4.3-R	CCGTAAGCCACTAGACCAACA	RT-qPCR
q-GLK1-F	CCGGCTGTTGACGGTGTAT	RT-qPCR
q-GLK1-R	TCGCTTGCCCTACGGATCTTG	RT-qPCR
q-GLK2-F	AGTGCATGTATCGAAGTTAAGCAAC	RT-qPCR
q-GLK2-R	TGCAATGATGCTTCGGGAGT	RT-qPCR
q-TCP15-F	GGTGGCGGTGGAGAACATAG	RT-qPCR
q-TCP15-R	CGTCACGGTTTTGCTGGTTG	RT-qPCR
q-TCP14-F	GCAAGTTTCCGGCGACTCT	RT-qPCR
q-TCP14-R	CGGCAGAAAATCCCACCGTT	RT-qPCR
q-TCP10-F	ACTGGCGTTAGGCTGGGATA	RT-qPCR
q-TCP10-R	ACCGAAGAAATAGAAACCGCAAG	RT-qPCR
q-GLK1 OE-F	CCGTCAAAGAGAGCGTGGA	RT-qPCR
q-GLK1 OE-R	ATAACACCGTCAACAGCCGG	RT-qPCR
q-TCP10OE-F	CCACGGAGAAGAAGCTACTCA	RT-qPCR
q-TCP10OE-R	GAGGTGTGAGTTTGGAGGAGAA	RT-qPCR
q-BASTAR-F	AACTGGCATGACGTGGGTTT	RT-qPCR
q-BASTAR-R	ATTCGGTGACGGGCAGG	RT-qPCR
CHIP-LHCB1.4-F1	GGTTGGGGTATACGTCCACTTT	ChIP-qPCR
CHIP-LHCB1.4-R1	AGGACAAGATAACGACAATCCCA	ChIP-qPCR
CHIP-LHCB1.4-F2	ACACAAAGAACTTTGGGGAAAT	ChIP-qPCR
CHIP-LHCB1.4-R2	TTGGCGTTCGAAACAACTTGA	ChIP-qPCR
CHIP-LHCB2.2-F1	GACCTCTGGATCCTCCAGTACAT	ChIP-qPCR
CHIP-LHCB2.2-R1	GTGATGACTACTCGACCAGACC	ChIP-qPCR
CHIP-LHCB2.2-F2	GCACCACCACAACCATTACCA	ChIP-qPCR
CHIP-LHCB2.2-R2	CAAATGTACACGTCAGAGGGTTC	ChIP-qPCR
CHIP-SAUR14-F	CGGACCACGGCATGATAAGT	ChIP-qPCR
CHIP-SAUR14-R	TCTGTGGCAAGAAAGGAAAATTTGA	ChIP-qPCR
CHIP-SAUR50-F	ATCAGAAGGGGCCACAATGTC	ChIP-qPCR
CHIP-SAUR50-R	GAAGGAGATGGTGGGAGCCA	ChIP-qPCR

CHIP-TCP10-F	TTCTCATCTCTTTGGGAAAACCCCT	ChIP-qPCR
CHIP- TCP10-R	GCAGTCACAAGATTCAATGACCC	ChIP-qPCR
CHIP-GLK1-F1	CTTGAGGACCCATAGGACGTG	ChIP-qPCR
CHIP-GLK1-R1	ACGTGAATGAGGCTCGCAA	ChIP-qPCR
CHIP-GLK1-F2	GGGTTCTGGGTTTTCTGGGTTTAG	ChIP-qPCR
CHIP-GLK1-R2	CCAAACCGAACCCGACCCG	ChIP-qPCR
CHIP-GLK2-F1	GCAAGCCCAAGCTTCCTTGT	ChIP-qPCR
CHIP-GLK2-R1	CCCTGGAAAACGAGAGACATGA	ChIP-qPCR
CHIP-GLK2-F2	TCTTATAAGTTGATTTTGATTGGCTA	ChIP-qPCR
CHIP-GLK2-R2	CATAGGTATGCCATTAGAA	ChIP-qPCR

