



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**Tesis de Doctorado**

**“Función del microARN miR396 y los Factores de  
Transcripción GRFs en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*”**

Presentada por

**Lic. María Florencia Ercoli**

**Director: Dr. Ramiro E. Rodríguez**

**Rosario, Santa Fe, Argentina**

**2017**

# **“Función del microARN miR396 y los Factores de Transcripción GRFs en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*”**

María Florencia Ercoli

Licenciada en Biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre Abril de 2012 y Febrero de 2017, bajo la dirección del Dr. Ramiro Esteban Rodríguez Virasoro.

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

#### **Publicaciones científicas.**

- Rodriguez RE, Ercoli MF, Debernardi JM, Breakfield NW, Mecchia MA, Sabatini M, Cools T, De Veylder L, Benfey PN, Palatnik JF (2015). MicroRNA miR396 Regulates the switch between stem cells and transit-amplifying cells in Arabidopsis roots. doi:10.1105/tpc.15.00452. The Plant Cell.
- Ercoli MF, Rojas AM, Debernardi JM, Palatnik JF and Rodriguez, RE. (2016). Control of cell proliferation and elongation by miR396. doi: 10.1080/15592324.2016.1184809. Plant Signaling & Behavior.

#### **Presentaciones a congresos.**

Ercoli MF, Mecchia MA, Debernardi JM, Palatnik JF, Rodriguez RE. "Function of miR396 and GROWTH REGULATING FACTORS transcription factors in Arabidopsis root development". **XLVI Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología molecular**. Puerto Madryn, 30 de Noviembre al 3 de Diciembre de 2010.

Ercoli MF., Debernardi JM., Sabatini M., Mecchia MA., Palatnik JF., Rodríguez RE. "Function of miR396 and GROWTH REGULATING FACTORS transcription factors in *Arabidopsis thaliana* root development". **XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal**. Mar del Plata 17 al 30 de Septiembre de 2012.

Ercoli M.F., Debernardi J.M., Sabatini M., Palatnik J., Rodriguez R.E. "Regulación de la proliferación celular en plantas por el microARN miR396". **XXXIV Jornadas Argentinas de Botánica**. La Plata, Argentina. Del 2 al 6 de Septiembre de 2013.

Rodriguez RE, Ercoli MF, Debernardi JM, Breakfield NW, Mecchia MA, Perrone AP, Sabatini M, Cools T, De Veylder L, Benfey PN, Palatnik JF. "Control of root development by miR396 and GROWTH-REGULATING FACTOR transcription factors". **Congreso Internacional de Biología Molecular en plantas**. Cataratas del Iguazú, Brasil. Del 25 al 30 de octubre de 2015.

Rodriguez RE, Debernardi JM, Ercoli MF, Schommer C, Palatnik JF. "Control of plant development by microRNA miR396" -presentación oral. **Congreso Internacional de Biología Molecular en plantas**. Cataratas del Iguazú, Brasil. Del 25 al 30 de octubre de 2015.

*The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries,  
is not "Eureka!" (I found it!) but "That's funny ..."*

*- Isaac Asimov.*

Porque durante estos cinco años de Tesis me *DiVerTí*, porque sentí que estaba haciendo lo que me apasionaba, porque la curiosidad fue una de las grandes impulsoras y porque esto no podría haber sido lo que es sin la ayuda de otros... **Gracias!**

Rama y Javier, gracias por aceptarme cuando quise ser parte del labo, por los consejos del día a día, por sobre todo por la paciencia (Cuanta paciencia). Me llevo del lab, lo mejor que un doctorado me puede dejar, que es la posibilidad de pensar críticamente, todavía falta ... pero este es un gran comienzo.

Carla, sos lo mas, y lo sabes, vamos a hacer mate?.

Gracias los primeros miembros del Lab // Entrar en un labo no es fácil. Nico, gracias por todos esos chocolates conceptuales que siempre nos daban la oportunidad de charlar luego de tus viajes. Arni, gracias por siempre brindarme una abrazo, una sonrisa y un ...vamos Florchu !. Juan, Deber, un hermano mayor, gracias por trasmitirme uno de los grandes conceptos que me impulsaron en estos años "Simplemente no podés dejarlo ir....No". Uci, no tendría a mano un script que me permita darte gracias por el aguante :). Luiyi! gracias por el tango y la buena onda !

A los miembros actuales del lab, que mas allá de pipetear a la par se volvieron grandes amigos, Gracias Pingüinos ... gracias Young Private, Cabito, Anto, por la dulzura y la garra con la que llevas el día a día. Rico, Arantxa, esa bolsa de sorpresas que sabe todo, Como voy a seguir sin vos!. Golhija, Camilita, llegaste sin pingüino con el cual nombrarte, pero bien podrías ser el Rey Julian, gracias por tu locura, tu aguante infinito, sabes que te adoro! Y que sería de Kulwosky (Yo) sin su Skipper... gracias Belencita, Moshilu, Bebu. Arrancamos la facu con tus ojotas de pasto (que sería el equivalente a la pata izquierda pero divertida) y el parlantito, y después de muchos años nos volvimos a cruzar arrancando con "Para... que esto no es agregar amigos al facebook" y desde ahí pasamos por tantas cosas más (un doctorado!)... Somos Tan diferentes, pero tan parecidas ... Te quiero.

Maty, gracias por ese silencio complice, Ana por los millones de plantas genotipeadas y Julita por la "TrenzaTransgénica". Santiaguito, el más nuevito, bienvenido. Gracias a los compañeros del lab Carrillo, Pauli, la Colo y el rodri, compartimos no sólo el espacio físico y sino también la buena onda.

Gracias a las chicas de Lavado y Esterilización, Clau, Vivi, Lilo, Silvita y Ester. Porque son parte fundamental del laburo del día a día, gracias también por compartir un mate, unas masitas, un buenos días... :)

Por los almuerzos en la cocina del piso 1, donde corremos para ganarle el nicho ecológico a los Villanos ... y si no ganamos, lo compartimos. Hola Nahuel! ... porque ese reggeton te sienta, y no, no voy a empezar a fumar ahora que estoy escribiendo la tesis.

A Rodriguito, por las infinitas horas de confocal, por la columela, CQ y por que la "Cumbia me divierte...Inesita".

A una gran amiga que me trajo la FBioyF, una compañera de la Vida, EuGe "piChunPichun" gracias por todo lo que compartimos, primero en forma de trabajos prácticos... con el que estás haciendo euge ...FILTRANDO! pero luego en forma de sencilla amistad.

Porque el Flamenco fue siempre un cable a tierra, y me dejo dos hermanas, Flor y Xime.

Dani, mi genial teacher de inglés, la vida es un constante aprender, y adoro hacerlo al lado tuyo.

Agradezco el amor incondicional de mi Familia. El aguante de mis viejos, yo no sería lo que soy si no fuera por ustedes, no tengo palabras que me permitan describir lo mucho que los quiero. A mis hermanos Guillermo (el mayor, casi un segundo viejo para mí), Mauricio (Del otro lado del charlo, pero siempre presente) y Riki ( el más chico, pero aún así más grande y compañero), a mis cuñadas y a mis adorables sobrinos.

A la Tata, mi madrina, que siempre estuvo, está y va a estar. Gracias Tata, te quiero. A la tía, que es mi segunda mama. Y a la abuela que desde donde quiera que este, seguro va a levantar la copa y va brindar !.

A Juan, The BBB, The Bad Belgium Boy ... Thanks for walking with me, hand by hand, during this last years of the Thesis. Because "...The arithmetic of life does not always have a logical answer" (Inshirah Abdur-Rauf) & Because ... "The rest is Rust and Stardust" (Vladimmir Nabokov)... I love u! (The best is Yet to come!).

# Índice General.

1. Resumen.....	4
2. Abreviaturas y términos tomados del inglés.....	6
3. Introducción. ....	8
3.1. Desarrollo primario post embrionario en plantas a partir de los meristemas apicales del vástago y de la raíz. ....	8
3.2. miR396/ <i>GRF/GIF</i> y su rol en el desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	10
3.2.1. Factores de transcripción de la familia de <i>GROWTH REGULATING FACTORS</i> ( <i>GRFs</i> ). ....	11
3.2.2. <i>GRF-INTERACTING FACTORS</i> .....	13
3.2.3. Regulación de la expresión de los <i>GRFs</i> por el miR396.....	15
3.2.4. Rol del sistema <i>GRFs/GIFs/miR396</i> en el desarrollo vegetativo. ....	18
3.3. Desarrollo del sistema radicular en <i>Arabidopsis</i> .....	21
4. Objetivos.....	25
4.1. Objetivo general.....	25
4.2. Objetivos particulares. ....	25
5. Materiales y Métodos. ....	26
5.1. Metodología para el clonado de fragmentos de ADN.....	26
5.1.1. Cepas bacterianas empleadas.....	26
5.1.2. Vectores plasmídicos utilizados. ....	26
5.1.3. Vectores utilizados en esta tesis. ....	26
5.1.4. Extracción de ADN genómico de <i>Arabidopsis</i> . ....	27
5.1.5. Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	28
5.1.6. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	29
5.1.7. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.....	29
5.1.8. Ligación de fragmentos de ADN. ....	29
5.1.9. Transformación bacteriana. ....	30
5.1.10. Minipreparaciones de ADN plasmídico.....	31
5.2. Material vegetal utilizado y obtención de plantas transgénicas.....	31
5.2.1. Ecotipos y mutantes utilizados, y condiciones de crecimiento.....	31
5.2.2. Transformación de <i>Arabidopsis</i> .....	34
5.2.3. Recolección y esterilización de semillas.....	34
5.2.4. Selección de transformantes.....	34

5.3. Caracterización del sistema radicular de las plantas y microscopía. ....	35
5.3.1. Condiciones de crecimiento. ....	35
5.3.2. Medidas de elongación de raíz primaria. ....	35
5.3.3. Microscopia y caracterización celular del sistema radicular. ....	36
5.3.4. Estimación de la Duración del Ciclo Celular. ....	36
5.4. Cuantificación del nivel de expresión génica. ....	36
5.4.1. Extracción de ARN. ....	36
5.4.2. Cuantificación y chequeo de la integridad del ARN purificado. ....	37
5.4.3. Tratamiento del ARN preparado con ADNasa. ....	37
5.4.4. Retrotranscripción (RT). ....	37
5.4.5. Retrotranscripción para analizar la expresión de miARNs. ....	38
5.4.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. ....	39
5.4.7. Análisis de transcriptoma por RNAseq. ....	41
5.4.8. Recursos bioinformáticos. ....	42
6. Resultados Capítulo 1. ....	43
6.1. Introducción. ....	43
6.2. Resultados. ....	44
6.2.1. El microARN miR396 contribuye a determinar la arquitectura del meristema radicular. ....	44
6.2.2. Suprimir la función del microARN miR396 reduce el tamaño del meristema radicular. ....	49
6.2.3. El microARN miR396 modula la progresión a través del ciclo celular. ....	53
6.2.4. El microARN miR396 controla las divisiones generativas periclinales. ....	56
6.2.5. El microARN miR396 excluye a los <i>GRFs</i> del SCN. ....	59
6.2.6. Deficiencias en <i>GRFs</i> en el meristema activa la expresión de genes marcadores de SCN en las TACs. ....	60
6.2.7. Los genes <i>PLTs</i> son necesarios para la expresión del microARN miR396 en el SCN. ....	64
6.3. Discusión. ....	65
6.3.1. Los <i>GRFs</i> como marcadores de las TACs en el meristema apical de la raíz. ....	65
6.3.2. Los <i>GRFs</i> reprimen las propiedades de SC en las TACs. ....	66
6.3.3. La exclusión de los <i>GRFs</i> del SCN mediada por el miR396 es esencial. ....	67
6.3.4. La interacción regulatoria entre miR396, <i>GRF</i> y <i>PLT</i> controla la transición entre SC y TACs. ....	68
7. Resultados Capítulo 2. ....	69
7.1. Introducción. ....	69
7.2. Resultados. ....	70
7.2.1. Los genes de la familia <i>GIFs</i> regulan de manera redundante el desarrollo radicular. ....	70

7.2.2. Las mutantes <i>gif</i> presentan una expansión del carácter de SC en el meristema radicular. ....	73
7.2.3. Los <i>GIFs</i> participan en mantenimiento del CQ. ....	75
7.2.4. Los <i>GIFs</i> son necesarios para el mantenimiento de los diferentes dominios en el eje longitudinal de la raíz. ....	77
7.2.5. <i>AN3</i> determina las TACs y el CQ a través de diferentes vías genéticas. ....	79
7.3. Discusión. ....	84
7.3.1. Los cofactores de la familia <i>GIF</i> actúan de manera redundante regulando el desarrollo del sistema radicular. ....	84
7.3.2. La inactivación de los <i>GIFs</i> tiene efectos opuestos en el CQ y en las TACs. ....	84
8. Resultados Capítulo 3. ....	88
8.1. Introducción. ....	88
8.2. Resultados. ....	89
8.2.1. Identificación de genes regulados por <i>AN3</i> y <i>GRF3</i> . ....	89
8.2.2. Análisis bioinformático de los datos obtenidos por RNAseq. ....	93
8.2.3. Patrón de expresión de los genes que responden a la regulación por <i>AN3</i> y <i>GRF3</i> . ....	97
8.2.4. Identificación de un mecanismo de regulación de los genes <i>PLT</i> por GRF/GIF. ....	100
8.3. Discusión. ....	104
8.3.1. Análisis genómico de la red regulatoria de <i>AN3</i> y <i>GRF3</i> en raíces. ....	104
8.3.2. El sistema miR396/GRF/GIF junto con las hormonas peptídicas de la familia GLVs regulan el patrón de expresión de los genes PLTs y determinan los límites de las diferentes zonas de desarrollo de la raíz. ....	105
8.3.3. Perspectivas de trabajo. ....	108
9. Conclusiones. ....	109
10. Anexo. ....	111
11. Referencias Bibliográficas. ....	149

## 1. Resumen.

Las plantas dependen de las células madres (SC, del inglés Stem Cells) para la generación de los diferentes tipos celulares que constituyen sus órganos. Las SC se localizan dentro de contextos celulares específicos, llamados nichos de células madre (SCN, del inglés Stem Cell Niche). Mientras que las SC se dividen lentamente para generar diferentes tipos celulares, su progenie generalmente experimenta divisiones celulares rápidas de amplificación que aseguran el correcto crecimiento del órgano. Posteriormente, estas células se diferencian y adquieren su tamaño y forma final. A lo largo del eje longitudinal de la raíz se pueden identificar claramente diferentes zonas de desarrollo abocadas a procesos de generación de nuevos tipos celulares, proliferación celular, elongación y maduración.

La familia de factores de transcripción *GROWTH-REGULATING FACTOR (GRF)* es una pequeña familia de genes que se encuentra ampliamente conservada en plantas y se encuentra definida por la presencia de dos dominios protéicos llamados, WRC y QLQ. La expresión de los *GRFs* se encuentra reprimida a nivel post-transcripcional a través de la actividad del microARN miR396. Como resultado de esta regulación, estos factores de transcripción se expresan preferentemente en tejidos en proliferación celular donde promueven la división celular. La actividad de los *GRFs* también se encuentra regulada por la interacción con una pequeña familia de genes, conocida como *GRF INTERACTING FACTORS (GIFs)* que en *Arabidopsis*, está compuesta por tres miembros: *ANGUSTIFOLIA3 (AN3)*, también conocido como *GIF1*, *GIF2* y *GIF3*.

En este trabajo de tesis describimos el papel de la red regulatoria conformada por el miR396, los *GRFs* y sus coactivadores *GIFs* en el control del desarrollo de la raíz. Realizamos la caracterización fenotípica de plantas con niveles alterados de los diferentes componentes del sistema, el análisis de sus patrones de expresión y la evaluación de la interacción con otras vías regulatorias que controlan el desarrollo radicular.

En primer lugar, mostramos que el miR396 regula la transición de las SC a las células en activa proliferación (TACs, del inglés "transit-amplifying cells"). Los *GRFs* se expresan en TACs, pero son excluidos de las SC gracias a la regulación por el miR396. A su vez, los factores de transcripción *GRF* reprimen genes normalmente expresados SC en las TACs, siendo esto esencial para la rápida progresión del ciclo celular, característica distintiva de esta zona que posibilita la amplificación del número de células del órgano en crecimiento. Además, encontramos que al suprimir la regulación de la expresión de los *GRFs* por el miR396 en el SCN ocurre una distorsión de la organización del centro quiescente (CQ). Estos resultados demuestran que las interacciones entre el miR396, los *GRFs* y los

genes específicos de SC son necesarias para establecer el límite entre el SCN y la región de activa proliferación celular.

A continuación, describimos la función de los *GIFs*, que si bien no pueden unirse al ADN *per se*, interactúan físicamente con los *GRFs*, funcionando como coactivadores transcripcionales de estos FTs. Además de la interacción con los *GRFs*, se ha visto que AN3 interactúa con componentes de complejos de remodelación de la cromatina tales como la ATPasa SWI/SNF BRAHMA. Encontramos que los *GIFs* actúan en las TACs junto con los *GRFs* para reprimir los genes normalmente expresados en las SC. Sin embargo, una inspección más detallada indicó que los *GIFs* también forman parte de una vía regulatoria independiente de los *GRFs* necesaria para mantener la integridad del CQ. Estos resultados indicaron que los *GIFs* regulan la expresión de los mismos genes en formas opuestas, dependiendo del contexto celular quizás mediante la formación de diferentes complejos.

Finalmente, se generaron herramientas y se llevaron a cabo experimentos de transcriptómica para comenzar a dilucidar la red regulatoria controlada por los complejos *GRF/GIF* en el sistema radicular. Los datos obtenidos se utilizaron para identificar candidatos a ser regulados de forma directa por estos factores de transcripción. La información y las herramientas generadas son importantes para comprender los mecanismos moleculares por los cuales los *GRFs* y *GIFs* regulan diferentes procesos de desarrollo.

## 2. Abreviaturas y términos tomados del inglés

A	Adenosina.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNasa	ADN nucleasa.
ADNc	ADN complementario.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNasa	ARN nucleasa.
ARNm	ARN mensajero.
ATP	Adenosín trifosfato.
CQ	Centro quiescente.
C	Citosina.
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina.
DPS	Días Post Siembra.
EE	Error estándar.
G	Guanina.
GFP	Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein).
LB	Medio de cultivo para bacterias Luria-Bertani.
miARN	MicroARN.
MS	Medio de cultivo para plantas Murashige-Skoog.
nt	Nucleótidos.
pb	Pares de base.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN.
RT	Retrotranscripción.
RT-qPCR	Transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real cuantitativa.
SAM	Meristema Apical del Vástago (Shoot Apical Meristem).
RAM	Meristema Apical de la raíz (Root Apical Meristem).

RNAseq	Secuenciación de alto rendimiento del ARN.
SMC	Sitio de Múltiple Clonado.
SCN	Nicho de células madre (Stem Cell Niche).
SC	Célula Madre (Stem Cell).
T	Timina.
T1	Líneas transgénicas primarias.
T-ADN	Fragmento de ADN plasmídico transferido al genoma nuclear en las transformaciones con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
U	Uracilo.
ZM	Zona Meristemática.
ZE	Zona de Elongación.
Z Mad	Zona de Maduración.
ZT	Zona de transición.

## **INTRODUCCIÓN.**

### 3. Introducción.

#### 3.1. Desarrollo primario post embrionario en plantas a partir de los meristemas apicales del vástago y de la raíz.

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

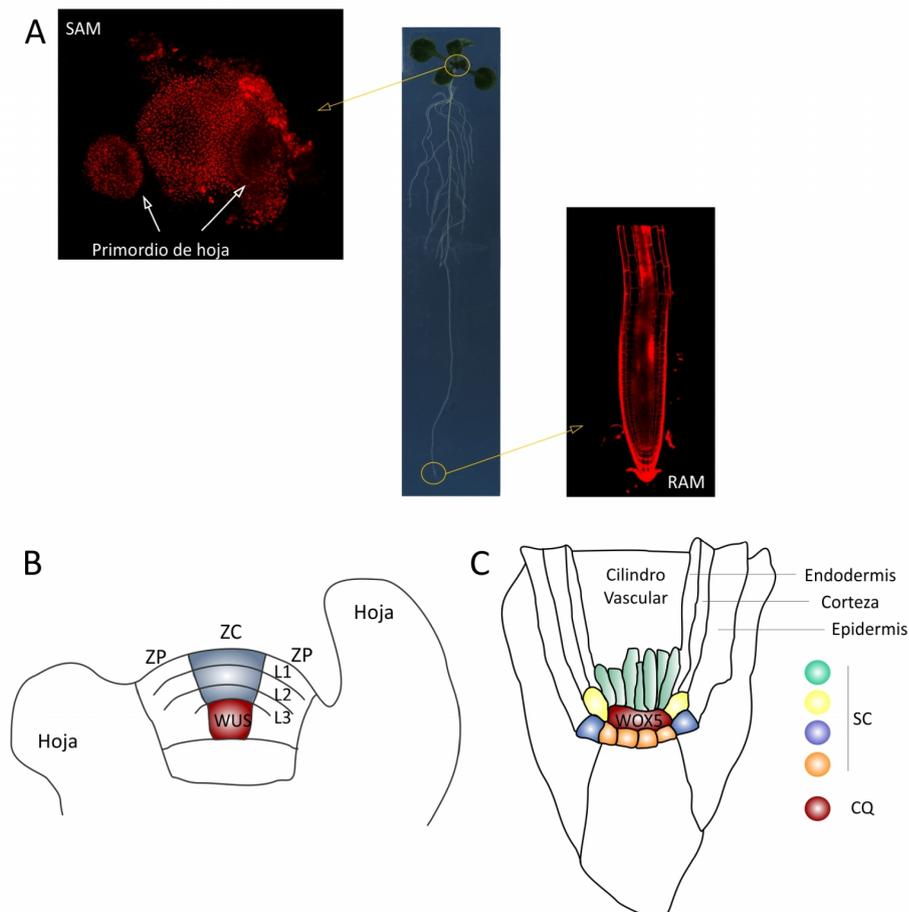
Cuando una semilla germina, el desarrollo post embrionario de la raíz y del vástago es impulsado por la actividad continua de las células madres (SC, del inglés "Stem Cells") pluripotentes, las cuales residen en microambientes llamados meristemas. Dos meristemas primarios, el meristema apical del vástago (SAM, de "shoot apical meristem") y el meristema apical de la raíz (RAM, de "root apical meristem"), son responsables tanto del desarrollo de nuevos órganos como del crecimiento longitudinal de la planta y se localizan en la punta del tallo y la raíz, respectivamente (Figura I.1A). Además, algunas plantas desarrollan un meristema secundario, el cambium, que les permite crecer radialmente, y que aporta células a su vasculatura y genera las estructuras mecánicas de soporte (1). El control de la pluripotencia de las SC durante toda la vida de una planta, incluso adulta, es un proceso clave, ya que, a diferencia de lo que sucede con los animales, los órganos que definen el cuerpo de la planta se generan mayormente luego de la embriogénesis.

El SAM genera tallo, hojas y también meristemas laterales durante la ontogenia del vástago. El mismo consiste en una estructura en forma de domo organizada en tres capas clonalmente distintas: Las capas L1 y L2, que son las dos capas más externas, en donde las células se dividen exclusivamente de manera anticlinal, y por último la capa L3, situada por debajo de L2, en donde las células se dividen en todas las orientaciones (Figura I.1B). A través de estudios moleculares y genéticos se han definido dominios funcionales en el SAM (Figura I.1B) que incluyen una zona central (ZC) donde se localizan las SC, por debajo de la cual se encuentra el centro organizador (CO) el cual es esencial para mantener la pluripotencia en las SC (Figura I.1B). Las SC se dividen raramente y parte de su progenie se desplaza lateralmente hacia la zona periférica (ZP), que exhibe una tasa de división celular mucho mayor (2). Como consecuencia de estas divisiones, las células son empujadas continuamente más hacia la periferia, donde finalmente son reclutadas para formar los órganos laterales y el tallo.

Dos clases de factores de transcripción con homeodominio tienen papeles esenciales en la formación y mantenimiento del SAM. El grupo de células del CO del meristema expresa el gen *WUSCHEL* (*WUS*), y esto define en la capa superior de células el nicho de células madre (SCN, del

inglés "Stem Cell Niche")(3). El otro factor de transcripción con homeodominio es *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, un gen de la familia de homeobox tipo *KNOTTED1 (KNOX)* (4). La expresión de este no está confinada a un pequeño grupo de células como *WUS*, sino que se expresa en todo el meristema y previene la diferenciación temprana de células (4).

En el extremo extremo basal de la planta, el RAM contiene las SC que darán a lugar a todos los tejidos subterráneos (Figura I.1A). En contraste con el SAM, la estructura celular del RAM sigue una organización altamente estereotipada (Figura I.1C), con todas las SC rodeando una región "organizadora" llamada centro quiescente (CQ) (5). El CQ se compone de un pequeño número de células que rara vez se dividen y se caracterizan por la expresión del gen *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5)*, un homólogo de *WUS* (6). En los últimos años se han llevado a cabo estudios genéticos y genómicos con el objetivo de estudiar los mecanismos de control de la quiescencia y su relevancia para el mantenimiento de la homeostasis del SCN. Estos estudios mostraron que la quiescencia no se requiere para el mantenimiento de las SC, sino más bien para mantener el crecimiento ante un estrés genotóxico, lo que permite que el CQ actúe como un reservorio que permite la reposición de SC después de la lesión (7-9). En el SCN, las SC se dividen lentamente para generar dos células hijas con diferentes destinos. La célula hija adyacente al QC permanece como SC, mientras que la otra célula hija puede sufrir una división asimétrica que generará los diferentes tipos celulares que integran el órgano en desarrollo (10).



**Figura 1.1. Estructura y organización celular de los meristemas apicales de las plantas. (A)** Se muestra una plantula de *Arabidopsis* de 14 días luego de la siembra. En forma ampliada se observan imágenes obtenidas por LSCM de un meristema apical del vástago (SAM, izquierda), visto desde arriba; o de un meristema apical de la raíz (RAM, derecha), en una sección longitudinal media. **(B)-(C)** Representación esquemática de secciones longitudinales media del SAM **(B)** y RAM **(C)** mostrando los correspondientes dominios funcionales.

En los últimos años, ha comenzado a surgir un cuadro refinado que describe los diferentes componentes involucrados en la regulación de la actividad de los meristemas, el mismo implica la interacción entre fitohormonas, redes regulatorias que involucran diferentes familias de factores de transcripción y ARN pequeños, y los componentes de la maquinaria de remodelación de la cromatina. Este análisis resulta de particular interés ya que los grupos de SC pluripotentes que se encuentran activos de manera permanente en los meristemas representan una caja de herramientas celulares ideal para permitir a las plantas afrontar las fluctuaciones sustanciales de su entorno directo.

### 3.2. miR396/*GRF/GIF* y su rol en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

Numerosas redes regulatorias han sido implicadas en el establecimiento y el mantenimiento de los meristemas, como así también en la promoción de la proliferación celular de los primordios de órganos que se desarrollan a partir de los mismos. En este conjunto de redes regulatorias se incluye a

la red que involucra a la familia de factores de transcripción *GROWTH REGULATING FACTORS* (*GRF*), junto con la familia de co-factores de transcripción *GRF INTERACTING FACTOR* (*GIF*) y el microARN miR396.

### 3.2.1. Factores de transcripción de la familia de *GROWTH REGULATING FACTORS* (*GRFs*).

Los genes de la familia *GRF* no sólo se han encontrado en todos los genomas de plantas terrestres, incluyendo representantes de angiospermas y gimnospermas, sino también en el musgo *Physcomitrella patens* y la licófito *Selaginella moellendorffii* (11). Hasta el momento, no se ha identificado a los *GRFs* en los genomas de clorófitas o cariófitas, ni en especies de otros reinos, lo que indica que esta familia de FT es específica de embriófitas, los miembros multicelulares más complejos de reino Plantae. El miembro fundador de la familia *GRF* es el *GROWTH-REGULATING FACTOR 1* (*OsGRF1*) de *Oryza sativa*. El mismo fue identificado como uno de los genes inducidos en los entrenudos de *O. sativa* en respuesta a giberelinas (GA,(12)).

En *Arabidopsis thaliana*, la familia *GRF* está compuesta por nueve miembros (13, 14) (Figura I.2). Esta familia se define por la presencia de dos dominios proteicos altamente conservados en la región N-terminal. El dominio QLQ, llamado así por las secuencia conservada Gln-Leu-Gln (Figura I.2), presenta homología a la región N-terminal de la proteína de levadura SWITCH2/SUCROSE NONFERMENTING2 (SWI2/SNF2), una ATPasa que participa en procesos de remodelación de la cromatina (12, 15). La región N-terminal de SWI2/SNF2 media la interacción con otros componentes del complejo de remodelación de la cromatina en levaduras y, de la misma manera, el dominio QLQ de los *GRFs* está implicado en interacciones proteína-proteína (13, 16). El dominio WRC contiene una señal funcional de localización nuclear y un supuesto motivo de unión al ADN de tipo dedos de Zinc (Zn) formado por tres cisteínas y una histidina conservadas (CX<sub>9</sub>CX<sub>10</sub>CX<sub>2</sub>H). Es interesante que el arreglo particular de estos residuos de cisteínas e histidina se ha encontrado solo en plantas (12, 16).

Estas características sugirieron que los *GRFs* actuarían como factores de transcripción (12, 16). Esta idea estaba soportada además por experimentos realizados en levadura donde se demostró que los mismos tendrían actividad de transactivación transcripcional (16). Por otro lado, en cebada ha sido descrito un represor, denominado HRT, que se une a un elemento de respuesta a giberelinas a través de un motivo de dedos de zinc (CX<sub>9</sub>CX<sub>10</sub>CX<sub>2</sub>H) similar (12, 17).

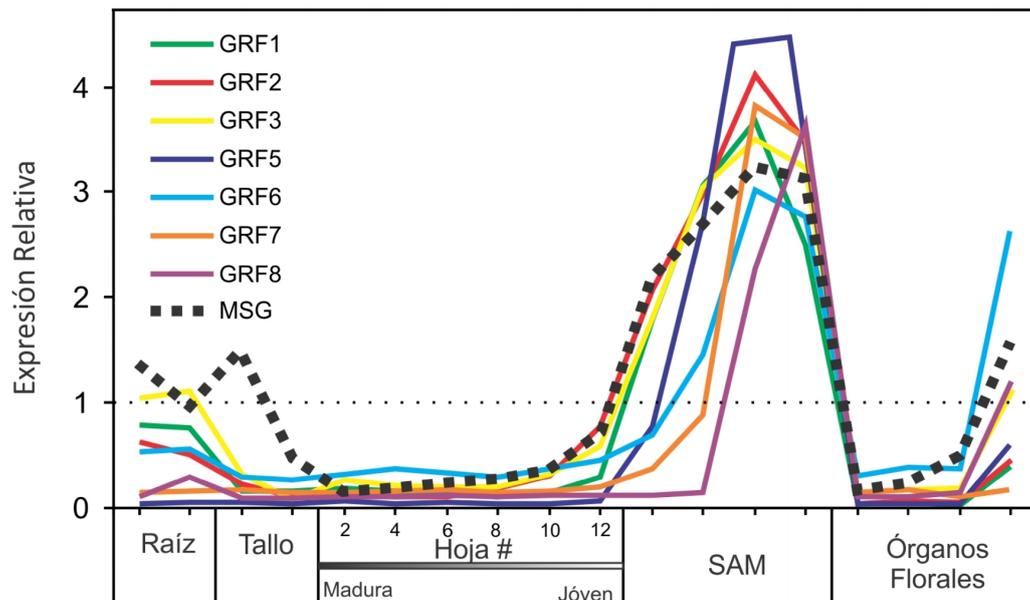
La región C-terminal de las proteínas *GRF* es la más divergente, tanto en longitud como en secuencia de aminoácidos, entre los miembros de esta familia de factores de transcripción (FTs). Este dominio es rico en residuos de Pro, Gln, His, Ala/Gly, y Ser/Thr, aminoácidos que se encuentran con frecuencia en dominios de transactivación transcripcional de otros FTs (18). De hecho, los estudios

de delección realizados en varios GRFs de Arabidopsis y de arroz indicaron que la región C-terminal es responsable de la actividad de transactivación transcripcional en protoplastos de levadura o Arabidopsis (19, 20).



**Figura I.2. Los GRFs son una familia de FTs específicos de plantas.** Esquema de los nueve GRFs de Arabidopsis. Se indican los dominios proteicos QLQ y WRC conservados que definen la familia. En rojo se indica la región C-terminal de GRF1, GRF2, GRF5 y GRF7 que presentan actividad de transactivación transcripcional(14, 21).

El análisis de los patrones de expresión de los GRFs en varias especies ha demostrado de manera consistente que los niveles más altos de expresión se detectan en tejidos en desarrollo, con activa proliferación celular (12-14, 19, 22-25). El análisis de niveles de expresión de estos genes en el atlas de expresión génica de varias especies de plantas, como el caso de Arabidopsis (26) y arroz (27), también muestra que los picos de expresión de los GRFs se detectan en los tejidos en los que se observa el máximo de expresión de genes específicos de mitosis (MSG, del inglés "Mitosis Specific Genes")(Figura I.3).El hecho de que los GRFs se expresen en este tipo de tejidos se correlaciona con su función como promotores de la proliferación celular.



**Figura I.3.** La expresión de los *GRFs* correlacionan con los marcadores de proliferación celular. El gráfico muestra el perfil de expresión de los *GRFs* y de los genes específicos de mitosis en determinados tejidos de *Arabidopsis* según AtGenExpress (26).

### 3.2.2. *GRF-INTERACTING FACTORS*.

Los factores de transcripción con dominios de unión a ADN a menudo cooperan con coactivadores para promover la transcripción mediante la estimulación del ensamblado del complejo transcripcional basal o mediante el reclutamiento de remodeladores de la cromatina (28).

En una búsqueda de proteínas asociadas a *GRF1* se identificó una pequeña familia coactivadores, llamado *GRF-INTERACTING FACTORS* (*GIFs*). Homólogos a los genes *GIF*, a diferencia de los *GRF*, se encuentran en la mayoría de los organismos eucariotas, como embriófitas, algas verdes, y metazoos, lo cual indica que tienen orígenes más antiguos que los propios *GRFs* (16, 29).

La familia *GIF* en *Arabidopsis* esta compuesta por tres miembros. *GIF1*, también conocido como *ANGUSTIFOLIA3* (*AN3*), junto con *GIF2* y *GIF3* (13, 16, 30). Los genes de esta familia codifican proteínas pequeñas que carecen de un dominio de unión al DNA. La región N-terminal de estas proteínas es homóloga al dominio SNH del coactivador humano SYNOVIAL TRANSLOCACIÓN (*SYT*) (13, 14), que ha demostrado interactuar con los complejos remodeladores de la cromatina *SWI/SNF*, mientras que en el dominio C-terminal se encuentran regiones ricas en Gln y Gly (Figura I.4A).

Se ha demostrado que *AN3* interactúa físicamente con *GRF1*, *GRF2*, *GRF4*, *GRF5*, *GRF7* y *GRF9* *in vitro* y por ensayos de doble híbrido en levadura (16, 21). El análisis bioquímico utilizando versiones truncadas indicó que la formación de los complejos *GRF-GIF* se produce a través de los dominios *QLQ* y *SNH* (14). Complejos similares *GRF-GIF* han sido descritos en arroz (20) y maíz (31). Se ha visto que las proteínas *GIF* presentan actividad de transactivación transcripcional en levaduras

*per se* (16, 20), e incluso pueden estimular la actividad transcripcional de los GRFs en Arabidopsis y arroz (20, 21).

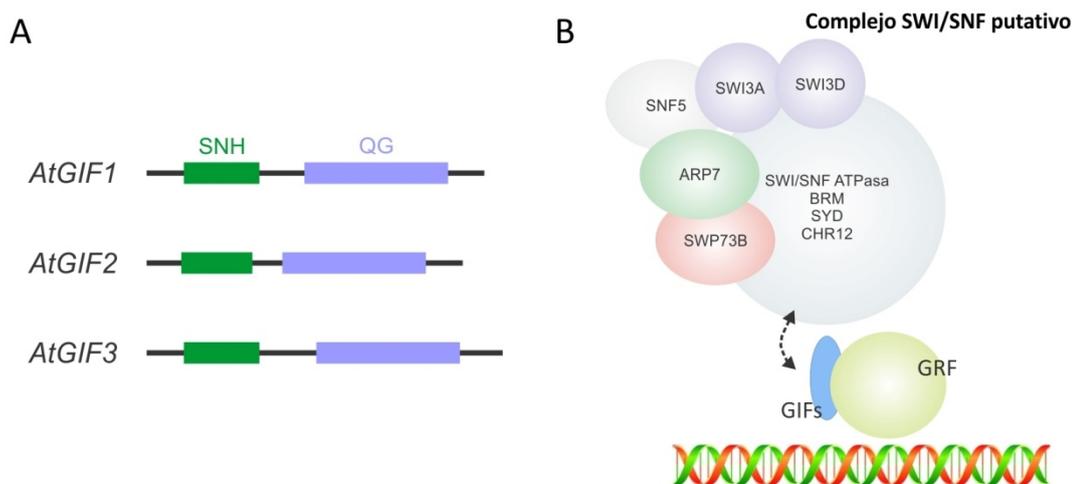
En particular, la interacción de AN3 con GRF5 y GRF3 se confirmó *in vivo* a través de ensayos de Co-inmunoprecipitación (Co-IP) seguidos de análisis por espectrometría de masas en cultivos celulares de Arabidopsis, plántulas e inflorescencias (25, 32). En este mismo análisis se observó que AN3 se encuentra además asociada a complejos de remodelación de la cromatina de tipo SWI/SNF (Figura I.4B) (25, 32).

Los complejos de remodelación de la cromatina utilizan la energía derivada de la hidrólisis de ATP para inducir modificaciones en las interacciones entre el octámero de histona y el ADN que constituyen un nucleosoma. Estas modificaciones incluyen el desplazamiento del nucleosoma a una nueva posición en el ADN, cambios conformacionales de las histonas, o la pérdida o intercambio de histonas (33). Hasta ahora han sido caracterizados cuatro clases principales de complejos de remodelación de la cromatina (SWI/SNF, ISWI, CHD y INO80), los cuales se distinguen por la ATPasa catalítica central y por la composición única de subunidades auxiliares (33).

Los complejos de la clase SWI/SNF fueron inicialmente descubiertos en *Sacharomices cerevisiae*, y luego fueron descritos en especies de *Drosophila* y en mamíferos (34). En todos los casos se encontró que junto con la ATPasa SWI/SNF, formarían el complejo central y catalíticamente activo, proteínas que representan los homólogos de SNF5 y SWI3 de levadura (34, 35). Además, otras proteínas accesorias formarían parte del complejo, entre las que se encuentran proteínas SWP73s (SWI/SNF ASSOCIATED PROTEINS 73) y ARPs (ACTIN RELATED PROTEINS) (35).

El genoma de Arabidopsis codifica para 4 ATPasas de la familia SWI/SNF (BRAHMA (BRM), SPLAYED (SYD), CHR12 y CHR23), 4 proteínas SWI3 (SWI3A-D), un homólogo de SNF5 (BUSHY-BSH), dos proteínas SWP73 (SWP73A y B) y dos ARPs (ARP4 y 7) (34, 35). Se ha visto que varios de estos componentes estarían asociados a AN3 *in vivo*. De hecho, exceptuando a la subunidad BSH, co-precipitaron con AN3 todos los componentes de un complejo SWI/SNF funcional (34).

Los complejos SWI/SNF no presentan especificidad intrínseca de unión al ADN, sino que generalmente son reclutados a los promotores de genes mediante la interacción con factores de transcripción (34). Por lo tanto, aparece como hipótesis plausible que el cofactor de transcripción AN3, y tal vez los otros GRFs, reclute complejos SWI/SNF hacia determinadas regiones del genoma de manera de dejarlas expuestas a los factores de transcripción *GRF*, u otros factores de transcripción, para estimular o reprimir la transcripción de los genes blanco de regulación directa (Figura I.4.B).



**Figura I.4. La familia de cofactores de transcripción GIF en Arabidopsis.** (A) Esquema que muestra los dominios proteicos que caracterizan a esta familia. El dominio SNH media la interacción con los dominios QLQ de los GRFs y de las ATPasas catalíticas BRM y SYD de los complejos de remodelación de la cromatina. (B) Esquema de un modelo donde AN3, o posiblemente otros GIFs, reclutando a los complejos de remodelación de la cromatina a los sitios del ADN genómico reconocidos por los GRFs u otros factores de transcripción. La composición y estequiometría del complejo SWI/SNF tiene en cuenta información de la bibliografía (25, 34).

### 3.2.3. Regulación de la expresión de los *GRFs* por el miR396.

Los ARNs pequeños son importantes reguladores de la expresión de genes en eucariotas (36). Tienen una longitud de entre 20-24 nt y se originan después del procesamiento de un ARN más largo. Una amplia variedad de ARNs pequeños existen en plantas, y pueden ser clasificados según diferencias en su biogénesis y modo de acción. Estos ARN pequeños han sido agrupados en diferentes clases, siendo las más importantes los siARNs (del inglés “small-interfering RNA”) y los microARNs (miARNs) (37).

Los microARNs son ARNs pequeños generados a partir de *loci* endógenos en la célula, tanto en animales como en plantas. Estos ARN pequeños controlan una gran variedad de procesos biológicos, como el desarrollo, la diferenciación y proliferación celular, y respuesta a estrés (38-42). Su función es controlar la abundancia de los ARN blanco que regulan, ajustando los niveles finales de las proteínas o eliminando los transcritos de ARN en la célula. La identidad de los genes blancos está especificada por la molécula de miARN, la cual reconoce una secuencia en los ARNs blanco por complementariedad de bases.

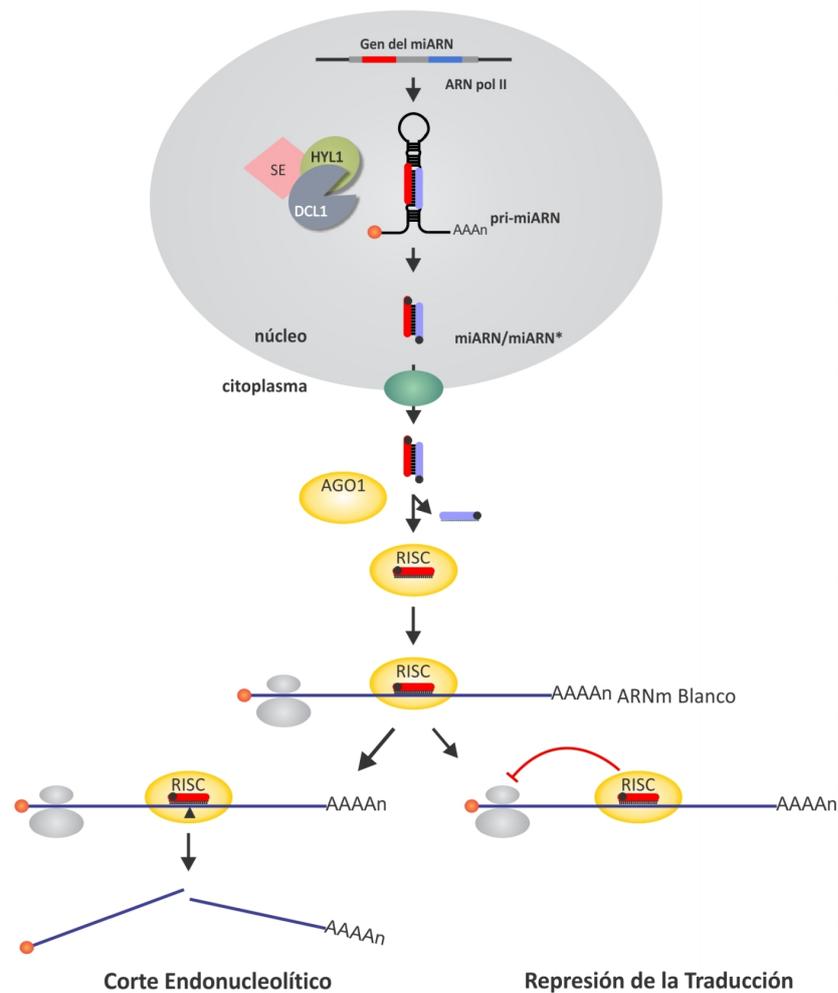
En plantas, los miARNs tienen una buena complementariedad con sus blancos y en general regulan genes de una misma familia (43). Hasta hoy, en Arabidopsis se han identificado más de 300 miARNs (44) (<http://microrna.sanger.ac.uk>). Estos tienen usualmente entre 20 y 22 nucleótidos de longitud y se diferencian de otros ARNs pequeños por su particular biogénesis que implica su escisión de un precursor con extensa estructura secundaria localizado en un largo transcripto primario.

En general, la biogénesis de estos ARN pequeños comienza con la transcripción por la ARN polimerasa II (45) a partir de unidades transcripcionales distribuidas en el genoma (Figura I.5) (46). Los transcritos primarios, llamados pri-miARNs, pueden tener varias kilobases de longitud y sufrir diferentes modificaciones post-transcripcionales. Estos transcritos contienen precursores para miARNs con extensa estructura secundaria en forma de tallo-burbuja (Figura I.5) (43). Donde el miARN maduro se ubica en uno de los brazos del tallo apareado con una secuencia parcialmente complementaria denominada miARN\*.

Los precursores son procesados completamente en el núcleo a través de la acción de una ribonucleasa llamada DCL1 (46, 47) (del inglés DICER LIKE 1) en asociación con el cofactor proteico de unión a ARN de doble hebra HYL1 (48) (del inglés HYPONASTIC LEAVES 1) y la proteína SERRATE (49) (Figura I.5). El producto generado a partir de los cortes llevados a cabo por DCL1, es un dúplex miARN-miARN\* que luego continúa siendo procesado por otros componentes enzimáticos hasta dar lugar al miARN maduro de 21 nt.

El paso final de la biogénesis de los miARN es la incorporación asimétrica, a partir del dúplex miARN-miARN\*, del miARN maduro dentro de un complejo de silenciamiento, mientras que el miARN\* en la mayoría de los casos se degrada. Este complejo se denomina RISC (del inglés RNAi Silencing Complex) (Figura I.5). El componente central de todos los complejos de silenciamiento es un miembro de la familia de proteínas ARGONAUTA (AGO). En Arabidopsis existen distintas proteínas AGO que participan en diferentes procesos biológicos (Figura I.5) (50).

Los miARNs una vez incorporados al complejo RISC se unen a secuencias complementarias en los ARNm promoviendo su degradación (43), aunque algunos miARNs también regulan la expresión de sus genes blancos por represión traduccional. En cualquier caso, es el miARN el que proporciona la especificidad contra las moléculas de ARN blanco (51).



**Figura I.5. Biogénesis y actividad de miARNs en plantas.** Los pri-miARNs son transcritos por la ARN polimerasa II, y adoptan una estructura de tipo tallo-burbuja con apareamientos imperfectos. Estas estructuras son procesadas en el núcleo por DICER-LIKE1 (DCL1) junto a HYPOPLASTIC LEAVES 1 (HYL1) y SERRATE (SE) liberando el dúplex miARN-miARN\*. En la figura se muestra que el corte del pri-miARN ocurre en la base del tallo-burbuja. Se ha observado que para ciertos miARNs el primer corte mediado por DCL1 ocurre en el extremo de la burbuja (52). El dúplex miARN-miARN\* es exportado al citoplasma. La hebra del miARN maduro (en rojo) se asocia con una proteína Argonauta (AGO), mayoritariamente AGO1, para formar el complejo RISC. En el complejo RISC, el miARN principalmente induce el corte endonucleolítico de los ARNm blancos, aunque algunos miARNs también regulan la expresión de sus genes blancos por represión traduccional. Adaptado de (37).

En un intento por buscar microARNs conservados en plantas, Jones-Rhoades y col. (53) encontraron un nuevo microARN al que llamaron miR396. El miR396 es un miARN altamente conservado de plantas. Según la especie, puede encontrarse como un único gen o hasta en familias de nueve miembros, como en el caso de arroz (<http://www.mirbase.org/>) (23).

En *Arabidopsis* la familia del miR396 está compuesta por dos genes (*MIR396A* y *MIR396B*) que producen moléculas de ARN maduras de 21 nt que solamente difieren en el último nucleótido 3' (Figura I.6). Predicciones bioinformáticas y posterior confirmación experimentales mostraron que este microARN reprime la expresión de 7 miembros de la familia de factores de transcripción *GRFs*

(*GRF1*, 2, 3, 4, 7, 8 y 9) (53, 54), a través de la unión a un sitio complementario, localizado en la región codificante (Figura I.6).

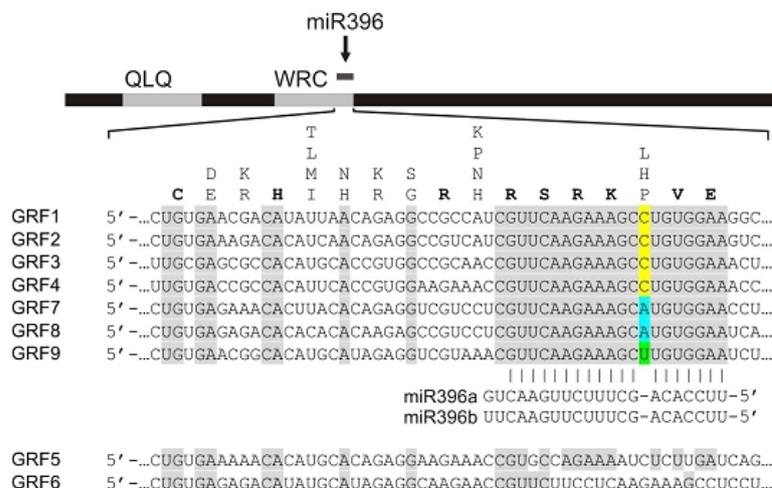


Figura I.6. Complementariedad de bases entre el miR396 y el sitio blanco de los siete *GRFs* que regula en *Arabidopsis*. En gris se muestran los nucleótidos conservados entre los *GRFs*.

### 3.2.4. Rol del sistema *GRFs/GIFs/miR396* en el desarrollo vegetativo.

#### 3.2.4.1. Participación en desarrollo del SAM.

Varias líneas de evidencia indican que los *GRFs* son requeridos para el desarrollo y mantenimiento del SAM.

Tanto el miR396 como el *GRF2* se expresan en el SAM de *Arabidopsis* (Figura I.7A). La sobreexpresión del miR396 causa una disminución en el tamaño del SAM, mientras que el efecto opuesto se observa en plantas que expresan elevados niveles de *GRF2* (54). Estos cambios se correlacionan con la activa proliferación celular que ocurre en el SAM, lo que sugiere que los *GRFs* actúan como promotores de la proliferación celular en los meristemas. Las plantas con una disminución adicional en la actividad de los *GRFs*, obtenida por sobreexpresión del miR396 en las mutantes *an3* (54) o en las cuadruples mutantes *grf1 grf2 grf3 grf4* (55), carecen de un SAM funcional y mostraron cotiledones fusionados como consecuencia de defectos en el desarrollo embrionario. Finalmente, el tamaño del SAM también se correlaciona con la dosis de genes *GIFs* (56).

En conjunto, estos resultados indican que la red *miR396-GRF-GIF* regula el desarrollo embrionario, el establecimiento y/o mantenimiento del SAM y determina el tamaño del SAM controlando la proliferación celular.

#### 3.2.4.2. Rol en el control del desarrollo de las hojas.

En plantas dicotiledóneas, los primordios de las hojas se inician en la ZP del SAM (Figura I.1A,B y 7A). Inicialmente, tienen una estructura tipo cilindro que rápidamente adquiere polaridad dorso-

ventral para constituir una lámina plana formada por dos superficies anatómicamente distintas: el lado adaxial y el abaxial (revisado en(57)). En el paso siguiente, la lámina de la hoja se expande para adquirir su tamaño y forma final. En primer lugar, la proliferación celular tiene lugar a lo largo de todo el primordio de las hojas pequeñas, que puede visualizarse utilizando reporteros de ciclinas mitóticas tales como *CYCB1;1-GUS* (Figura I.7B) (58). A medida que el órgano crece, la región que contiene células proliferativas se restringe a la base del órgano y las células localizadas en la parte distal de la hoja comienzan su expansión (Figura I.7B). Finalmente, la proliferación celular cesa y la lámina foliar continúa creciendo sólo por expansión celular. En monocotiledóneas, la organización espacial de los procesos que contribuyen al crecimiento de órganos ocurre de manera similar. En una hoja de maíz en crecimiento, las células se dividen sólo en la zona de división en la base de la hoja, mientras que se expanden en la zona de expansión situada más distalmente. Tanto en las dicotiledóneas como en las monocotiledóneas, el tamaño y la persistencia de la zona de división es uno de los principales factores que determinan el tamaño final de las hojas (32, 54, 59).

Las plantas de *Arabidopsis* mutantes en los *GRFs* tienen hojas pequeñas con menos células (14, 16) (Figura I.7C). Además, se encuentran fenotipos similares en plantas que sobreexpresan el miR396 (Figura I.7D) (54, 60) o en mutantes *an3* (13). El tamaño de la hoja de *an3* se reduce significativamente como resultado de la combinación con los mutantes *gif2* o *gif3* (56). El análisis detallado de estos mutantes y transgénicos indicó que el complejo GRF/GIF promueve la proliferación celular en las hojas en desarrollo, y que la disminución de los niveles de estos genes conlleva a una terminación prematura de la proliferación celular (30, 54).

Considerando la interacción entre AN3 y los diferentes componentes de la maquinaria de remodelación de la cromatina, se ha visto que las mutantes en varios de los componentes de estos complejos son plantas enanas, con hojas significativamente más chicas y con una velocidad de crecimiento reducida (61-67). Estos fenotipos son semejantes a los de plantas con niveles reducidos de *GIFs* o *GRFs* (13, 14, 16, 54), apoyando la idea de la interacción entre los sistemas.

Por otra parte, el aumento de los niveles de los *GRF* por sobreexpresión del *GRF1*, *GRF2* o *GRF5* bajo el control de un promotor constitutivo fuerte (13, 14, 68), o mediante alelos de los *GRFs* insensibles a la regulación por el miR396 (llamados versiones resistentes de *GRFs* o *rGRF*) (25, 54), produjeron hojas más grandes con más células (Figura I.7E). La sobreexpresión de AN3 también aumentó el tamaño de las hojas (16) y, de acuerdo con su función como coactivador, aumentó sinérgicamente el efecto de *rGRF3* y *GRF5* sobre el tamaño de las hojas (25).

En hojas jóvenes en desarrollo, el miR396 y los *GRFs* tienen gradientes de expresión opuestos. El *MIR396* se expresa en un gradiente a lo largo del eje longitudinal del órgano, presentando un pico de expresión en la parte distal (Figura I.7B). La represión por miR396 de la expresión de los *GRFs*

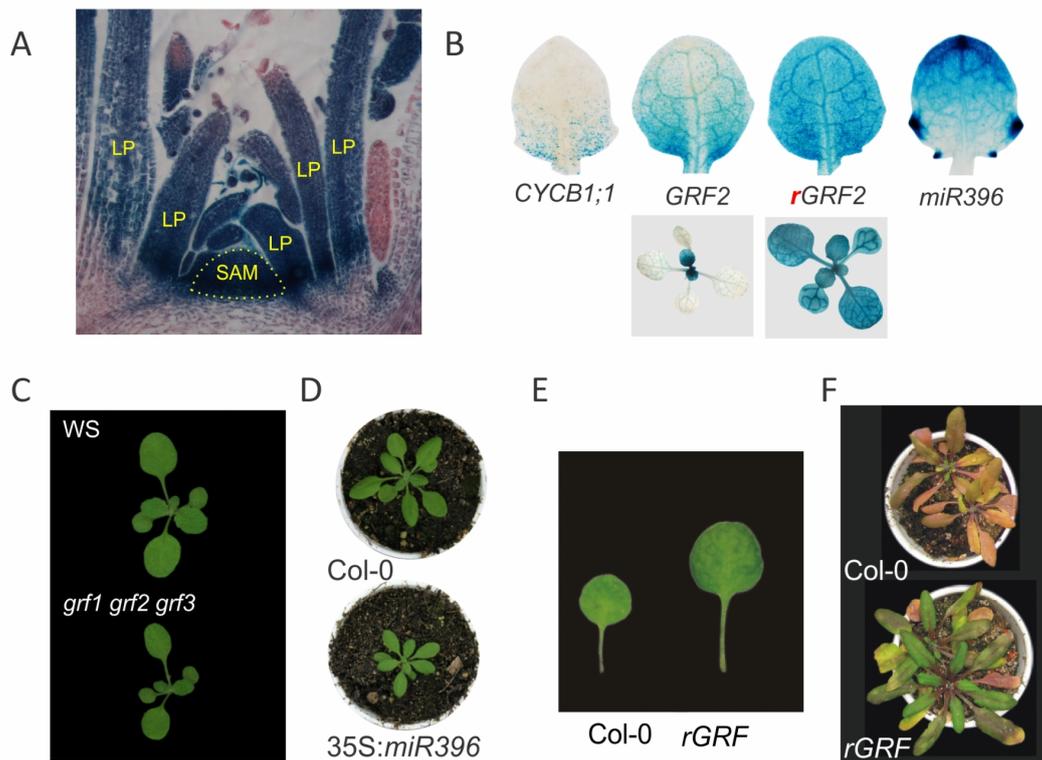
genera un gradiente de expresión opuesto de los FTs, con niveles más altos de los *GRFs* en la parte proximal del órgano (Figura I.7B). Así, la regulación posttranscripcional de los *GRFs* por miR396 da como resultado que la expresión de los *GRFs* presente un pico en las células que proliferan activamente (23, 54). La expresión de *AN3* también está restringida a la parte proximal de los primordios foliares, como es de esperar debido a su función como coactivadores de los *GRFs* (69).

Defectos similares en el desarrollo de las hojas y patrones de expresión comparables de *GRF*, *GIF* y miR396 se obtuvieron en plantas monocotiledóneas (20, 70), indicando una función conservada para este sistema en el desarrollo de hojas en diferentes especies.

En conjunto, estos resultados indican que la red *miR396-GRF-GIF* controla el crecimiento de los órganos foliares tras la iniciación de los primordios. En el desarrollo de las hojas, los complejos proteicos GRF-GIF promueven la proliferación celular en la parte proximal de la hoja, mientras que el miR396 restringe la actividad de los complejos reprimiendo posttranscripcionalmente la expresión de *GRF* en la parte distal, donde se produce la expansión y la diferenciación celular.

### **3.2.4.3. miR396/GRFs/GIFs en el control de la senescencia de las hojas.**

La última etapa de desarrollo de una hoja es la senescencia, un programa complejo y activo que recicla sus recursos y reubica los nutrientes en las semillas (71). Se ha demostrado que la red *miR396-GRF-GIF* regula la longevidad de las hojas. El análisis de plantas de *Arabidopsis* con mayores niveles de *GRF3* o *GRF5* reveló un retraso en la senescencia foliar (Figura I.7F) como así también de la expresión de marcadores específicos de senescencia foliar, como *SEN1*, *SEN4* y *SAG12* (25). Semejante a los efectos sobre el tamaño de la hoja, el retraso en la senescencia fue potenciado por la sobreexpresión de *AN3*. De acuerdo con estos resultados, las plantas que sobreexpresan el miR396 o las simples mutantes *grf3*, *grf5*, y *an3* senescen más rápido que las plantas control. Por lo tanto, los complejos GRF/GIF no sólo estimula la proliferación celular durante los períodos tempranos del desarrollo foliar, sino que también les impiden entrar en el programa de senescencia prematuramente.



**Figura 1.7. Rol de los GRFs/GIFs/miR396 en el desarrollo vegetativo de Arabidopsis.** (A) Arquitectura del SAM en secciones longitudinales de plantas que expresan un reportero GUS de *GRF2*. (B) Patrón de expresión de una ciclina mitótica (*CYCB1;1*), *GRF2*, *rGRF2* y *miR396* en hojas en desarrollo. Obsérvese que la proliferación celular y la expresión de *GRF2* están restringidas a la parte proximal de la hoja, mientras que la expresión del *miR396* ocurre en la parte distal. Adaptado de Debernardi et al., (2012) Plos Genetics. (C) Las triple mutante *grf1 grf2 grf3* presentan hojas más pequeñas. (D) Fenotipo de roseta de plantas de 18 días que sobreexpresan *miR396*. Las plantas *35S:miR396* reducen los niveles de *GRF*. (E) Fenotipos de plantas que expresan un transgén *GRF* insensible a la regulación del *miR396* (*rGRF*). Se observan hojas grandes sin cambios importantes en forma. (F) Senescencia retardada observada en plantas *rGRF3*.

### 3.3. Desarrollo del sistema radicular en Arabidopsis.

Las raíces son órganos que normalmente se encuentran debajo de la superficie del suelo, donde crecen y responden a una variedad de fluctuaciones ambientales. Estas estructuras no sólo proporcionan soporte a la parte aérea de la planta sino que también son responsables de la adquisición de agua y nutrientes esenciales para el crecimiento del organismo. Las raíces de *Arabidopsis* tienen una organización celular muy simple accesible por microscopía confocal y se pueden crecer fácilmente en medios de cultivo sólidos, lo que facilita el análisis.

En la parte distal de la punta de la raíz se encuentra la caperuza, que consiste en una parte central llamada columela (Col) y las células laterales de la caperuza (LRC del inglés "Lateral Root Cap") (Figura 1.8A,C). Por encima de esta estructura se encuentra el SCN, y más allá el cuerpo principal de la raíz (Figura 1.8A), que consiste en una serie de tejidos concéntricos que se definen, de afuera hacia adentro, como epidermis (Ep), corteza (Co), endodermis (End), periciclo y el cilindro vascular en posición central (Figura 1.8B,C). La simetría radial de la raíz combinada con la falta de movimiento

celular conduce a que células relacionadas clonalmente se encuentren con frecuencia formando filas de células. Se puede identificar el origen de cada una de estas filas de células en alguno de los tipos de células madre presentes en la punta de la raíz (Figura 1.8C) (72).

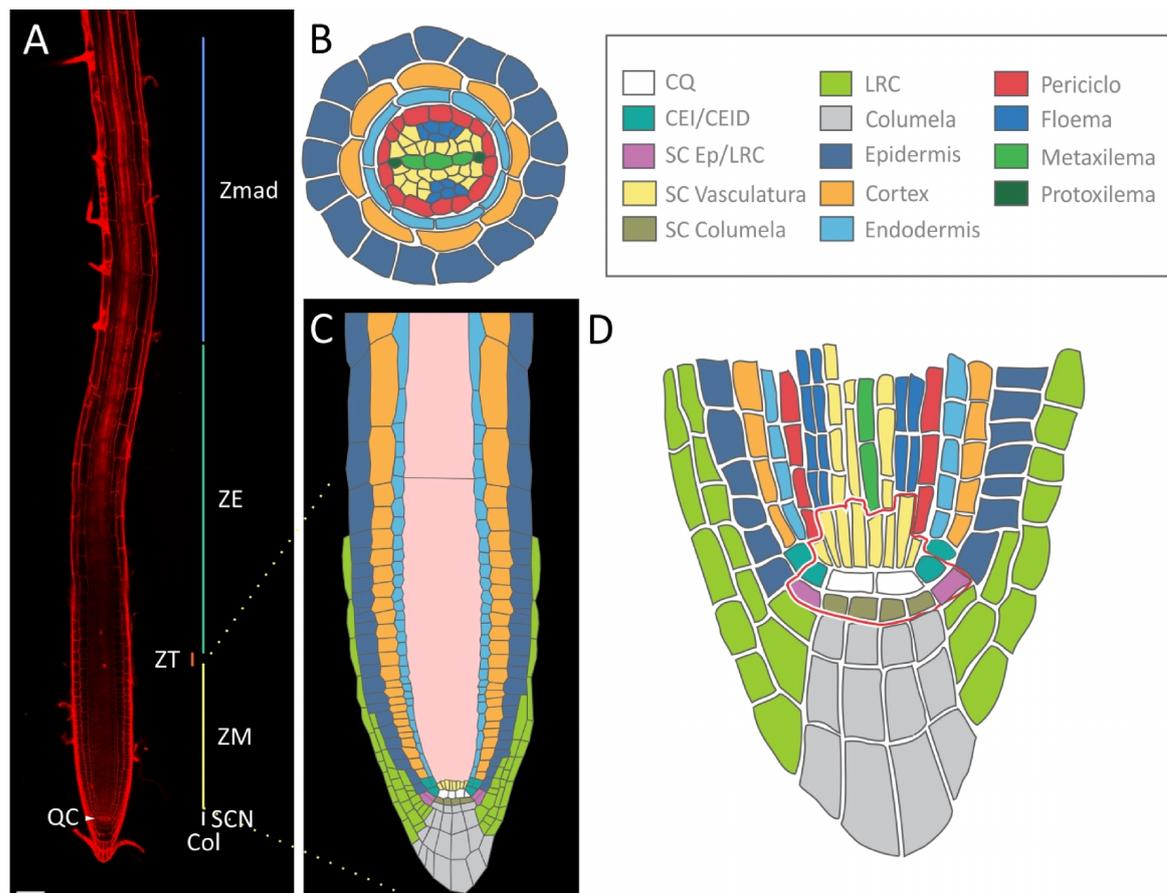
El crecimiento indeterminado en la raíz es mantenido por el SCN en donde las SC propiamente dichas se organizan alrededor de células mitóticamente inactivas que constituyen el centro quiescente (CQ) (Figura 1.8D) (73). El CQ es esencial para la especificación del SCN y el mantenimiento del estado indiferenciado de las SC (74). La identidad del CQ es especificada mediante dos vías paralelas: la vía de los genes *PLETHORA (PLT)* y la vía de *SHORTROOT (SHR)/SCARECROW (SCR)* (73, 75, 76). Los genes *PLTs* codifican para FTs que presentan el dominio AP2 (75), mientras que *SHR* y *SCR* codifican para miembros de la familia de factores de transcripción GRAS [GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR DE GA1-3 (RGA), SCR](76). Las plantas mutantes para estos genes presentan raíces muy cortas, donde la finalización prematura del crecimiento se encuentra acompañada de la pérdida de la identidad del CQ (73, 75-79). El pico de expresión de las proteínas *PLT* se encuentran en el SCN, donde promueven la identidad de SC (75). *SHR* se expresa en la estela y se mueve hacia el CQ y las iniciales de corteza/endodermis (80) para activar la expresión *SCR* (81). A su vez, *SCR* mantiene QC y identidad de la SC (76), en parte mediante la inducción de la expresión de *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5)*, un gen específico del CQ (6). Por último, recientemente han aparecido otros reguladores de la identidad de SC, entre los que se encuentra la familia de hormonas peptídicas llamada *GOLVEN /ROOT GROWTH FACTORS/CLE-Like (GLV/RGF/CLEL)*, que promueven el mantenimiento postembrionario del SCN a través de la regulación post-transcriptional de las proteínas *PLT* (82).

Las SC que rodean al CQ incluyen a las SC de las células vasculares, las SC de Corteza (Co) y Endodermis (End) (CEI, del inglés "Cortex/Endodermal Initial"), las SC de Ep/LRC, y por último las SC que darán lugar a las células de la columela (83). Las SC se dividen lentamente, para generar dos células hijas con diferentes destinos celulares. La célula hija adyacente al CQ permanece como SC, mientras que la otra célula hija entrará en un ciclo de sucesivas rondas de división celular (10). La generación de células hijas con diferentes destinos celulares indica que las divisiones que sufren las células madres son asimétricas y generativas, que suelen tener orientación periclinal.

Las nuevas células producidas por las SC en el RAM progresan a través de diferentes fases de desarrollo en su camino hacia la madurez. Estas zonas se encuentran dispuestas de manera consecutiva a lo largo del eje longitudinal de la raíz (Figura 1.8A). En primer lugar se encuentra la zona meristemática (ZM), en donde las células se dividen activamente para determinar el tamaño final del órgano. Este tipo de divisiones de amplificación son características de las células llamadas TACs del inglés "transit-amplifying cells" (75). La capacidad que presentan las células meristemáticas de

dividirse disminuye con el incremento de la distancia desde el SCN. Las células finalmente salen del ciclo celular mitótico en la zona de transición (TZ), ubicada entre la ZM y la zona de elongación (ZE). La posición de la zona de transición determina el tamaño del meristema. En la ZE, las células pierden su capacidad de dividirse y aumentan su tamaño expandiéndose de manera unidireccional. Las células que pasan del ciclo mitótico en la MZ a una fase de elongación sufren cambios celulares drásticos que incluyen el desarrollo de una vacuola central, la reorganización del citoesqueleto y el aumento del ancho de la célula (84). La rápida expansión celular se asocia mayormente con la expansión vacuolar mediante la captación de agua (85). El largo final que adquieren las células, junto con el tamaño de la zona meristemática, contribuye a determinar el crecimiento de la raíz primaria (86). Después de que las células alcanzan su tamaño final, entran en la zona de maduración (ZMad), donde adquieren las características celulares finales especializadas. Dos características notables de la DZ incluyen el desarrollo de la banda de Caspari y la aparición de los pelos radiculares que desempeñan un papel importante en la absorción de agua y nutrientes. Se sabe relativamente poco acerca de los mecanismos moleculares subyacentes al proceso de diferenciación.

Se ha demostrado que existe una correlación entre la localización de los límites entre las diferentes zonas de desarrollo de la raíz y el patrón de expresión en gradiente de *PLT* a lo largo del eje longitudinal del órgano. El pico máximo de expresión de *PLT* se encuentra en el SCN, donde los altos niveles de estos factores de transcripción determinan la identidad de células madre (73, 75, 87). La progenie de las SC expresa un menor nivel de *PLT* y sufren sucesivas rondas de división celular antes de que comiencen a alargarse y diferenciarse, paso final para el que se requiere una reducción adicional de los niveles de expresión de estos genes (75, 87). Este gradiente de expresión es establecido mediante una combinación de movimiento de célula a célula de las proteínas y de segregación de las proteínas luego de la mitosis, a partir de un dominio transcripcional restringido al SCN (75, 87). La disrupción en el establecimiento del gradiente de estos reguladores conlleva a una modificación en el establecimiento de las diferentes zonas de desarrollo a lo largo del eje longitudinal de la raíz. Por ejemplo, en el caso de las dobles mutantes *plt1 plt2* se observa una diferenciación celular temprana, acompañada de la pérdida de identidad del SCN y una severa reducción del tamaño del meristema (73, 75). Por el contrario se ha visto que el aumento de niveles de expresión de *PLT2* promueve el crecimiento del meristema, manteniendo la actividad mitótica de las TACs e impidiendo su diferenciación (75).



**Figura 1.8. Estructura de la raíz de Arabidopsis.** (A) Imagen de las sección longitudinal media obtenida de un raíz de una planta silvestre teñida con IP por LSM. Se detallan las diferentes zonas de desarrollo que se observan en todo momento a lo largo del eje longitudinal. Col: Columela; SCN; ZM: zona meristemática; ZT: Zona de Transición; ZE: Zona de Elongación; ZMad: Zona de Maduración. (B) - (C) Esquemas que muestra la organización radial de los tejidos en un corte transversal de una raíz salvaje (C) y en filas en una sección longitudinal. Particularmente en (C) se encuentra ampliada la ZM. (D) Se muestra ampliada la región del RAM que contiene el SCN (Delineado en Rojo). Rodeado por las SC que darán a lugar a los diferentes tipos celulares de la raíz se encuentra el CQ. Barra de escala = 50µm.

La raíz como sistema de estudio resulta técnicamente atractivo ya que permite obtener una caracterización a nivel celular detallada, resultando apropiado para estudiar organogénesis. En primer lugar, como se ha mencionado previamente, existe en todo momento en el extremo de cada raíz zonas claramente definidas de proliferación, elongación y maduración (Figura 18.A). Segundo, tiene una organización muy simple, con solo 15 tipos celulares dispuesto de forma radial (Figura 18.B) (88). Por último, es técnicamente sencillo, utilizando LSM, obtener imágenes que permiten reconstruir el órgano a resolución celular en todas sus etapas de desarrollo (Figura 18.A).

En los últimos años la raíz de Arabidopsis ha sido objeto de numerosos estudios que han conducido a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen al desarrollo de las raíces. Sin embargo siguen siendo necesarios estudios que brinden información que contribuya a responder preguntas importantes como aquellas relacionadas a la regulación de las divisiones celulares asimétricas y el establecimiento de los diferentes linajes celulares luego de esta división.

## **OBJETIVOS.**

## 4. Objetivos.

### 4.1. Objetivo general.

El objetivo general de esta tesis es contribuir al conocimiento de los procesos que regulan el desarrollo de las plantas. Para esto analizamos la red regulatoria que constituyen el miR396, los factores de transcripción *GRFs* y sus cofactores de transcripción *GIFs* en el desarrollo del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*.

### 4.2. Objetivos particulares.

A) Describir los mecanismos por los cuales la red regulatoria *miR396/ GRFs/ GIFs* controla el desarrollo de la raíz.

- Analizar los patrones de expresión del *MIR396*, de sus genes blanco los *GRFs* y de los cofactores *GIFs*.
- Caracterizar los fenotipos de las diferentes mutantes y transgénicas con modificaciones en los niveles de los diferentes componentes de esta red regulatoria.
- Evaluar la interacción de la red regulatoria *miR396/GRFs/GIFs* con otros programas genéticos involucrados en el establecimiento de las diferentes zonas de desarrollo en la raíz.

B) Identificar los genes regulados a nivel transcripcional por los FTs *GRFs* y sus co-activadores transcripcionales *GIFs*.

- Realizar experimentos de transcriptómica haciendo uso de sistemas de expresión controlada por agregado exógeno de inductores.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

## 5. Materiales y Métodos.

### 5.1. Metodología para el clonado de fragmentos de ADN.

#### 5.1.1. Cepas bacterianas empleadas.

- *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (89).
- *Agrobacterium tumefaciens* ASE. Esta cepa es resistente a los antibióticos cloramfenicol y kanamicina.

#### 5.1.2. Vectores plasmídicos utilizados.

- Plásmido **pBluescript II SK(-)** (Stratagene)
- Plásmido **pCHF3**. Vector binario que permite la transformación de *Arabidopsis* por *A. tumefaciens*. Posee orígenes de replicación para *E. coli* y *A. tumefaciens*, y un gen de resistencia a espectinomicina para la selección bacteriana. El T-ADN es la porción de ADN transferida al genoma de la planta durante la transformación. Esta región contiene el gen nptII que confiere resistencia a kanamicina en plantas bajo el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor. Además presenta un sitio de múltiple clonado (SMC) flanqueado por el promotor 35S y el terminador de la transcripción de la subunidad pequeña de RuBisCo de arveja.(90)

#### 5.1.3. Vectores utilizados en esta tesis.

Vector	Construcción	Cromosoma: Inicio-Final <sup>a</sup>
pRER32	<i>rGRF3</i>	GRF3: <i>rGRF3</i> , 2: 15274101 – 15270085 CGCAAC CGT TCT AGA AAA CCA GTA GAGACTCCA R N R S R K P V E T P
pRER35	<i>rGRF2</i>	GRF2: <i>rGRF2</i> , 4:17729683–17725302 CGTCAT CGTTC TAGAAAACCGGTCGAAGTCCAA R H R S R K P V E V Q
pJD136	<i>rGRF3-GR-GFP</i>	[GRF3: <i>rGRF3</i> , 2: 15274101 – 15270085] - GR CDS - GFP CDS CGCAAC CGT TCT AGA AAA CCA GTA GAGACTCCA R N R S R K P V E T P
pMF12*	<i>GRF2-GFP</i>	[GRF2: <i>GRF2</i> , 4:17729683–17725302] - <i>GFP</i>
pJD104	<i>GRF3-GFP</i>	[GRF3: <i>GRF3</i> , 2: 15274101 – 15270085] - <i>GFP</i>

pJD105	rGRF3-GFP	[GRF3:rGRF3, 2: 15274101 – 15270085] - GFP CGCAAC CGT TCT AGA AAA CCA GTA GAG ACTCCA R N R S R K P V E T P
pJD106	AN3-GFP	[AN3:AN3, 5: 10651497 – 10647833] - GFP CDS
pMF25*	GIF2-GFP	[GIF2:GIF2,1:70496- 73880] - GFP
pMF28*	GIF3-GFP	[GIF3:GIF3,4:355679 - 358925] - GFP
pMS9	MIR396A:GFP	[MIR396A, 2: 4145577– 4142487] - erGFP
pMM64	MIR396B:GFP	[MIR396B, 5: 13609792 – 13611781] - erGFP
pJD69	AN3-SRDX	[AN3:AN3, 5:10649780 - 10647970] - SRDX
pJD144	AN3-GR-GFP	[AN3:AN3, 5: 10651497 – 10647833] - GR CDS - GFP CDS
pMF31*	AN3	35:[AN3:AN3, 5:10649780 - 10647970]

**Vectores de expresión para miR396 y MIM396.**

Vector	Construcción	Secuencia Expresada <sup>b</sup>
RER38	35S:miR396b	GTACCATGAAGATCCTGGTCATACTTCCACAGCTTCTTGAACCTCTTTTTCATTTCCATTGTTTT TTTCTTAAACAAAAGTAAGAAGAAAAAACTTTAAGATTAAGCATTGGAAGCTCAAGAAAGC TGTGGGAAAACATGACAATTCAGGGTTTGGATCR
MM10	35S:miR396a	GATCCATCTTCCTTCTCACAACCTCAACTCCCTCTTCTATATTACGCTTTTGCCCTCACTCCCT CTTCCACAATTAGGGTTTCGTCTGCTCTACATGACCCTCTCTGTATTCCTCCACAGCTTCTTGAAC TGCAAACTTCTCAGATTTTTTTTTTTCTTTTATATCTCTTACGCATAAAATAGTGATTTTCTC ATATCTGCTCGATTGATTTGCGGTTCAATAAAGCTGTGGGAAGATACAGACAGAGTCAAATGA TTTTCTAAATTCGTTATATATGAAAGCGTGATTGATCCATAATCAGATCTGATCACAGATCT TTCGTTACGTGTTTTTGTCTCTTTGTTATTTTTATGACTACCAACTATATTGTAGCTAGA CTGCA
JD57	35S:MIM396	GGTACCGGATCCGCCGTAGCCGGCAGGCTTCTCCCTCTAGAAATTGTTCAAGAGCTCAGCTGTG GAAAGCTTCGGTTTTTCTTTGGAAATGTTCAAGAGCGCAGCTGTGGAAATTTTTCAATTTTTTGGT TGGAATGTTCAAGAGCTTAGCTGTGGAATTTTGTGGAAGATCTGCCGTAGCCGGCGTCGAC

**a** Resaltado en amarillo, los nucleótidos que se aparean con el miR396. Subrayado, los residuos mutagenizados. En Rojo, las secuencias corriente arriba y corriente abajo.

**b** Resaltado en amarillo, la secuencia del microARN maduro expresado. Subrayado, la secuencia del "target mimicry" del miR396.

\* Vector Construidos en esta tesis.

**5.1.4. Extracción de ADN genómico de Arabidopsis.**

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

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

Las hojas contenidas en tubos de microcentrífuga se sumergieron en N<sub>2</sub> líquido y se redujeron a un polvo fino utilizando un pilón. Posteriormente la muestra se resuspendió en 600 µl de buffer CTAB modificado precalentado, y la suspensión resultante se incubó a 65 °C por una hora. Luego se adicionó 600 µl de una mezcla cloroformo: alcoholisoamílico (24:1) y se agitó durante 5 min. A continuación se realizó una centrifugación a máxima velocidad a 4°C durante 10 min. Finalizada la centrifugación se transfirió la fase acuosa superior a un tubo de microcentrífuga nuevo. Se realizó la precipitación del ADN en la fase acuosa mediante la adición de 0,7 volúmenes de isopropanol, mezclando por inversión e incubando a 4 °C por al menos una hora. Luego se centrifugó a máxima velocidad durante 20min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 µl de 70% (v/v) etanol y agitación. Se centrifugó la muestra durante 5 min a 8000 g a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado resultante se secó completamente y finalmente se resuspendió en 40µl de agua Milli-Q (Milipore). La muestra de ADN resultante fue conservada a -20°C.

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

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: en un volumen final de reacción de 50 µl se adicionó 5 µl de buffer Pfx50 ADN polimerasa10x (Invitrogen), 7,5 pmol de cada oligonucleótido y 2 U de Pfx50 ADN polimerasa (Invitrogen). La concentración en la mezcla de reacción de cada uno de los dNTPs (dCTP, dATP, dGTP, dTTP) fue de 0,2 mM. Se completó el volumen restante con agua Milli-Q. La cantidad de ADN molde varió dependiendo del ADN utilizado: 1 ng de ADN plasmídico; 100 ng de ADN genómico. El termociclado de las mezclas de reacción se llevó a cabo en un equipo PCR SPRINT Termal Cycler (Termo Electron Corporation) según el siguiente programa:

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95° C	30 seg.
2	35	95° C	30 seg.
		55° C	30 seg.
		68° C	X min.
3	1	68° C	10 min.

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

La separación de moléculas de ADN por electroforesis en geles de agarosa se realizó mediante el sistema tipo submarino (91) en cubas de acrílico. Se utilizaron concentraciones de agarosa de 1 a 1,5% (p/v) según el tamaño de las moléculas de ADN a resolver. Los geles se prepararon con solución buffer 1X TAE y se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 0,3 µg/ml. Las muestras de ADN, previo a la siembra, se mezclaron con 1/5 volúmenes de solución de siembra. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo en solución buffer 1X TAE, empleando voltaje constante. Se utilizaron marcadores de tamaño molecular adecuados.

### **5.1.6. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.**

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

### **5.1.7. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.**

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

### **5.1.8. Ligación de fragmentos de ADN.**

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

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

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

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

**b)** La ligación de fragmentos de ADN generados por corte con enzimas de restricción en los vectores plasmídicos correspondientes se llevó a cabo con la enzima T4 ADN ligasa (Fermentas). Las

condiciones de la reacción fueron las especificadas por el fabricante. En todos los casos el volumen de reacción de ligación fue de 10  $\mu$ l y se utilizaron 5  $\mu$ l de la misma para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$ .

### 5.1.9. Transformación bacteriana.

**a) Transformación de *E. coli*.** Para la preparación de electrocompetentes se partió de un cultivo saturado de *E. coli* DH5 $\alpha$ , crecido toda una noche a 37° C en medio Luria-Bertani (LB; 10 g/l peptona de caseína, 5g/l extracto de levadura y 5 g/l NaCl), se realizó una dilución 1:100 en el mismo medio y se incubó 2 horas a 37 °C. Una vez que este cultivo alcanzó una DO 600 ente 0.5 y 1, se centrifugó durante 7 min a 4000 g a 4°C. Luego, se removió el sobrenadante y se lavó el sedimento de células sucesivamente con agua Milli-Q y una solución de glicerol al 10% (v/v). Finalmente el sedimento de células libre de iones se resuspendió suavemente en 125  $\mu$ l de glicerol al 10% (v/v) y se redistribuyó en tubos de microcentrifuga. Por cada transformación se tomó un tubo de electrocompetentes, se adicionó el volumen correspondiente de solución plasmídica. Esta mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación (BIO-RAD), y utilizando un electroporador MicroPulser (BIO-RAD) se sometió a la mezcla a cortos pulsos de corriente eléctrica de alto voltaje (pulso de 2,5 kV con capacitancia de 25  $\mu$ F y una resistencia de 400  $\Omega$ ). A continuación, se adicionó 900  $\mu$ l de medio LB y se incubó durante una hora a 37 °C. Transcurrida la incubación se realizó una centrifugación de 2 min a 2600 g a temperatura ambiente, el sedimento de células se resuspendió en 100 $\mu$ l de medio LB y finalmente se sembró en placas de medio LB que contenían el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C.

**b) Transformación de *A. tumefaciens*.** Un cultivo de *A. tumefaciens* (cepa ASE), crecido toda la noche a 28 °C en medio LB, se diluyó 1:100 en el mismo medio y se cultivó hasta una DO 600 entre 0,5 y 1. La suspensión de células se fraccionó en alícuotas de 1,5 ml, cada una de las cuales sirve para realizar una transformación. Se centrifugó a 2600 g por 2 min a 4 °C, y se resuspendió el sedimento de células en 0,5 ml de agua destilada estéril a 4 °C. Se repitió estos lavados 3 veces. Luego se resuspendió las células en 0,5 ml de 10% (v/v) glicerol estéril a 4 °C. Se centrifugó nuevamente a 2600 g por 2 min a 4 °C y se resuspendió las células en 20  $\mu$ l de 10% (v/v) glicerol estéril. Se transfirió a una cubeta de electroporación (Biorad) y se aplicó un pulso de 2,5 kV con capacitancia de 25  $\mu$ F y una resistencia de 400  $\Omega$ . A continuación se adicionó 1ml de medio LB y se incubó durante dos horas a 28° C. Transcurrida la incubación se realizó una centrifugación de 2 min a 2600 g a temperatura ambiente, el sedimento de células se resuspendió en 100 $\mu$ l de medio LB y finalmente se sembró en placas de medio LB que contenían el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron toda la noche a 28 °C.

### 5.1.10. Minipreparaciones de ADN plasmídico.

Las minipreparaciones de ADN plasmídico se realizaron según dos métodos distintos:

**a) Método de lisis alcalina.** A partir de colonias aisladas de células transformadas se obtuvo cultivos saturados en medio LB suplementados con el antibiótico correspondiente. Se centrifugó 4,5ml de cultivo a 2600 g durante 5 min en un tubo de microcentrífuga. El precipitado de células obtenido se resuspendió en 200 µl de Solución 1 y se incubó 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se adicionó 300 µl de Solución 2, se invirtió suavemente para mezclar y se incubó en hielo 5 min. Luego se agregó 300 µl de Solución 3, se mezcló suavemente por inversión y se incubó nuevamente 5 min en hielo. Transcurrida la incubación se centrifugó durante 15 min a 10500 g a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se adicionó un volumen de cloroformo. Se agitó y se centrifugó a 20000 g durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se recuperó la fase acuosa y se repitió la extracción con cloroformo de la misma forma antes descrita. Luego, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se precipitó el ADN plasmídico mediante la adición de un volumen de isopropanol e incubación a temperatura ambiente durante 15 min. Después, se centrifugó 10 min a 20800 g a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado mediante la adición de 500 µl de 70%(v/v) etanol y agitación. Se centrifugó durante 5 min a 20800 g a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado resultante se secó, se resuspendió en 25 µl de agua Milli-Q conteniendo 0,04 µg/µl de RNasa A y se incubó 30 min a 37 °C. Posteriormente se precipitó el ADN mediante la adición de 65 µl de una solución con 0,55 M NaCl y 9% (p/v) PEG800. La mezcla se incubó 20 min en hielo y a continuación se centrifugó 15 min a 20800 g a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado mediante la adición de 250 µl de 70% (v/v) etanol y agitación. Se centrifugó durante 5 min a 20000 g a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado resultante se secó y se resuspendió en 20µl de agua Milli-Q.

- Solución 1: 25mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA pH 8,0.
- Solución 2: 0,2N NaOH, 1% (p/v) SDS.
- Solución 3: 5M Acetato de potasio pH 5,2.

**b) Alternativamente, se obtuvo plásmidos utilizando el “kit” comercial “Wizard® PlusSV Minipreps” (Promega), según las indicaciones del fabricante.**

## 5.2. Material vegetal utilizado y obtención de plantas transgénicas.

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

Las plantas de Arabidopsis utilizadas en esta tesis corresponden a los ecotipos Columbia-0 (Col-0), S96 y WS. Las plantas se cultivaron en una cámara de crecimiento con un régimen de 16 h de

luz ( $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y 8 h de oscuridad (condición día largo). La temperatura de crecimiento fue de  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  durante el ciclo luz/oscuridad, mientras que la humedad fue mantenida en 65% de humedad relativa. Las plantas se regaron una vez por semana con agua. Para el crecimiento directo en tierra, las semillas se estratificaron a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 días en tubos de microcentrífuga con 1ml de 0,1% (p/v) agarosa, y luego se sembraron en tierra.

En esta tesis se utilizaron diferentes plantas mutantes y líneas transgénicas reporteras, estas se indican en la Tabla MM1.

Tabla MM1. Mutantes y líneas transgénicas reporteras utilizadas en esta tesis.

Mutante / Línea transgénica reportera	Descripción de la línea	Cita bibliográfica
<i>grf1 grf2 grf3</i>	Triple mutante <i>GRFs</i> en Ecotipo WS	Kim et al., (2003) Plant J.
<i>an3 / gif1</i>	Mutante insercional SALK_150407 en Ecotipo Col-0	Lee et al., (2009) Plant Physiol.
<i>an3-1</i>	Mutante por Delección en Ecotipo S96	Horiguchi et al., (2005) Plant J.
<i>an3-4</i>	Mutante por Delección en Ecotipo Col-0	Horiguchi et al., (2005) Plant J.
<i>gif2</i>	Mutante insercional SAIL_328_A03 en Ecotipo Col-0	Lee et al., (2009) Plant Physiol.
<i>gif3</i>	Mutante insercional SALK_072950 en Ecotipo Col-0	Lee et al., (2009) Plant Physiol.
<i>plt1 plt2</i>	Doble mutante genes <i>PLT1</i> y <i>PLT2</i> en Ecotipo WS	Aida et al., (2004) Cell.
<i>brm-1</i>	Mutante insercional SALK_030046 en Ecotipo Col-0	Hurtado et al., (2006) Plant Mol Biol. Kwon et al., (2006) Development.
<i>CYCB1;1-GFP</i>	Reportero GFP para <i>CYCB1;1</i>	Ubeda-Tomas et al., (2009) Curr Biol.
<i>WER-GFP</i>	Marcador de Ep y LRC	Lee and Schiefelbein (1999) Cell.
<i>SMB-GFP</i>	Reportero de SMB y marcador específico de Lateral Root Cap	Fendrych et al., (2014) Curr Biol.
<i>AGL42-GFP</i>	Reportero GFP cuya expresión se encuentra enriquecida en el CQ y en las SC de estela y tejido fundamental	Nawy et al., (2005) Plant Cell.
<i>PLT1-CFP</i>	Reportero transcripcional de <i>PLT1</i>	Galinha et al., (2007) Nature.
<i>PLT1:PLT1-YFP</i>	Reportero traduccional de <i>PLT1</i>	Galinha et al., (2007) Nature.
<i>PLT2:PLT2-YFP</i>	Reportero traduccional de <i>PLT2</i>	Galinha et al., (2007) Nature.
<i>pGL2-GAL4—pUAS-H2AF (pGL2:H2B-YFP)</i>	Marcador de células epidérmicas que no generan pelo radicular	Material no publicado Provisto por Lieven De Veylder
<i>pCo2-GAL4—pUAS-H2AF (pCO:H2B-YFP)</i>	Marcador de células de la corteza	Material no publicado Provisto por Lieven De Veylder
<i>pEn7-GAL4—pUAS-H2AF (pEND:H2B-YFP)</i>	Marcador de células de la endodermis	Material no publicado Provisto por Lieven De Veylder
<i>WOX5-GFP</i>	Marcador específico de CQ	Sarkar et al.,(2007) Nature.