11.2. Anexo 2: Niveles de expresión de plantas transgénicas y mutantes utilizadas.

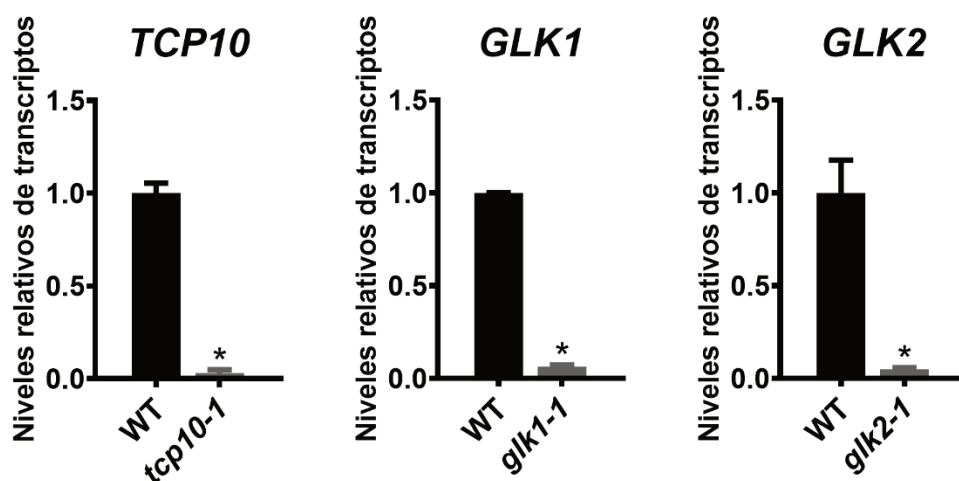


Figura 60: Niveles de expresión de *TCP10*, *GLK1* y *GLK2* en plantas mutantes simples en los genes correspondientes (*tcp10-1*, *glk1-1* y *glk2-1*). Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las plantas WT ($p < 0,05$; prueba t de Student).

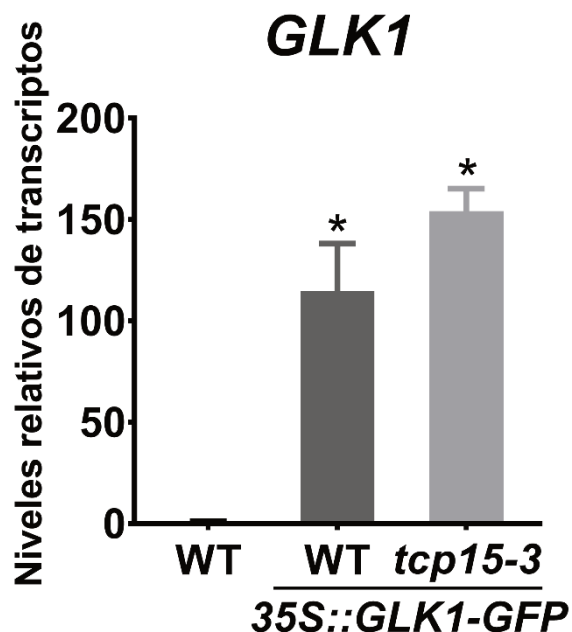


Figura 61: Niveles de expresión de plantas transgénicas que expresan la construcción *35S::GLK1-GFP* en fondo salvaje y mutante *tcp15-3*. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con las plantas WT ($p < 0,05$; prueba t de Student).

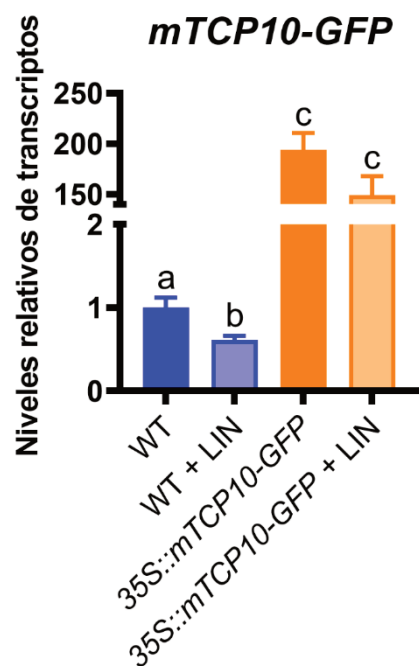


Figura 62: Niveles de expresión de plantas salvajes y *35S::mTCP10-GFP* cultivadas 3 días en luz continua ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con el agregado de DMSO (Control) o lincomicina (LIN). Los valores están relativizados a los de las plantas WT en condición control. Las barras indican la media \pm SEM de tres réplicas biológicas. Letras distintas indican diferencias significativas en comparación con las plantas WT control ($p < 0,05$; prueba t de *Student*).