Las cruces entre líneas reporteras y mutantes como así también la generación de múltiples mutantes requirió del genotipo de las líneas *an3*, *gif2* y *brm-1*. Una vez que se realizó la extracción de ADN de las plantas de interés (Materiales y métodos 5.1.4) se llevo a cabo una reacción de PCR utilizando la siguiente combinación de oligos:

Inserción	Oligo Directo	Oligo Reverso	Producto
<i>an3</i> SALK_150407	TTGGACGAAAACAAATCGTTGA	GTCGACCTTTCAATCCCATCATCTG	Amplificación Gen Silvestre
	TTGGACGAAAACAAATCGTTGA	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	Amplificación de la Inserción T ADN
<i>gif2</i> SAIL_328_A03	TCTAGAGAATTCAAGATGCAGCAGCAGCAGTCTCC	GTCGACAAGCTTCTTTGGATCCTTTTAC	Amplificación Gen Silvestre
	TCTAGAGAATTCAAGATGCAGCAGCAGCAGTCTCC	CTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC	Amplificación de la Inserción T ADN
<i>brm-1</i> SALK_030046	GATTTCCCCAAATTCGATGC	TGAGGCATTTGCATAGAGCCC	Amplificación Gen Silvestre
	GATTTCCCCAAATTCGATGC	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	Amplificación de la Inserción T ADN

### 5.2.2. Transformación de Arabidopsis.

La transformación de plantas de Arabidopsis se realizó mediante la técnica de “floral-dip” (92). Se cultivaron las cepas de *A. tumefaciens* ASE transformadas con los distintos plásmidos binarios en 100 ml de LB conteniendo 50 µg/ml de espectinomicina, 50 µg/ml de kanamicina y 25 µg/ml de cloranfenicol a 28 °C hasta llegar a una DO 600 cercana a 2. Se cosechó las células por centrifugación a 5.000 g durante 10 min a temperatura ambiente y se resuspendió en un medio con 5% (p/v) sacarosa y 200 µl/l de Silwet L-77. Las inflorescencias de plantas de Arabidopsis regadas el día anterior se sumergieron en la suspensión de células durante 30 segundos. Luego de escurrir el exceso de medio de cultivo, se colocaron las plantas en posición horizontal dentro de bolsas plásticas para conservar la humedad. Luego de 24 hs se sacaron de las bolsas y se prosiguió con el cultivo de las plantas en la cámara de crecimiento hasta la maduración de las semillas.

### 5.2.3. Recolección y esterilización de semillas.

La recolección de semillas se realizó a partir de plantas que finalizaron su ciclo de vida y que presentaban semillas maduras. Se retiraron las plantas del pote de tierra y frotando las mismas con las manos se dejó caer las semillas sobre una hoja de papel. Se eliminaron los restos de silicua y hojas por tamizado. Las semillas se almacenaron en bolsas de papel en un recipiente seco hasta su posterior utilización. Para la esterilización de las semillas, las mismas se incubaron con una solución de 70% (v/v) etanol, 0,1% (v/v) tritón-X-100, durante 8 min. Luego se realizó un enjuague con 96% (v/v) etanol y finalmente se las dejó secar en el flujo laminar. La manipulación del material vegetal en condiciones de esterilidad se realizó en una cabina de flujo laminar.

### 5.2.4. Selección de transformantes.

Para la selección de plantas transformadas, las semillas esterilizadas se sembraron en placas de Petri con medio MS-agar (93) suplementado con 25 µg/ml de kanamicina. Las placas se mantuvieron en oscuridad a 4 °C por 48 hs. Transcurrido este período, se transfirieron las placas a la

cámara de cultivo y en estas condiciones las plantas se dejaron crecer 5-10 días. Luego se analizaron las placas y aquellas plantas que presentaban un fenotipo de resistencia al agente de selección, evidenciado por el desarrollo de la raíz primaria y del primer par de hojas verdaderas, se transfirieron a potes con tierra. Los potes se ubicaron en bandejas con agua las cuales se cubrieron con papel de nylon transparente, de modo de evitar la pérdida de humedad. En estas condiciones se cultivaron en la cámara durante 2 días, momento en el que se retiró el nylon y se continuó con su cultivo.

### **5.3. Caracterización del sistema radicular de las plantas y microscopía.**

#### **5.3.1. Condiciones de crecimiento.**

Para los experimentos abocados a la caracterización fenotípica del sistema radicular las plantas fueron crecidas verticalmente en medio MS-Agar 1X (93) suplementado con 1% P/V sacarosa, y 2.3 mM ácido 2-(N-morpholino) etanesulfónico (MES) (pH 5.8).

En el caso de realizarse tratamientos con dexametasona (Sigma-Aldrich), la misma se adicionó al medio a partir de una solución madre de concentración 25 mM preparada en etanol absoluto (MERCK), de forma de obtener las concentraciones indicadas (de 5 a 25  $\mu$ M) para cada experimento. De la misma manera, los tratamientos con el péptido sintético GLV8 (GenScript) fueron realizados adicionando al medio un volumen adecuado de una solución acuosa de concentración 1mM. Secuencia del péptido sintético: LSMDYRTFRRRRPVHN.

#### **5.3.2. Medidas de elongación de raíz primaria.**

Para los análisis del crecimiento de la raíz primaria, las semillas esterilizadas se dispusieron sobre la superficie del agar en una línea recta haciendo uso de un palillo estéril. A continuación, las placas fueron estratificadas en oscuridad a 4°C por 48 horas. Transcurrido este periodo las placas fueron transferidas a la cámara de cultivo. Las medidas de velocidad de elongación comenzaron a los 4 días post siembra (DPS), para lo que se realizó marcas en la cara posterior de la placa en las puntas de las raíces, de manera de registrar el crecimiento en forma de segmentos secuenciales diarios durante al menos 5 días.

Una vez finalizado el marcado de las placas, se procedió a tomar una imagen digital de las mismas y haciendo uso del software FIJI (94) se midió el largo de cada segmento marcado. La evaluación de la longitud de estos segmentos en función del tiempo derivó en el gráfico de largo de la raíz primaria (cm) en función del tiempo. De la pendiente de la curva generada se obtuvo el valor de velocidad de elongación para cada raíz.

### 5.3.3. Microscopia y caracterización celular del sistema radicular.

Para determinar los parámetros celulares y analizar los patrones de expresión de las diferentes líneas reporteras en el sistema radicular, se utilizó Microscopía Confocal de Barrido Laser (LSCM, del inglés Laser Scanning Confocal Microscopy). Imágenes de secciones longitudinales medias fueron obtenidas utilizando raíces teñidas con 10 µg/ml de Ioduro de Propidio (IP) (Sigma) para visualizar las paredes celulares.

Las imágenes de LSCM fueron obtenidas en un microscopio ZEISS LSM880. La GFP y el IP fueron excitados utilizando la línea de 488nm el láser multilínea de ión de argón, y su fluorescencia fue detectada en un rango de 496nm-542nm para la GFP y 590nm-700nm para el IP. En el caso de la CFP, la excitación se realizó con la línea 458nm de láser ión de Argón y la fluorescencia emitida fue detectada en un rango entre 465nm-570nm. Por último, la YFP fue excitada utilizando la línea 514nm del laser de ión de Argón y la detección se realizó en el rango de 524nm-570nm.

El análisis de los parámetros celulares y de la intensidad de fluorescencia fue llevado a cabo utilizando el software FIJI (94). Particularmente, la determinación del largo de la zona meristemática se realizó midiendo la distancia entre el CQ y la primer célula de la corteza que muestra signos claros de expansión (95).

### 5.3.4. Estimación de la Duración del Ciclo Celular.

La ecuación utilizada para calcular la duración promedio del ciclo celular (T) se describe como :

$$T = (\ln 2 N_m \times L_e) / Vel$$

Donde  $N_m$  es el número de células meristemáticas de la corteza,  $L_e$  es el largo promedio de las células maduras de la corteza y  $Vel$  es la velocidad de crecimiento de la raíz.

Esta ecuación, que permite evaluar la duración del ciclo celular en el meristema apical de la raíz, deriva de un modelo que se basa en el crecimiento de la raíz en estado estacionario (96)

## 5.4. Cuantificación del nivel de expresión génica.

### 5.4.1. Extracción de ARN.

La extracción de ARN de tejido vegetal de Arabidopsis se realizó utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen). La recolección de las muestras de tejido se realizó en tubos de microcentrífuga que inmediatamente fueron sumergidos en N<sub>2</sub> líquido. El material fue reducido a un polvo fino utilizando un pilón. A continuación, sobre este polvo se adicionó TRIzol (1 ml de reactivo para un máximo de 100 mg de tejido) y se agitó de modo de resuspender el tejido mortereado. El homogenado se centrifugó a 12000 g a 4 °C durante 10 min y finalmente se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga nuevo.

A continuación se agregó 0,2 volúmenes de cloroformo por cada volumen de TRIzol original. Esta mezcla se invirtió vigorosamente por 15 segundos y se centrifugó a 12000 g a 4 °C durante 15 min. Se transfirió la fase superior a un nuevo tubo de microcentrífuga, y se agregó 1 µl de GlycoBlue (Invitrogen), y un volumen de isopropanol para precipitar el ARN. El agregado del coprecipitante Glycoblu facilita la visualización del precipitado de ARN, que en el caso de muestras de puntas de raíces suele ser muy pequeño. Esta mezcla se incubó por lo menos durante 2 hs a -20 °C. Luego se centrifugó a 12000 g a 4 °C durante 10 min. Finalizada la centrifugación se descartó el sobrenadante.

Se lavó el precipitado de ARN mediante el agregado de 1 ml de 70 % (v/v) etanol frío y agitación con vortex. Luego se centrifugó a 7500 g a 4 °C durante 5 min, descartando el sobrenadante una vez finalizada la centrifugación. Este paso de lavado se repitió una vez más.

El precipitado de ARN obtenido se secó en estufa 37 °C por 10 min y luego se resuspendió en 30 µl de agua Milli-Q esteril.

### **5.4.2. Cuantificación y chequeo de la integridad del ARN purificado.**

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

### **5.4.3. Tratamiento del ARN preparado con ADNasa.**

Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

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

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

### **5.4.4. Retrotranscripción (RT).**

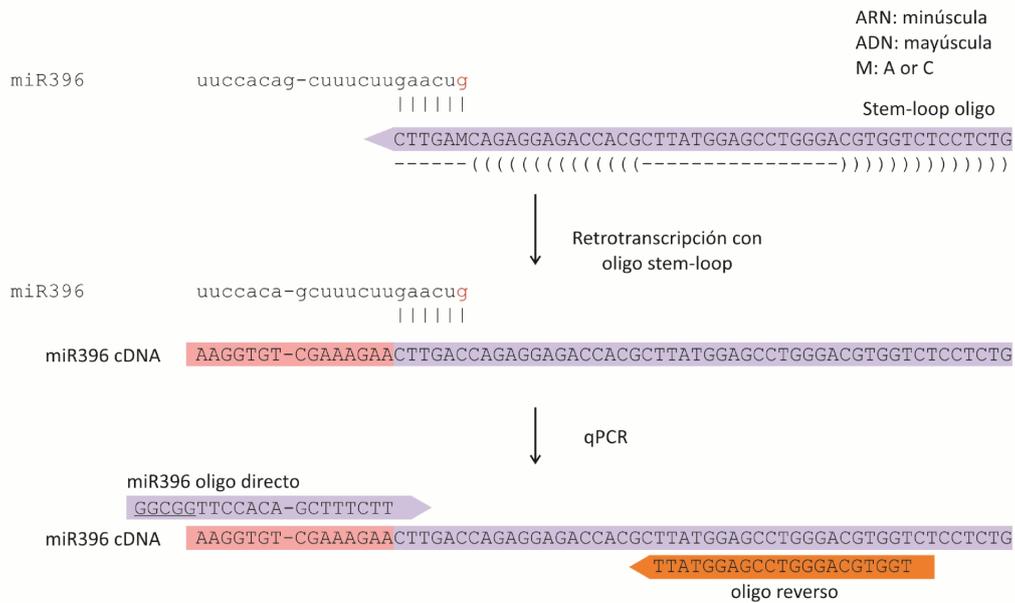
La síntesis del ADNc a partir del ARN preparado se llevó cabo según el siguiente protocolo. En una primera etapa se preparó la siguiente mezcla: en un volumen final de 12 µl se adicionó 0,25 µg de oligo dTv (0.5 µg/ µl), 10 µl de ARN tratado con ADNasa, dNTPs a una concentración final de 0,4 mM cada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

La mezcla de reacción se incubó durante 5 min a 65 °C y a continuación en hielo durante al menos un minuto. Luego se realizó una centrifugación rápida y se adicionó a cada tubo de reacción 4 µl de "5X First Strand Buffer", 2 µl de 0,1 M DTT, 1 µl "RnaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor" (Invitrogen) y 100 U de "Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase" (M-MLV) (Invitrogen).

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

### **5.4.5. Retrotranscripción para analizar la expresión de miARNs.**

Debido a que los miARNs maduros no poseen una cola de poliA en el extremo 3', se utilizó un protocolo alternativo para realizar la retrotranscripción. En la etapa de desnaturalización, se realizó la siguiente mezcla: en un volumen final de 12 µl se adicionó: 0,25 µg de oligo dTv, 8 µl de ARN tratado con ADNasa, dNTPs a una concentración final de 0,4 mM cada uno y 1 µM de oligo específico para la retrotranscripción del miARN a analizar, denominado stem-loop oligo (97) (Figura MM1). La mezcla de reacción se incubó durante 5 min a 65 °C y a continuación en hielo durante al menos un minuto. Luego se realizó una centrifugación rápida y se adicionó a cada tubo de reacción 4 µl de "5X FirstStrand Buffer", 2 µl de 0,1 M DTT, 1 µl "Rnase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor" (Invitrogen) y 100 U de "Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase" (M-MLV) (Invitrogen). Se mezcló por inversión y se incubó 30 min a 16 °C y luego 50 min a 37 °C. Por último, se realizó una centrifugación rápida y se inactivó la reacción mediante la incubación a 70 °C durante 15 min. El ADNc a usar como molde en la reacciones de amplificación se diluyó al menos 40 veces en agua Milli-Q.



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

#### 5.4.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

La cuantificación relativa de los niveles de expresión génica se llevó a cabo mediante la técnica de PCR en tiempo real (Real-Time PCR) según el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (98). Como calibrador se utilizó un gen de expresión constitutiva que codifica por la Ser/Thr proteína fosfatasa 2 (PP2A; At1g13320) (99). Un aspecto importante que se tuvo en cuenta para la aplicación del método de cuantificación  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  es que las eficiencias de amplificación de los fragmentos del gen de interés y del gen de referencia sean similares y próximas a 2 (98). Para el diseño de los oligonucleótidos para la cuantificación de blancos de miARNs se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones. Los miARNs en plantas regulan la expresión de sus blancos principalmente mediante el corte del ARNm. De esta manera para cuantificar el nivel de expresión de un gen que es blanco de un miARN es fundamental distinguir el ARNm completo del cortado. Dado que en la RT se sintetizan las hebras de ADNc a partir del oligo dTv que hibrida en el extremo 3' de los ARN mensajeros, la secuencia que se ubica 5' del sitio complementario al miARN solamente será retrotranscripta en aquellos ARNm que no hayan sido cortados por el miARN. De esta manera si los oligonucleótidos utilizados en la PCR en tiempo real hibridan en esta región se amplificará específicamente un fragmento presente en el ADNc generado de ARNm intactos.

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

Gen	Locus ID	Oligo Directo	Oligo Reverso
<b>GRF1</b>	At2g22840	ATGGAAAGAAATGGCGGTGCTC	CGGCGGCAGCATTAGTATTGT
<b>GRF2</b>	At4g37740	CACATCAACAGAGGCCGTCATCG	AACCGGAGATTCCTTGGGTTGTAAG
<b>GRF3</b>	At2g36400	GTCTTCGCTGGCCACAAGTATT	TGTTGCTGTTGTAGTGGTGGCT
<b>GRF4</b>	At3g52910	GCCACATTCACCGTGAAGAAA	CCACTGTTAGCTTCATATGGCCTC
<b>GRF5</b>	At3g13960	CTCTTCATCATGCTTCCGCTTT	TTGCTAACGGTGTGGTGATG
<b>GRF6</b>	At2g06200	TCCTCAAGAAAGCCTCCTCCTA	ATCTTCCATTGCTGAGCCAGAG
<b>GRF7</b>	At5g53660	TGCGCGAAAGAAGTCGTCTCTA	CACCATTGTTGTTAGGGCGAGA
<b>GRF8</b>	At4g24150	GCATGTGGAATCATCTCACCAA	TCTCCGGGTTAAAGTTCCAAT
<b>GRF9</b>	At2g45480	GCTGCAAAATTCTCAAGCAACA	GCACCTTCCTGGTTCATTGTCT
<b>PLT1</b>	At3g20840	ACAATGCTCACGATTCCTCCTC	AGCAGAGCCGGATTGCTATGAA
<b>PLT2</b>	At1g51190	CGCAGCTTCATCTTCACCAACA	TTCACGGCTGGAACTCTTCT
<b>PLT3</b>	At5g10510	AAGCTCTCTTTGGAAGCTGCTG	TTGGTGGTGGTGGTAAAGAGCA
<b>BBM</b>	At5g17430	AGCTTATTGCAGCAACAGCAGG	ACCGATGTTCCAACAGGGATTG
<b>PP2A</b>	At1g13320	CCTGCGGTAATAACTGCATCT	CTTCACTTAGCTCCACCAAGCA
<b>CYCD6;1</b>	AT4G03270	CGACCCATCTCTGACGTATCTTGC	AGGGCTTTGACTGCGGCATATC
<b>MIR396A</b>	At2g10606	GCGGTTCCACAGCTTTCTT	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT
<b>MIR396B</b>	At5g35407	GCGGTTCCACAGCTTTCTT	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT
<b>AN3</b>	At5g28640	TTGGACGAAAACAATCGTTGA	CTGTTGCTGTTGAGTCGCTTG
<b>SCR</b>	At3g54220	CTCAAAGATTAGCTCCTAAAG	TGCTCCAGTGAGTCAAAGA

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

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización	95	1 min	1
Ciclos	95	15 seg	40
	55	30 seg	
	72	40 seg	
	Lectura de fluorescencia		

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

#### **5.4.7. Análisis de transcriptoma por RNAseq.**

##### **a) Generación de muestras .**

Para la realización del experimento de RNAseq se seleccionaron líneas inducibles *an3* x *AN3-GR-GFP* y *35S:miR396* x *rGRF3-GR-GFP* cuya funcionalidad biológica había sido previamente evaluada. Se escogieron tratamientos de dos horas con 25  $\mu$ M dex, con el objetivo de encontrar mayormente genes blancos regulados a nivel transcripcional de forma directa por el sistema AN3/GRF3. Se obtuvieron por triplicado muestras de puntas de raíces de plántulas de seis días de ambos sistemas inducibles luego del tratamiento con dex y sus correspondientes controles sin tratamiento. A continuación se extrajo el ARN total utilizando el Kit "RNeasy Plant Mini Kit" (QIAGEN). La calidad de ARN fue testada por electroforesis y a continuación las muestras fueron enviadas a Alemania al servicio de genómica para la comunidad científica del EMBL "GeneCore" para la correspondiente generación de bibliotecas y secuenciación masiva.

##### **b) Análisis de los resultados de la secuenciación masiva.**

Los resultados de la secuenciación masiva fueron analizados en el laboratorio por el Dr. Uciel Chorostecky. En primer lugar se analizó la calidad de la secuenciación, mediante la herramienta FASTQC y a continuación, como la calidad de las mismas resultó satisfactoria se procedió al cálculo de los niveles de expresión y sus cambios luego de los tratamientos con dex siguiendo los pasos estipulados en la literatura (100).

#### **5.4.8. Recursos bioinformáticos.**

**- agriGO:**

El software agriGo permite identificar categorías de Ontología Génica enriquecidas en listas de genes obtenidas en experimentos de RNAseq. Como salida del programa se obtiene una lista de categorías GO con un p-value asociado. Se consideran significativamente enriquecidas aquellas categorías con un p-value <0.001. Disponible en <http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/> (101).

## **RESULTADOS I.**

## 6. Resultados Capítulo 1.

El MicroARN miR396 regula la transición entre las SC y las TAC en las raíces de Arabidopsis.

### 6.1. Introducción.

El crecimiento indeterminado de las raíces es mantenido a través de la coordinación de dos procesos que tienen lugar en la punta de la raíz: la división y la elongación celular. La punta de la raíz está organizada en diferentes zonas distribuidas consecutivamente en el eje longitudinal, cada una de ellas abocadas a un proceso de desarrollo en particular (Figura 1.8A). Cercano a la punta, el SCN genera los diferentes tipos celulares a través de las divisiones generativas de las SC. Por encima de esta región, cada tipo celular prolifera en la zona meristemática a una mayor velocidad para amplificar el número de células. Por último, las células dejan de proliferar para comenzar a expandirse y luego diferenciarse en las zonas de elongación y maduración respectivamente (83).

Los ARN pequeños son reguladores cruciales de la expresión génica en animales y plantas desempeñando un rol fundamental en el desarrollo (36). Una clase de ARN pequeños son los microARNs. El genoma de Arabidopsis codifica para más de 300 genes de microARNs, los cuales se encuentran agrupados en familias de acuerdo a la similitud en secuencia. La familia del miR396 consiste en dos genes, *MIR396A* y *MIR396B*, y regula la expresión de los factores de transcripción pertenecientes a la familia de los *GROWTH REGULATING FACTORS (GRF)* (23, 54). Siete de nueve de los *GRFs* en Arabidopsis presentan el sitio de unión para el microARN miR396 (Figura 1.6) y, esta interacción se encuentra conservada en angiospermas y gimnospermas (23, 53).

En hojas, la represión post transcripcional de los *GRFs* por la actividad del miR396 resulta en la expresión de los factores de transcripción en las células en activa proliferación (23, 54). En consecuencia, la sobreexpresión del miR396 causa una reducción significativa de la expresión de los *GRFs*, y por ende, plantas con hojas más pequeñas con un número reducido en células (23, 54, 60).

La red regulatoria miR396-*GRFs* también ha sido implicada en el desarrollo y el crecimiento de otros órganos y estructuras en las plantas (11). Por ejemplo, las plantas con severas reducciones en los niveles de expresión de los *GRFs* debido a la sobreexpresión del miR396 tienen defectos en el desarrollo floral, incluyendo un número reducido de órganos y fusiones de los mismos, lo cual compromete la fertilidad de la planta (102). Además existe evidencia que indica que los *GRFs* son necesarios también para el desarrollo y mantenimiento del SAM. Las plantas cuádruple mutante *grf1 grf2 grf3 grf4* carecen de un SAM funcional y muestran fusiones de cotiledones resultado de defectos durante el desarrollo embrionario (55), mientras que las plantas que acumulan mayores niveles de

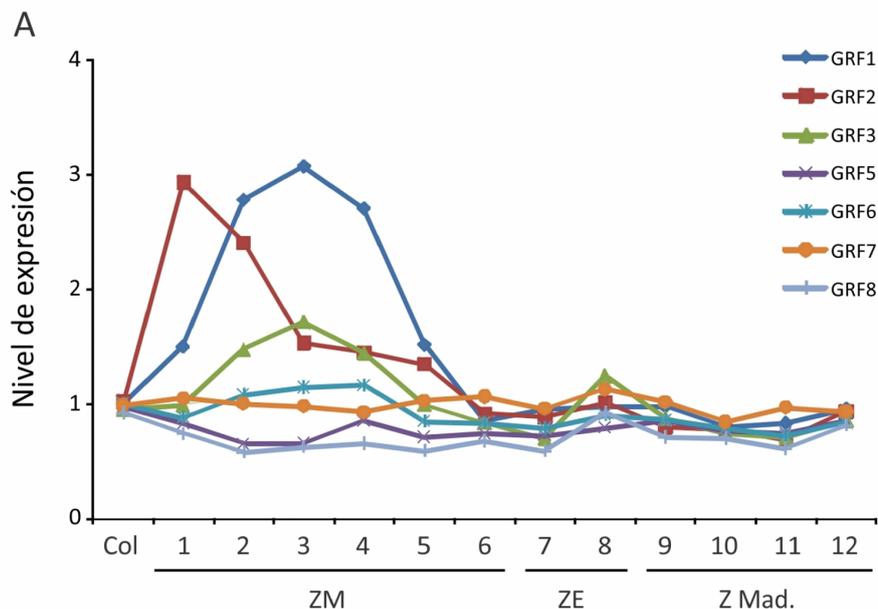
*GRFs* tienen SAM más grandes (54). Estos cambios en la morfología del SAM se correlacionan con la participación de los *GRFs* como promotores de la proliferación celular no sólo en los órganos laterales en desarrollo, sino también en el propio meristema apical del vástago.

Resultados obtenidos en la planta modelo *Medicago truncatula*, en la que se han identificado seis *GRFs* (*MtGRFs*) que presentan el sitio de reconocimiento del miR396, brindaron información acerca de la participación del sistema en la regulación del RAM (24). Los *MtGRFs* y el miR396 presentaron gradientes de expresión opuestos en la punta de la raíz, sugiriendo que el microARN probablemente sea responsable de restringir la expresión de los *MtGRFs* a regiones de proliferación en el RAM tal como se observa en las hojas de *Arabidopsis* (54). La disminución de los niveles de expresión de los *MtGRFs* produjo una reducción del largo de la raíz primaria debido a una disminución del tamaño y la actividad del meristema, junto con una caída de la expresión de marcadores de proliferación (24). El estudio de la participación de la red regulatoria miR396/*GRF* en la raíz de *Arabidopsis* indicó que el balance preciso de los niveles de expresión del miR396 y *GRF* en *Brassicaceae* es necesario para el desarrollo radicular (103), ya que tanto la disminución de los niveles de los *GRFs* por sobreexpresión del miR396 como la sobreexpresión de *GRF1* o *GRF3* resultó en raíces más cortas. Estos resultados indicaron que los mecanismos que subyacen a la función de esta red regulatoria en el desarrollo radicular aún no se encuentran completamente descritos. Por lo que en este primer capítulo nos abocamos a la caracterización de los fenotipos de plantas mutantes y transgénicas que presentan niveles modificados de los FTs de la familia *GRFs* y el miR396, el análisis de sus patrones de expresión y de la interacción con otras redes regulatorias que se sabe que participan en el establecimiento del sistema radicular de *Arabidopsis*, de manera de contribuir al conocimiento acerca de la participación de esta red regulatoria en el desarrollo de la raíz.

## 6.2. Resultados.

### 6.2.1. El microARN miR396 contribuye a determinar la arquitectura del meristema radicular.

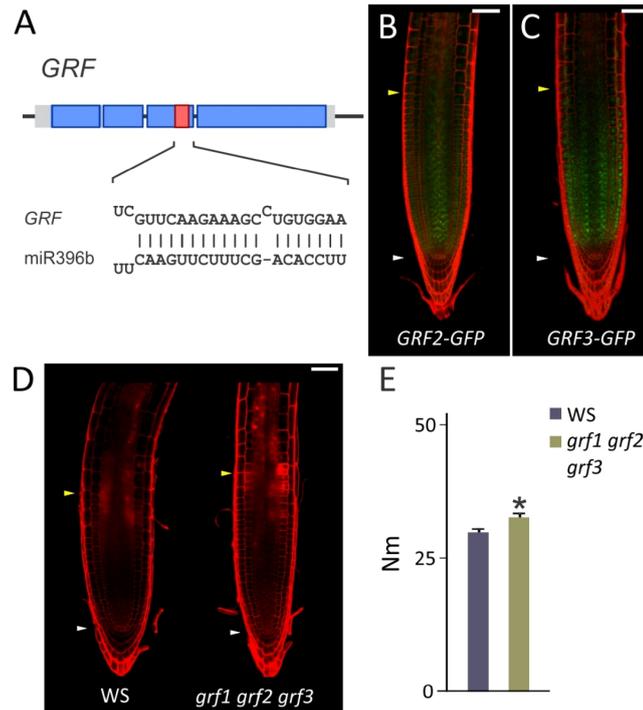
Haciendo uso del conjunto de datos de transcriptoma disponibles en bases de datos públicas se pudo determinar que varios de los factores de transcripción de la familia *GRF* se expresan en la zona meristemática en la punta de la raíz (Figura R1.1) (104). En particular, *GRF1*, *GRF2*, y *GRF3* son los que presentan los mayores niveles de expresión en la ZM, especialmente en su extremo distal, donde se concentra la mayor actividad mitótica del meristema.



**Figura R1.1. Niveles de expresión génica de los GRFs a lo largo del eje longitudinal de la raíz.** Los datos de expresión se obtuvieron de la base de datos RootMap (adaptado de (104)). Col, Columela; ZM, Zona meristemática; ZE, Zona de elongación; Z Mad, Zona de maduración. *GRF4* y *GRF9* no son detectados en los microarreglos.

A continuación, analizamos en mayor detalle el patrón de expresión de dos de estos *GRFs*, el *GRF2* y el *GRF3*, que son regulados a nivel post-transcripcional por el miR396. (Figura R1.2A). Para evaluar el patrón de expresión de estos genes preparamos reporteros traduccionales para *GRF2* y *GRF3*, que consisten en la fusión C-terminal de la GFP a la secuencia genómica completa, incluyendo intrones, de *GRF2* ó *GRF3* (*GRF2-GFP* y *GRF3-GFP*). La expresión de estas construcciones es controlada por las propias secuencias promotoras de los *GRFs* correspondientes. Tanto *GRF2* como *GRF3* fueron detectados en la zona meristemática (Figura R1.2B, C), más precisamente en las TACs, siendo consistente con el rol de los *GRFs* en la promoción de la proliferación celular.

Sobre la base de los patrones de expresión de los *GRFs* decidimos examinar el fenotipo de la triple mutante *grf1 grf2 grf3* y encontramos que la zona meristemática de estas plantas era más larga en comparación con la planta silvestre (Figura R1.2D, E). Resultados previos mostraron que la disminución en los niveles de *GRF*, debidos a la sobreexpresión del miR396, causa una reducción en el número de células y por ende del tamaño del SAM (54, 55). Por lo tanto, a pesar de que el aumento en el tamaño del meristema apical de las *grf1 grf2 grf3* fue moderado, este resultado era inesperado considerando los resultados previos obtenidos en la parte aérea de la planta.



**Figura R1.2. Los GRFs se expresan en las TACs y regulan el tamaño del RAM.** (A) Esquema de un gen *GRF* típico y la interacción del ARNm con el microARN miR396. (B) y (C) Expresión de reporteros GFP de los genes *GRF2* (B) y *GRF3* (C). (D) Arquitectura de la punta de la raíz siete días post siembra (DPS) de las plantas silvestres (WS) y triple mutante *grf1 grf2 grf3*. (E) Número de células de la corteza en el meristema (Nm) de plantas silvestres (WS) y triple mutante *grf1 grf2 grf3*. El número de células meristemáticas de la corteza fue evaluado en diez filas de células de la corteza por cada uno de los genotipos. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de diez réplicas biológicas. El asterisco indica una diferencia significativa respecto a las raíces de plantas silvestres determinada a través de la prueba T-Student ( $P < 0,05$ ). Las puntas de flecha blancas marcan la posición del CQ y las puntas de flecha de color amarillo marcan el final del meristema (ZM) donde las células comienzan a alargarse Barra de escala = 50 $\mu$ m.

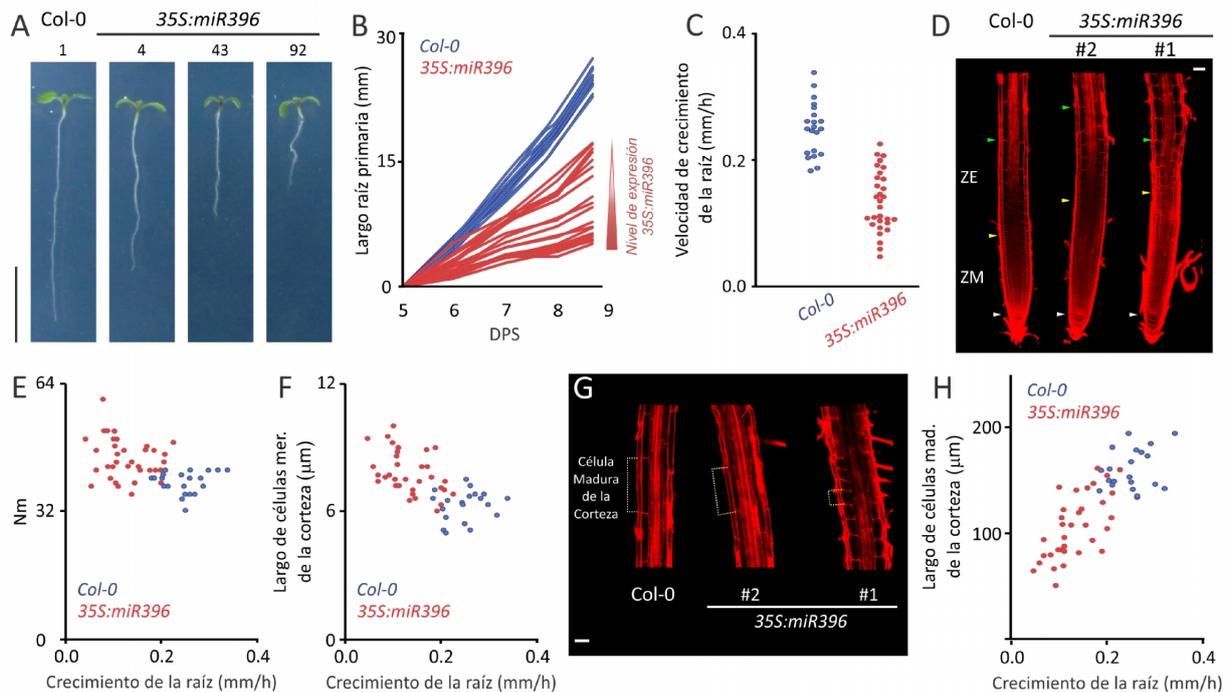
Para disminuir la expresión de todos los *GRFs* regulados por el miR396 generamos una serie de plantas sobreexpresantes del miR396 (Figura R1.3A). Analizamos el crecimiento de la raíz de 34 líneas transgénicas independientes (T1) que expresan el vector *35S:miR396* y 21 plantas control (Col-0) (Figura R1.3A). Observamos que todas las plantas *35S:miR396* presentaron una inhibición del crecimiento de la raíz en comparación con las plantas control, aunque como era de esperarse el grado de inhibición resultó variable entre las diferentes T1 (Figura R1.3A-C). A continuación, a partir de esta población de T1 generamos muestras de plantas en función de la magnitud de inhibición del crecimiento de la raíz y estimamos los niveles de miR396 maduro por RT-qPCR. Encontramos una correlación directa entre los niveles de sobreexpresión del miR396 y la inhibición del crecimiento de la raíz (Figura R1.3A, B). De hecho, las sobreexpresantes más fuertes presentaron una reducción del 70% de la velocidad de elongación de la raíz, confirmando la importancia del microARN y los *GRFs* en el crecimiento de este órgano.

Para comprender mejor a nivel celular las causas de este fenotipo, analizamos a nivel microscópico las raíces de esta población de T1. De esta manera, pudimos estudiar en detalle los

parámetros celulares que determinan el crecimiento de la raíz como órgano, es decir, la proliferación y la elongación celular.

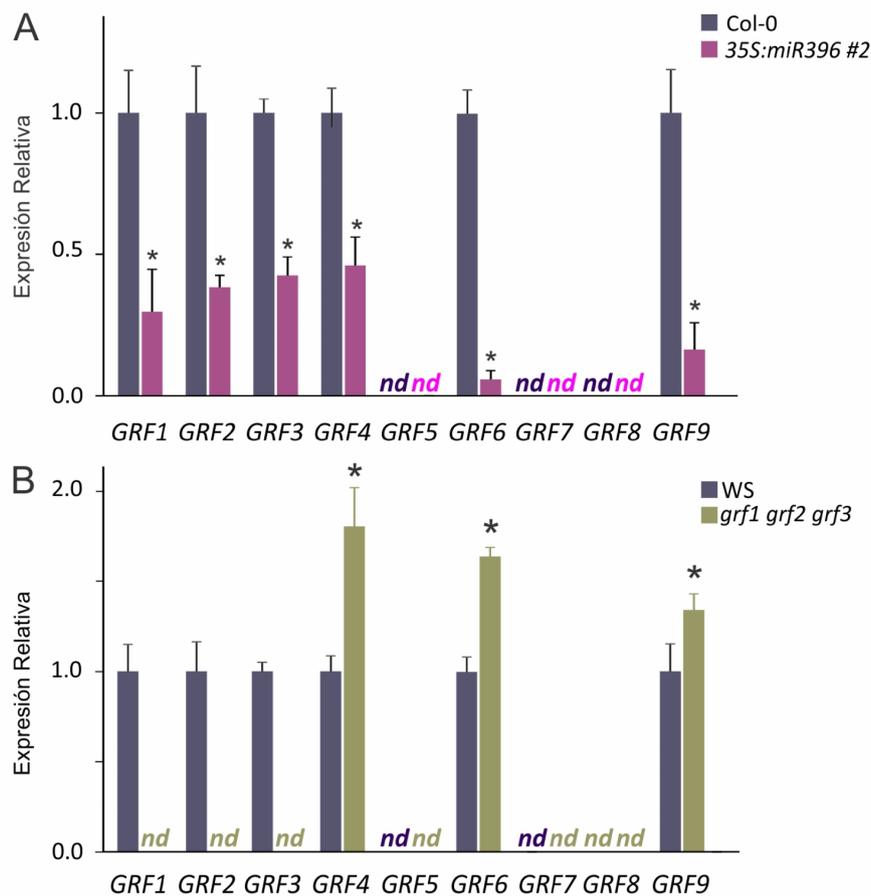
En primer lugar, nos enfocamos en el estudio de la zona meristemática, y observamos que independientemente del nivel de expresión de miR396 (*35S:miR396#2*, línea que expresa niveles moderados de miR396; *35S:miR396#1* expresa niveles de miR396 mucho mayores) la zona meristemática resulta más larga en comparación con la planta silvestre (Figura R1.3D). Este aumento de tamaño es debido tanto a un incremento del número de células como del área de las mismas (Figura R1.3E, F). En los gráficos puede observarse que los fenotipos más extremos en número y tamaño celular se correlacionan con la mayor disminución en el crecimiento de la raíz, que puede interpretarse en términos de niveles de expresión del miR396 de acuerdo a la relación establecida anteriormente (Figura R1.3A, B). Este resultado se encuentra en concordancia con el fenotipo de las *grf1 grf2 grf3* y confirma que la relación miR396/GRFs tiene diferentes efectos en RAM y el SAM.

Observando en mayor detalle las plantas transgénicas *35S:miR396 #1* que expresan los mayores niveles de miR396, encontramos que las mismas presentaban otros defectos en la estructura de la raíz, que no eran evidentes en plantas de tipo *35S:miR396#2*. Hallamos que la zona de elongación estaba reducida (Figura R1.3D) y que las células de la zona madura eran más cortas, alcanzado una disminución de hasta 50% del largo (Figura R1.3G). Nuevamente, la correlación entre los niveles de sobreexpresión del miR396 y la inhibición en la elongación de las células de la zona madura resultó directa (Figura R1.3H). De esta manera podemos concluir que en parte, el fenotipo de raíces cortas en plantas sobreexpresantes del microARN podría ser explicado como un resultado de un defecto en la elongación celular. Además, estos resultados nos indican que la sobreexpresión del miR396 presenta efectos opuestos en las células meristemáticas cuando se los compara con las células maduras, ya que promueve la elongación de las células en activa división pero disminuye el tamaño de las células diferenciadas.



**Figura R1.3: El balance miR396/GRF regula el tamaño del meristema y el crecimiento de la raíz.** En las imágenes de LSCM las puntas de flecha blancas marcan la posición del CQ, las puntas de flecha de color amarillo marcan el final del meristema (ZM) donde las células comienzan a alargarse, y las puntas de flecha verde marcan el final de la zona de elongación (ZE). **(A)** Fenotipo de crecimiento de la raíz siete DPS de una planta silvestre (Col-0) y tres plantas transgénicas independientes (*35S:miR396*) que sobreexpresan niveles crecientes del miR396. Los números por encima de las fotografías indican los niveles de expresión relativa del miR396 con respecto a las raíces de plantas silvestres estimados por RT-qPCR. Barra de escala = 1cm. **(B)** Distribución de los fenotipos de elongación de raíz primaria en función de los DPS en la población de plantas T1 transformadas con un vector que sobreexpresa el *miR396* bajo el control del promotor 35S (*35S:miR396*) o plantas control (Col-0). **(C)** Velocidad de elongación de raíz primaria (mm/h) para cada una de las plantas control y *35S:miR396* de la población de T1 analizada. **(D)** Arquitectura de la punta de la raíz de la planta control y de dos líneas transgénicas que expresan cantidades crecientes de miR396 (*35S:miR396* #1 y #2, que acumulan 90 ó 4 veces más miR396 en comparación con la planta control, respectivamente). Barra de escala = 50 $\mu$ m. **(E)** y **(F)** Número de células de la corteza en el meristema (Nm) **(E)** y largo de las células meristemáticas de la corteza **(F)** de la población de plantas silvestres y *35S:miR396*. **(G)** Células maduras de la corteza en la planta silvestre y dos líneas transgénicas que expresan cantidades crecientes de miR396 (*35S:miR396* #1 y #2) Barra de escala = 50 $\mu$ m. **(H)** Largo de las células maduras de la corteza de la población de plantas silvestres y *35S:miR396*. Tanto en **(F)**, **(G)** y **(H)** los valores son graficados en función de la velocidad de crecimiento de cada raíz.

Para evaluar los niveles de expresión de los *GRFs* en estas líneas transgénicas sobreexpresantes hicimos uso de RT-qPCR, y observamos una reducción significativa en los niveles de transcritos de seis de los *GRFs* (Figura R1.4A). Este resultado puede explicar los efectos más fuertes observados en las sobreexpresantes del microARN comparadas con las *grf1 grf2 grf3* (Figura R1.2D, E). Además, el análisis por RT-qPCR de los niveles de los *GRFs* en esta triple mutante reveló que algunos de los *GRFs* resultaron inducidos, efecto que puede compensar parcialmente la pérdida de función de *GRF1*, *GRF2* y *GRF3* (Figura R1.4B).



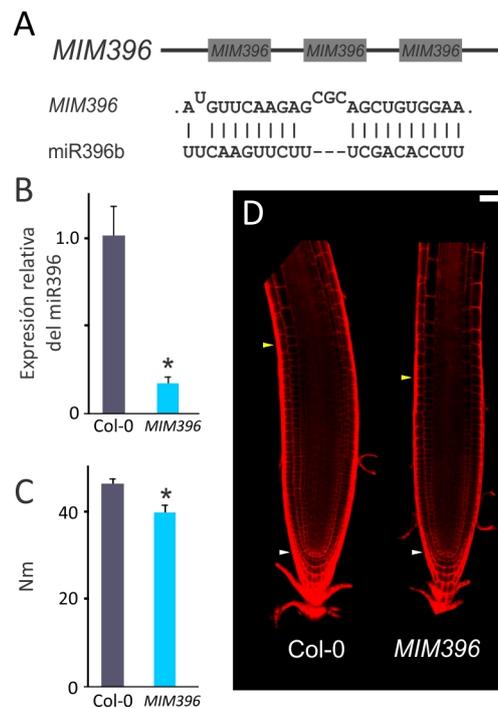
**Figura R1.4. Niveles de expresión de GRFs en plantas 35S:miR396 y triple mutante *grf1 grf2 grf3*.** (A) y (B) Niveles de expresión relativa de los GRFs en plantas que sobreexpresan el miR396 en forma moderada (35S:miR396#2) (A) y en plantas triple mutante *grf1 grf2 grf3* (B) estimados por RT-qPCR en muestras de puntas de raíces. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de tres réplicas biológicas. El asterisco indica una diferencia significativa respecto a las raíces de plantas silvestres determinada a través de la prueba T-Student ( $P < 0,05$ ). nd: no detectado.

Sobre la base de estos resultados concluimos que el balance entre el miR396 y los GRFs afecta fundamentalmente el tamaño del meristema, mientras que altos niveles del miR396 afectan severamente la estructura global a lo largo del eje longitudinal de la raíz.

### 6.2.2. Suprimir la función del microARN miR396 reduce el tamaño del meristema radicular.

Como las mutantes insercionales en los precursores de los microARNs son difíciles de obtener debido a su tamaño pequeño, para estudiar los fenotipos causados por la disminución en la actividad del miR396, recurrimos al uso del "target mimicry". Esta tecnología se basa en la expresión de un ARN no codificante que secuestra al microARN de interés (105, 106) gracias a una interacción por apareamiento de bases que bloquea la actividad del microARN y promueve su degradación (Figura R1.5A).

Generamos las plantas que expresan un ARN no codificante que contiene tres sitios de unión para el miR396 que fueron denominadas *MIM396* (por "mimic" de los genes blanco del miR396). La disminución de los niveles de expresión del miR396 en las plantas *MIM396* fue corroborada por RT-qPCR (Figura R1.5B). El análisis por LSCM de la punta de las raíces reveló que la disminución de la actividad del miR396 en las plantas *MIM396* causó una reducción moderada del tamaño del meristema (Figura R1.5C, D).

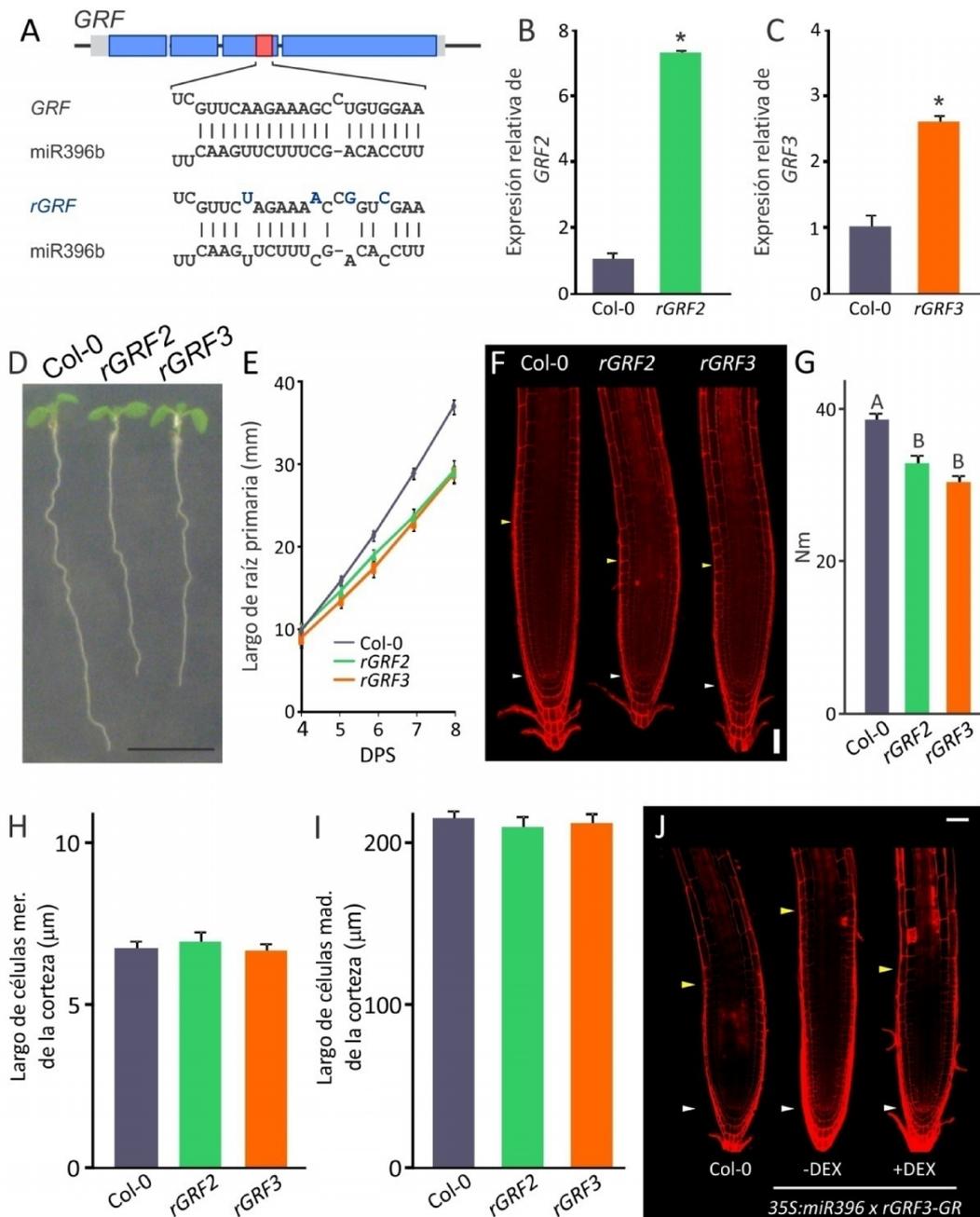


**Figura R1.5: Disminución del tamaño del meristema en plantas *MIM396*.** (A) Esquema que representa una de las estrategias para disminuir los niveles del miR396 que consiste en la sobreexpresión del *MIM396* que actúa como una esponja que interacciona con el miR396 para disminuir su actividad y niveles de expresión. (B) Niveles de expresión relativa del miR396 maduro en plantas *MIM396* estimados por RT-qPCR en muestras de puntas de raíces. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de tres réplicas biológicas. (C) Número de células de la corteza en el meristema (Nm) de plantas silvestres (Col-0) y *MIM396*. El número de células meristemáticas de la corteza fue evaluado en diez filas de células de la corteza por cada uno de los genotipos. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de diez réplicas biológicas. Tanto en (B) como en (C) El asterisco indica una diferencia significativa respecto a las raíces de plantas silvestres determinada a través de la prueba T-Student ( $P < 0,05$ ). (D) La inactivación del miR396 a través del *MIM396* reduce el tamaño del meristema de la raíz. Las puntas de flecha blancas marcan la posición del CQ y las puntas de flecha de color amarillo marcan el final del meristema (ZM) donde las células comienzan a alargarse. Barra de escala = 50 $\mu$ m.

Para determinar la relevancia de la represión por miR396 sobre determinados *GRFs*, analizamos el efecto de mutaciones silenciosas en el sitio blanco del miR396 en *GRF2* y *GRF3*. Estas mutaciones impiden la interacción del microARN creando una versión resistente al microARN de estos *GRFs* sin introducir cambios en la secuencia de la proteína (*rGRF2* y *rGRF3*) (Figura R1.6A). Estas versiones de los *GRFs* se transcriben a partir de sus propias regiones promotoras, pero son insensibles a la regulación post-transcripcional por el miR396. Tanto las plantas *rGRF2* como *rGRF3* acumulan mayores niveles de los correspondientes transcritos (Figura R1.6B, C) y presentan una

reducción en el crecimiento de la raíz (Figura R1.6D, E). El análisis a nivel celular reveló una reducción en el tamaño del meristema de las plantas *rGRF2* y *rGRF3*, que puede ser explicada en base a una disminución del número de células en esta zona (Figura R1.6F, G). A continuación, evaluamos la elongación celular, tanto en las células del meristema como de la zona madura, y no encontramos defectos obvios (Figura R1.6H, I).

Para confirmar que la disminución en los niveles de expresión de los *GRFs* era la responsable del incremento en el tamaño del meristema de las plantas *35S:miR396*, generamos un alelo de *rGRF3* inducible por dexametasona expresado bajo el control de su propio promotor en el cual *rGRF3* se encuentra fusionado al receptor de glucocorticoides (*rGRF3-GR*). Esta construcción a continuación fue introducida por cruza en plantas *35S:miR396*. Como era esperado, en ausencia de dexametasona, el *rGRF3-GR* se encuentra secuestrado en el citoplasma, y las plantas *35S:miR396 x rGRF3-GR* tienen un meristema más largo en comparación con la planta silvestre (Figura R1.6J). El tratamiento de estas plantas con dexametasona induce la translocación al núcleo de *rGRF3-GR* y, luego de 72 horas, el rescate del fenotipo de meristema (Figura R1.6J) confirmando la importancia de la relación *miR396/GRFs* en el control del tamaño del meristema en la raíz de *Arabidopsis*.



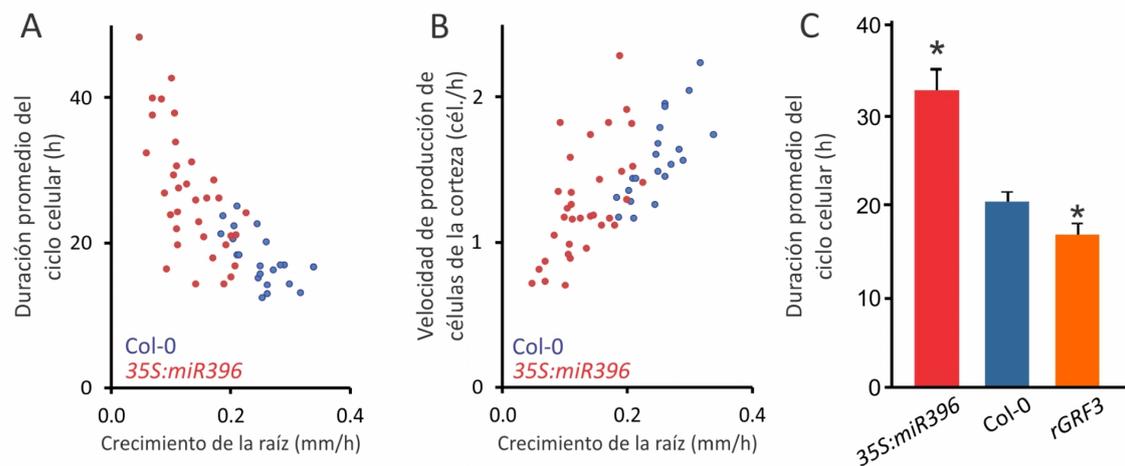
**Figura R1.6. Caracterización de las plantas *rGRF2* y *rGRF3*.** (A) Esquema que describe la generación de un *GRF* insensible a la regulación por el miR396. Se detalla la secuencia de un gen *GRF* típico sensible al miR396 y un *rGRF* donde el sitio blanco para el miR396 se encuentra modificado. Las mutaciones que alteran la interacción entre el *GRF* y el miR396 se muestran en rojo. (B) y (C) Niveles de expresión relativa de *GRF2* (B) y *GRF3* (C) estimados por RT-qPCR en muestras de puntas de raíces de plantas transformadas con *rGRF2* y *rGRF3* respectivamente. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de tres réplicas biológicas. El asterisco indica una diferencia significativa respecto a las raíces de plantas silvestres determinada a través de la prueba T-Student ( $P < 0,05$ ). (D) Fenotipo de raíces cortas siete DPS en plántulas de *rGRF2* y *rGRF3*. Barra de escala = 1cm. (E) Evaluación del largo de raíz primaria en función de los DPS en plantas control (Col-0) y plantas *rGRF2* y *rGRF3*. (F) Arquitectura de la punta de la raíz siete DPS en las plantas silvestres y de plantas *rGRF2* y *rGRF3*. (G) Número de células meristemáticas de la corteza (Nm) de plantas control (Col-0) y plantas *rGRF2* y *rGRF3*. El número de células meristemáticas de la corteza fue evaluado en diez filas de células de la corteza por cada uno de los genotipos. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de diez réplicas biológicas. Letras diferentes indican diferencias significativas determinadas por ANOVA seguido de la prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). (H) Largo de las células meristemáticas de la corteza en plantas silvestres (Col-0), *rGRF2* y *rGRF3*. (I) Largo de las células maduras de la corteza en plantas silvestres (Col-0), *rGRF2* y *rGRF3*. Para (H) e (I) al menos diez células de la corteza fueron medidas en 10 plantas diferentes. Se graficaron

los valores promedios  $\pm$  EE de 100 células individuales. **(J)** Complementación del fenotipo de largo de meristema de plantas *35S:miR396* x *rGRF3-GR* después del tratamiento con dex (5  $\mu$ M, 72 h). Las puntas de flecha blancas marcan la posición del CQ, mientras que las puntas de flechas amarillas marcan el final del meristema (ZM) donde las células comienzan a alargarse. Barra de escala = 50  $\mu$ m.

### 6.2.3. El microARN miR396 modula la progresión a través del ciclo celular.

A pesar del aumento en tamaño del meristema, las plantas *35S:miR396* presentan un fenotipo macroscópico de raíces cortas, lo que aparenta ser una contradicción a primera vista. Planteamos entonces la hipótesis de que la reducción en los niveles de los *GRFs* estaba afectando las propiedades de las TACs. Una de las características que definen a las TACs es la rápida velocidad de división celular, por lo que decidimos analizar la duración del ciclo celular de estas células. Haciendo uso del análisis celular realizado en las raíces de la población de T1 sobreexpresantes del miR396 y sus correspondientes controles (Figura R1.3) estimamos la duración promedio del ciclo celular de las células meristemáticas de la corteza (96). Encontramos que a diferencia de las plantas control, las células en el meristema de plantas *35S:miR396* progresan de manera más lenta a través del ciclo celular (Figura R1.7A). En las plantas más afectadas, la duración promedio del ciclo celular fue de al menos el doble en comparación con las células de la planta silvestre (Figura R1.7A), como consecuencia, en estas plantas se observó una reducción del 40% en la velocidad de generación de nuevas células de la corteza (Figura R1.7B). El retraso en la progresión en el ciclo celular probablemente explique el incremento en el tamaño de las células en proliferación en el meristema de las sobreexpresantes del miR396 (Figura R1.3F), como así también la incapacidad de estos meristemas de producir nuevas células dando cuenta de la inhibición del crecimiento de la raíz de las plantas *35S:miR396* (Figura R1.3A).

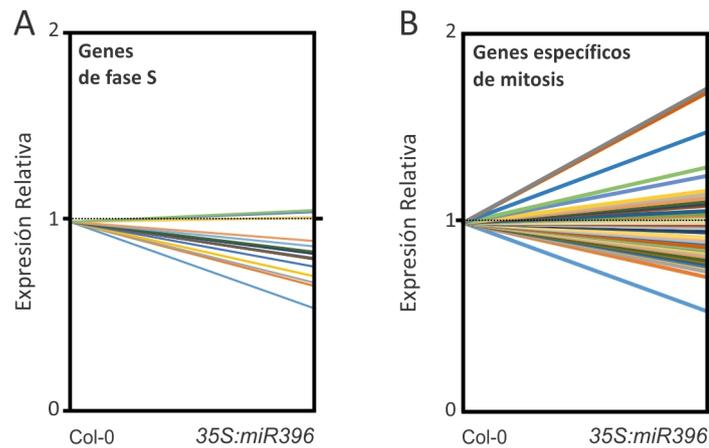
Particularmente para el caso de la línea estable *35S:miR396 #2* el aumento en la duración del ciclo celular fue moderado en concordancia con el incremento de los niveles miR396 que esta línea suave presenta (Figura R1.7C). Además, en forma esperable la duración del ciclo celular en plantas *rGRF3* se vio reducida cuando se comparaba con las plantas silvestres, resultado que se relaciona directamente con la función de los *GRFs* como promotores de la proliferación celular (Figura R1.7C).



**Figura R1.7. Control de la duración del ciclo celular por el miR396.** (A) Duración promedio del ciclo celular en las células meristemáticas de la corteza en plantas control (Col-0) y *35S:miR396*. (B) Producción de células de la corteza por el meristema (células/h) de plantas control (Col-0) y *35S:miR396*. Tanto en (A) y (B) los valores son graficados en función de la velocidad de crecimiento de cada raíz. (C) Duración promedio del ciclo celular en células meristemáticas de la corteza de raíces de plantas *35S:miR396#2*, control (Col-0) y *rGRF3*. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de diez réplicas biológicas. El asterisco indica diferencia significativa con respecto a las raíces de plantas silvestres determinada a través de la prueba T-Student ( $P < 0,05$ ).

El ciclo celular es un proceso organizado en etapas consecutivas. En la fase S, las células mitóticas replican su genoma mientras que en la fase M los genomas duplicados se distribuyen entre las dos células hijas. Ambas fases son precedidas por fases preparativas, G1 y G2 respectivamente. La transición entre estas fases es regulada por la actividad oscilante de varios reguladores del ciclo celular, incluyendo como componentes claves de este mecanismo a los complejos entre ciclinas (CYC) y quinasas dependientes de ciclinas (CDK) (107).

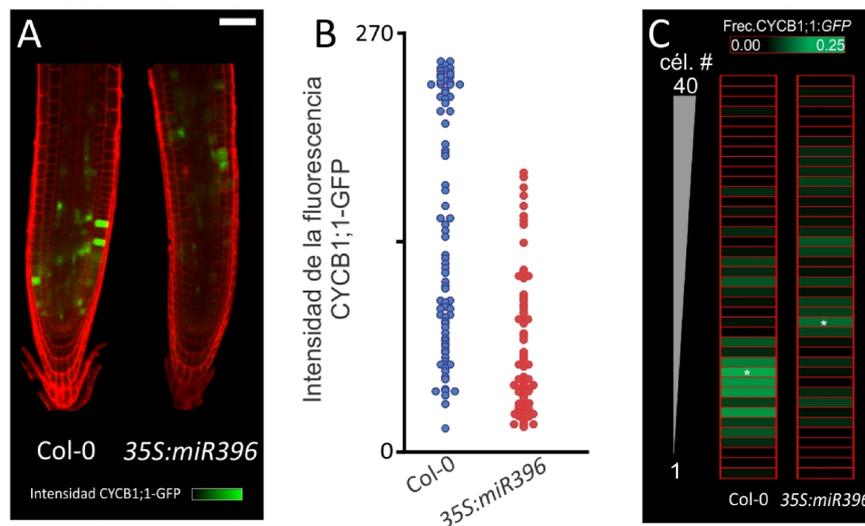
Para entender como la sobreexpresión del miR396, y por ende la disminución del nivel de expresión de los *GRFs* afecta el ciclo celular, analizamos la expresión de marcadores del ciclo celular (108) en datos de transcriptómica disponibles en el laboratorio obtenidos a partir de muestras de meristemas radiculares microdisectados de plantas silvestres comparadas con *35S:miR396*. Encontramos que la expresión de los genes de fase S (108) se ve reducida en las raíces *35S:miR396* (Figura R1.8A; Anexo Tabla A1), indicando que existe una merma en el número de células en este estadio particular del ciclo celular en la población de células en división mitótica de plantas *35S:miR396*. Cuando los genes específicos de mitosis (MSG del inglés "Mitosis Specific Genes") (108) fueron evaluados, encontramos que algunos genes se encontraban aumentados mientras que otros se encontraban disminuidos (Figura R1.8B; Anexo Tabla A2) sugiriendo que las células meristemáticas podrían estar demoradas en algún estadio intermedio de la transición de G2 a M.



**Figura R1.8: El balance miR396/GRFs regula la progresión a través del ciclo celular. (A) y (B)** Expresión de genes de fase S (A) y MSG (B) en plantas *35S:miR396* según estimación por microarreglos ATH1 en meristemas de raíces.

La transición entre estas fases del ciclo celular es dirigida por los perfiles de expresión oscilante de reguladores del ciclo celular, que resultan de la combinación de mecanismos de regulación transcripcional, post transcripcional y post traduccional (107, 109, 110). Entre estos últimos, la degradación proteica vía ubiquitinación y direccionamiento al proteosoma, es la responsable de la remoción de muchas proteínas reguladoras del ciclo celular. Para determinar si la sobreexpresión del miR396 afectaba la acumulación de ciclinas mitóticas a nivel proteico, analizamos cuantitativamente la expresión del reportero *CYCB1:1-GFP* en plantas silvestres y *35S:miR396* (Figura R1.9A). Encontramos que el máximo de intensidad de fluorescencia estaba reducido un 30% en plantas *35S:miR396* con respecto a las plantas silvestres (Figura R1.9A, B). Por lo tanto, la acumulación de los reguladores del ciclo celular parece fallar en plantas con deficiencia en los *GRFs*, lo cual puede dar cuenta del retraso en la progresión del ciclo celular observado.

Además, se pudo observar que el patrón de expresión del reportero *CYCB1:1-GFP* en las TACs se encontraba más alejado del CQ en las raíces *35S:miR396* en comparación con las plantas silvestres (Figura R1.9C), indicando que el nodo miR396/GRF estaría afectando otras funciones además de la velocidad de progresión del ciclo celular, que probablemente se encuentren relacionadas con el establecimiento de las zonas de desarrollo a lo largo del eje longitudinal de la raíz.

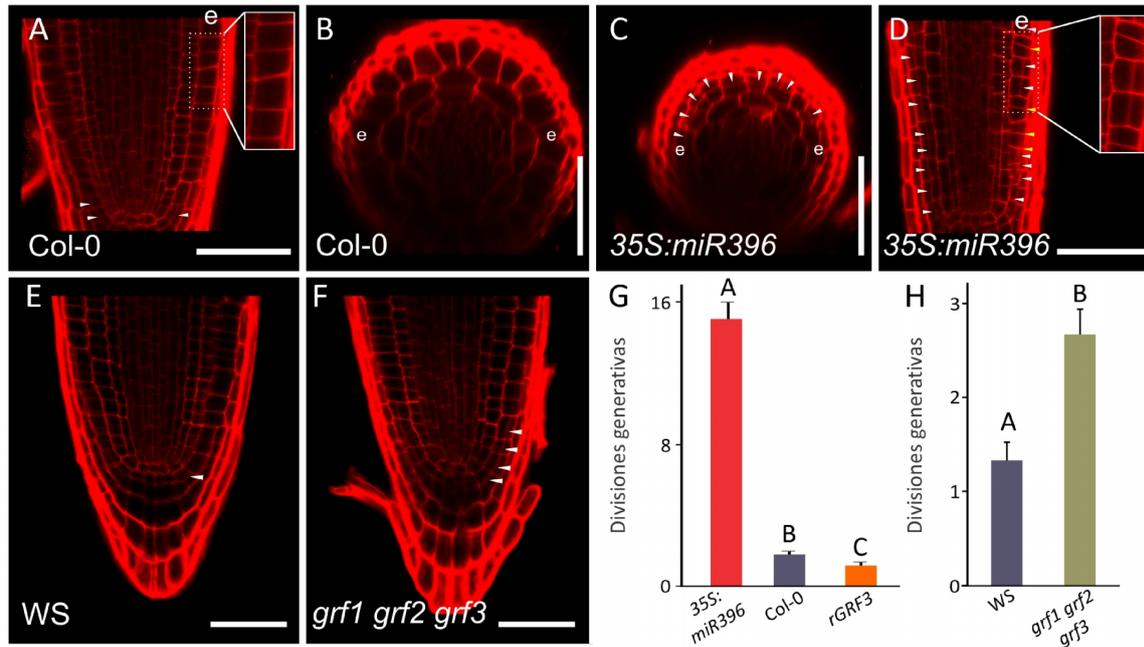


**Figura R1.9. Los niveles de miR396/GRFs afectan la acumulación de la ciclina mitótica *CYCB1;1*.** (A) Defectos en la acumulación del marcador mitótico *CYCB1;1-GFP* en el meristema de raíces de plantas silvestres y *35S:miR396*. (B) Intensidad de fluorescencia de células de la corteza que expresan el reportero *CYCB1;1-GFP* en el meristema de raíces silvestres y *35S:miR396*. Se analizaron al menos 70 células de 20 plantas para cada genotipo. (C) Mapa de distribución de la frecuencia de células que expresan el marcador *CYCB1;1-GFP* a una distancia dada desde el CQ cuantificada por el número de células corticales. Puede observarse el desplazamiento de las frecuencias máximas (marcadas con el asterisco). La distribución de células que expresan *CYCB1;1-GFP* se obtuvo evaluando la totalidad de células del meristema desde la célula adyacente al CQ (1) hasta la célula 40. 36 filas de la corteza fueron evaluadas a partir de 18 plantas de cada genotipo.

#### 6.2.4. El microARN miR396 controla las divisiones generativas periclinales.

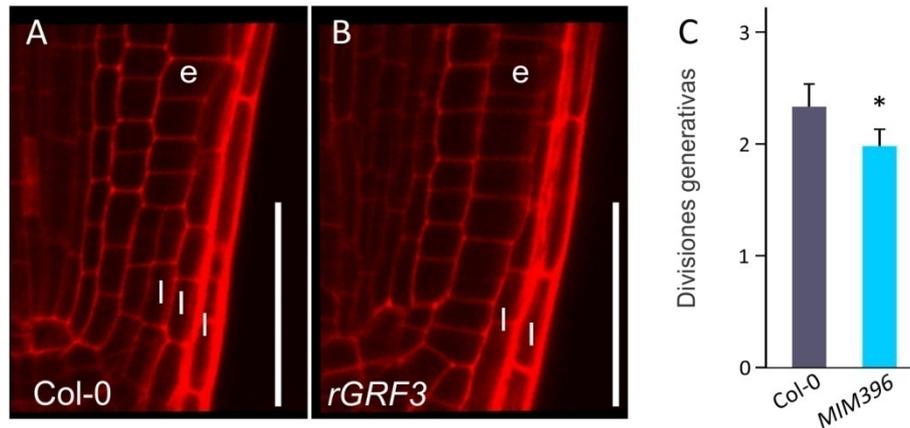
Las divisiones asimétricas generativas de las SC generan células hijas con diferentes identidades celulares, como la SC de Ep/LRC que, como su nombre lo indica, genera células de la Ep y LRC. Una vez que ocurre esta división generativa las células hijas comienzan a dividirse anticlinalmente amplificando cada uno de los tipos celulares (111, 112).

Por lo general, en la planta silvestre se observan una o dos células con divisiones periclinales generando la Ep y las capas de LRC (Figura R1.10A, B y G) (111). En comparación con la planta silvestre, las plantas *35S:miR396* presentaron un aumento significativo del número de divisiones periclinales a lo largo del meristema (Figura R1.10C, D y G). Como era de esperar, también se observó un aumento de las divisiones periclinales en la triple mutante *grf1 grf2 grf3* (Figura R1.10 E, F y H).



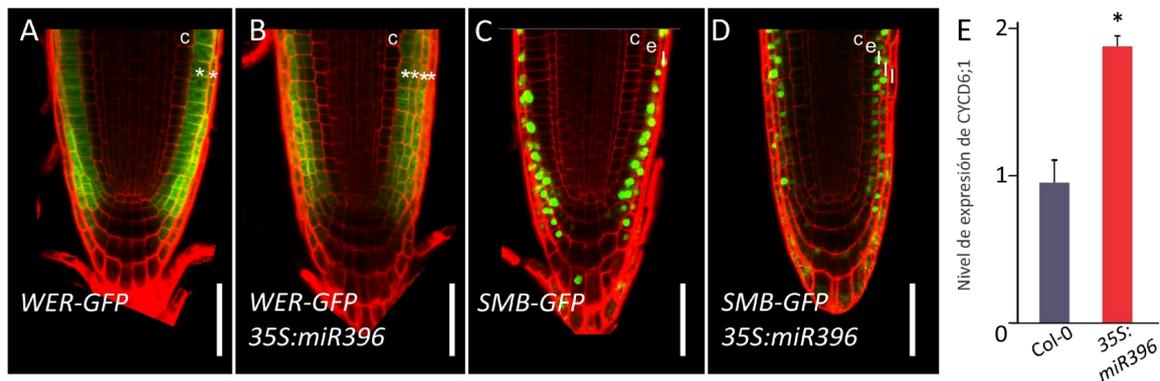
**Figura R1.10. El patrón de divisiones periclinales generativas se ve modificado en plantas *35S:miR396*.** (A) - (D) La sobreexpresión del *miR396* estimula divisiones celulares periclinales generativas. Las puntas de flechas blancas marcan estas divisiones mientras que las puntas de flechas amarillas marcan divisiones anticlinales de amplificación. (A) y (D) muestran secciones longitudinales de raíces de plantas silvestres (Col-0) (A) y *35S:miR396* (D). (B) y (C) muestran secciones transversales de raíces de plantas silvestres (Col-0) (B) y *35S:miR396* (C) 100  $\mu$ m por encima del CQ, donde no ocurren divisiones celulares en la Ep (e) de las plantas silvestres. (E) y (F) Divisiones celulares periclinales en las iniciales Ep/LRC en raíces de plantas silvestres (WS) (E) y triple mutante *grf1 grf2 grf3* (F). (G) Número de divisiones celulares generativas en raíces *35S:miR396*, control (Col-0) y *rGRF3*. (H) Aumento del número de divisiones periclinales en *grf1 grf2 grf3* con respecto a la planta silvestre (WS). Tanto en (G) como en (H) se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de diez réplicas biológicas. Letras diferentes indican diferencias significativas determinadas por ANOVA seguido de la prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). Barra de escala = 50  $\mu$ m.

Por otro lado, las plantas que expresan *rGRF3* exhibieron un número reducido de capas de LRC (Figura R1.11A, B) y un bajo número de divisiones periclinales asociadas con las iniciales Ep/LRC (Figura R1.10G). Como era esperado, las plantas *MIM396* también presentaron un menor número de divisiones periclinales (Figura R1.11C), asemejándose al efecto de *rGRF3*.



**Figura R1.11.** El aumento de los niveles de *GRF* produce cambios en el patrón de divisiones generativas opuestos a la sobreexpresión del *miR396*. (A) y (B) Reducción del número de capas de LRC en *rGRF3* (B) en comparación con las plantas silvestres (Col-0) (A). e:Epidermis, l:LRC. (C) Número de divisiones celulares periclinales en raíces control (Col-0) y *MIM396*. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de diez réplicas biológicas. El asterisco indica una diferencia significativa respecto a las raíces de plantas silvestres determinada a través de la prueba T-Student ( $P < 0,05$ ). Barra de escala = 50  $\mu$ m.

La utilización del marcador de Ep y LRC *WER-GFP* confirmó la identidad de las capas de células externas a las células de la corteza en las plantas *35S:miR396* (Figura R1.12A, B). *SOMBRERO (SMB)*, un factor de transcripción con dominio NAC específico de LRC, se expresa inmediatamente después de la división celular asimétrica que genera las células de la LRC. Se ha demostrado que la expresión de *SMB* evita más divisiones asimétricas generativas, reforzando el destino y la diferenciación celular (113-115). El análisis del reportero *SMB-GFP* en las plantas *35S:miR396* confirmó que las divisiones periclinales extra generaban capas adicionales de LRC por fuera de las capas de Ep (Figura R1.12C, D), sugiriendo que existe un incremento en el carácter de SC en la parte distal del meristema de las plantas *35S:miR396*. La mayoría de las divisiones periclinales ectópicas detectadas en las plantas *35S:miR396* se asociaron con las capas de células Ep/LRC, sin embargo experimentos de RT-qPCR también mostraron un aumento en los niveles de la *CYCD6; 1* en las raíces *35S:miR396* (Figura R1.12E), una ciclina necesaria para que la división asimétrica que genera células de la corteza y endodermis tenga lugar (116, 117).

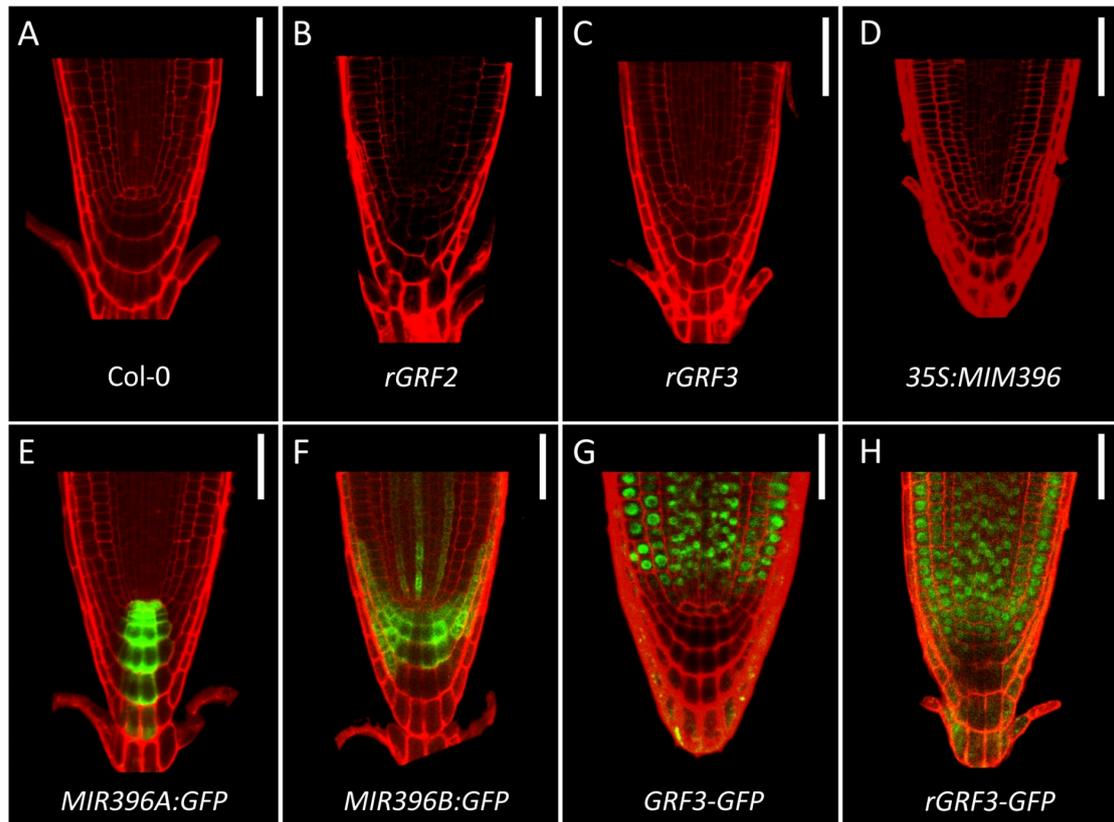


**Figura R1.12. Las plantas 35S:miR396 tienen un aumento en el número de divisiones asimétricas generativas. (A) y (B)** Acumulación del reportero *WER-GFP* en raíces de plantas silvestres (Col-0) (A) y *35S:miR396* (B). c indica la capa de células corteza, y los asteriscos indican capas de Ep y LRC. (C) y (D) Expresión de un marcador de específico de LRC (*SMB-GFP*) en raíces de plantas silvestres (Col-0) (C) y *35S:miR396* (D). l indica células de LRC. (E) Niveles relativos de expresión de *CYCD6;1* en puntas de raíces *35: miR396* y plantas control, según lo estimado por RT-qPCR. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de tres réplicas biológicas. El asterisco indica diferencias significativas con respecto a las raíces de plantas silvestres determinada a través de la prueba T-Student ( $P < 0,05$ ). Barra de escala = 50  $\mu$ m.

### 6.2.5. El microARN miR396 excluye a los *GRFs* del SCN.

El análisis más detallado del SCN de las plantas *rGRF2* y *rGRF3* reveló una distorsión de CQ y patrones de división celular anormal en las células de columela (Figura R1.13A-C). De la misma manera, las plantas *MIM396* también presentaron un CQ distorsionado (Figura R1.13D). Estos resultados indicaron que la represión de los *GRFs* por el miR396 es necesaria para la homeostasis y función del SCN. De forma consistente con esta hipótesis, se encontró que el *MIR396A* se expresa en altos niveles en el CQ y en la columela (Figura R1.13E). Además detectamos que el *MIR396B* se expresa en la raíz pero a niveles más bajos que el *MIR396A*, lo cual es consistente con la información disponible por secuenciación de ARN pequeños, que indica que *MIR396A* es la isoforma más abundante en raíces (118, 119). El patrón de expresión del *MIR396B* se extiende a la columela, las SC de EP/LRC, la LRC, y en niveles más bajos en el cilindro vascular de la zona meristemática (Figura R1.13F).

Evaluando la expresión de los genes blanco del miR396, encontramos que a pesar de que el reportero de tipo silvestre *GRF3-GFP* estaba ausente en el SCN (Figura R1.2C y R1.13G), un reportero *GFP-GRF3* insensible a la regulación por el miR396 (*rGRF3-GFP*) amplió su expresión avanzando sobre la zona del SCN (Figura R1.13H). Por ejemplo, *GRF3-GFP* estaba ausente en las iniciales de Ep/LRC, y estaba presente sólo en las TACs que sufren divisiones de amplificación anticlinal (Figura R1.14G), mientras que *rGRF3-GFP* presentó un patrón de expresión ampliado, invadiendo la zona del SCN (Figura R1.13H). Estos demuestran que la actividad de miR396 excluye los factores de transcripción *GRFs* de las SC.



**Figura R1.13.** El miR396 reprime la expresión de los *GRFs* en el SCN. (A) - (D) Defectos de SCN en raíces de plantas *rGRF2* (B), *rGRF3* (C) y *MIM396* (D) en comparación con la planta silvestre (Col-0) (A). (E) y (F) Los patrones de expresión de los reporteros transcripcionales del *MIR396A* (E) y *MIR396B* (F). (G) y (H) Patrón de expresión de los reporteros traduccionales de *GRF3* (G) y *rGRF3* (versión resistente al miR396) (H). Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .

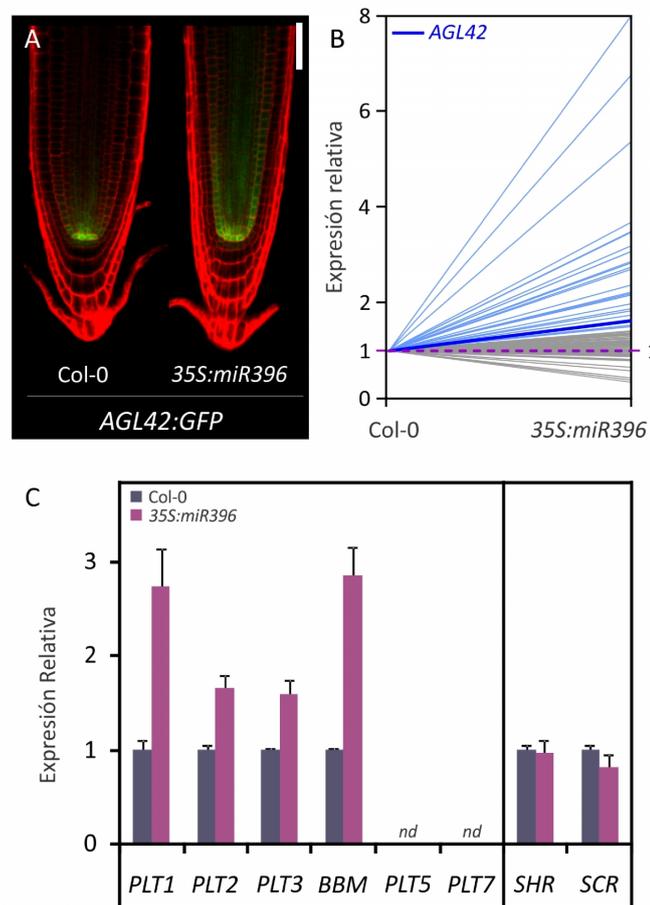
### 6.2.6. Deficiencias en *GRFs* en el meristema activa la expresión de genes marcadores de SCN en las TACs.

Los resultados derivados del estudio de la progresión del ciclo celular como así también la aparición de divisiones periclinales generativas a lo largo de las TACs en el meristema de las plantas *35S:miR396*, sugieren una expansión del carácter de SC a la región de activa proliferación celular.

*AGAMOUS-LIKE 42* (*AGL42*) es un factor de transcripción de tipo MADS box, cuya expresión se encuentra enriquecida en el CQ, en las SC de estela, y las SC de corteza y endodermis (*AGL42:GFP*, Figura R1.14A) (120). La sobreexpresión del miR396 causó una expansión en el patrón de expresión del reportero *AGL42:GFP*, resultado coherente con una expansión hacia las TACs de las características de SCN en plantas con niveles reducidos de los *GRFs* (Figura R1.14A).

Para definir las redes reguladas por la red miR396/*GRFs* hicimos uso de datos de transcriptómica disponibles en el laboratorio, generados a partir de muestras de meristemas microdisectados de plantas silvestres y *35S:miR396*. Es interesante que un número considerable de genes que se expresan en el CQ, incluido *AGL42*, se ven inducidos en las muestras de raíces *35S:miR396* (Figura R1.14B; Anexo Tabla A3).

A continuación, analizamos este conjunto de datos en búsqueda de cambios en la expresión de genes importantes para el establecimiento del SCN. Si bien no aparecen cambios en la expresión de *SCR* o *SHR*, varios genes de la familia *PLT* se encontraron inducidos en las raíces *35S:miR396* (Figura R1.14C).

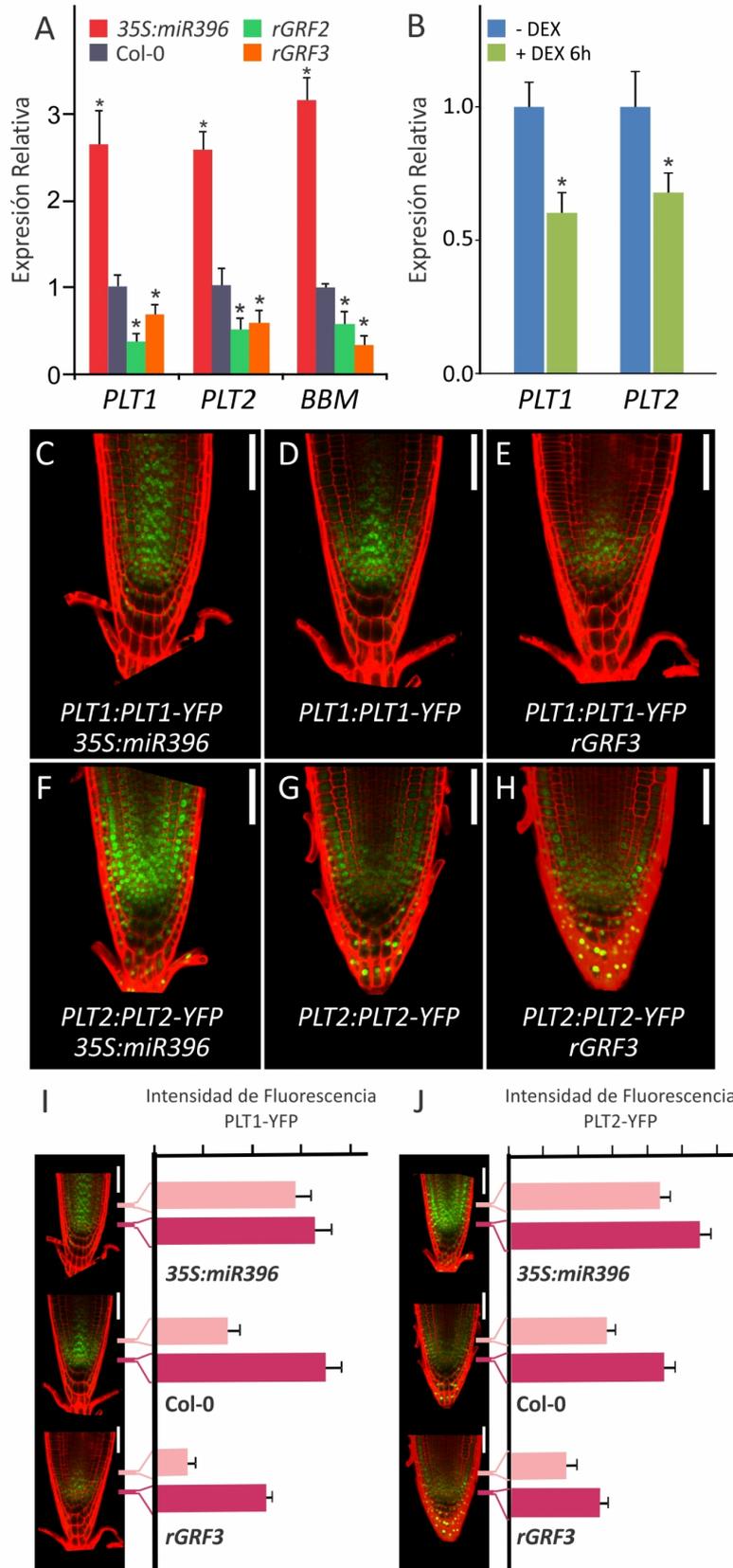


**Figura R1.14. Extensión hacia las TACs de la expresión de marcadores de SCN en plantas 35S:miR396.** (A) Expresión de un reportero GFP específico para en el CQ, en las SC de estela, y las SC de corteza y endodermis (*AGL42: GFP*) en plantas control (Col-0) y *35S: miR396*. Barra de escala = 50  $\mu$ m. (B) Expresión relativa de los genes específicos de CQ en el meristema de raíces de plantas silvestres y *35S:miR396*. En color azul claro se representan los genes cuya expresión aumenta significativamente en el meristema de raíces *35S:miR396* (21 de los 88 genes). La línea azul oscuro resalta la expresión de *AGL42*. La línea de puntos de color púrpura indica valores iguales a 1. (C) Niveles de expresión de *PLT*, *SHR*, y *SCR* en meristemas de plantas *35S:miR396*. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de tres réplicas biológicas. **nd**: no detectado.

A continuación, evaluamos los niveles de transcritos de *PLT1*, *PLT2* y *BBM/PLT4* por RT-qPCR y confirmamos que los mismos se encuentran incrementados en plantas *35S:miR396* (Figura R1.15A), mientras que resultaron reprimidos en las plantas que expresan *rGRF2* o *rGRF3* (Figura R1.15A). Además, las plantas *rGRF3-GR* tratadas con dex durante 6 horas mostraron una disminución de los niveles de expresión de *PLT1* y *PLT2* (Figura R1.15B).

Las proteínas de la familia PLT presentan un máximo de expresión en el área del SCN y su distribución forma un gradiente a lo largo del eje longitudinal de la raíz (Figura R1.15D, G). La formación de este gradiente es fundamental para su función como reguladores dosis-dependientes del desarrollo de las raíces (75, 87). Los máximos de expresión tanto de *PLT1-YFP* como de *PLT2-YFP* se vieron reducidos en el SCN de plantas *rGRF3*, y sus gradientes en la zona de las TACs se apagaron más abruptamente, en comparación con las plantas control (Figura R1.15E,H, I y J). Por el contrario, en las raíces *35S:miR396*, ambos genes *PLT* presentaron niveles más elevados de expresión a lo largo de una región más amplia (Figura R1.15C, F, I y J).

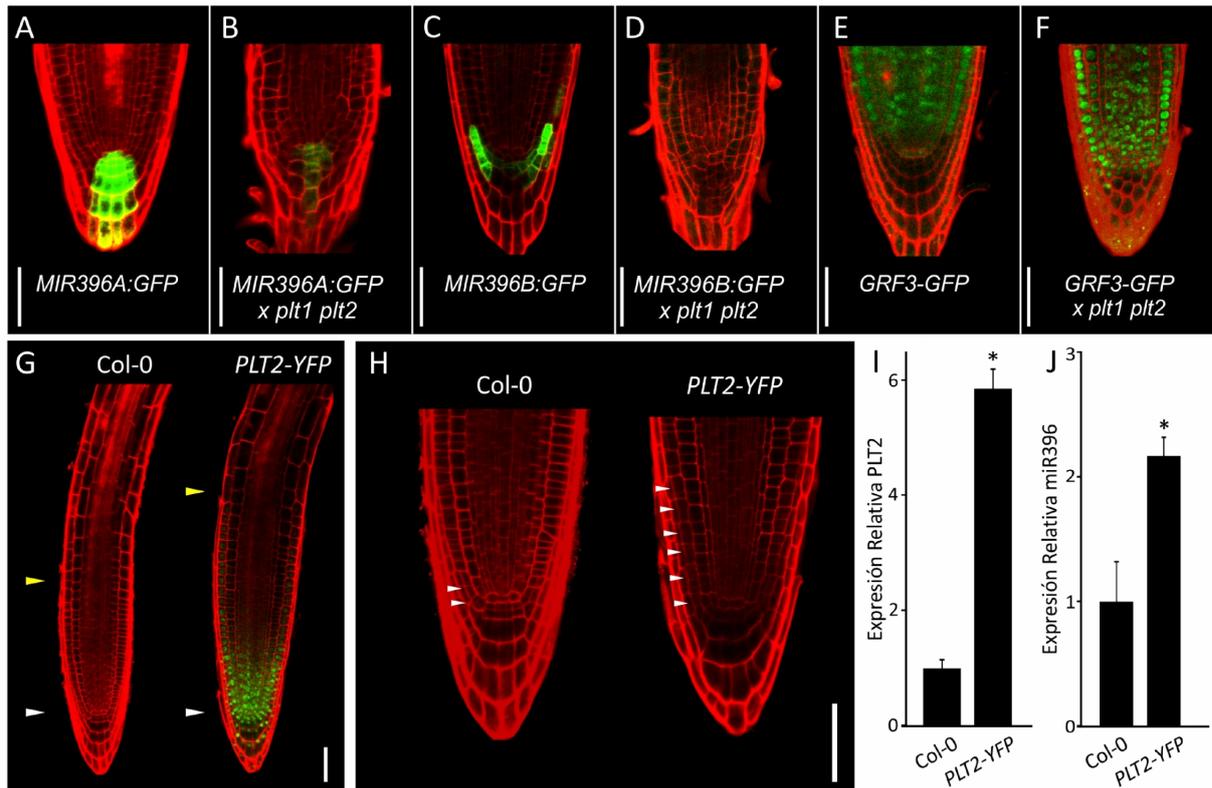
Como altos niveles de *PLT1* y *PLT2* están asociados con la identidad de SC, la extensión de los máximos de expresión es consistente con la expansión de la identidad de SC en el meristema de raíces *35S:miR396* (Figura R1.12B, Figura R1.14A, B). En conjunto, estos resultados indican que los *GRFs* regulados por el miR396 actúan como represores de *PLT*, controlando su patrón de expresión y la abundancia a lo largo del eje longitudinal de la raíz.



**Figura R1.15. La red regulatoria miR396/GRF modula el gradiente de distribución de los genes *PLTs*.** (A) Valores de expresión relativa de *PLT1*, *PLT2* y *BBM* en el meristema de plantas *35S:miR396* y *rGRF* según lo estimado por RT-qPCR. (B) Expresión relativa de los genes *PLT1* y *PLT2* luego del tratamiento con dexametasona (10  $\mu$ M, 6h) de plantas transformadas con un *rGRF3* inducible (*rGRF3-GR*). En (A) y (B) se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican una diferencia significativa respecto a las raíces silvestres determinada a través de la prueba T-Student ( $P < 0,05$ ). (C) a (H) Modificación de los gradientes de *PLT1* y *PLT2* en raíces de plantas *35S:miR396* y *rGRF3* en comparación con raíces control (Col-0). (I) y (J) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de *PLT1-YFP* (I) y *PLT2-YFP* (J) en plantas silvestres (Col-0), *35S:miR396* y *rGRF3*. Las barras de color púrpura indican la región del CQ, mientras que las barras de color rosa representan una región en la estela 50 $\mu$ m por encima del CQ. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de ocho réplicas biológicas. Barra de escala = 50 $\mu$ m.

### 6.2.7. Los genes *PLTs* son necesarios para la expresión del microARN miR396 en el SCN.

Como altos niveles de *PLTs* son necesarios para la correcta actividad del SCN (73, 75, 87) y el miR396 excluye los *GRFs* de dicha área, hipotetizamos que los *PLTs* en sí mismos pueden ser requeridos para activar la expresión de los genes que codifican al *MIR396* en el SCN. Ciertamente, encontramos que la expresión de ambos *MIR396* se veía reducida de manera significativa en las dobles mutantes *plt1 plt2* (Figura R1.16A-D). Consistente con estos resultados, vimos que a pesar de que la expresión de *GRF3-GFP* se veía excluida del SCN en plantas control, su expresión se extendía a la zona del SCN en la doble mutante *plt1 plt2* (Figura R1.16E, F). Finalmente, encontramos que las plantas *PLT2-YFP*, que acumulan mayores niveles de *PLT2* en comparación con las plantas silvestres (Figura R1.16I), y que además poseen un meristema de mayor tamaño en el cual pueden identificarse divisiones generativas ectópicas en la Ep (Figura R1.16G, H), acumulan mayores niveles de miR396 maduro (Figura R1.16J). Estos resultados indican que los altos niveles de *PLT* en el SCN son necesarios para la activación de los genes *MIR396*, que a continuación excluyen a los *GRFs* del SCN.



**Figura R1.16. Los genes *PLTs* son necesarios para la expresión del *MIR396* en el SCN. (A) - (F)** Expresión del *MIR396A-GFP* (A y B), *MIR396B-GFP* (C y D), y *GRF3-GFP* (E y F) en el meristemo de plantas silvestres (A,C y E) y *plt1 plt2* doble mutante (B, D y F). (G) Incremento en el tamaño de la zona meristemática de plantas *PLT2-YFP* en comparación con la planta silvestre (Col-0). (H) Divisiones celulares periclinales (punta de flecha blanca) de las SC de Ep/LRC en plantas *PLT2-YFP*. (I) y (J) Valores de expresión relativa de *PLT2* (I) y *miR396* (J) en el meristemo de plantas *PLT2:YFP* y Col-0 según lo estimado por RT-qPCR. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de tres réplicas biológicas. El asterisco indica diferencias significativas con respecto a las raíces silvestres determinada a través de la prueba T-Student ( $P < 0,05$ ). Barra de escala = 50 $\mu$ m.

### 6.3. Discusión.

#### 6.3.1. Los *GRFs* como marcadores de las TACs en el meristemo apical de la raíz.

La expresión de *GRF2* y *GRF3* se detectó en el RAM, específicamente en las TACs. Interesantemente, ni *GRF2* ni *GRF3* fueron detectados en la columela. Como este tejido no cursa a través de una fase de amplificación celular, podríamos decir que la expresión de los *GRFs* parece estar restringida a las células que se someten a ciclos de divisiones mitóticas para amplificar el número de células de los diferentes tipos celulares ya establecidos por la actividad de las SC.

Los *GRFs* presentan regiones promotoras que son capaces de conducir su transcripción en una región más amplia, incluso siendo visible en el SCN. Esto se demostró mediante la introducción de mutaciones que evitan la unión de *miR396* a *GRF3*, indicando que la represión post-transcripcional por *miR396* es esencial para lograr el patrón de expresión de los *GRFs* en las TACs en el RAM. En hojas, el *miR396* presenta un máximo de expresión en células en expansión y diferenciación generando un gradiente de expresión opuesto de los *GRFs*, el cual coincide con las células en

proliferación (23, 54). Por lo tanto, la modificación del patrón de expresión de los *GRFs* a partir de la actividad del miR396 parece ser una estrategia recurrente para asegurar que determinados tipos celulares expresen estos factores de transcripción.

Curiosamente, mientras el *MIR396B* es el miembro de la familia del miR396 que más se expresa en hojas (23, 119, 121, 122), el *MIR396A* se expresa mayormente en raíces (118, 119). El *MIR396B* es inducido en hojas por actividad del *TCP4* (122), un factor de transcripción involucrado en la represión de la proliferación celular y la promoción de la diferenciación celular (122, 123). En raíces, observamos que la expresión del *MIR396* depende de los genes *PLT*, indicando que el miR396 es activado durante el desarrollo de distintos órganos por diferentes reguladores.

### 6.3.2. Los *GRFs* reprimen las propiedades de SC en las TACs.

La transición entre las SC y las TACs en la raíz de *Arabidopsis* se encuentra bien marcada, ya que a diferencia de las SC, las células hijas entran inmediatamente a una vía caracterizada por rápidas divisiones celulares anticlinales de amplificación. Una disminución en los niveles de los *GRFs* vuelve a esta transición borrosa: las divisiones celulares generativas, que son típicas de las SC, se observan entre las TACs y, en forma concordante, se produce una expansión en la expresión de marcadores específicos de CQ y de las SC en el meristema. La expansión de las características de SC en el meristema de la raíz de las plantas con altos niveles de miR396 probablemente explique la disminución en la velocidad del ciclo celular y el aumento de tamaño del meristema de la raíz. Las células en el SCN proliferan a una frecuencia mucho más lenta que las TACs en el meristema (7, 8, 72, 111, 124) y una modificación de los niveles de los *GRFs* en las TACs modificó la duración promedio del ciclo celular de manera esperada.

Aunque se observó que *MIR396* se expresa fundamentalmente en las SC en el RAM y su expresión ectópica expande el dominio de las células con carácter de SC, en hojas la expresión del miR396 se asocia a células en expansión y su sobreexpresión induce la diferenciación de las células en proliferación (23, 54). A pesar de estas claras diferencias, en ambos tejidos los factores de transcripción *GRFs* se expresan en células que se dividen rápidamente, y este patrón de expresión se encuentra garantizado al menos en parte por la actividad del miR396.

En concordancia con la expansión del carácter de SCN, en las plantas *35S:miR396*, el pico de divisiones celulares de las TACs se apartó hacia arriba de las SC, tal como se ha informado recientemente para las plantas que expresan altos niveles de *PLT* (87). Dos vías paralelas, que involucran a los factores de transcripción *PLTs* o *SHR/SCR*, participan en el establecimiento del CQ y las SC (83) Que sólo los niveles de los genes *PLTs* hayan respondido a los niveles de miR396, sugiere que los *GRFs* reprimen específicamente estos genes que establecen el SCN. Recientemente se ha

mostrado que altos niveles de auxina producen un dominio de transcripción de *PLT* restringido a las SC, a partir del cual las proteínas PLT se propagan a través de dilución, consecuencia de la división celular o el movimiento célula-célula, generando un gradiente de expresión más amplio que el de transcripción con un máximo en el SCN (87). Además de estos procesos, nuestros resultados muestran que la represión de la expresión de los genes *PLTs* en las TACs es un proceso activo que requiere la actividad de los *GRFs*. De esta manera, la reducción en la actividad de los *GRFs* causa una expansión del gradiente de PLT, que a continuación define las zonas de desarrollo a lo largo del eje longitudinal de la raíz.

Se ha demostrado que la expresión de *PLT1* es reprimida en la región apical del embrión por *HANABA TARANU* y *ANGUSTIFOLIA (AN3)* (125). Se sabe que AN3 interacciona con los factores de transcripción *GRF* (13, 16, 25), por lo que no podríamos descartar que los *GRFs* repriman a los genes *PLTs* en otros tejidos también. Nuestros resultados muestran que la represión de los genes *PLTs* a través de los *GRFs* contribuye cuantitativamente a la regulación de los niveles de estos genes en el meristema de la raíz, ya que la disminución de los niveles de *GRF* por el miR396 o el incremento de los mismos a través de la utilización de un *rGRF*, resulta en cambios opuestos en los niveles de expresión de los genes *PLTs*.

Es interesante notar, que en los casos más extremos, la sobreexpresión del miR396 produce defectos en la elongación celular. La elongación celular se encuentra también inhibida por altos niveles de *PLT* (87). Por lo que proponemos que la interrelación entre el miR396, los *GRFs* y los factores de transcripción *PLTs* pueden afectar la elongación en los casos más extremos.

### **6.3.3. La exclusión de los *GRFs* del SCN mediada por el miR396 es esencial.**

Los reporteros de los promotores del *MIR396A* y *MIR396B* mostraron su pico máximo de expresión en las células SCN y la columela. Cada microARN se expresa en un subconjunto específico de células, lo que sugiere que diferentes señales contribuyen a su regulación, aunque la expresión de ambos requiere de la actividad de *PLT*.

Los transgenes que expresan versiones resistentes al miR396 de *GRF3 (rGRF3)* conllevan a la expresión de los factores de transcripción de *GRF* en el SCN, dando lugar a distorsiones en el CQ y células de la columela. Estos resultados son consistentes con un papel positivo de los *GRFs* en la promoción del ciclo celular. Las raíces en las que la actividad del miR396 se ve reducida, ya sea por la expresión del MIM396 o por la versión de *GRF* resistente al miR396, mostraron defectos en la actividad de la SC de Ep/LRC, resultado que resulta opuesto al encontrado en las plantas triple mutante *grf1 grf2 grf3* o *35S:miR396*. La exclusión de los *GRFs* parece ser necesaria para que ocurran las divisiones periclinales generativas, como puede corroborarse con la aparición de divisiones

generativas ectópicas en las TACs de plantas con bajos niveles de los *GRFs*. Un efecto similar puede observarse con un incremento en los niveles de los genes *PLT* (75). Por el otro lado, defectos en la actividad de las SC de Ep/LRC y meristemas más cortos, como los fenotipos que se observan en las plantas *rGRF3*, son características que se ven exacerbadas en las mutantes en los genes *PLT* (73), indicando que estos factores de transcripción tienen funciones opuestas en la especificación de las SC y las TACs.

#### 6.3.4. La interacción regulatoria entre miR396, *GRF* y *PLT* controla la transición entre SC y TACs.

En conjunto, nuestros resultados indican que las interacciones entre miR396, *GRFs* y *PLTs* son requeridas para definir el límite entre las SC y las TACs. En el SCN, *PLT* activa al miR396 que a su vez excluye a los *GRF* de esta zona. Los *GRFs* son activos las TACs, donde promueven la proliferación celular y reprimen la expresión de *PLT* (Figura R1.17). De esta manera, el miR396 establece por un lado un límite al excluir los *GRFs* del SCN y por el otro define la transición desde las SC, que proliferan lentamente y son capaces de generar diferentes tipos de células, a las TACs que se dividen rápidamente para asegurar el crecimiento órgano (Figura R1.17).

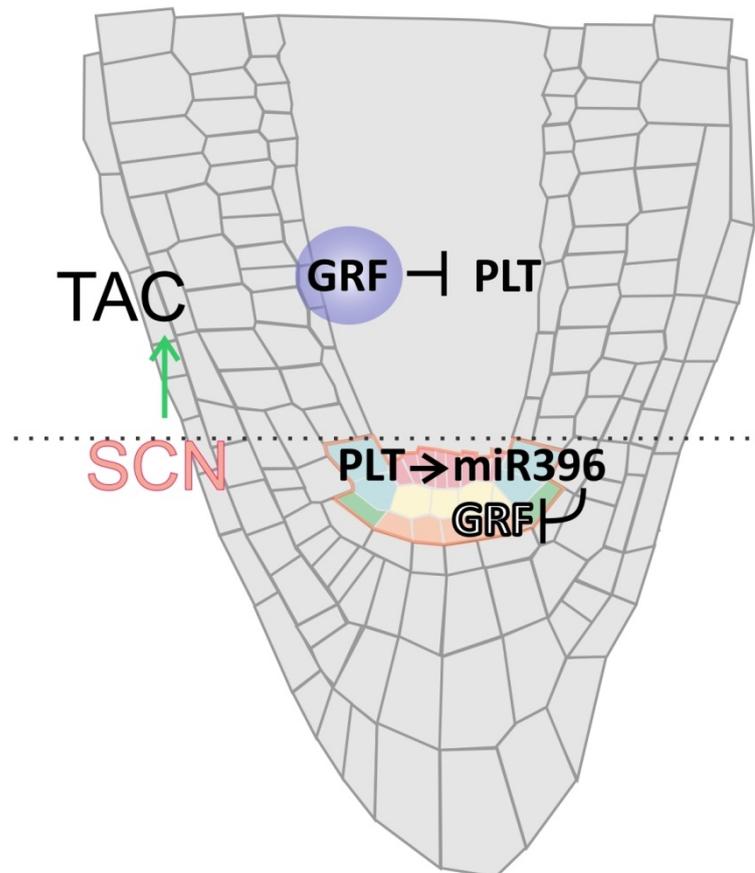


Figura R1.17. Modelo propuesto por el cual las interacciones entre el miR396, *GRF* y *PLT* definen la transición entre las células madre y las TACs. El SCN, se encuentra delineado en Rosa.

## **RESULTADOS II.**

## 7. Resultados Capítulo 2.

### Rol dual de los genes *GIF* en el control del CQ y las TACs.

#### 7.1. Introducción.

En el meristema de la raíz, el CQ se encuentra rodeado por las SC que a continuación darán lugar a todos los tipos celulares de la raíz. El CQ, que se caracteriza por la expresión del factor de transcripción con homeodominio *WOX5* (83), raramente se divide en condiciones normales, sin embargo puede hacerlo para reponer las SC en el caso que las mismas sean dañadas (7-9). Las células hijas de las SC, en la región distal del meristema, se someten a rondas adicionales de división celular para asegurar de esta manera el número necesario de células para el crecimiento del órgano, estas células se conocen como TACs.

Como describimos en la sección anterior los factores de transcripción *GRFs* se encuentran altamente expresados en las TACs, donde promueven las divisiones celulares de amplificación, al tiempo que reprimen los genes que se expresan normalmente en las SC. El patrón de expresión de los *GRFs* en la raíz se encuentra determinado por la represión post-transcripcional del microARN miR396, que excluye a los *GRFs* del SCN.

Los *GRF-INTERACTING FACTORS* (*GIFs*) son una pequeña familia de genes, que en *Arabidopsis*, está compuesta por tres miembros: *ANGUSTIFOLIA3* (*AN3*), también conocido como *GIF1*, *GIF2* y *GIF3* (Figura R2.1A) (16). Los *GIFs* no tienen un dominio de unión al ADN identificado, pero interactúan físicamente con los *GRFs* para funcionar como co-activadores transcripcionales (13, 16, 25, 126). Además de la interacción con los *GRFs*, *AN3* interactúa con los componentes de los complejos de remodelación de la cromatina como la ATPasa SWI/SNF BRAHMA (25, 32, 126). Los *GIFs* se definen por un dominio N-terminal que es homólogo al dominio SNH presente en la proteína humana SYNOVIAL TRANSLOCATION (SYT) (Figura R2.1A) (13, 16) y se ha demostrado que este dominio media la interacción con la proteína humana BRAHMA (BRM) y BRAHMA RELATED GENE 1 (BRG1) (127, 128). El dominio SNH de los *GIFs* media también la interacción con el dominio QLQ de los *GRFs* (11). Por lo tanto, la interacción entre los complejos *GIFs/SYT* y BRAHMA está conservada en animales y plantas, mientras que la interacción entre *GIFs* y *GRFs* está presente sólo en el reino vegetal ya que los *GRFs* son factores de transcripción específicos de plantas.

La pérdida de la función de *AN3* reduce el tamaño de la hoja (13, 16) mientras que mutaciones adicionales en *GIF2* y *GIF3* disminuyen de forma significativa el crecimiento de las hojas y el meristema apical del vástago (13, 16, 56, 69). Además, las mutaciones simultáneas de *AN3* y HANABA TANARU generan raíces ectópicas en los cotiledones (125) destacando el papel de los *GIFs* en el control del desarrollo de la parte aérea de la planta.

Sobre la base de los resultados obtenidos para el sistema miR396/*GRFs* en el desarrollo del meristema de la raíz y considerando que la actividad de los *GRFs* también se encuentra regulada por la interacción con los *GIFs* nos propusimos caracterizar la función de esta familia de co-activadores transcripcionales en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*. Si bien el análisis inicial del fenotipo de las mutantes indicaba que el rol de estos co-activadores estaba relacionado directamente con la actividad de los *GRFs*, una caracterización más detallada de los mismos mostró que presentan funciones adicionales e independientes de los *GRFs*, que dependen de la dosis *GIFs* y que cursan a través de redes regulatorias diferentes.

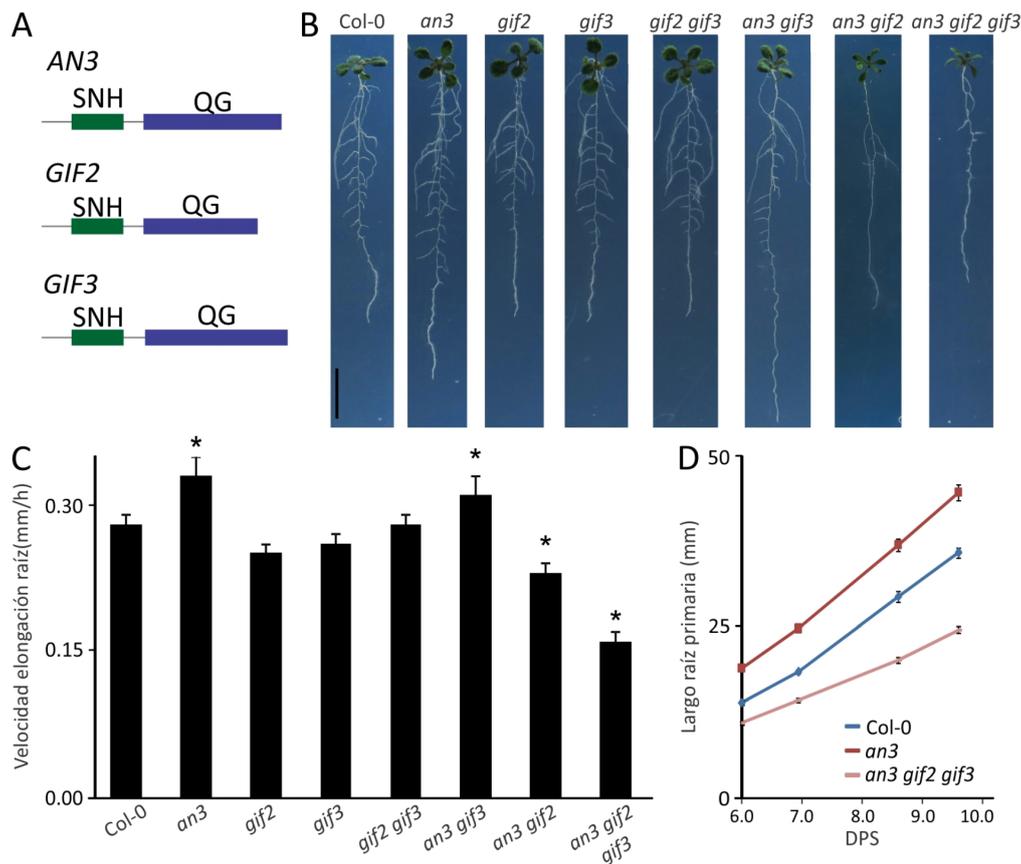
## 7.2. Resultados.

### 7.2.1. Los genes de la familia *GIFs* regulan de manera redundante el desarrollo radicular.

Trabajos previos han mostrado que los genes de la familia *GIFs* actúan de manera redundante como reguladores positivos de la proliferación celular afectando el crecimiento y el desarrollo de los órganos en plantas (56). Particularmente, se ha visto que las mutantes múltiples presentan fuertes defectos del desarrollo del SAM y los órganos florales, poniendo en evidencia nuevas funciones de los genes *GIFs* que no habían sido previamente descritas.

Para describir la participación de los cofactores de la familia *GIFs* (Figura R2.1A) en el desarrollo de la raíz, comenzamos caracterizando su crecimiento en las mutantes simples *an3*, *gif2*, *gif3* (Figura R2.1B). Encontramos que en la mutante *an3* las raíces eran más largas en comparación a la planta silvestre (Figura R2.1B-D). Este resultado fue inesperado ya que las mutantes *an3* presentan un SAM más pequeño y una reducción del área de las hojas en comparación con la planta silvestre. No encontramos ningún efecto evidente en el largo de la raíz de las mutantes simples de los otros miembros de la familia, *gif2* y *gif3* (Figura R2.1B, C).

Considerando la redundancia en función de los genes *GIFs* procedimos con la caracterización de las mutantes múltiples. Al igual que lo visto para el desarrollo de órganos laterales (56), la combinación de mutantes *gif2 gif3* no presentó diferencias apreciables respecto a la planta silvestre (Figura R2.1B, C), mientras que la doble mutante *an3 gif3* presentó raíces más largas, que incluso superaron en longitud a las raíces de la simple mutante *an3* (Figura R2.1B, C). Curiosamente, la doble mutante *an3 gif2* exhibió raíces ligeramente más cortas que la planta silvestre, (Figura R2.1B, C), fenotipo que resultó ser más fuerte al analizar la triple mutante *an3 gif2 gif3* (Figura R2.1B-D).



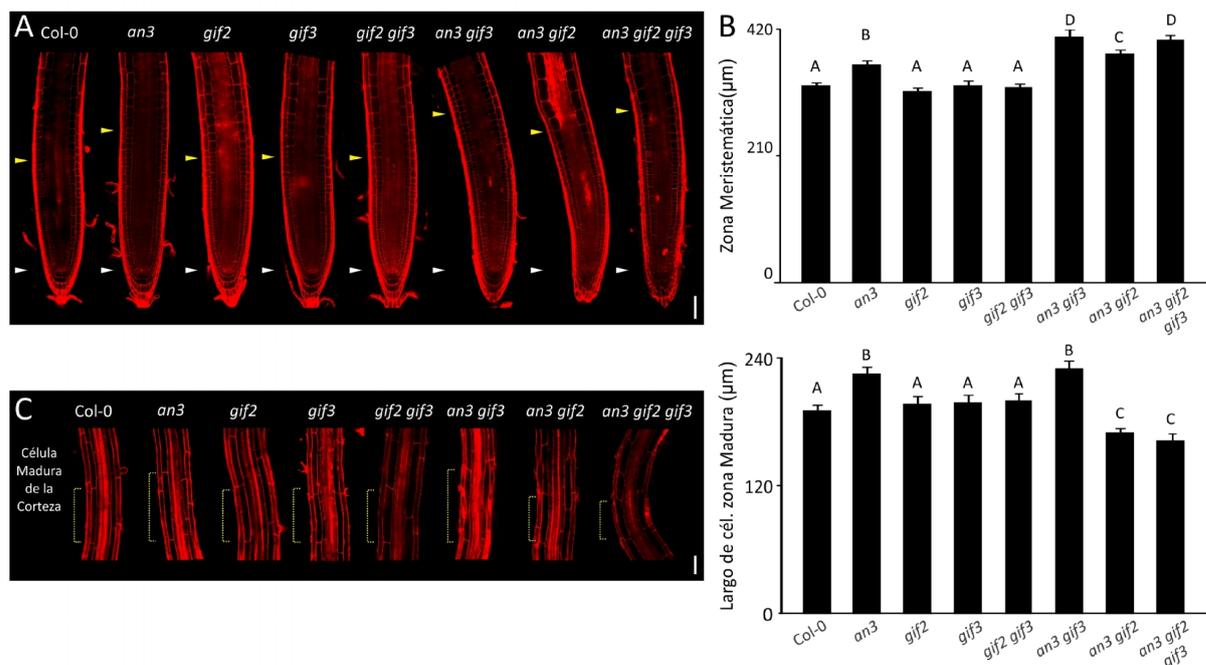
**Figura R2.1. Desarrollo radicular de las diferentes mutantes de los genes de la familia GIFs.** (A) Comparación esquemática de la estructura de los dominios SNH y QG de los diferentes miembros de la familia GIF de Arabidopsis. (B) Fenotipo de crecimiento de la raíz 15 DPS de plantas silvestres (Col-0), *an3*, *gif2*, *gif3*, *gif2 gif3*, *an3 gif3* y *an3 gif2 gif3*. Barra de escala = 1 cm. (C) Velocidad de elongación primaria para la planta silvestre y las mutantes simples y múltiples de los diferentes miembros de la familia GIF. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de 15 réplicas biológicas. El asterisco indica una diferencia significativa respecto a las raíces de plantas silvestres determinada a través de la prueba T-Student ( $P < 0,05$ ). (D) Evaluación del largo de raíz primaria en función DPS en plantas control (Col-0), la mutante simple *an3* y la triple mutante *an3 gif2 gif3*.

Con el objetivo de explicar las diferencias en el fenotipo de velocidad de elongación de raíz primaria, decidimos evaluar en detalle la estructura celular de las diferentes mutantes simples y múltiples. En primer lugar, nos enfocamos en el estudio de la zona meristemática, y encontramos que las mutantes que no presentaron diferencias de crecimiento de raíz primaria con respecto a la planta silvestre tampoco exhibieron cambios significativos en el largo del meristema (Figura R2.2A, B). Sin embargo el resto de las mutantes, independientemente de que se trate de mutantes con raíces más largas o más cortas en comparación con la planta silvestre, presentaron zonas meristemáticas más largas (Figura R2.2A, B). Incluso se observó un efecto aditivo, ya que las dobles mutantes *an3 gif3*, *an3 gif2* y la triple mutante *an3 gif2 gif3* presentaron un meristema significativamente más largo que la simple mutante *an3* (Figura R2.2A, B), resultado que indica que existe redundancia de función entre los genes de esta familia.

Los fenotipos de zona meristemática de *an3* y *an3 gif3* se correlacionaban con el aumento del crecimiento de su raíz, sin embargo no fue así para las mutantes *an3 gif2* y *an3 gif2 gif3*.

Considerando que el tamaño final de la raíz no sólo se encuentra determinado por el tamaño de la zona meristemática sino también por la magnitud de la elongación celular, evaluamos el tamaño de las células en la zona madura. En este caso encontramos, que en forma consistente con el largo de raíz primaria, las mutantes *an3* y *an3 gif3* presentaron células en la zona madura de mayor longitud en comparación con la planta silvestre (Figura R2.2C, D), sin embargo las mutantes múltiples *an3 gif2* y *an3 gif2 gif3* exhibieron células maduras más cortas en comparación con las plantas control (Figura R2.2C, D). Las mutantes *gif2*, *gif3* y *gif2 gif3* no exhibieron defectos evidentes en las células diferenciadas respecto a las plantas silvestres.

Tomando en conjunto estos resultados, podemos decir que las raíces de las mutantes *an3* y *an3 gif3* son más largas que las raíces de las plantas silvestres como consecuencia tanto de un aumento del tamaño de la zona meristemática como de una mayor elongación de las células en la zona madura, sin embargo el fenotipo de las plantas *an3 gif2* y *an3 gif2 gif3* es debido mayormente a defectos de elongación celular.



**Figura R2.2. Los genes GIFs participan en la regulación del desarrollo radicular. (A)** Arquitectura de la punta de la raíz siete DPS en las plantas control (Col-0), *an3*, *gif2*, *gif3*, *gif2 gif3*, *an3 gif3* y *an3 gif2 gif3*. Las puntas de flecha blancas marcan la posición del CQ, mientras que las puntas de flechas amarillas marcan el final del meristema (ZM) donde las células comienzan a alargarse. **(B)** Evaluación del largo de la zona meristemática en plantas silvestres y mutantes. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de 15 réplicas biológicas. **(C)** Células maduras de la corteza en plantas silvestres y mutantes simples y múltiples de los genes de la familia *GIF* siete DPS. **(D)** Largo de las células maduras de la corteza de plantas silvestres y mutantes. Se midieron al menos 5 células de la corteza en la zona madura por cada raíz. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de 75 réplicas biológicas. Tanto en **(B)** como en **(D)** letras diferentes indican diferencias significativas determinadas por ANOVA seguido de la prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). Barra de escala = 50µm.

Es claro entonces que los genes *GIFs* participan en la regulación del desarrollo de la raíz teniendo impacto en las diferentes zonas a lo largo del eje longitudinal del órgano. En la zona meristemática y en la zona de maduración, la contribución de cada mutación a los fenotipos

observados implica un mayor protagonismo de *AN3* y luego de *GIF2* y *GIF3*. Esta contribución diferencial a los fenotipos observados puede relacionarse directamente con los niveles de expresión que presentan los *GIFs*, ya que se sabe que si bien los miembros de esta familia presentan patrones de expresión comparables, *AN3* es el miembro que se expresa de manera más abundante en comparación con *GIF2* y *GIF3* (56). Para poder estudiar los patrones de expresión de estos genes en raíces preparamos fusiones traduccionales de los tres genes *GIFs*, que consisten en la fusión de la GFP al extremo C-terminal de la secuencia genómica completa, incluyendo intrones de *AN3*, *GIF2* y *GIF3* (*AN3-GFP*, *GIF2-GFP* y *GIF3-GFP*) (Figura R2.3A), bajo el control de sus propias secuencias promotoras. Con estos reporteros GFP, pudimos corroborar que *AN3* y *GIF2* se expresan en mayores niveles en comparación con *GIF3*. Además, los patrones de expresión de los tres genes indican que los mismos se expresan mayormente en el meristema y en niveles más bajos en la zona de maduración (Figura R2.3).



**Figura R2.3. Patrones de expresión de los *GIFs*.** Expresión de reporteros de *AN3*, *GIF2* y *GIF3* fusionados a GFP. Las puntas de flecha blancas marcan la posición del CQ, las puntas de flechas amarillas marcan el final del meristema (ZM) donde las células comienzan a alargarse y las puntas de flecha verde marcan el final de la zona de elongación (ZE). Barra de escala = 50 $\mu$ m.

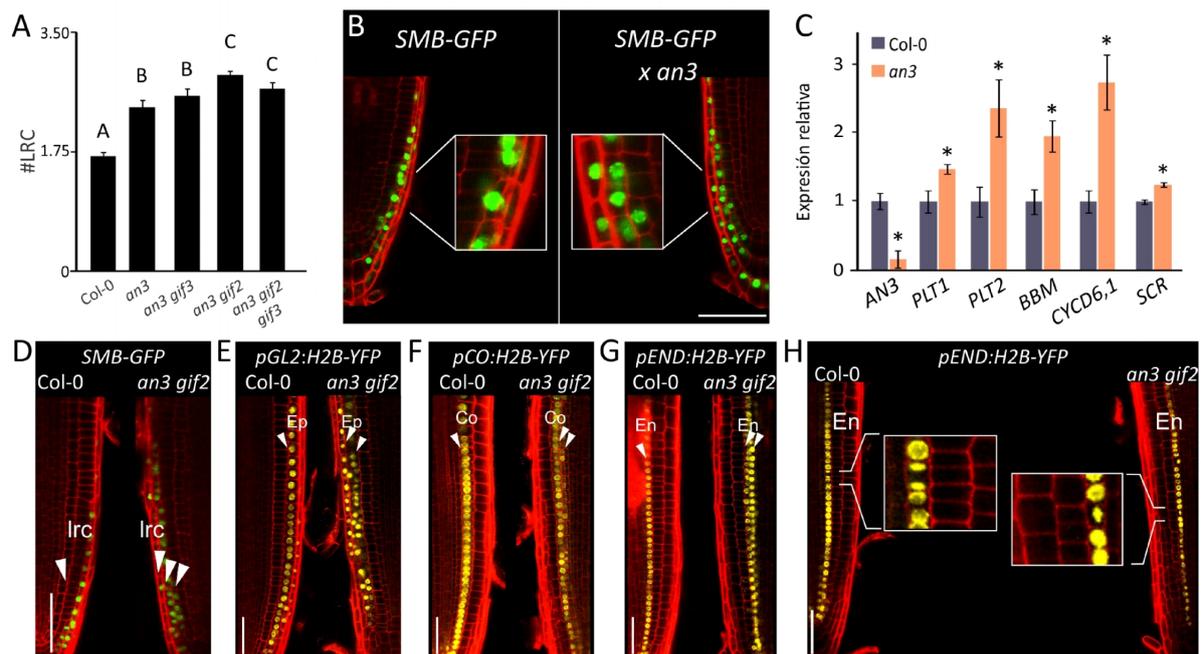
### 7.2.2. Las mutantes *gif* presentan una expansión del carácter de SC en el meristema radicular.

Una inspección más detallada de las raíces *an3* reveló que tienen un aumento en el número de capas de LRC (Figura R2.4A, B). Cruzas de *an3* con el reportero de LRC, *SMB-GFP* (115) confirmaron el aumento en el número de capas de este tejido (Figura R2.4B). Como se describió en el capítulo

anterior, este incremento sugiere una expansión del carácter de SC a la zona de las TACs. Por esto, determinamos por RT-qPCR los niveles de transcripto de varios marcadores de SC. Observamos que los niveles de expresión de *PLT1*, *PLT2*, *BABYBOOM (BBM)*, *SCR* y *CYCD6;1* se encontraban significativamente aumentados en *an3* con respecto a las raíces de tipo silvestre (Figura R2.4C).

A continuación analizamos el número de LRC en las múltiples mutantes para los genes *GIFs* y encontramos que tanto en el caso de *an3 gif2* como de *an3 gif2 gif3* el aumento de capas de LRC resultó incluso mayor que en la mutante simple *an3* (Figura R2.4A). Esa diferencia podría estar relacionada con la función redundante de estos genes controlando el desarrollo del meristema y hablaría nuevamente de un efecto aditivo sobre el grado de expansión de la actividad de las SC en las TACs. Profundizamos estos estudios utilizando reporteros de varios tipos celulares en la doble mutante *an3 gif2*. La utilización de marcadores de LRC (*SMB-GFP*) (Figura R2.4D), de células epidérmicas que no generan pelos radiculares (*pGL2: H2B-YFP*) (Figura R2.4E), de células de la corteza (*pCO: H2B-YFP*) (Figura R2.4F) y de células de la endodermis (*pEND7:H2B-YFP*) (Figura R2.4G,H) reveló la aparición de divisiones celulares periclinales generativas ectópicas a lo largo de todo el meristema. No sólo se verificó el aumento en el número de capas de LRC, sino que también se encontraron capas celulares adicionales en todo el meristema. Observamos capas adicionales de epidermis (Figura R2.4E) en cuatro de cada diez plantas, de la corteza (Figura R2.4F) en tres de cada diez y de endodermis (Figura R2.4G, H) en cinco de cada diez.

Además, siendo que los reporteros tejido específico utilizados presentan la proteína fluorescente YFP fusionada a la histona H2B, esta construcción permite evaluar la disposición espacial de los cuerpos mitóticos, que ayuda a distinguir la orientación de las divisiones en curso. En la zona de activa proliferación celular de una planta silvestre, las células presentan figuras mitóticas que se disponen de forma perpendicular al eje longitudinal de la raíz, las cuales son características de células que se dividen anticlinalmente (Figura R2.4H). Sin embargo, en la misma zona, las dobles mutantes presentan con cierta frecuencia células con cuerpos mitóticos dispuestos de manera paralela al eje longitudinal (Figura R2.4H), asociados a divisiones periclinales generativas ectópicas que podrían explicar la aparición de capas extra de tejido.



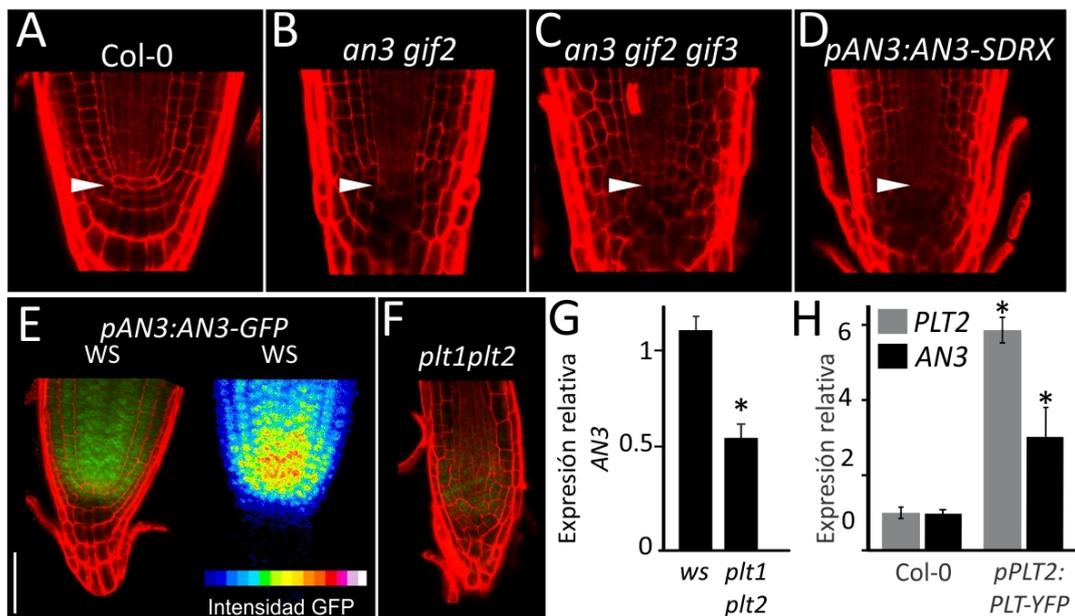
**Figura R2.4. Los *GIFs* reprimen la actividad de las SC en las TACs. (A)** Número de capas de LRC (#LRC) medidos a 50µm hacia arriba del CQ de plantas silvestres (Col-0), *an3*, *an3 gif3*, *an3 gif2* y *an3 gif2 gif3*. Se contaron las capas de LRC en al menos diez plantas. Se graficaron los valores promedios ± EE de diez réplicas biológicas. Letras diferentes indican diferencias significativas determinadas por ANOVA seguido de la prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). **(B)** Expresión de un marcador de específico de LRC (*SMB-GFP*) en raíces de plantas silvestres (Col-0) y *an3*. Se observa ampliada la misma región en las diferentes raíces para mostrar en detalle el aumento de LRC. **(C)** Expresión relativa de *AN3* y una selección de genes específicos de SC en puntas de raíces de plantas control y *an3* estimados por RT-qPCR. Se graficaron los valores promedios ± EE de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican una diferencia significativa respecto a las raíces de plantas silvestres determinada a través de la prueba T-Student ( $P < 0,05$ ). **(D),(E),(F)** y **(G)** Patrón radial de diferentes tejidos en la doble mutante *an3 gif2* analizado mediante la expresión de reporteros tejido específico: de LRC (Lrc) **(D)**, de células epidérmicas que no darán pelo radicular (Ep) **(E)**, de células de la corteza (Co) **(F)** y de células de la endodermis (En) **(G)**. Se resalta la aparición de las capas adicionales de células en la doble mutante *an3 gif2*. Las puntas de flecha blancas indican las capas de células adicionales que se encuentran en *an3 gif2* para el tipo de célula en particular. **(H)** Detalle de la orientación de una división celular periclinal generativa en el meristema de la mutante *an3 gif2* que explicaría la capa de endodermis extra. La dirección de la división se infiere de la disposición espacial de la figura mitótica evidenciada por el reportero utilizado. Los recuadros de mayor magnificación muestran figuras mitóticas correspondientes a una división anticlinal en la planta silvestre y periclinal en la doble mutante. Barra de escala = 50µm.

### 7.2.3. Los *GIFs* participan en mantenimiento del CQ.

Junto con el análisis que mostró la aparición de divisiones periclinales generativas ectópicas a lo largo de la zona meristemática, la evaluación en mayor detalle del SCN en las plantas múltiples mutantes *an3 gif2* y *an3 gif2 gif3* reveló una fuerte desorganización del CQ (Figura R2.2A; Figura R2.5A-C). En lugar del pequeño número de células con tamaños y formas delimitadas por divisiones celulares estereotipadas y paredes celulares orientadas de las plantas silvestres, no se pudo observar una organización regular en la región del presuntivo CQ en las raíces *an3 gif2* y *an3 gif2 gif3*. Por el contrario el CQ de la doble y triple mutante tenían un mayor número de células, de diferentes tamaños, formas y orientaciones de la pared celular (Figura R2.5B, C). El análisis del resto de las mutantes simples y múltiples no mostró defectos en esta zona.

Para validar el fenotipo de CQ de las múltiples mutantes, generamos una versión represora dominante de *AN3* mediante la fusión del motivo SRDX a su extremo C-terminal (129). Esta construcción se expresó bajo el control de su propia secuencia regulatoria (*pAN3:AN3-SDRX*). Observamos que *pAN3:AN3-SDRX* también causó una fuerte desorganización del CQ (16 de 20 plantas transgénicas primarias independientes) (Figura R2.5D). Estos resultados indican que además de la expansión del carácter de SC en la zona de elevada proliferación celular, los *GIFs* también son necesarios para el mantenimiento del CQ.

Sobre la base de estos resultados, llevamos a cabo una inspección más minuciosa de la expresión de *pAN3:AN3-GFP* en la región meristemática y encontramos que este gen presenta una expresión en gradiente, con un pico máximo en el SCN que disminuye hacia las TACs y se agota hacia el final del meristema (Figura R2.5E). Como el patrón de expresión de *AN3* se asemejaba al de los genes *PLT* (75, 87), cruzamos el reportero *pAN3:AN3-GFP* con la doble mutante *plt1 plt2*. Encontramos una disminución significativa en la expresión *AN3* en estas mutantes (Figura R2.5E, F), un resultado esperado considerando el papel de *AN3* en establecimiento del CQ. Así mismo, encontramos que los niveles de transcritos de *AN3* correlacionaron con los cambios en *PLT1* y *PLT2* (Figura R2.5G, H). En concordancia con estos resultados, un trabajo publicado recientemente demostró que *AN3* es blanco directo de regulación por *PLT2* (130), y que tanto *PLT1* como *PLT2* junto con los otros genes de esta familia lo regulan positivamente (130).



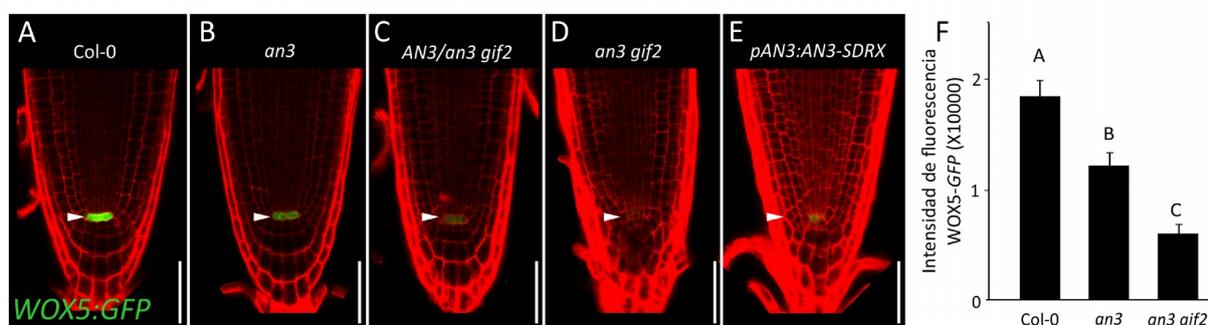
**Figura R2.5. Los *GIFs* son necesarios para la homeostasis del CQ.** (A) - (D) Organización celular del CQ de raíces de plantas silvestres (Col-0) (A), *an3 gif2* (B), *an3 gif2 gif3* (C) y la versión represora dominante de *AN3* (*pAN3: AN3-SRDX*) (D). (E) Pico máximo de expresión de *AN3* en el SCN de una planta silvestre (WS). El panel de la derecha muestra el análisis del perfil de intensidad de GFP. (F) Expresión del reportero *pAN3: AN3-GFP* en mutantes *plt1 plt2*. (G) Expresión relativa de *AN3* en puntas de raíces de plantas silvestres (WS) y *plt1 plt2* determinado por RT-qPCR. (H) Expresión relativa de *AN3* y *PLT2* en puntas de raíces de plantas silvestres (Col-0) y *PLT2-YFP* determinado por RT-qPCR. Tanto en (G) como (H) se graficaron los

valores promedios  $\pm$  EE de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican una diferencia significativa respecto a las raíces de plantas silvestres determinada a través de la prueba T- Student ( $P < 0,05$ ). Barra de escala =  $50\mu\text{m}$ .

#### 7.2.4. Los *GIFs* son necesarios para el mantenimiento de los diferentes dominios en el eje longitudinal de la raíz.

Considerando la caracterización realizada de las TACs y el CQ en el meristema de las mutantes *GIFs*, decidimos analizar la posibilidad de que los fenotipos observados sean el resultado de cambios en los dominios de desarrollo a lo largo del eje longitudinal de la raíz. Para llevar a cabo este análisis realizamos cruza de la simple mutante *an3* y la doble *an3 gif2* con marcadores celulares específicos. Debido a que las plantas doble mutante *an3 gif2* resultan ser infértiles, las líneas resultantes deben ser mantenidas en heterocigosis para la mutación de *AN3* y homocigosis para la mutación en *GIF2*, esta situación nos brindó la posibilidad de analizar en simultáneo diferentes dosis de *AN3* en el contexto de *gif2*.

En primer lugar, realizamos cruza con el reportero *WOX5*, que se expresa específicamente en el CQ (6). Encontramos una reducción de la expresión del mismo en plantas *AN3/an3 gif2*, mientras que la expresión de *WOX5* se encontró fuertemente disminuida en las dobles mutantes *an3 gif2* (Figura R2.6C, D y F). Esta disminución de la expresión *WOX5* puede correlacionarse con la fuerte distorsión del CQ (Figura R2.5C; Figura R2.6.D, F). Luego, confirmamos que *AN3* controla los niveles de expresión de *WOX5* utilizando *pAN3:AN3-SDRX*. Las plantas expresando esta construcción también presentaron una disminución en los niveles de expresión de *WOX5* acompañados por la desorganización del CQ (Figura R2.6E). Finalmente, a pesar de que el CQ de la mutante *an3* no presenta una desorganización evidente, la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de la GFP mostró una disminución parcial de la expresión *WOX5* (Figura 2.6F), lo que sugiere que la expresión de este gen necesario para la homeostasis del CQ depende cuantitativamente de los niveles de *GIF*.

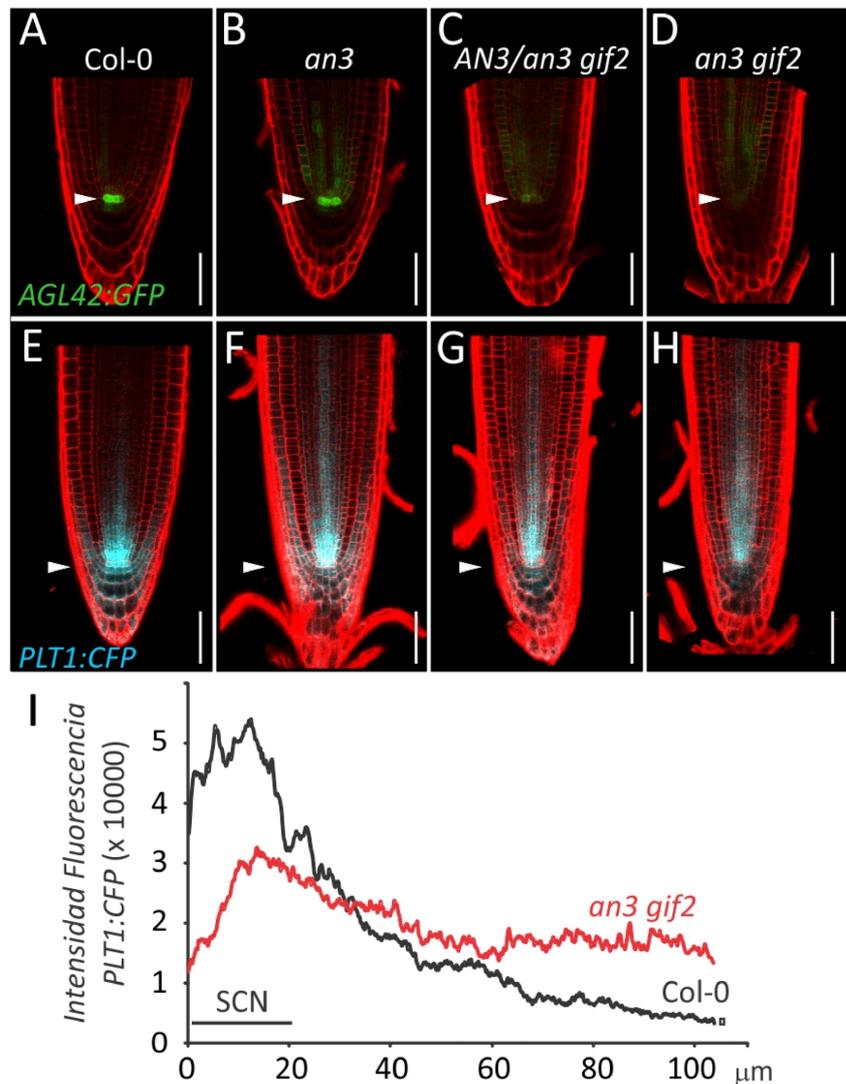


**Figura R2.6. Los genes *GIFs* regulan cuantitativamente los niveles de *WOX5*.** (A) - (E) Expresión de la línea reportera *WOX5:GFP* en plantas silvestres (Col-0) (A), *an3* (B), *AN3/an3 gif2* (C), *an3 gif2* (D) y *AN3-SDRX* (E). Las puntas de las flechas blancas marcan la posición del CQ. Barra de escala =  $50\mu\text{m}$ . (F) Intensidad de fluorescencia de la línea reportera *WOX5-GFP* en plantas silvestres (Col-0), *an3* y *an3gif2*. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de diez réplicas biológicas. Letras diferentes indican diferencias significativas determinadas por ANOVA seguido de la prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A continuación, nos enfocamos en la expresión del reportero *AGL42-GFP* que se expresa en el CQ y en las SC adyacentes (120). En *an3* se observó que el reportero *AGL42* se encuentra expandido hacia la zona que alberga las TACs (Figura R2.7A, B) resultado que se encuentra en concordancia con la expansión a dicha zona del carácter de SC en las mutantes *an3*. En *AN3/an3 gif2* y la doble mutante *an3 gif2*, sin embargo, la expresión de *AGL42* cae específicamente en el CQ, mientras que permanece la expresión ectópica del reportero en las TACs (Figura R2.7C, D). Esto indica que *AN3* funciona como represor de genes específicos de SC en las TACs, pero como activador de estos mismos genes en el propio SCN.

Un resultado similar obtuvimos al analizar la expresión de un reportero transcripcional de *PLT1* (*PLT1:CFP*), que presenta un pico de expresión en el SCN, pero disminuye en las TACs (Figura R2.7E). El análisis de este reportero en las plantas *an3 gif2* mostró una vez más los efectos diferenciales de los *GIFs* en los diferentes dominios a lo largo del eje longitudinal de la raíz: en el SCN la expresión de *PLT1:CFP* disminuyó significativamente, mientras que se expandió hacia la zona de activa proliferación celular (Figura R2.7G, H). Como resultado, el gradiente de expresión bien caracterizado de *PLT1:CFP* a lo largo del eje longitudinal se volvió borroso (Figura R2.7I), mostrando un dominio de expresión más amplio con niveles más bien homogéneos a lo largo de la raíz de las *an3 gif2* (Figura R2.7H, I).

El establecimiento del gradiente de *PLT* es esencial para determinar los diferentes dominios en el eje longitudinal de la raíz: el pico de expresión *PLT* determina el SCN, mientras que una disminución de la expresión de *PLT* es necesaria para promover la proliferación celular en el meristema de la raíz (75, 87). Que la expresión de *PLT* se mantenga en un nivel intermedio, bastante homogéneo, a lo largo del meristema de *an3 gif2* (Figura R2.7I), es coherente con la falta de organización en el QC, el carácter de SC expandido hacia la zona de las TACs y el aumento del tamaño del meristema.



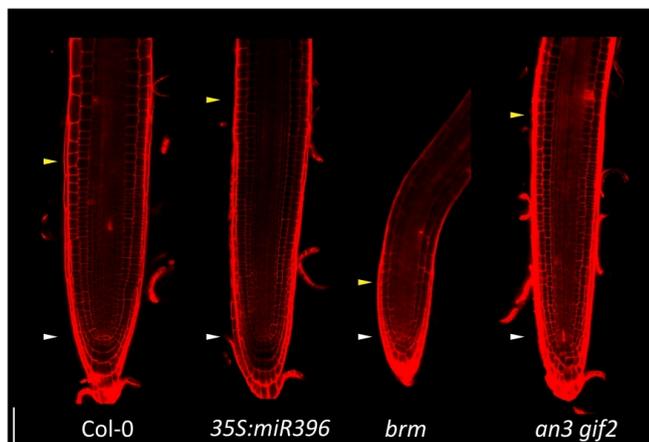
**Figura R2.7. Los GIFs participan en la definición de las zonas de desarrollo en el eje longitudinal de la raíz. (A) - (H)** Expresión de líneas reporteras, *AGL42: GFP* (A-D) y *PLT1: CFP* (E-H) en plantas silvestres (Col-0), *an3*, *AN3/an3 gif2* y *an3 gif2*. Las puntas de flechas blancas marcan la posición del CQ. Barra de escala = 50μm. (I) Perfil de la intensidad de fluorescencia del reportero PLT1-CFP en puntas de las raíces de silvestre y doble mutante *an3 gif2*. "SCN" indica la región que se define como SCN en el eje en el cual se hicieron estas medidas.

### 7.2.5. AN3 determina las TACs y el CQ a través de diferentes vías genéticas.

Los GIFs son capaces de interactuar con los factores de transcripción GRF o con BRAHMA (13, 16, 25, 32, 126). Considerando esta posibilidad, pensamos que AN3 sería capaz de desempeñar las funciones descritas en las secciones anteriores gracias a su participación en diferentes vías genéticas que involucran distintos reguladores del desarrollo.

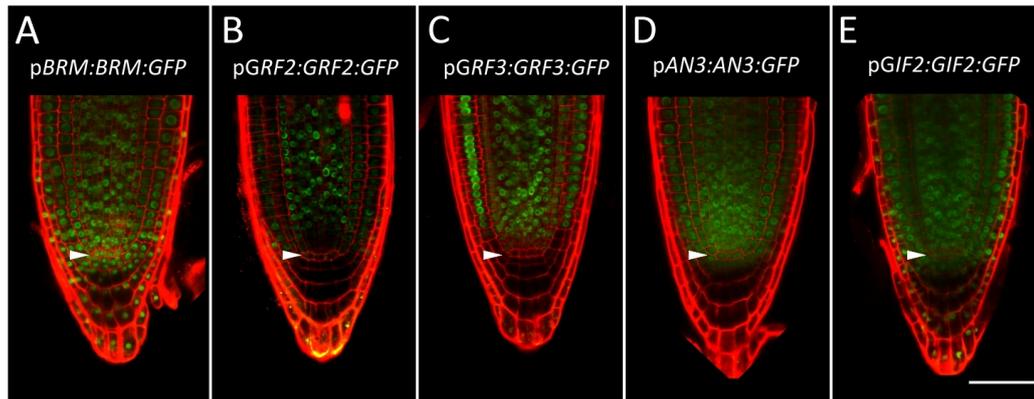
Sabemos que la disminución de la actividad de los *GRFs*, consecuencia de la sobreexpresión de miR396, genera un meristema de mayor tamaño con capas extra de LRC, fenotipo que se asemeja a las mutantes individuales *an3*. Además, trabajos previos han mostrado que las mutantes *brm* tienen el CQ desorganizado y una zona meristemática más corta en comparación con la planta silvestre (131) (Figura R2.8). Entonces, si bien tanto los *GRFs* como *BRM* pueden interactuar con AN3 (13, 16,

25, 32, 126), parecen tener diferentes funciones, participando principalmente en el mantenimiento de las TACs y el CQ, respectivamente. Teniendo en cuenta las características de cada sistema uno podría especular que los fenotipos de la doble mutante *an3 gif2* serían consecuencia de la disminución combinada de la actividad de los *GRFs* y *BRM* (Figura R2.8).



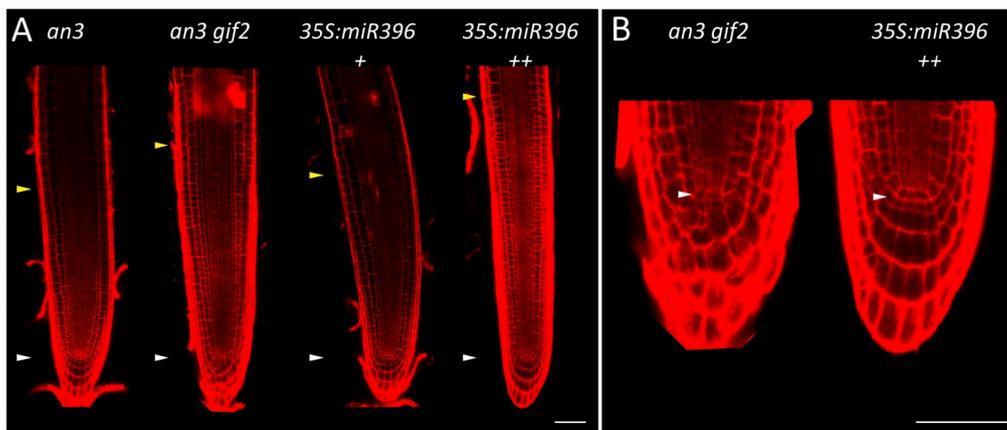
**Figura R2.8.** El fenotipo de *an3 gif2* podría ser la consecuencia de la interacción de AN3 en dos sistemas regulatorios diferentes. Arquitectura de la punta de la raíz siete DPS en las plantas silvestres (Col-0), *35S:miR396*, *brm* y *an3 gif2*. Las puntas de flecha blancas marcan la posición del CQ, mientras que las puntas de flechas amarillas marcan el final del meristema (ZM) donde las células comienzan a alargarse. Barra de escala =50  $\mu$ m.

Esta posibilidad nos llevó a comparar los patrones de expresión de *BRM*, *GRFs* y *GIFs*. Como vimos en la sección anterior, los reporteros de *GRF2* y *GRF3* se expresan en las TACs y se encuentran ausentes en el SCN gracias a la actividad del miR396 (Figura R1.2B, C; Figura R2.9B, C). Por el contrario, *BRM* se expresa en forma constitutiva en el RAM, detectándose tanto en el SCN como en las TACs (132) (Figura R2.9A), un resultado esperado para un componente de la maquinaria de remodelación de la cromatina que participa en la regulación de diferentes procesos del desarrollo. Por último, el reportero de *AN3* mostró una expresión con forma de gradiente hacia las TACs, presentando un pico máximo en el SCN (Figura R2.9D) mientras que *GIF2* se expresó con un patrón comparable, sin el pico en el SCN pero avanzando hacia las células de columela (Figura R2.9E). Combinando la información brindada por los patrones de expresión y la caracterización fenotípica, hipotetizamos que la función de los *GIFs* como activadores de la expresión de los genes específicos de SC y en el mantenimiento del CQ dependería de la interacción entre AN3 y BRM. Por el contrario, la función de los *GIFs* en la represión de la expresión de los mismos genes, y por lo tanto del carácter de SC en las TACs dependería de la interacción con los *GRFs*.



**Figura R2.9. Comparación de los patrones de expresión de *BRM*, *GRFs*, *AN3* y *GIF2* en el SCN y las TACs. (A) - (E) Expresión de reporteros GFP de *BRM* (A), *GRF2* (B), *GRF3* (C) y *AN3* (D), *GIF2* (E) en la punta de la raíz. Las puntas de flechas blancas indican la posición del CQ. Barra de escala = 50  $\mu$ m.**

Para corroborar esta hipótesis, analizamos diferentes sobreexpresantes del miR396 con el objetivo de descartar la posibilidad de que una severa disminución de los *GRFs* pudiera causar defectos en el CQ. Encontramos que líneas de plantas *35S:miR396* con un meristema incluso más largo que el de la doble mutante *an3 gif2* presenta un CQ sin defectos evidentes (Figura R2.10A, B). Esto indica que el defecto en el CQ ocurre sólo en plantas deficientes en *GIFs*.

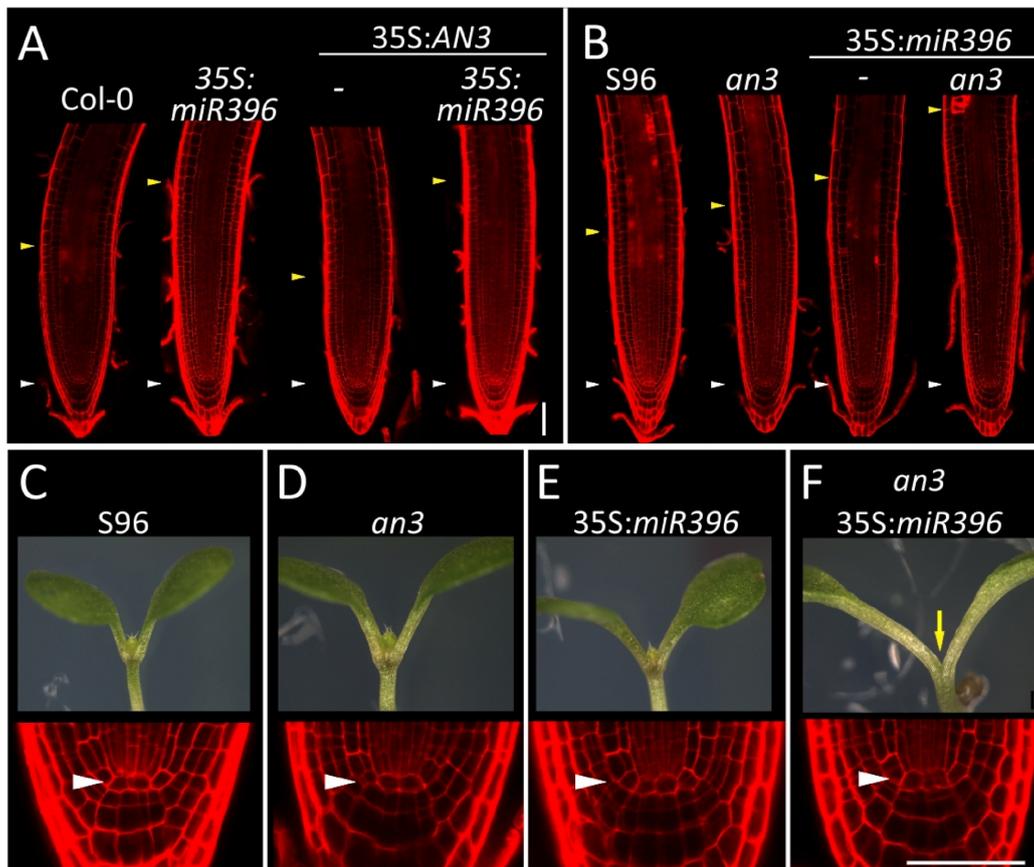


**Figura R2.10. Los *GRFs* y los *GIFs* participan en el control del tamaño del meristema, pero sólo los *GIFs* participan en el mantenimiento del CQ. (A) Arquitectura de la punta de la raíz siete DPS en las plantas *an3*, *an3 gif2* y dos líneas T1 sobreexpresando diferentes niveles del miR396 (*35S:miR396*). (B) Organización del CQ siete DPS en las plantas *an3 gif2* y sobreexpresante fuerte (++) del miR396. Las puntas de flecha blancas marcan la posición del CQ, mientras que las puntas de flechas amarillas marcan el final del meristema (ZM) donde las células comienzan a alargarse. Barra de escala = 50  $\mu$ m.**

Para confirmar que *AN3* controla el tamaño de meristema de la raíz a través de los *GRFs*, preparamos una construcción donde *AN3* se expresa bajo el control de un promotor constitutivo fuerte 35S (*35S:AN3*). Observamos que estas plantas presentaron un meristema más corto que las raíces de plantas silvestres, resultado esperado y opuesto al de la mutante *an3* (Figura R2.11A). A continuación, se analizó el efecto de la construcción *35S:AN3* en plantas que sobreexpresan el

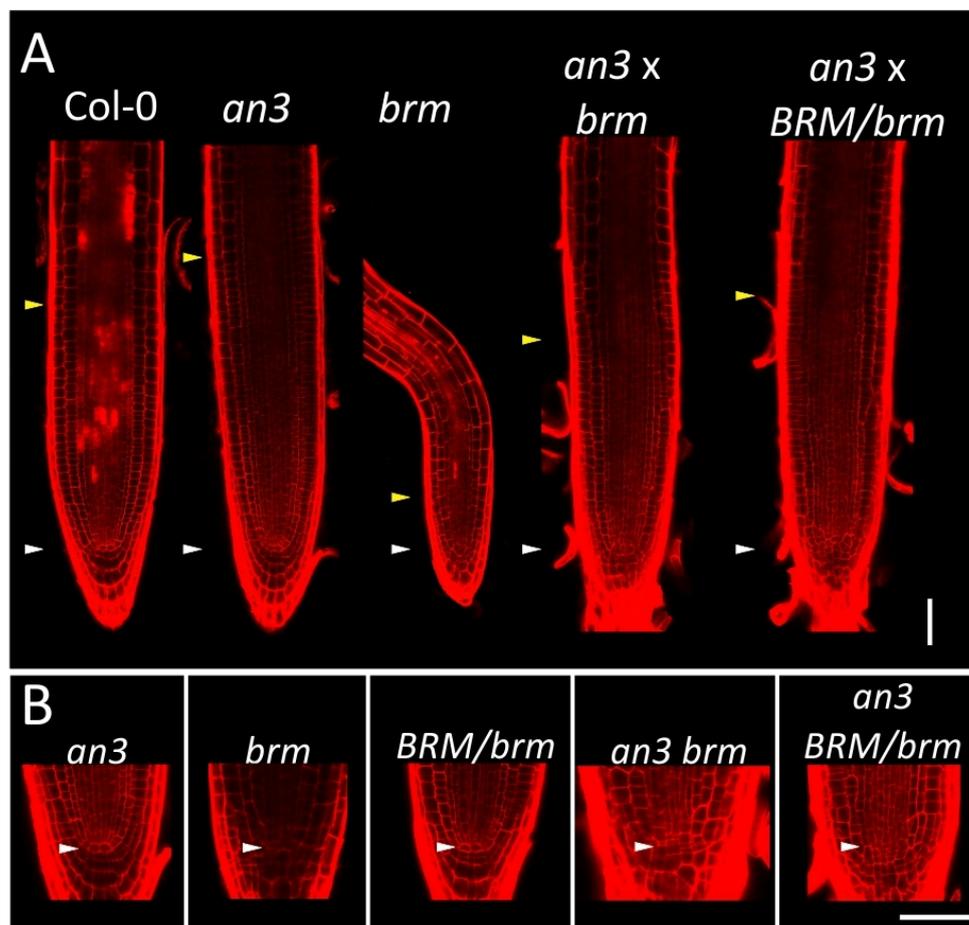
*miR396*, donde la actividad de los *GRFs* se ve reducida. En este caso, se encontró que el fenotipo de ganancia de función de *AN3* estaba suprimido, demostrando que el control del tamaño del meristema por *AN3* requiere la presencia de los factores de transcripción *GRF* (Figura R2.11A).

A continuación, sobreexpresamos el *miR396* en mutantes *an3* y observamos un aumento aún mayor del tamaño del meristema de la raíz (Figura R2.11B). No se encontraron defectos evidentes en el CQ de las plantas *35S:miR396 x an3* (Figura R2.11B-F). Estos resultados sugieren que los *GRFs* y *GIF* controlan el tamaño meristema de la raíz, pero sólo los *GIF* están implicados en la homeostasis del CQ. Es interesante, que las plantas *35S:miR396 x an3* a pesar de presentar un CQ y SCN comparable al de una planta silvestre carecen de SAM funcional (54) (Figura R2.11C-F), indicando que el sistema *GRF-GIF* exhibe funciones diferentes en el meristema apical del vástago y la raíz, ya que una disminución de los niveles del sistema limita la actividad del meristema apical del vástago, mientras que produce el aumento del tamaño del meristema de la raíz.



**Figura R2.11. La actividad de los GIFs en el meristema depende de su interacción con los GRFs.** Las puntas de las flechas blancas marcan la posición del QC y las puntas de flecha de color amarillo marcan el final del meristema (ZM) donde las células comienzan a elongarse. (A) Tamaño de la zona meristemática después de la sobreexpresión de *AN3* a partir del promotor 35S (*35S: AN3*) en plantas silvestres y sobreexpresantes del *miR396* (*35S:miR396*). (B) Tamaño de la zona meristemática después de la sobreexpresión de *miR396* en plantas silvestres (S96) y *an3-1*. (C) - (F) Meristema apical del vástago (arriba) y CQ (abajo) producto de la sobreexpresión del *miR396* en plantas silvestres (S96) y *an3-1*. La flecha amarilla indica la falta de meristema apical funcional en plantas *35S:miR396 x an3-1*. Barra de escala negra = 1 mm. Barra de escala blanca = 50 μm.

A diferencia de las plantas *35S:miR396*, las mutantes *brm* se caracterizan por una fuerte distorsión del CQ y un meristema corto (Figura R2.8; Figura R2.12A). Para estudiar la interacción genética entre *AN3* y *BRM* analizamos las raíces de la doble mutante *an3 x brm*. Observamos que el CQ de la cruce presentó una distorsión aún mayor que la mutante *brm* individual (Figura R2.12A, D). Más interesante aún fue encontrar que la cruce de *an3 x brm* derivó en el rescate parcial del tamaño del meristema de la raíz (Figura R2.12A). Considerando los fenotipos de CQ y largo de meristema, *an3 x brm* se asemeja a una doble mutante *an3 gif2*. Curiosamente, las raíces *an3 BRM/brm* ya exhiben un CQ distorsionado, mientras que las heterocigotas *BRM/brm* poseen un CQ comparable a una planta silvestre, dejando en evidencia la interacción de *AN3* y *BRM* en el establecimiento del CQ (Figura R2.12B).



**Figura R2.12. AN3 y BRM interaccionan para regular la homeostasis del CQ. (A)** Arquitectura de la punta de la raíz en plantas silvestres (Col-0), *an3*, *brm*, *an3 brm* y *an3 BRM/brm*. Las puntas de las flechas blancas marcan la posición del QC y las puntas de flecha de color amarillo marcan el final del meristema donde las células comienzan a elongarse. **(B)** Organización del QC de raíces de siete DPS de *an3*, *brm*, *BRM/brm*, *an3 brm* y *an3 BRM/brm*. Barra de escala =50  $\mu$ m.

### 7.3. Discusión.

#### 7.3.1. Los cofactores de la familia *GIF* actúan de manera redundante regulando el desarrollo del sistema radicular.

A lo largo de este capítulo hemos mostrado que los cofactores de la familia *GIFs* son necesarios para el normal desarrollo radicular. Las mutantes en estos genes exhiben diferentes fenotipos que dan cuenta de su importancia. Si bien es claro que *AN3* es el gen más relevante en esta familia, la aparición de nuevos fenotipos en las múltiples mutantes demuestran la importancia de *GIF2* y *GIF3*, los otros miembros de esta familia.

Los tres genes miembros de la familia *GIFs* actúan de manera redundante reprimiendo la expresión de genes de SCN en las TACs. A diferencia de las raíces de las plantas simple mutante *an3* en las que se observó un incremento en el largo del meristema acompañado de un aumento en el número de capas de LRC, en la doble mutante *an3 gif2* el largo del meristema fue significativamente mayor. Además de verse un efecto similar en el número de capas de LRC, se pudo observar el desarrollo de capas extra en otros tejidos como epidermis, corteza y endodermis. Este incremento es consecuencia de las sostenidas divisiones periclinales generativas que ocurren en la región de las TACs, interpretándose como resultado de una expansión del carácter de SC hacia la zona de las TACs.

El análisis macroscópico de la estructura radicular de las plántulas de las múltiples mutantes *an3 gif2* y *an3 gif2 gif3* reveló defectos en el desarrollo de raíces laterales (Figura R2.1B). Estas plantas desarrollaron notoriamente un menor número de raíces laterales en comparación con la planta silvestre, además las mismas resultaron más cortas. La raíz primaria y las raíces laterales tienen morfología similar, las estructuras anatómicas son comparables, poseen un meristema apical en el cual el CQ se encuentra rodeado por las SC (72). En las raíces laterales maduras de las mutantes múltiples la organización del CQ es comparable al de la raíces primarias, detectándose una disminución en la expresión de *WOX5* (Datos no mostrados). Se ha visto que en las plantas mutantes *wox5-1* la densidad de raíces laterales se ve disminuida (133), por lo que podríamos entender los defectos de las múltiples mutantes *GIFs* en función de la disminución de la expresión de *WOX5*. Además es de esperar que en las raíces laterales los patrones de expresión de los genes *PLTs* adopten la misma forma que en la raíz primaria, de modo que el desarrollo de las diferentes zonas a lo largo del eje longitudinal también se vean afectadas. Estos resultados estarían en concordancia con la idea de que los genes que actúan como reguladores maestros del desarrollo de las raíces primarias, también son requeridos para el desarrollo de las raíces laterales y el mantenimiento de su SCN (133).

#### 7.3.2. La inactivación de los *GIFs* tiene efectos opuestos en el CQ y en las TACs.

La organización celular de las diferentes zonas de desarrollo a lo largo del eje longitudinal de la raíz resulta esencial para el correcto crecimiento del órgano. Al menos dos vías regulatorias paralelas

son necesarias para establecer el meristema de la raíz. Mutaciones en *PLT* y *SHR/SCR* [revisado en Petricka (134)] dan a lugar a la pérdida tanto del CQ como de las SC, comprometiendo el crecimiento del órgano.

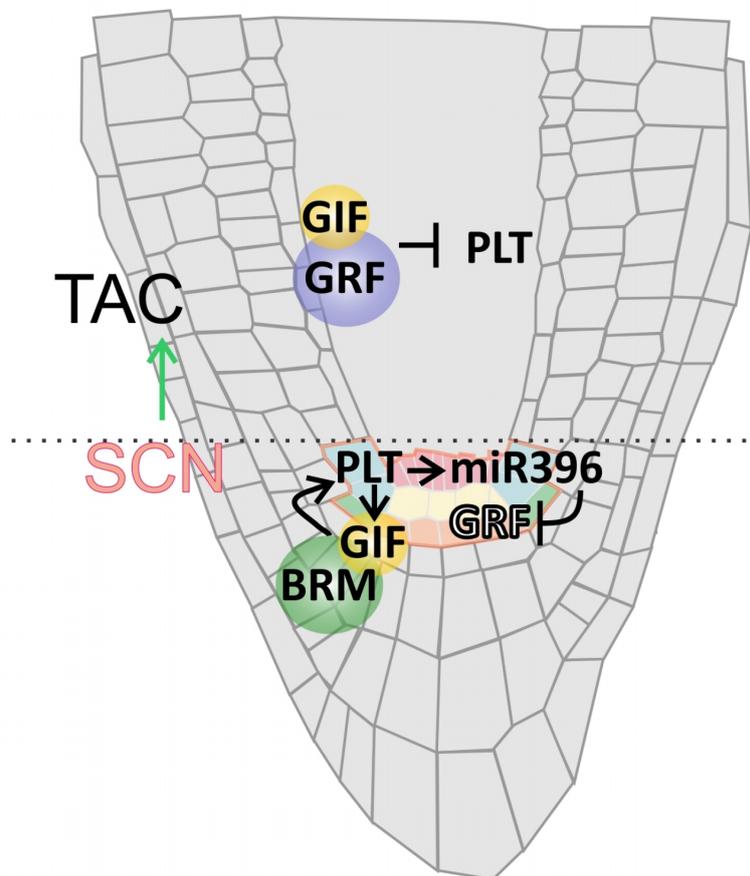
Los resultados detallados en este capítulo indican que los genes *GIFs* participan a diferentes niveles, manteniendo la homeostasis del CQ y las SC. Las múltiples mutantes *an3 gif2* y *an3 gif2 gif3* presentaron un CQ desorganizado, que afecta también al conjunto de SC que lo rodean de modo que no pudieron definirse las células y sus identidades. Más aún la expresión de *WOX5*, un gen necesario para el establecimiento del CQ se vio fuertemente disminuida en las dobles mutantes. Estos resultados indicaron que los *GIFs* son necesarios para el mantenimiento del CQ. Por otro lado estos coactivadores transcripcionales restringen el carácter de SC por fuera del SCN, confinando estas características a las células que rodean el CQ. La pérdida de función de los *GIFs* resulta en la expansión de las propiedades de SC hacia la región del meristema que alberga las células en alta proliferación. Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que los *GIFs* tienen un doble papel en el desarrollo de la raíz: activar la expresión de genes específicos de SC en el CQ y reprimir su expresión en las TACs. Estas funciones requieren de una dosis génica diferente, ya que las mutantes *an3* muestran defectos en el tamaño de meristema de la raíz, pero la distorsión del QC se hace evidente en las dobles mutantes *an3 gif2*.

El máximo de expresión de *AN3* en el SCN, con un gradiente que se extiende hacia las TACs presenta similitud con el patrón de expresión de *PLT*. Interesantemente, el efecto regulatorio de *AN3* sobre *PLT* depende del contexto celular (Figura R2.13). *AN3* es necesario para generar el pico de expresión de *PLT1* en el SCN, mientras que restringe la expresión de *PLT1* en las células en activa proliferación (Figura R2.13). Sin la actividad de los *GIFs*, el gradiente de expresión de *PLT*, que es esencial para establecer las diferentes zonas de desarrollo en el eje longitudinal de la raíz (75 1295, 87 3021) se transforma en una región más amplia de expresión homogénea que se traduce en el fenotipo de la doble mutante *an3 gif2*. Además, encontramos que la actividad de *PLT* es necesaria para la correcta expresión de *AN3* (Figura R2.13), resultado confirmado recientemente en (130). Estas relaciones regulatorias entre *AN3* y *PLT1* establecen entonces dos circuitos regulatorios, uno positivo y otro negativo, dependiendo el contexto celular.

Es bien sabido que los *GIFs* pueden interactuar con los *GRFs* y con las ATPs *BRAHMA* de los complejos de remodelación de la cromatina (13, 16, 25, 32, 126). Además, se ha propuesto que *AN3* puede ser el vínculo entre los *GRFs* u otros factores de transcripción y los complejos de remodelación de la cromatina durante el desarrollo de la hoja (32). En base a nuestros resultados proponemos que en el meristema de la raíz, los *GIFs* pueden tener papeles independientes, ya sea interactuando con los *GRFs* en las TACs o con *BRM* en el CQ y las SC (Figura R2.13).

Mostramos que los complejos entre GIFs y GRFs reprimen la expresión de genes de SCN en las TACs, función que tiene aún lugar en la mutante *brm*. Esto sugiere que la función de BRM no es esencial para el mecanismo de represión del carácter de SC por el complejo GRF/GIF en las TACs. Por otro lado, también hemos mostrado que la doble mutante *an3 gif2* carece de un SCN definido, siendo esta una función independiente de los GRFs, pero que depende de su asociación con BRM (Figura R2.13).

Cabe destacar que la función de los *GIFs* es diferente de la de otros reguladores previamente descritos. Se ha visto que, en general afectar la actividad de genes responsables del establecimiento y mantenimiento del SCN viene acompañada por defectos en el tamaño del meristema proximal donde se encuentran las TACs (73, 76, 135-140). Por el contrario, en el caso de los genes *GIFs*, los mismos presentan efectos antagónicos en el SCN, promoviendo el mantenimiento del CQ y reprimiendo el carácter de SC en las TACs (Figura R2.13).



**Figura R2.13. Modelo propuesto por el cual las interacciones entre el miR396, GRF, GIF, BRM y PLT definen la transición entre las células madre y las TACs. El SCN, se encuentra delineado en Rosa.**

Finalmente, es interesante mencionar que BRM y proteínas similares a los GIFs, como así también las interacciones entre ellos, se encuentran conservados en animales y plantas (34). Por el

contrario los *GRFs* sólo se encuentran en las plantas terrestres, sugiriendo que la vía de los *GIFs* se vuelve más compleja en plantas a través de la evolución con nuevos interactores.

## **RESULTADOS III.**

## 8. Resultados Capítulo 3.

### Identificación de la red transcripcional controlada por *AN3* y *GRF3*.

#### 8.1. Introducción.

Los factores de transcripción *GRFs* y los miembros de la familia *GIF* han sido descritos como reguladores importantes del desarrollo de las hojas (13, 14, 16, 54, 56, 141-144). Se ha visto además que estos genes participan en el control de otros procesos del desarrollo. Se observó que las plantas con niveles reducidos de varios *GRFs* y *GIFs* presentan defectos embrionarios, en la estabilidad del meristema apical del vástago y en la diferenciación de las caras de las hojas (54, 56, 142-144). Además, se ha visto que este sistema cumpliría un rol en etapas tardías del desarrollo de las hojas, participando en procesos biológicos relacionados con la progresión hacia la senescencia (25). Por último, en los dos primeros capítulos de esta tesis se mostró que este sistema cumpliría un rol en el desarrollo radicular.

Se ha propuesto que los factores de transcripción *GRFs* y sus co-activadores los *GIFs* interactúan formando complejos encargados de regular la expresión de genes implicados en los diferentes procesos mencionados. En estos complejos, los *GRFs* aportarían la especificidad de secuencia de ADN reconocida, mientras que los co-reguladores *GIFs* actuarían ayudando en el reclutamiento de la maquinaria de transcripción o de otros reguladores de la expresión génica (25). Además, la interacción de *AN3*, y tal vez los otros *GIFs*, con la maquinaria de remodelación de la cromatina, abre la posibilidad de explicar funciones de estos cofactores independientes de la interacción con los *GRFs*.

La interacción del sistema de los *GRF/GIF* con otros programas genéticos que participan en el desarrollo radicular pudo ser establecida gracias al análisis de datos de transcriptómica de puntas de raíces de plantas *35S:miR396*. Sin embargo, al tratarse de datos de transcriptómica generados con una línea estable sobreexpresante del *miR396*, resultó imposible distinguir entre blancos directos e indirectos de regulación por los complejos *GRF/GIF*. En este capítulo se describen las estrategias complementarias que fueron desarrolladas para identificar la red transcripcional directamente controlada por los complejos de los *GRF* y *GIF*. Por un lado, se generaron las herramientas necesarias para poder estudiar respuestas directas a cambios de expresión de *AN3* y *GRF3*, que a continuación fueron utilizadas para realizar análisis de transcriptómica en raíces. Finalmente, la información obtenida permitió caracterizar en mayor detalle la interacción entre la red regulatoria estudiada en esta Tesis junto con otras que contribuyen a regular el desarrollo radicular.

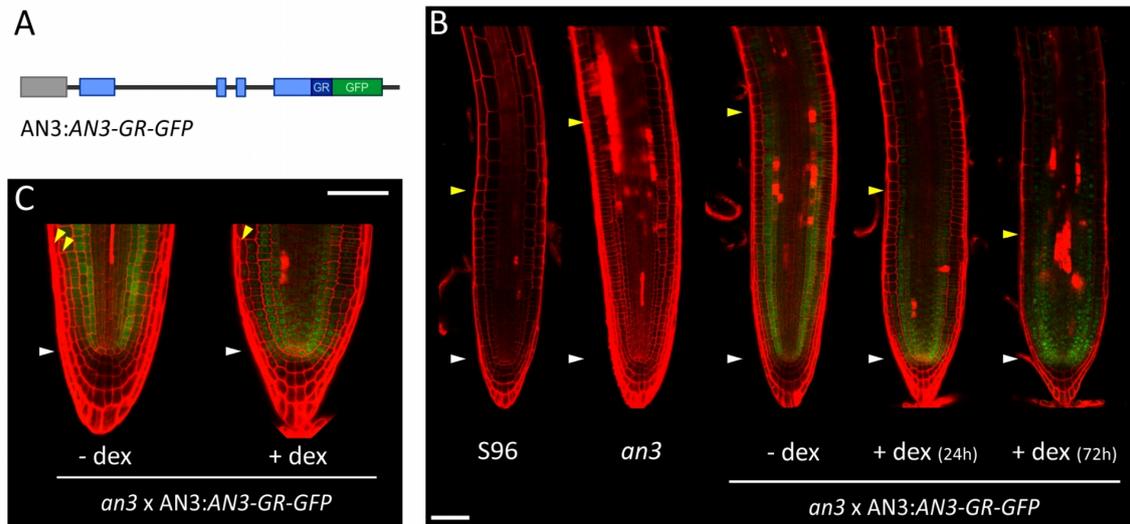
## 8.2. Resultados.

### 8.2.1. Identificación de genes regulados por *AN3* y *GRF3*.

El análisis de la función de los *GRFs* y sus cofactores *GIFs* mostraron que los mismos presentan cierta redundancia genética entre ellos, sugiriendo que funcionan a través de la formación de complejos, que podrían regular la expresión del mismo conjunto de genes. Además, los *GIFs* son capaces de interactuar con *BRM* que forma parte de los complejos de remodelación de la cromatina. Esto indica que los componentes de esta red podrían actuar independientemente uno de otro, controlando la expresión de otros genes.

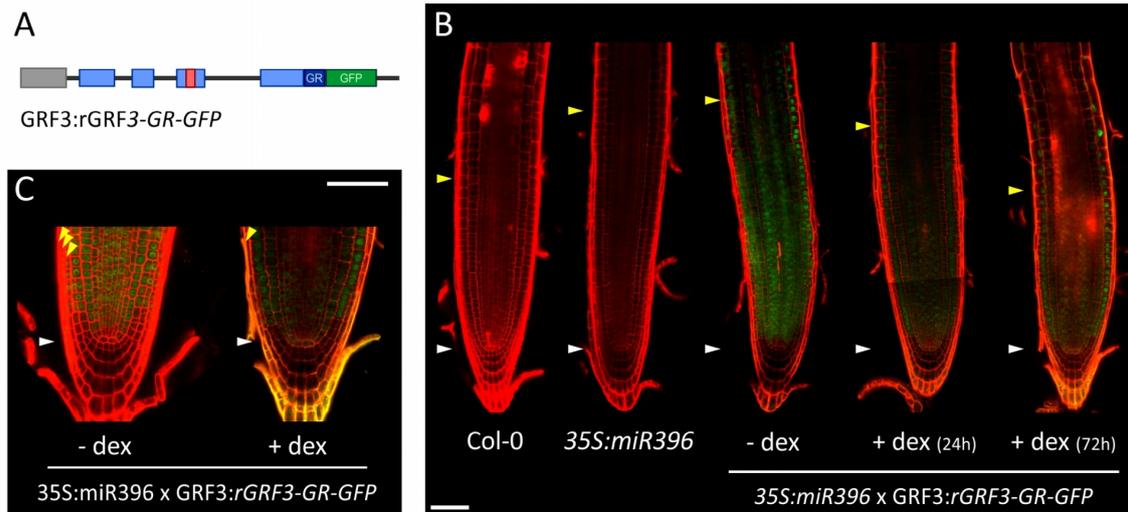
Para identificar los genes que son regulados por la red regulatoria *GRF/GIF* en raíces decidimos utilizar fusiones traduccionales de estos genes al Receptor de Glucocorticoides (*GR*). Este sistema permite controlar la actividad de proteínas nucleares mediante la adición a las plantas del glucocorticoide sintético dexametasona (*dex*) (92, 145). En ausencia de *dex* el dominio *GR* es retenido en el citoplasma por unión a chaperonas endógenas. La adición de *dex* libera las proteínas de esta retención, que resulta en la translocación de las fusiones al núcleo y la activación de las respuestas transcripcionales corriente abajo. De esta manera se pueden analizar respuestas transcripcionales en tiempos cortos, lo cual tiene varias ventajas (92). En primer lugar, se considera que las regulaciones transcripcionales directas ocurren en un lapso de unas 2 a 4 horas, mientras que las indirectas ocurren en ventanas de tiempo mayores (116). En segundo lugar, se evitan efectos secundarios debido a las alteraciones fenotípicas asociadas a los cambios constitutivos en la expresión de las proteínas en estudio.

Para *AN3* se utilizó una variante disponible en el laboratorio en la que el receptor *GR* se encuentra fusionado al extremo C-terminal de su secuencia. Esta versión además cuenta con la secuencia de la *GFP* para detectar su expresión (*AN3:AN3-GR-GFP*) (Figura R3.1A) y está bajo el control de la propia región promotora. Este vector se transformó en plantas mutantes *an3*, las cuales poseen raíces con zonas meristemáticas más largas que las plantas silvestres y en las que se verifica un aumento en el número de capas de *LRC* (Figura R2.2A). Luego, para estudiar la funcionalidad de la construcción se analizó el crecimiento de estas plantas en placas de *MS* en presencia o ausencia de 25  $\mu\text{M}$  *dex* durante 24 horas. En estas condiciones, las plantas transgénicas crecidas con *dex* presentaron una complementación del largo de meristema (Figura R3.1C) y del número de capas de *LRC* (Figura R3.1B). Se verificó la expresión de la construcción mediante la visualización de la fluorescencia de *GFP*, observándose que la proteína de fusión se desplaza al núcleo en presencia de *dex* (Figura R3.1B, C).



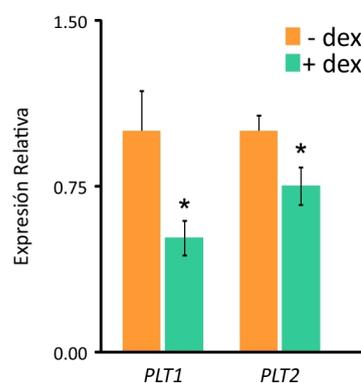
**Figura R3.1. Desarrollo de un sistema dual, inducible y reportero de AN3.** (A) Esquema de la fusión del Receptor de Glucocorticoides (GR) y GFP al extremo C-terminal de AN3; AN3:AN3-GR-GFP. (B) Reducción del número de capas de LRC en *an3* x AN3-GR-GFP luego del tratamiento con 25  $\mu$ M dex durante 24 h (+ dex) en comparación con la misma línea en ausencia de dex (- dex). Las puntas de flecha amarillas marcan las capas de LRC, la punta de flecha blanca marca la posición del CQ. (C) Arquitectura de la punta de la raíz siete DPS de las plantas silvestres (S96), *an3*, y *an3* x AN3-GR-GFP en ausencia (-dex) o presencia de dex (25  $\mu$ M dex durante 24 h y 5  $\mu$ M dex durante 72h). Luego del tratamiento de 24 h puede observarse la complementación del fenotipo. La inducción de 72 h causó una reducción del largo del meristema comparable a una planta que sobreexpresa AN3. Las puntas de flecha blancas marcan la posición del CQ y las puntas de flecha de color amarillo marcan el final del meristema (ZM) donde las células comienzan a alargarse. Barra de escala = 50 $\mu$ m.

Para *GRF3* se utilizó una variante donde el receptor GR se fusionó al extremo C-terminal de una versión de *GRF3* resistente a la regulación por el miR396 (*rGRF3*), que a su vez se encuentra fusionada a GFP (*GRF3:rGRF3-GFP*) (Figura R3.2A). La expresión de esta construcción es controlada por la secuencia promotora de *GRF3*. Con este vector se transformaron plantas *35S:miR396*, que al igual que las mutantes *an3*, presentaba un meristema más largo que la planta silvestre y un mayor número de capas de LRC (Figura R1.3D). El análisis de estas plantas en ausencia y presencia de 25  $\mu$ M dex durante 24 horas no mostró la complementación del fenotipo esperada (Figura R3.2C). Decidimos entonces probar con otro tratamiento, más prolongado y con menor concentración de dex, de 72 horas 5  $\mu$ M dex. Luego del mismo detectamos la complementación del largo del meristema y del número de capas de LRC (Figura R3.2B, C). Ese mismo tipo de inducción utilizando el sistema AN3-GR-GFP produjo un fenotipo de meristema más corto en comparación con la planta silvestre (Figura R3.1B, C), lo cual habla de una ganancia de función comparable con la sobreexpresión de AN3 (Figura R2. 10A). Al igual que la construcción AN3-GR-GFP, el agregado de dex permitió la translocación de *rGRF3* al núcleo, sin embargo en el caso de *rGRF3-GR-GFP*, aún en ausencia de dex pudo detectarse una localización parcialmente nuclear (Figura R3.2B, C).



**Figura R3.2. Desarrollo de un sistema dual, inducible y reportero de *rGRF3*.** (A) Esquema de la fusión del Receptor de Glucocorticoides (GR) y GFP al extremo C-terminal de *rGRF3*, *GRF3:rGRF3-GR-GFP*. (B) Reducción del número de capas de LRC en *35S:miR396 x rGRF3-GR-GFP* luego del tratamiento con 5  $\mu$ M dex durante 72h (+ dex) en comparación con la misma línea en ausencia de dex (- dex). Las puntas de flecha amarilla marcan las capas de LRC, la punta de flecha blanca marca la posición del CQ. (C) Arquitectura de la punta de la raíz siete DPS de las plantas silvestres (Col-0), *35S:miR396*, y *35S:miR396 x rGRF3-GR-GFP* en ausencia (-dex) o presencia de dex (25  $\mu$ M dex durante 24h y 5  $\mu$ M dex durante 72h). Luego del tratamiento de 24h no se observa la complementación del fenotipo, lo cual fue sólo posible mediante una inducción de 72h. Las puntas de flecha blancas marcan la posición del CQ y las puntas de flecha de color amarillo marcan el final del meristema (ZM) donde las células comienzan a elongarse. Barra de escala = 50 $\mu$ m.

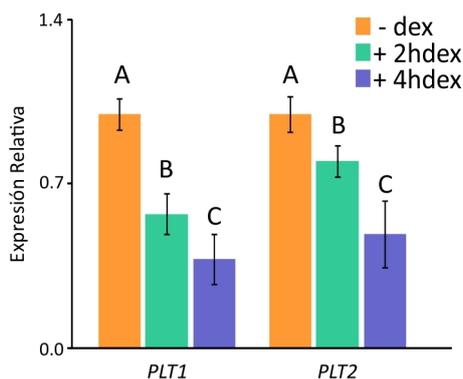
Estos resultados indicaron que las construcciones *AN3-GR-GFP* y *rGRF3-GR-GFP* eran biológicamente funcionales, por lo que decidimos evaluar por RT-qPCR la capacidad de estos sistemas inducibles de regular la expresión de los genes caracterizados en los capítulos anteriores como blanco de este sistema regulatorio. Encontramos que la expresión de *PLT1* y *PLT2* respondía de la manera esperada, disminuyendo sus niveles de manera significativa, en muestras de puntas de raíces de las plantas *rGRF3-GR-GFP*, luego de una inducción con 25  $\mu$ M dex durante dos horas (Figura R3.3).



**Figura R3.3. Disminución en los niveles de expresión de genes *PLTs* luego de la inducción de la actividad de *rGRF3*.** Niveles de expresión relativa de *PLT1* y *PLT2* en plantas *35S:miR396 x rGRF3-GR-GFP* estimados por RT-qPCR en muestras de puntas de raíz colectadas luego de una inducción con 25  $\mu$ M dex durante dos horas. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de

tres réplicas biológicas. El asterisco indica una diferencia significativa respecto al control (- dex) determinada a través de la prueba T- Student ( $P < 0,05$ ).

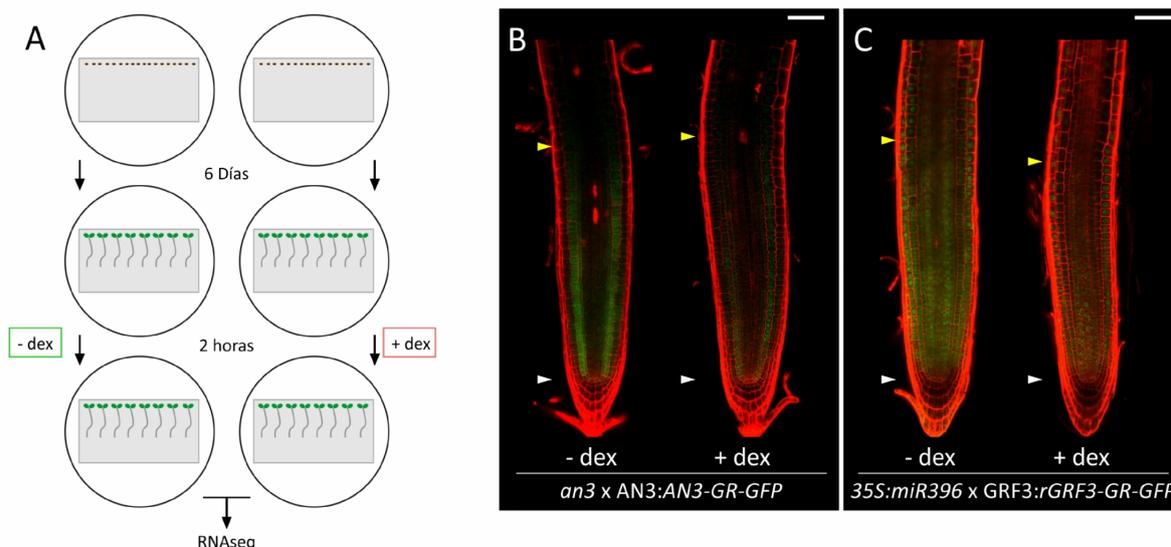
En las plantas *AN3-GR-GFP* se vio que una inducción de cuatro horas con 25  $\mu\text{M}$  dex produjo una disminución en la expresión de *PLT1* y *PLT2* significativamente más fuerte en comparación con la represión que ocurre luego de dos horas de inducción. Este resultado nos habla de una posible regulación de tipo cuantitativa por parte de este sistema sobre los genes *PLTs* (Figura R3.4).



**Figura R3.4. Disminución en los niveles de expresión de genes *PLTs* luego de la inducción de la actividad de *AN3*.** Niveles de expresión relativa de *PLT1* y *PLT2* en plantas *an3* x *AN3-GR-GFP* estimados por RT-qPCR en muestras de puntas de raíz colectadas luego de una inducción con 25  $\mu\text{M}$  dex durante dos y cuatro horas. Se graficaron los valores promedios  $\pm$  EE de tres réplicas biológicas. Letras diferentes indican diferencias significativas determinadas por ANOVA seguido de la prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ).

La complementación de los fenotipos y la respuesta a nivel de expresión de génica tras la inducción de estos sistemas nos permitieron validar la utilización de estas herramientas para analizar el transcriptoma de las plantas con niveles alterados de *GRF3* y *AN3* a través de experimentos de RNAseq.

Con la intención de analizar blancos directos de *AN3* y *GRF3* y considerando los resultados preliminares obtenidos por RT-qPCR en donde se vio respuesta de los genes candidatos luego de tiempos cortos de inducción (Figura R3.3; Figura R3.4), decidimos colectar muestras de puntas de raíces luego de un tratamiento de dos horas en ausencia y presencia de 25  $\mu\text{M}$  dex (Figura R3.5A). Este tratamiento fue suficiente para permitir la translocación al núcleo de las proteínas, sin embargo no produjo cambios fenotípicos en *an3* y *35S:miR396* (Figura R3.5B). Se generaron tres réplicas biológicas para cada condición (ausencia y presencia de dex). A continuación se llevó a cabo la extracción de ARN. Las muestras de RNA fueron luego testeadas para evaluar su calidad y por último enviadas a Alemania al servicio de genómica para la comunidad científica del EMBL "GeneCore" para la correspondiente generación de bibliotecas y secuenciación masiva.

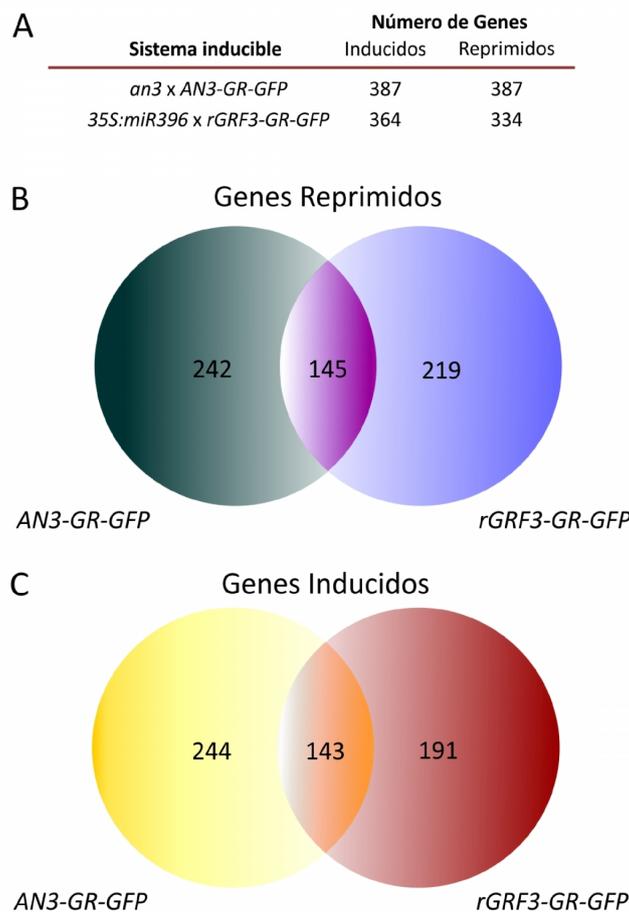


**Figura R3.5. Generación de muestras para RNAseq.** (A) Diseño experimental. Las plantas fueron crecidas seis días en placas con medio MS, y luego incubadas 2h en presencia o ausencia de 25  $\mu$ M dex. A continuación se colectaron las puntas de raíces. (B) Arquitectura de la punta de la raíz de *an3 x AN3:AN3-GR-GFP* en ausencia (-dex) o presencia de dex (25  $\mu$ M) durante 2 horas. (C) Arquitectura de la punta de la raíz de *35S:miR396 x rGRF3:GR-GFP* en ausencia (-dex) o presencia de dex (25  $\mu$ M) durante 2 horas. Las puntas de flecha blancas marcan la posición del CQ y las puntas de flecha de color amarillo marcan el final del meristema (ZM) donde las células comienzan a alargarse. Barra de escala = 50 $\mu$ m.

### 8.2.2. Análisis bioinformático de los datos obtenidos por RNAseq.

Los resultados de la secuenciación fueron analizados en el laboratorio por el Dr. Uciel Chorostecky. El análisis preliminar de los datos, mediante la herramienta FASTQC, indicó que la calidad de las bibliotecas generadas era buena, por lo que se procedió a determinar el número de secuencias que mapean contra el genoma de *Arabidopsis* y, por último, se obtuvieron los valores de expresión génica diferencial según se indica en Materiales y Métodos.

Inicialmente, se identificaron los genes cuya expresión cambió significativamente en *an3 x AN3-GR-GFP* ó en *35S:miR396 x rGRF3-GR-GFP* tras el tratamiento con dex. Se consideraron cambios de al menos un 25% en el nivel de expresión y un FDR <0,05. Encontramos 378 genes inducidos por *AN3* y 364 por *GRF3*. Además, 378 genes fueron reprimidos luego de la inducción de *AN3* y 334 por la inducción de *GRF3* (Figura R3.6A; Anexo Tablas A4-A5). Hallamos un 40% de solapamiento entre ambos sistemas tanto para los genes activados como reprimidos (Figura R3.6B, C), resultado que soporta la noción de que las dos proteínas funcionan como un complejo que regula la transcripción de un conjunto de genes. Cabe destacar, que a pesar de que las construcciones inducibles fueron introducidas en diferentes ecotipos (S96 y Col-0), la cantidad de genes que resultan co-regulados muestra la robustez de la interacción GRF/GIF. Los genes que no aparecen en esta intersección pueden dar cuenta de las funciones que los GIFs y los GRFs desempeñan de manera independiente.



**Figura R3.6. Resultados globales de los experimentos de Transcriptómica.** (A) Número de genes con cambios de expresión significativos en *an3* x *AN3-GR-GFP* y *35S:miR396* x *rGRF3-GR-GFP* tras el tratamiento con dex. (B) y (C) Diagrama que muestra el número de genes reprimidos (A) e inducidos (B) que cambian su expresión de manera significativa en las plantas *an3* x *AN3-GR-GFP* y en *35S:miR396* x *rGRF3-GR-GFP*.

En capítulos anteriores de esta tesis, describimos la función de los *GRFs* actuando junto con los *GIFs* para reprimir la expresión de genes específicos de SCN en las células en activa proliferación celular. Sobre la base de estos resultados, decidimos comenzar el análisis de los datos del RNAseq en búsqueda de genes que respondan a esta función. Como las versiones inducibles *AN3-GR-GFP* y *rGRF3-GR-GFP* fueron introducidas en plantas *an3* y *35S:miR396* respectivamente, era de esperar que los genes de SCN se vieran reprimidos luego del tratamiento con dex en una proporción significativamente más fuerte de lo que sucedería con esos sistemas inducibles en el contexto de una planta silvestre. Al evaluar la lista de genes reprimidos por *AN3* y *GRF3* en búsqueda de genes que se expresan en el SCN (Tabla R3.1) (120), encontramos de manera esperable a *PLT1*. En la lista también aparece *GLV6/RGF8*, un gen que codifica para un pequeño péptido regulatorio que pertenece a la familia de péptidos *GOLVEN/ROOT GROWTH FACTOR/CLE-Like (GLV/RGF/CLEL)*, que se ha visto que es requerida para el mantenimiento del SCN y la proliferación celular en las TACS (82).

AGI	Anotación
AT1G62500	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
<b>AT2G03830</b>	<b>GLV6, RGF8</b>
AT1G12860	ICE2, SCRM2, basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT3G53450	LOG4, Putative lysine decarboxylase family protein
AT1G35610	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT3G22120	CWLP, cell wall-plasma membrane linker protein
AT3G50190	Plant protein of unknown function (DUF247)
AT2G29330	TRI, tropinone reductase
AT2G32440	ATKAO2, CYP88A4, KAO2, ent-kaurenoic acid hydroxylase 2
<b>AT3G20840</b>	<b>PLT1, Integrase-type DNA-binding superfamily protein</b>
AT3G26120	TEL1, terminal EAR1-like 1
AT4G39950	CYP79B2, cytochrome P450, family 79, subfamily B, polypeptide 2
AT5G56790	Protein kinase superfamily protein
AT3G50620	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT5G25900	ATKO1, CYP701A3, GA3, GA requiring 3

**Tabla R3.1. Genes que se expresan en SCN y son reprimidos por AN3 y GRF3.**

De la familia de genes *PLTs* reprimidos por *AN3* y *GRF3*, encontramos además de *PLT1* a *PLT2*. Los otros miembros de la familia, *PLT3* y *BBM*, no resultaron afectados tal como se había visto en los datos de transcriptómica de puntas de raíces *35S:miR396* (Figura R1.15C). Teniendo en cuenta que los cambios de expresión detectados para *PLT1* y *PLT2* se producen luego de una breve inducción de dos horas en ambas líneas, podríamos pensar en una regulación de tipo directa del sistema GRF/GIF sobre *PLT1* y *PLT2*, mientras que para *PLT3* y *BBM*, podríamos pensar en una regulación indirecta que ocurre probablemente a tiempos mayores de inducción o en líneas estables sobreexpresantes del *miR396*.

Además de *GLV6*, se vieron reprimidos *GLV3* y *GLV9*, pertenecientes a la misma familia de péptidos de señalización que *GLV6*. Aparecen también genes como *SBT1.3* (AT5G51750) y *RGI5* (AT1G34110) que codifican para una enzima involucrada en la maduración del péptido y para uno de sus receptores, respectivamente. Estos resultados nos indicaron que el complejo GRF/GIF afecta de manera global la vía de señalización de los *GLV*.

A continuación, nos enfocamos en los genes regulados positivamente por el sistema GRF/GIF. Considerando la extensa caracterización de este sistema como estimulador de la proliferación, era de esperar que la mayoría de los genes regulados positivamente se encontraran involucrados en el control de la progresión del ciclo celular, por lo que decidimos en primer lugar analizar la intersección de la lista de genes regulados positivamente por ambos sistemas inducibles con una lista de genes específicos de mitosis (MSG del inglés "Mitosis Specific Genes") (108). Llamativamente ninguno de los MSG se encontraba inducido por el complejo GRF/GIF. Resultados similares fueron encontrados cuando se analizaron datos de transcriptómica en muestras de ápice de vástagos de plantas *rGRF3* y

35S:AN3 (Tesis Dr. Juan Manuel Debernardi). En el capítulo 1 de esta Tesis, vimos que estos genes aparecen regulados negativamente en las muestras de puntas de raíz de plantas 35S:miR396, sugiriendo que el efecto de los *GRF* y *GIF* sobre la expresión de los genes involucrados en el ciclo celular puede ser indirecta.

Decidimos a continuación explorar la lista de genes inducidos en búsqueda de categorías de Ontología Génica enriquecidas. Al analizar la lista, encontramos un enriquecimiento significativo en numerosas categorías (Anexo Tabla 6), particularmente fue interesante la aparición de categorías relacionadas con regulación de procesos biológicos, dentro de la cual se encuentran los procesos de desarrollo y metabólicos, como así también en aquellas que indican la participación del complejo en la regulación de la expresión génica (Tabla R3.2).

Descriptor	Descripción	p-value
GO:0065007	biological regulation	1.30E-07
GO:0009987	cellular process	3.80E-05
GO:0050789	regulation of biological process	1.80E-06
GO:0032502	developmental process	0.0018
GO:0048856	anatomical structure development	0.0028
GO:0048731	system development	0.00073
GO:0048513	organ development	0.00073
GO:0022621	shoot system development	0.0011
GO:0048367	shoot development	0.0011
GO:0048366	leaf development	0.0022
GO:0010468	regulation of gene expression	0.0019
GO:0006350	transcription	0.0028
GO:0032774	RNA biosynthetic process	0.0028
GO:0051252	regulation of RNA metabolic process	0.00082
GO:0006351	transcription, DNA-dependent	0.0028
GO:0045449	regulation of transcription	0.00076
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-dependent	0.00075
GO:0008152	metabolic process	0.00017
GO:0019222	regulation of metabolic process	1.60E-05
GO:0044238	primary metabolic process	0.0022
GO:0080090	regulation of primary metabolic process	0.0001
GO:0044237	cellular metabolic process	0.00021
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	0.00035
GO:0060255	regulation of macromolecule metabolic process	0.00036

**Tabla R3.2. Categorías de Ontología Génica relacionadas con la regulación de la expresión génica y procesos de desarrollo enriquecidas en la tabla de genes inducidos por AN3 y GRF3.**

Tomados en conjunto, el análisis de las categorías de ontología génica enriquecidas sugieren un rol para *AN3* y *GRF3* en la regulación de procesos generales que mantienen una alta tasa metabólica en células que se dividen activamente.

El análisis de la lista de los genes inducidos reveló la inducción de dos *GRFs*, el *GRF5* y el *GRF6*. Incluso si se considera un cambio de expresión ligeramente menor al 25% *GRF3* también resultaría inducido por ambos sistemas. En trabajos anteriores se ha visto que la inducción de *AN3* en las primeras hojas en desarrollo conduce a un aumento en la expresión de *GRF3*, *GRF5* y *GRF6* entre otros (32). Además existe evidencia de que *AN3* interacciona en forma directa con *GRF3* y *GRF5* derivada de experimentos de doble híbrido y co-inmunoprecipitación (25, 32). Considerando estos resultados, podríamos sugerir que no sólo en parte aérea sino también en raíces los complejos *AN3/GRF* estarían activando su propia transcripción.

### **8.2.3. Patrón de expresión de los genes que responden a la regulación por *AN3* y *GRF3*.**

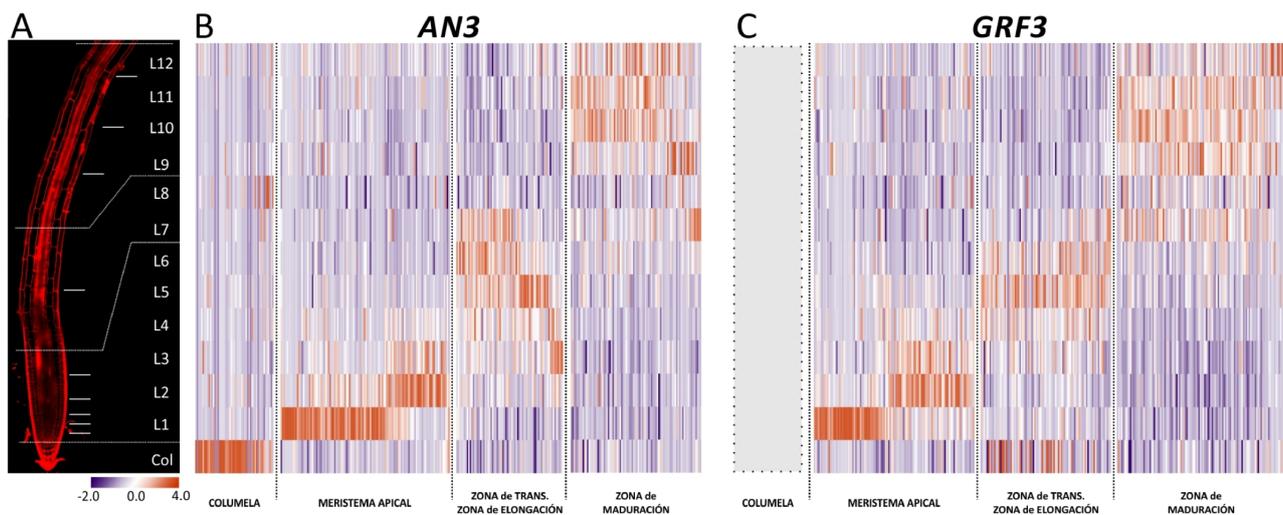
El patrón de expresión de *AN3* puede describirse como un gradiente, donde el máximo de expresión se encuentra en el CQ y las SC y luego cae gradualmente a lo largo del meristema, siendo detectable inclusive en la zona madura (Figura R2.3). El *GRF3* se expresa en la zona de activa proliferación celular, por encima del SCN, donde sería capaz de interactuar con *AN3* para formar un complejo. Como hemos descrito en los capítulos anteriores la actividad de este complejo es necesaria para regular la expresión de numerosos genes que contribuyen a definir los límites de las diferentes zonas de desarrollo a lo largo del eje longitudinal de la raíz.

Como la formación del complejo *AN3/GRF3* se da gracias a la superposición de los gradientes de expresión de ambas proteínas, nos preguntamos si sus genes blanco se expresaban en zonas específicas de la raíz. En primer lugar, mapeamos el patrón de expresión de los genes regulados por *AN3* y *GRF3* haciendo uso de la base de datos RootMap (104). Esto nos permite obtener una perspectiva de la expresión de estos genes a lo largo del eje longitudinal de la raíz. A continuación, considerando los picos máximos de expresión de cada uno de los genes, pudimos clasificarlos en diferentes grupos (Figura R3.7 y 8) que nos permiten especular sobre las funciones biológicas relacionadas con cada una de las zonas de desarrollo. De esta manera generamos cuatro grupos de genes con picos de expresión en Columela (Col); Meristema Apical (L1-L3) donde L1 corresponde al CQ y el SCN, y L2-L3 a las células en activa proliferación; Zona de Transición y Zona de Elongación (L4-L8) donde las células gradualmente dejan de proliferar para comenzar a elongarse; y por último la Zona de Maduración (L9-L12) donde las células adquieren su identidad y tamaño final (Figura R3.7 y 8).

En el caso de los genes regulados negativamente, puede verse en primer lugar, que aparece un grupo de genes reprimidos por *AN3* en la columela (Col) (53 genes de un total de 327), que no fueron detectado para el caso de los genes regulados por *GRF3* (Figura R3.7). Una inspección detallada mostró que la proteína *AN3* puede ser detectada en las SC de columela (Figura R2.5E), de modo que se podría pensar que la regulación de la expresión de genes en la Col se da en este grupo de células donde *AN3* se expresa.

En segundo lugar, aparece el grupo de genes que presentan un pico de expresión en el meristema apical, en donde se encuentra el 50% de genes co-reprimidos por *AN3* y *GRF3*. Como era de esperar en este grupo se incluyen *PLT1*, *PLT2*, *GLV3*, *GLV6* y *GLV9*, es decir los genes que se expresan específicamente en el SCN y que son reprimidos por el complejo GRF/GIF en las células en activa proliferación.

Por último, resulta interesante destacar que el solapamiento entre ambos sistemas en los grupos de genes correspondientes a zona de transición y zona de elongación como así también de la Zona de Maduración es mucho menor indicando que en estas zonas *AN3* y *GRF3* pueden estar cumpliendo funciones independientes.



**Figura R3.7. Patrón de expresión a lo largo del eje longitudinal de la raíz de los genes regulados negativamente por *AN3* o *GRF3*.** (A) Raíz de Col-0 mostrando las diferentes zonas de desarrollo. Las líneas horizontales marcan las secciones ("Layers" L1 a L12) definidas según el Root Gene Expression Atlas (104). (B) y (C) Perfiles de expresión (z-score) de genes (eje X) reprimidos en los sistemas inducibles *AN3-GR-GFP* (B) y *rGRF3-GR-GFP* (C) según la base de datos de Root Map (104).

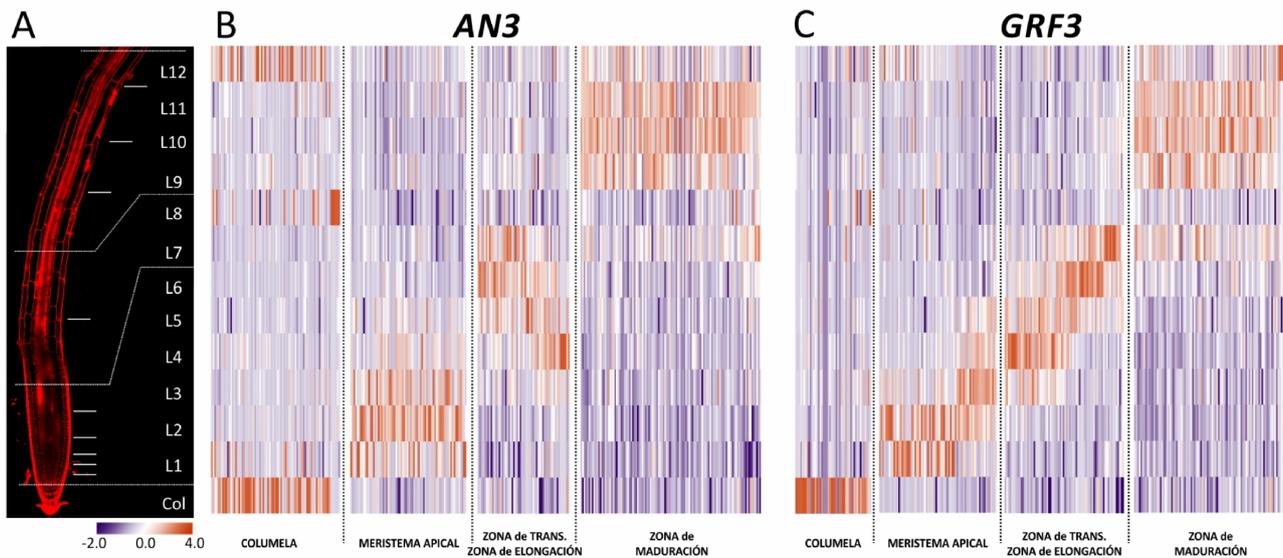
La distribución de genes regulados en diferentes grupos, de acuerdo a su patrón de expresión, permitió encontrar dentro de los genes regulados exclusivamente por *AN3* un enriquecimiento de categorías de Ontología Génica relacionadas con la síntesis y la organización de la pared celular (Figura R3.7; Tabla R3.3) en la Zona de Transición y Zona de Elongación. Sobre la base de estos resultados, una inspección más detallada de la mutante *an3* al nivel de la zona de elongación indicó que la misma era de mayor longitud en comparación con la planta silvestre (datos no mostrados),

resultado que junto con el aumento del largo de células de la corteza en la zona madura (Figura R2.2C) justifica el incremento en la velocidad de crecimiento de la raíz primaria de esta mutante. El aumento de la expresión de genes relacionados con la síntesis de pared celular podría dar cuenta del aumento en el tamaño de las células en estas zonas en la raíz de *an3*.

Descriptor	Descripción	p-value
<b>GO:0042545</b>	<b>cell wall modification</b>	<b>5.50E-06</b>
<b>GO:0071555</b>	<b>cell wall organization</b>	<b>1.20E-05</b>
<b>GO:0071554</b>	<b>cell wall organization or biogenesis</b>	<b>0.00027</b>
<b>GO:0008152</b>	<b>metabolic process</b>	<b>0.00051</b>
GO:0016051	carbohydrate biosynthetic process	0.00054
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	0.00043
GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	0.00095
<b>GO:0044042</b>	<b>glucan metabolic process</b>	<b>0.001</b>
<b>GO:0000902</b>	<b>cell morphogenesis</b>	<b>0.0013</b>
GO:0046527	glucosyltransferase activity	6.00E-06
GO:0003824	catalytic activity	6.00E-06
GO:0016758	transferase activity, transferring hexosyl groups	7.20E-05
GO:0016757	transferase activity, transferring glycosyl groups	0.00063

**Tabla R3.3** Categorías de ontología génica enriquecidas en la lista de genes reprimidos sólo por AN3 que se expresan en la Zona de Transición y de Elongación.

Los genes regulados positivamente por los sistemas *AN3* y *GRF3* presentaron un patrón de expresión a lo largo del eje longitudinal de la raíz muy similar. *AN3* y *GRF3* co-regulan aproximadamente la misma cantidad de genes en cada una de los grupos descriptos. Particularmente se encontró a *GRF3* activando la expresión de genes que se expresan en la Columela, resultado que podría explicarse en base a la expansión de la expresión de *rGRF3* hacia el SCN debido a la incapacidad de ser regulado post-transcripcionalmente por el miR396. *AN3* reprime y activa genes en esta sección, lo cual puede verse relacionado con el hecho de que la columela incluye tanto células que proliferan como así también células diferenciadas.



**Figura R3.8. Patrón de expresión a lo largo del eje longitudinal de la raíz de los genes inducidos por AN3 o GRF3. (A)** Raíz de Col-0 mostrando las diferentes zonas de desarrollo. Las líneas horizontales marcan las secciones ("Layers" L1 a L12) definidas según el Root Gene Expression Atlas (104). **(B) y (C)** Perfiles de expresión (z-score) de genes (eje X) inducidos en los sistemas inducibles AN3-GR-GFP **(B)** y rGRF3-GR-GFP **(C)** según la base de datos de Root Map (104).

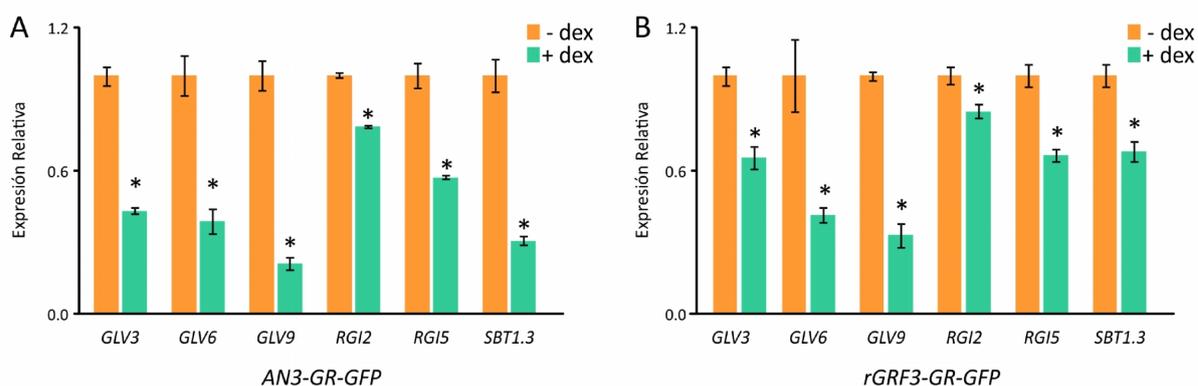
#### 8.2.4. Identificación de un mecanismo de regulación de los genes *PLT* por GRF/GIF.

Dentro de los genes reprimidos en forma conjunta por *AN3* y *GRF3* se encuentran los que codifican por las hormonas peptídicas de la familia *GOLVEN/ROOT GROWTH FACTORS/CLE-Like* (*GLV/RGF/CLEL*), algunos de los cuales que actúan de manera redundante como reguladores del mantenimiento del RAM en Arabidopsis (146).

Esta familia está constituida por 11 genes que codifican para un precursor polipeptídico que debe ser procesado post-transcripcionalmente antes de ser activo. El precursor polipeptídico consiste en una región central variable que conecta dos regiones conservadas: un dominio N-terminal que codifica para el péptido señal que dirige al precursor hacia el sistema de endomembranas para su posterior secreción y un dominio C-terminal, conocido como el motivo GLV, que codifica para el péptido maduro activo. En los pasos de procesamiento proteolítico participan enzimas del tipo subtilisina-serin proteasas, también conocidas como subtilasas, que liberan al péptido maduro (147). En el sistema endomembrana el precursor polipeptídico no sólo es clivado sino que también sufre modificaciones químicas de sulfatación en un residuo de tirosina del dominio C-terminal (82, 146). Por último el péptido activo es secretado al apoplasto y es censado por receptores de la superficie celular pertenecientes a la categoría de receptores tipo quinasas ricos en repeticiones de leucina (LRR) (RLKs; LRR-RLKs) (148).

De los 11 miembros de esta familia, *GLV3* (AT3G30350), *GLV6* (AT2G03830) y *GLV9* (AT5G15725) son regulados negativamente por el complejo GRF/GIF (Figura R3.9). Se ha visto que *GLV3* y *GLV9* se expresan en las TACs justo por encima del CQ, mientras *GLV6* se expresa tanto en las

TACs como en el CQ y la columela (146). Considerando que la actividad de estos péptidos puede verse regulada no sólo a nivel transcripcional sino también a nivel post-transcripcional en los diferentes pasos de procesamiento del precursor polipeptídico y el censado del péptido maduro, decidimos analizar la lista de genes reprimidos en búsqueda de genes relacionados. En primer lugar vimos que de las 56 subtilasas que codifica el genoma de Arabidopsis solamente la expresión de la *SUBTILASA 1.3 (SBT1.3)*(AT5G51750) se ve regulada en forma conjunta por AN3 y GRF3 (Figura R3.9). Si bien hasta el momento solamente se sabe que las *SUBTILASAS 6.1/2* participan en el procesamiento del precursor polipeptídico de los GLVs (147), aún no se conoce la totalidad de los blancos de estas enzimas, por lo que puede que la *SBT1.3* esté también implicada en la maduración de los *GLVs*. Por último, encontramos que nuestro sistema regula negativamente uno de los receptores a través de los cuales los GLVs ejercen su función, *RGF1 INSENSITIVE 5 (RGI5)* (AT1G34110) (148). Incluso observamos un cambio de expresión ligeramente menor al 25% de otro receptor de la misma familia, *RGF1 INSENSITIVE 2 (RGI2)* (AT5G48940) (148) (Figura R3.9).

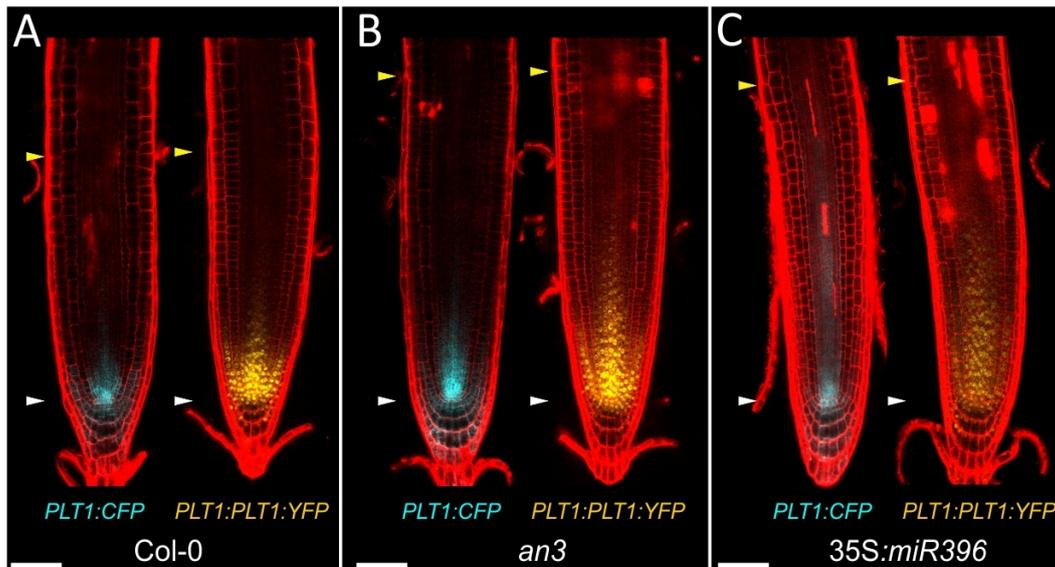


**Figura R3.9. La actividad de los péptidos de la familia GLV se encuentra regulada a diferentes niveles por el sistema GRF/GIF.** Niveles de expresión de *GLV3*, *GLV6*, *GLV9*, *RGI2*, *RGI5*, *SBT1.3* en meristemas de plantas *an3* x *AN3-GR-GFP* y *35S:miR396* x *rGRF3-GR-GFP* según lo estimado a partir de los valores de cuentas por millón (cpm) correspondientes al RNAseq. Se graficaron los valores medios  $\pm$  error estándar de tres réplicas biológicas.

Se ha visto que las mutantes múltiples de los genes de esta familia de péptidos presentan raíces más cortas caracterizadas por zonas meristemáticas con un menor número de células (146). De forma opuesta, la sobreexpresión de los mismos o el agregado exógeno de péptidos sintéticos genera un aumento del largo de la zona meristemática (146). Se ha propuesto que los *GLVs* participan en el mantenimiento del RAM regulando positivamente la expresión de los genes *PLT1* y *PLT2*. Se ha planteado que esta regulación es mayormente a nivel post-transcripcional, promoviendo la estabilidad de la proteína (82).

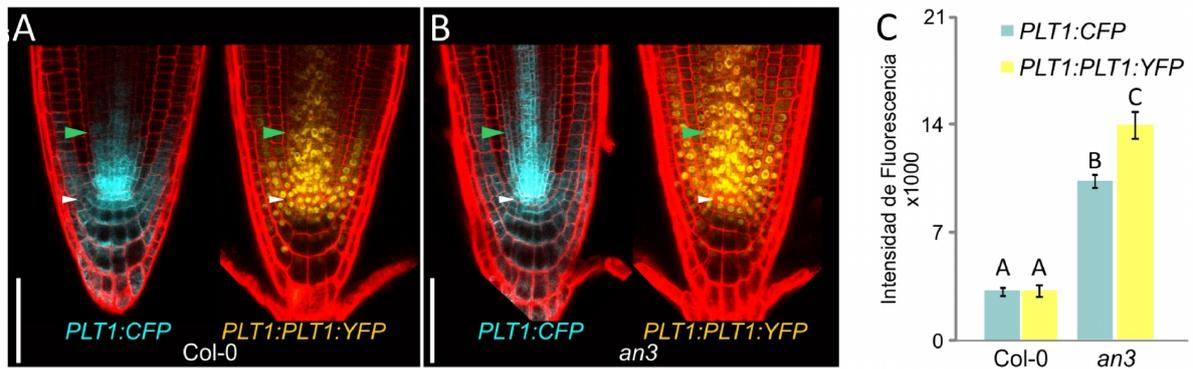
Considerando que el complejo GRF/GIF reprime la expresión de los genes *PLTs* a nivel transcripcional y que además regula la expresión, el procesamiento y el censado de los péptidos *GLVs* que afectan la estabilidad proteica de *PLT*, hipotetizamos que en la mutante *an3* y en la

sobreexpresante del miR396 el patrón de expresión de los *PLTs* se ve extendido por dos razones. En primer lugar la falta de represión transcripcional por GRF/GIF expandiendo la actividad de los promotores de los genes *PLTs* y, en segundo lugar la regulación post-transcripcional que aumenta la estabilidad de las correspondientes proteínas. Al comparar entonces el patrón de expresión de la fusión transcripcional *PLT1:CFP* con el patrón de expresión de la fusión traduccional *PLT1:PLT1:YFP* en las plantas *an3* y *35S:miR396* (Figura R3.10), encontramos que la proteína PLT1 estaba expandida en mayor medida que la actividad del promotor.



**Figura R3.10. Comparación de los patrones de expresión de los reporteros *PLT1:CFP* y *PLT1:PLT1:YFP*.** (A), (B) y (C) Patrón de expresión de la fusión transcripcional *PLT1:CFP* en plantas silvestres (Col-0)(A), *an3* (B) y *35S:miR396* (C) comparado con el patrón de expresión de la proteína fusionada a YFP. Puede notarse que tanto el patrón de transcripción de *PLT1* como el patrón de expresión de la proteína *PLT1* se encuentran expandidos en las plantas *an3* y *35S:miR396* aunque no en la misma proporción. Las puntas de flecha blancas marcan la posición del CQ y las puntas de flecha de color amarillo marcan el final del meristema (ZM) donde las células comienzan a alargarse. Barra de escala = 50µm.

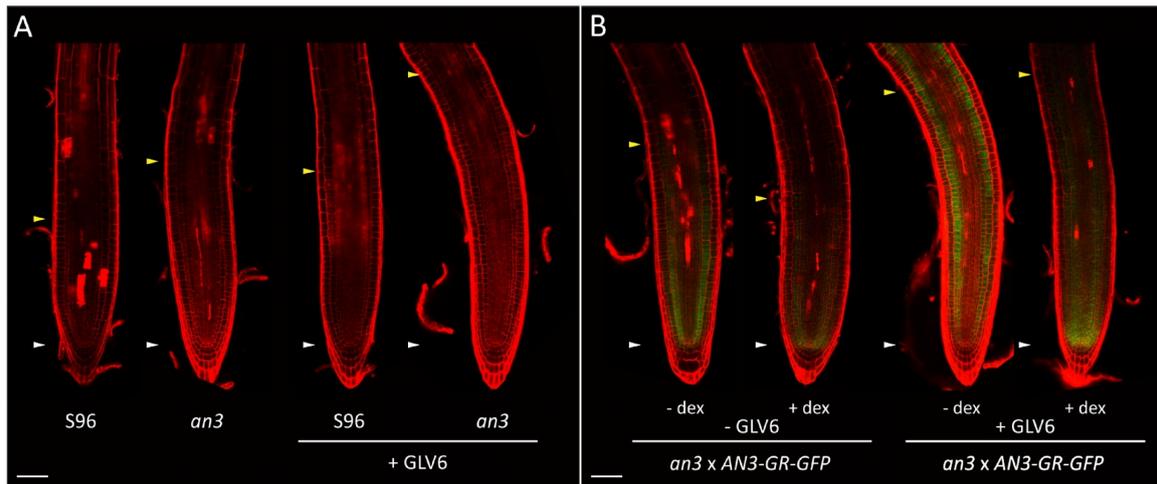
Cuantificamos la expresión de los reporteros *PLT1:CFP* y *PLT1:PLT1:YFP* en las mutantes *an3* en el CQ y a unas 100 µm hacia arriba (Figura R3.11A,B). Estas medidas nos indicaron que la expansión de la expresión de la fusión traduccional era significativamente mayor de lo que podría ser explicado por la expansión del patrón de actividad del promotor evaluado a partir de la fusión transcripcional, diferencia que indica que existe una estabilización de la proteína *PLT1* en la mutante *an3*, quizás por una mayor acumulación de los péptidos GLV en esta mutante.



**Figura R3.11.** La expansión de la actividad del promotor de *PLT1* no explica el grado de expansión del patrón de expresión de la proteína *PLT1* en las mutantes *an3*. (A) y (B) Puntas de raíces silvestres (Col-0) (A) y *an3* (B) expresando los reporteros transcripcional y traduccional de *PLT1*. (C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los reporteros *PLT1:CFP* y *PLT1:PLT1:YFP* en una región a 100µm del CQ en plantas silvestres (Col-0) y *an3*. Letras diferentes indican diferencias significativas determinadas por ANOVA seguido de la prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). Las puntas de flecha blancas marcan la posición del CQ y las puntas de flecha de color verde marcan la posición en la que se realizó la cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Barra de escala = 50µm.

Para confirmar la relación entre *AN3* y los péptidos GLV, realizamos tratamientos con el péptido agregado al medio de cultivo. Encontramos que la aplicación exógena del péptido sintético GLV6 produce el aumento del largo del meristema de las plantas salvajes (S96) e incluso tiene el mismo efecto sobre las mutantes *an3*, resultando en un meristema aún mayor que la mutante crecida en ausencia de péptido (Figura R3.12A).

En segundo lugar, observamos que la aplicación del péptido anuló por completo la complementación del fenotipo de la mutante *an3* por la inducción de *AN3* en plantas *an3* x *AN3-GR-GFP*. (Figura R3.12B). Estos fenotipos apoyan la noción de que *AN3* reprime la expresión de los genes que codifican por los GLVs.



**Figura R3.12. GLV6 actúa corriente abajo de AN3 en el control del tamaño del meristema.** (A) Arquitectura de la punta de la raíz siete DPS de las plantas silvestres (S96), *an3* en ausencia o presencia de GLV6 (50  $\mu$ M durante 24h). Luego del tratamiento puede observarse el aumento del largo de la zona meristemática tanto en la planta silvestre como en la mutante. (B) Arquitectura de la punta de la raíz siete DPS de las plantas *an3* x *AN3-GR-GFP* en ausencia (-dex) y presencia de dex (25  $\mu$ M dex durante 24h) combinado con la ausencia o presencia del péptido GLV6. Luego del tratamiento de 24 h sólo con dex se observa la complementación del fenotipo, mientras que el agregado del péptido anula el efecto de la dex. En (A) y (B) las puntas de flecha blancas marcan la posición del CQ y las puntas de flecha de color amarillo marcan el final del meristema (ZM) donde las células comienzan a alargarse. Barra de escala = 50 $\mu$ m.

### 8.3. Discusión.

#### 8.3.1. Análisis genómico de la red regulatoria de AN3 y GRF3 en raíces.

Los factores de transcripción de la familia *GRFs* y los cofactores *GIFs* se expresan en el meristema apical de la raíz. Tal como se describió en los primeros capítulos, estos reguladores controlan la expresión de genes involucrados en el establecimiento de las diferentes zonas de desarrollo a lo largo del eje longitudinal de la raíz. Con el objetivo de dilucidar la red transcripcional regulada por los *GRFs* y *GIFs* decidimos generar las líneas *an3* x *AN3-GR-GFP* y *35S:miR396* x *rGRF3-GR-GFP* que permiten inducir de manera controlada a *AN3* y *GRF3* respectivamente.

La evaluación de ambos sistemas indicó que luego del tratamiento con el inductor, las proteínas *AN3* y *GRF3* fusionadas al receptor de glucocorticoides eran capaces de migrar al núcleo y complementar los fenotipos de las plantas *an3* y *35S:miR396* respectivamente. Además, la evaluación por RT-qPCR de la respuesta de genes blanco del sistema mostró que estas construcciones son capaces de regular la expresión génica en tiempos cortos de dos horas. Estos resultados indicaron que ambos sistemas eran adecuados para ser utilizados en experimentos de transcriptómica.

Los experimentos de RNAseq permitieron identificar redes regulatorias que se encuentran bajo el control del sistema GRF/GIF en raíces. Llamativamente, al analizar la intersección de las listas de

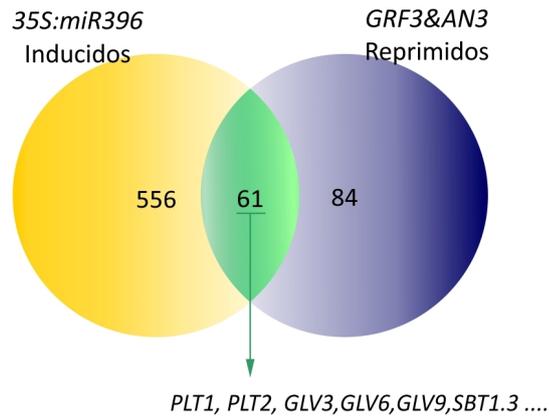
genes que responden a *AN3* y *GRF3* en raíces con listas generadas por el análisis de transcriptómica de ápices vegetativos de plantas *rGRF3* x *35S:AN3* o *35S:miR396* (25) no hubo mayor solapamiento.

Este resultado nos indica que el sistema GRF/GIF se encuentra desempeñando funciones diferentes en la raíz y en la parte aérea de la planta, y puede dar cuenta de los fenotipos opuestos que se encontraron en estos órganos al analizar la función de esta red regulatoria. Como se vio en capítulos anteriores de resultados de esta tesis, las plantas *35S:miR396* y las mutantes *an3* presentan un RAM de mayor tamaño en comparación con una planta silvestre, sin embargo se había visto previamente que en estas plantas el tamaño del SAM se encuentra disminuido (54, 56). De la misma manera, la sobreexpresión del miR396 en plantas *an3* produce pérdida del meristema apical, sin embargo el CQ y el SCN de estas plantas permanece comparable al de una planta silvestre.

### **8.3.2. El sistema miR396/GRF/GIF junto con las hormonas peptídicas de la familia GLVs regulan el patrón de expresión de los genes PLTs y determinan los límites de las diferentes zonas de desarrollo de la raíz.**

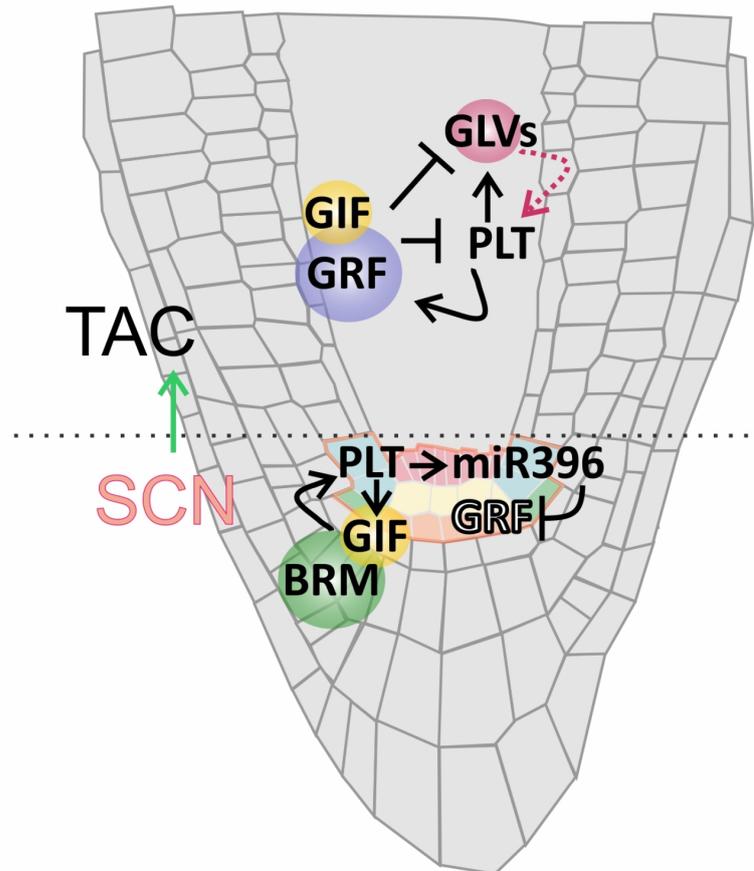
Los experimentos de RNAseq fueron realizados sobre muestras puntas de raíces de plantas luego de un tratamiento de dos horas con dex. La elección del tiempo de tratamiento se basó en resultados previos, que mostraban que los sistemas inducibles eran capaces de regular la expresión de genes a estos tiempos y en la posibilidad de que al hacer tratamientos cortos se pudieran encontrar genes regulados a nivel transcripcional por la acción directa del sistema GRF/GIF sobre sus secuencias regulatorias.

Realizamos la comparación de las listas de genes obtenidas por los experimentos de transcriptómica en raíces de plantas *35S:miR396* (149) y los sistemas inducibles *AN3-GR-GFP* y *rGRF3-GR-GFP* utilizados en esta tesis, con la intención de identificar genes cuya expresión responda a los niveles de *AN3* y *GRF3*. En la intersección de la lista de genes cuya expresión se ve aumentada en las plantas *35S:miR396* y disminuida en ambas líneas inducibles, se obtuvieron 61 genes (Figura R3.13). Dentro de los genes que se encuentran en esta intersección encontramos a los genes *PLT1* y *PLT2*, los genes que codifican a los péptidos regulatorios (*GLV3*, *GLV6*, *GLV9*) como así también a las enzimas que participan en su procesamiento (*SBT1.3*) y los receptores que los censan (*RGI2*, *RGI5*) (Figura R3.13). Esto indica que estos genes serían candidatos a ser regulados de manera directa por el sistema GRF/GIF.



**Figura R3.13. Búsqueda de genes regulados a nivel transcripcional de forma directa por el complejo GRF/GIF. (A)** Diagrama que representa el solapamiento entre las listas de genes inducidos en muestras de puntas de raíces *35S:miR396* y reprimidos en las muestras de raíces *an3 x AN3-GR-GFP* y *35S:miR396 x rGRF3-GR-GFP* luego de dos horas de inducción con dex. Los 61 genes en esta intersección serían putativos blancos de regulación directa por AN3 y GRF3.

Un trabajo reciente ha mostrado que PLT2 se une directamente a secuencias regulatorias en *AN3*, *GRF2* y *GLV6* para inducir su expresión en las células en activa proliferación celular (130). Con estos componentes proponemos la participación del sistema miR396/GRFs/GIFs, las hormonas peptídicas de la familia GLV y los genes *PLT* en una red regulatoria de retroalimentación que terminaría por definir las diferentes zonas de desarrollo a lo largo del eje longitudinal de la raíz (Figura R3.14). En esta red regulatoria PLT activaría al complejo GRF/GIF en las TACs, a continuación el complejo GRF/GIF contribuiría a dar forma al gradiente de expresión de los genes *PLTs* en dos niveles; en primer lugar a través de la regulación negativa de la transcripción de los genes *PLTs* y; en segundo lugar de forma indirecta impedirían la estabilización de la proteínas PLTs al disminuir los niveles activos de los péptidos GLVs, junto con las enzimas que los procesan y los receptores que los censan (Figura R3.14).



**Figura R3.14.** Red regulatoria identificada entre miR396/GRFs/GIFs, los péptidos GLVs, y los genes *PLT* que contribuye a definir las diferentes zonas de desarrollo a lo largo del eje longitudinal de la raíz. La línea punteada que une a los GLVs con *PLT* se refiere a la estabilización proteica de *PLT* por acción de los mismos. El SCN, se encuentra delineado en Rosa.

Teniendo en cuenta la respuesta rápida de los genes *PLTs* y *GLVs* luego de la inducción de *AN3* y *GRF3*, los mismos podrían ser blancos directos de este sistema. De acuerdo con esta hipótesis, los datos del Cistroma de *Arabidopsis* generados a partir de hojas jóvenes (150), muestran sitios de unión de un GRF a posibles secuencias regulatorias sobre el promotor de *PLT1* y en el tercer intrón de *GLV6*.

Si consideramos que *AN3* es capaz de interactuar, además de con los GRFs, con otras proteínas, incluyendo componentes de la maquinaria de remodelación de la cromatina y variados factores de transcripción (25, 32) una hipótesis posible es que *GRF3* se una a un subgrupo de los sitios a los que se une *AN3*. En ese caso, sería interesante estudiar los genes blanco de regulación transcripcional directa por *AN3* en plantas con deficiencias en los GRFs. También, sería interesante evaluar la posibilidad de que *AN3* pueda reconocer a un mismo gen blanco de regulación directa en dos sitios diferentes, uno de esos sitios reconocido a través de la formación del complejo con los GRFs y el otro a través de la interacción con otras proteínas, que puede ser *BRM* u otro factor de transcripción. Esta hipótesis daría cuenta de la dualidad de función de *AN3* que describimos en el

capítulo 2 de esta tesis. AN3 formando un complejo con los GRFs, actuaría como represor de genes característicos de SCN en las TACs, incluyendo los genes *PLTs* y *GLVs*. Mientras que en el SCN donde los *GRFs* no se expresan, podría formar un complejo con otras proteínas, incluida BRM, y actuaría como activador de los mismos genes. En concordancia con esta posibilidad, encontramos que la intersección de las lista de genes que dan señal en el CHIP de AN3 llevado a cabo con cultivos celulares (32) con los genes que dan señal en el CHIP de BRM realizado con plántulas completas (151) da como resultado que un 50% de los genes que presentan sitio de unión para AN3 también son reconocidos de manera directa por BRM.

De la misma manera sería interesante estudiar aquellos genes blanco regulados por *GRF3* que no lo son por AN3, de manera de encontrar posibles funciones de los *GRFs* independientes del cofactor. Este tipo de estudios mostrarían que el efecto de los *GRFs* y los *GIFs* actuando juntos o de forma independiente en la regulación de la expresión génica sería más complejo de lo que previamente se supuso.

### 8.3.3. Perspectivas de trabajo.

La determinación a nivel genómico de los genes cuya expresión cambia en respuesta a los niveles de *AN3* y *GRF3* en raíces abre la posibilidad de encontrar genes blanco directos e indirectos que a continuación puedan ser estudiados desde diferentes puntos de vista. En primer lugar, se plantea continuar con la caracterización de las vías regulatorias que se encuentran por debajo de los complejos GRFs/GIFs que permitan la completa caracterización de la función de este sistema en el desarrollo radicular. En segundo lugar, considerando los resultados que se han obtenido en nuestro laboratorio que muestran que el aumento de los *GRFs* y los *GIFs* causa un incremento de la productividad, biomasa y tolerancia a sequía, se espera que al menos algunos de los genes regulados por este complejo también cumplan esta función y por lo tanto sean nuevos genes candidatos a tener aplicaciones biotecnológicas.

## **CONCLUSIONES.**

## 9. Conclusiones.

La red regulatoria del miARN miR396/*GRFs/GIFs* está ampliamente conservada en plantas. Previo a este trabajo de Tesis sabíamos que este miARN limita la expresión de miembros de la familia de factores de transcripción GRF, los cuales junto a los co-reguladores *GIFs*, controlan la proliferación celular durante el desarrollo de las hojas y otros órganos de la planta.

En este trabajo se caracterizó la participación de esta red regulatoria en el desarrollo del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*. Encontramos que el sistema miR396/*GRF/GIF* es necesario para regular la expresión de genes que contribuyen a definir los límites de las diferentes zonas de desarrollo a lo largo del eje longitudinal de la raíz de *Arabidopsis*. Esta red regulatoria particularmente se ve abocada a controlar la transición entre las SC y las TACs en la raíz de *Arabidopsis*, a partir de la regulación de las hormonas peptídicas de la familia *GLV* y los genes *PLT*.

En esta red regulatoria *PLT* activa al complejo *GRF/GIF* en las TACs, a continuación este complejo contribuiría a dar forma al gradiente de expresión de los genes *PLT* en dos niveles; en primer lugar a través de la regulación negativa de la transcripción de los genes *PLT* y; en segundo lugar de forma indirecta, impedirían la estabilización de la proteínas *PLT* al disminuir los niveles activos de los péptidos *GLVs*, junto con las enzimas que los procesan y los receptores que los censan. En el SCN, *PLT* activaría al miR396, de manera que el mismo excluye a los *GRFs* de esta zona. Al mismo tiempo, *PLT* induce la expresión de *AN3*, que sería capaz de interactuar con *BRM* u otros factores de transcripción aún desconocidos para regular de manera positiva la expresión de los genes específicos de SCN, incluido el propio *PLT* (Figura R3.14).

Este modelo está basado en las siguientes conclusiones y observaciones:

- La expresión de los *GRFs* está restringida a las células que se someten a ciclos de divisiones mitóticas para amplificar el número de células de los diferentes tipos celulares ya establecidos por la actividad de las SC. Este patrón de expresión es determinado por la actividad del miR396 que excluye la expresión de los *GRFs* de las SC.

- Una disminución en los niveles de los *GRFs* vuelve la transición de las SC a TACs borrosa, observándose una expansión de la expresión de genes específicos de SC en las células en activa proliferación celular. Estos cambios se vuelven evidentes a través de características fenotípicas como la aparición de divisiones celulares periclinales generativas ectópicas en las TACs, que suelen ser exclusivas de las SC, la disminución en la velocidad de progresión a través del ciclo celular y el aumento de tamaño del meristema de la raíz.

- A diferencia de los *GRFs* que se encuentran ausentes en el SCN, *AN3* se expresa en el RAM generando un gradiente, con un pico máximo en el SCN que disminuye hacia las TACs y se agota

hacia el final del meristema. Los otros genes de la familia, *GIF2* y *GIF3*, se expresan de manera semejante.

- Las mutantes en los genes *GIFs* presentan fenotipos comparables a las plantas con niveles disminuidos de los *GRFs*. El aumento en el tamaño del meristema y la aparición de divisiones celulares periclinales generativas ectópicas en las TACs, sugiere que los *GIFs* interaccionan con los *GRFs* para reprimir la expresión de los genes específicos de SC en las TACs.

- La expresión de *WOX5*, un gen necesario para la homeostasis del CQ depende cuantitativamente de los niveles de los genes *GIFs*, indicando que los *GIFs* también son necesarios para el mantenimiento del CQ.

- Los fenotipos de las mutantes múltiples de los genes *GIFs* indicaron que dependiendo de la zona de desarrollo, los *GIFs* son capaces formar diferentes complejos regulatorios que activan o reprimen la expresión de los mismos genes. Esta regulación dual se puso en evidencia al evaluar en la doble mutante *an3 gif2* el gradiente de expresión de los genes *PLT*. Este patrón se vuelve borroso, presentando un dominio de expresión más amplio con niveles más bien homogéneos a lo largo de la raíz.

- Análisis del transcriptoma de plantas que expresan una versión de AN3 y GRF3 cuya expresión puede ser controlada a partir del agregado de un inductor exógeno permitió identificar a la familia de pequeños péptidos regulatorios GLVs como un nuevo nivel a través del cual el complejo GRF/GIF regularía los niveles de expresión de *PLT*.

**ANEXO.**

## 10. Anexo.

**Tabla A1.** Expresión de genes de fase S en muestras de puntas de raíces de plantas *35S:miR396* en comparación con plantas silvestres (Col-0). E.R expresión relativa 35S:miR396/Col-0.

AGI	E.R	Anotación
AT3G27640	0.54	homologue to L2DTL, a human WD-40 repeat gene homolog of the Drosophila lethal (2)
AT5G08020	0.66	replication factor A1- like protein
AT1G04020	0.68	unknown protein
AT3G14740	0.71	zinc finger protein-related; C2H2 Family
AT3G12170	0.76	DnaJ protein, putative
AT5G38690	0.8	putative protein
AT5G23420	0.8	HMG containing protein
AT3G59550	0.8	cohesion family protein SYN3; RAD21-2
AT5G43080	0.81	Arath;CYCA3;1
AT5G43530	0.83	DNA repair protein-like; RAD5-like; also strong similarity to RAD8
AT4G28310	0.83	expressed protein
AT2G24490	0.84	replication protein A1- like; rad11-like
AT5G52220	0.87	unknown protein
AT1G47210	0.9	Arath;CYCA3;2
AT5G02520	1.02	putative protein
AT4G39830	1.02	putative L-ascorbate oxidase
AT3G51030	1.05	thioredoxin h
AT5G63540	1.06	unknown protein

**Tabla A2.** Expresión de genes específicos de mitosis (MSG) en muestras de puntas de raíces de plantas *35S:miR396* en comparación con plantas silvestres (Col-0). E.R expresión relativa *35S:miR396/Col-0*.

AGI	E.R	Anotación
AT2G25060	0.53	AtENODL14_ENODL14__early nodulin-like protein 14
AT5G48310	0.71	Unknown protein
AT3G03090	0.74	AtVGT1_VGT1__vacuolar glucose transporter 1
AT2G22610	0.76	Di-glucose binding protein with Kinesin motor domain
AT4G05190	0.77	ATK5__kinesin 5
AT2G33560	0.78	BUBR1__BUB1-related (BUB1: budding uninhibited by benzimidazol 1)
AT1G18370	0.78	ATNACK1_HIK_NACK1__ATP binding microtubule motor family protein
AT5G55830	0.79	LecRK-S.7__Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein
AT3G03130	0.79	Unknown protein
AT2G28620	0.79	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT5G55520	0.80	Unknown protein
AT4G28230	0.80	Unknown protein
AT5G67270	0.82	ATEB1C_ATEB1H1_EB1C__end binding protein 1C
AT4G32830	0.82	AUR1_AtAUR1__ataurora1
AT5G51600	0.83	ATMAP65-3_MAP65-3_PLE__Microtubule associated protein (MAP65/ASE1) family protein
AT1G72250	0.84	Di-glucose binding protein with Kinesin motor domain
AT3G55660	0.85	ATROPGEF6_ROPGEF6__ROP (rho of plants) guanine nucleotide exchange factor 6
AT1G61450	0.86	Unknown protein
AT3G02640	0.87	Unknown protein
AT1G03780	0.87	AtTPX2_TPX2__targeting protein for XKLP2
AT4G02800	0.89	Unknown protein
AT3G14190	0.89	CMR1_PANS1__
AT1G59540	0.89	ZCF125__P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT3G60840	0.90	MAP65-4__microtubule-associated protein 65-4

AT2G16270	0.90	Unknown protein
AT4G26660	0.91	Unknown protein
AT1G75920	0.92	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
AT2G25880	0.92	AUR2_AtAUR2__ataurora2
AT4G05520	0.95	ATEHD2_EHD2__EPS15 homology domain 2
AT3G11520	0.95	CYC2_CYCB1;3__CYCLIN B1;3
AT2G44190	0.95	EDE1_EMB3116_QWRF5__ Family of unknown function (DUF566)
AT4G15830	0.96	ARM repeat superfamily protein
AT5G17160	0.96	Unknown protein
AT4G28430	0.96	Reticulon family protein
AT1G16330	0.96	CYCB3;1__cyclin b3;1
AT5G15510	0.97	TPX2 (targeting protein for Xklp2) protein family
AT5G66230	0.97	Chalcone-flavanone isomerase family protein
AT5G13840	0.97	CCS52B_FZR3__FIZZY-related 3
AT1G34355	0.97	ATPS1_PS1__forkhead-associated (FHA) domain-containing protein
AT5G62550	0.98	Unknown protein
AT1G23790	0.98	Plant protein of unknown function (DUF936)
AT3G51280	0.99	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT1G76310	0.99	CYCB2;4__CYCLIN B2;4
AT2G38160	0.99	Unknown protein
AT2G47500	1.00	P-loop nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein with CH (Calponin Homology) domain
AT5G60930	1.00	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT3G19590	1.00	BUB3.1__Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
AT3G20150	1.00	Kinesin motor family protein
AT3G12870	1.00	Unknown protein
AT3G27330	1.00	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
AT1G08560	1.00	ATSYP111_KN_SYP111__syntaxin of plants 111
AT5G11510	1.01	AtMYB3R4_MYB3R-4__myb domain protein 3r-4

AT5G23910	1.02	ATP binding microtubule motor family protein
AT3G26050	1.02	TPX2 (targeting protein for Xklp2) protein family
AT3G25980	1.04	AtMAD2_MAD2__DNA-binding HORMA family protein
AT1G02730	1.04	ATCSLD5_SOS6__cellulose synthase-like D5
AT5G45700	1.05	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
AT4G23800	1.05	3xHMG-box2__HMG (high mobility group) box protein
AT4G22860	1.05	Cell cycle regulated microtubule associated protein
AT2G26760	1.05	CYCB1;4__Cyclin B1;4
AT4G11080	1.06	3xHMG-box1__HMG (high mobility group) box protein
AT4G33400	1.09	Vacuolar import/degradation, Vid27-related protein
AT4G01730	1.10	DHHC-type zinc finger family protein
AT3G23670	1.10	KINESIN-12B_PAKRP1L__phragmoplast-associated kinesin-related protein, putative
AT2G17620	1.10	CYCB2;1__Cyclin B2;1
AT1G44110	1.11	CYCA1;1__Cyclin A1;1
AT5G33300	1.13	chromosome-associated kinesin-related
AT3G23890	1.13	ATTOPII_TOPII__topoisomerase II
AT4G35620	1.15	CYCB2;2__Cyclin B2;2
AT1G50490	1.17	UBC20__ubiquitin-conjugating enzyme 20
AT5G11300	1.25	CYC2BAT_CYC3B_CYCA2;2__mitotic-like cyclin 3B from Arabidopsis
AT1G76540	1.29	CDKB2;1__cyclin-dependent kinase B2;1
AT1G20930	1.48	CDKB2;2__cyclin-dependent kinase B2;2
AT1G69400	1.69	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
AT5G02370	1.71	ATP binding microtubule motor family protein

**Tabla A3.** Expresión de genes característicos de SC en muestras de puntas de raíces de plantas 35S:*miR396* en comparación con plantas silvestres (Col-0). E.R expresión relativa 35S:*miR396*/Col-0.

AGI	E.R	Anotación
AT3G22120	8	CWLP__cell wall-plasma membrane linker protein
AT1G69490	6.76	ANAC029_ATNAP_NAP__NAC-like, activated by AP3/PI
AT5G17800	5.38	AtMYB56_MYB56__myb domain protein 56
AT5G25900	3.68	ATKO1_CYP701A3_GA3__GA requiring 3
AT5G28640	3.49	AN3_ATGIF1_GIF_GIF1__SSXT family protein
AT2G32440	3.48	ATKAO2_CYP88A4_KAO2__ent-kaurenoic acid hydroxylase 2
AT3G50190	3.19	Plant protein of unknown function (DUF247)
AT1G62500	3.08	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT5G17430	2.86	BBM__Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT3G23570	2.83	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT3G20840	2.74	PLT1__Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT4G33070	2.7	Thiamine pyrophosphate dependent pyruvate decarboxylase family protein
AT2G03830	2.37	RGF8__Encodes a root meristem growth factor (RGF)
AT3G26120	2.22	TEL1__terminal EAR1-like 1
AT5G08380	2.19	AGAL1_AtAGAL1__alpha-galactosidase 1
AT3G01310	2.16	Phosphoglycerate mutase-like family protein
AT4G16447	1.99	unknown protein
AT1G49390	1.88	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT5G41620	1.84	unknown protein
AT1G29270	1.74	unknown protein
AT1G72070	1.65	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein
AT5G23780	1.63	ATDUF9_DUF9__DOMAIN OF UNKNOWN FUNCTION 724 9
AT1G16070	1.53	AtTLP8_TLP8__tubby like protein 8
AT2G29330	1.51	TRI__tropinone reductase
AT1G29980	1.42	Protein of unknown function, DUF642

AT5G09690	1.41	ATMGT7_MGT7_MRS2-7__magnesium transporter 7
AT5G51850	1.41	unknown protein
AT1G69700	1.38	ATHVA22C_HVA22C__HVA22 homologue C
AT5G40320	1.37	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT1G06630	1.36	F-box/RNI-like superfamily protein
AT1G12860	1.35	ICE2_SCRM2__basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT2G26470	1.35	unknown protein
AT5G60210	1.33	RIP5__ROP interactive partner 5
AT2G45340	1.3	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT1G75580	1.27	SAUR-like auxin-responsive protein family
AT3G25890	1.27	CRF11__Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT3G23580	1.26	RNR2_RNR2A__ribonucleotide reductase 2A
AT3G14890	1.23	phosphoesterase
AT5G09300	1.21	Thiamin diphosphate-binding fold (THDP-binding) superfamily protein
AT3G62100	1.19	IAA30__indole-3-acetic acid inducible 30
AT2G23050	1.18	MEL4_NPY4__Phototropic-responsive NPH3 family protein
AT3G18610	1.17	ATNUC-L2_NUC-L2_PARLL1__nucleolin like 2
AT3G05190	1.16	D-aminoacid aminotransferase-like PLP-dependent enzymes superfamily protein
AT2G26440	1.15	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
AT1G46264	1.14	AT-HSFB4_HSFB4_SCZ__heat shock transcription factor B4
AT3G63090	1.14	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family protein
AT4G11290	1.12	Peroxidase superfamily protein
AT3G63480	1.11	ATP binding microtubule motor family protein
AT5G43990	1.11	SDG18_SUVR2__SET-domain containing protein lysine methyltransferase family protein
AT3G03790	1.1	ankyrin repeat family protein / regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein
AT4G12300	1.1	CYP706A4__cytochrome P450, family 706, subfamily A, polypeptide 4
AT1G31010	1.07	OSB4__organellar single-stranded DNA binding protein 4
AT5G57620	1.07	AtMYB36_MYB36__myb domain protein 36

AT1G35610	1.05	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT5G24900	1.05	CYP714A2_ELA2__cytochrome P450, family 714, subfamily A, polypeptide 2
AT3G55550	1.04	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein
AT3G20880	1.02	WIP4__WIP domain protein 4
AT4G09940	1.01	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT1G61590	1	Protein kinase superfamily protein
AT2G30210	1	LAC3__laccase 3
AT3G47040	1	Glycosyl hydrolase family protein
AT3G60650	1	unknown proein
AT4G02780	1	ABC33_ATCPS1_CPS_CPS1_GA1__Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
AT5G20240	1	PI__K-box region and MADS-box transcription factor family protein
AT5G20710	1	BGAL7__beta-galactosidase 7
AT5G47440	1	Plant protein of unknown function (DUF828) with plant pleckstrin homology-like region
AT3G53800	0.99	Fes1B
AT4G29360	0.99	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein
AT3G54220	0.98	SCR_SGR1__GRAS family transcription factor
AT5G39790	0.98	5'-AMP-activated protein kinase-related
AT2G23700	0.96	Protein of unknown function, DUF547
AT3G63240	0.95	DNAse I-like superfamily protein
AT1G23000	0.92	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
AT1G31040	0.92	PLATZ transcription factor family protein
AT3G58690	0.92	Protein kinase superfamily protein
AT2G45870	0.91	Bestrophin-like protein
AT1G63260	0.9	TET10__tetraspanin10
AT2G41990	0.9	unknown protein
AT5G45780	0.88	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT4G30130	0.82	Protein of unknown function (DUF630 and DUF632)
AT2G18950	0.81	ATHPT_HPT1_TPT1_VTE2__homogentisate phytyltransferase 1

---

AT5G48360	0.79	Actin-binding FH2 (formin homology 2) family protein
AT1G68640	0.65	PAN__bZIP transcription factor family protein
AT1G05260	0.58	RCI3_RCI3A__Peroxidase superfamily protein
AT2G16760	0.44	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein
AT3G17680	0.39	Kinase interacting (KIP1-like) family protein
AT3G62760	0.35	ATGSTF13__Glutathione S-transferase family protein

**Tabla A4.** Resultados del RNAseq para el sistema inducible *an3 x AN3-GR-GFP*. Cambios de expresión de al menos 25% y un FDR<0.05. E.R expresión relativa *an3 x AN3-GR-GFP* dex/sin dex.

Reprimidos en <i>an3 x AN3-GR-GFP</i>		
AGI	ER	Anotación
AT5G15725	0.211	GLV9, Golven like 9
AT2G40435	0.241	
AT5G45200	0.250	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT2G04480	0.283	unknown protein
AT1G62500	0.292	Lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT5G51750	0.303	ATSBT1.3, SBT1.3, subtilase 1.3
AT3G59440	0.361	Calcium-binding EF-hand family protein
AT4G20362	0.362	other RNA
AT3G50200	0.374	Plant protein of unknown function (DUF247)
AT2G03830	0.382	GLV6, RGF8- root growth factor
AT4G22730	0.391	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT1G05610	0.415	APS2, ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit 2
AT3G28540	0.415	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT2G36550	0.420	
AT5G64570	0.424	ATBXL4, XYL4, beta-D-xylosidase 4
AT3G30350	0.428	GLV3, RGF4, Root Growth Factor
AT1G12860	0.436	ICE2, SCR2, basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT4G00950	0.449	MEE47, Protein of unknown function (DUF688)
AT1G78970	0.449	ATLUP1, LUP1, lupeol synthase 1
AT2G24700	0.456	Transcriptional factor B3 family protein
AT3G53450	0.458	LOG4, Putative lysine decarboxylase family protein
AT5G51850	0.462	TRM24, TON1 RECRUITING MOTIF 24
AT1G35610	0.466	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT3G16300	0.468	Uncharacterised protein family (UPF0497)
AT2G42660	0.469	Homeodomain-like superfamily protein
AT2G22330	0.472	CYP79B3, cytochrome P450, family 79, subfamily B, polypeptide 3
AT3G14490	0.482	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
AT3G22120	0.483	CWLP, cell wall-plasma membrane linker protein

Activados en <i>an3 x AN3-GR-GFP</i>		
AGI	ER	Anotación
AT5G01610	1.250	Protein of unknown function, DUF538
AT2G41380	1.251	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT1G72210	1.251	bHLH096, bHLH96, basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT1G75170	1.252	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein
AT3G09910	1.253	ATRAB18C, ATRABC2B, RABC2b, RAB GTPase homolog C2B
AT5G04910	1.254	unknown protein
AT5G55640	1.255	unknown protein
AT5G07870	1.255	HXXXD-type acyl-transferase family protein
AT5G20250	1.255	DIN10, RS6, Raffinose synthase family protein
AT4G03210	1.256	XTH9, xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 9
AT5G07950	1.257	unknown protein
AT1G71865	1.258	unknown protein
AT1G18060	1.258	unknown protein
AT1G55920	1.258	ATSERAT2;1, SAT1, SAT5, SERAT2;1, serine acetyltransferase 2;1
AT4G36970	1.259	Remorin family protein
AT5G47860	1.260	Protein of unknown function (DUF1350)
AT4G01070	1.262	GT72B1, UGT72B1, UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT1G70710	1.262	ATGH9B1, CEL1, GH9B1, glycosyl hydrolase 9B1
AT1G18490	1.262	Protein of unknown function (DUF1637)
AT1G23000	1.264	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
AT5G11460	1.265	Protein of unknown function (DUF581)
AT5G38970	1.265	ATBR6OX, BR6OX, BR6OX1, CYP85A1, brassinosteroid-6-oxidase 1
AT4G37010	1.266	CEN2, centrin 2
AT3G58690	1.266	Protein kinase superfamily protein
AT1G13195	1.266	RING/U-box superfamily protein
AT3G17040	1.267	HCF107, high chlorophyll fluorescent 107
AT4G16765	1.268	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT1G53560	1.268	Ribosomal protein L18ae family

AT1G76100	0.485	PETE1, plastocyanin 1
AT5G45210	0.489	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT1G71370	0.489	DEA(D/H)-box RNA helicase family protein
AT5G21482	0.497	ATCKX5, CKX7, cytokinin oxidase 7
AT5G28960	0.497	unknown protein
AT1G66930	0.506	Protein kinase superfamily protein
AT3G18080	0.507	BGLU44, B-S glucosidase 44
AT4G38410	0.509	Dehydrin family protein
AT1G79520	0.511	Cation efflux family protein
AT4G19980	0.518	unknown protein
AT3G18840	0.520	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT4G28410	0.520	RSA1, Tyrosine transaminase family protein
AT5G41290	0.520	Receptor-like protein kinase-related family protein
AT3G13760	0.521	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT5G02950	0.528	Tudor/PWWP/MBT superfamily protein
AT4G35720	0.529	Arabidopsis protein of unknown function (DUF241)
AT5G48170	0.534	SLY2, SNE, F-box family protein
AT3G45840	0.534	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT3G50190	0.535	Plant protein of unknown function (DUF247)
AT1G29418	0.538	unknown protein
AT1G33170	0.538	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT1G63600	0.540	Receptor-like protein kinase-related family protein
AT1G50520	0.542	CYP705A27, cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 27
AT1G15150	0.545	MATE efflux family protein
AT2G07708	0.550	unknown protein
AT3G63350	0.552	AT-HSFA7B, HSFA7B, winged-helix DNA-binding transcription factor family protein
AT5G41280	0.553	Receptor-like protein kinase-related family protein
AT2G29330	0.554	TRI, tropinone reductase
AT1G70700	0.557	JAZ9, TIFY7, TIFY domain/Divergent CCT motif family protein
AT3G62930	0.559	Thioredoxin superfamily protein
AT5G11160	0.561	APT5, adenine phosphoribosyltransferase 5
AT2G19800	0.561	MIOX2, myo-inositol oxygenase 2
AT2G32440	0.562	ATKAO2, CYP88A4, KAO2, ent-kaurenoic acid hydroxylase 2
AT2G37210	0.564	LOG3, lysine decarboxylase family protein
AT1G24030	0.567	Protein kinase superfamily protein

AT1G55740	1.268	AtSIP1, RS1, SIP1, seed imbibition 1
AT1G68810	1.269	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT5G41270	1.269	
AT4G16566	1.270	HINT4, histidine triad nucleotide-binding 4
AT4G30660	1.270	Low temperature and salt responsive protein family
AT4G37540	1.271	LBD39, LOB domain-containing protein 39
AT5G49480	1.271	ATCP1, CP1, Ca <sup>2+</sup> -binding protein 1
AT3G54140	1.271	ATPTR1, AtNPF8.1, NPF8.1, PTR1, peptide transporter 1
AT4G30530	1.271	GGP1, Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein
AT1G70790	1.272	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein
AT2G39725	1.273	LYR family of Fe/S cluster biogenesis protein
AT3G29575	1.273	AFP3, ABI five binding protein 3
AT2G45695	1.274	URM11, Ubiquitin related modifier 1
AT2G31750	1.275	UGT74D1, UDP-glucosyl transferase 74D1
AT3G12970	1.277	unknown protein
AT4G37520	1.279	Peroxidase superfamily protein
AT4G28830	1.279	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT3G54500	1.280	LNK2,
AT4G22745	1.280	MBD1, methyl-CPG-binding domain 1
AT1G09794	1.280	Cox19 family protein (CHCH motif)
AT5G65990	1.281	Transmembrane amino acid transporter family protein
AT3G12520	1.281	SULTR4;2, sulfate transporter 4;2
AT5G03690	1.281	AtFBA4, FBA4, Aldolase superfamily protein
AT5G16480	1.282	AtPFA-DSP5, PFA-DSP5, Phosphotyrosine protein phosphatases superfamily protein
AT1G60230	1.282	Radical SAM superfamily protein
AT2G36835	1.283	unknown protein
AT5G23850	1.283	Arabidopsis thaliana protein of unknown function (DUF821)
AT1G69530	1.283	AT-EXP1, ATEXP1, ATEXPA1, ATHEXP ALPHA 1.2, EXP1, EXPA1, expansin A1
AT4G30270	1.284	MER1-5, MER15B, SEN4, XTH24, xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 24
AT2G42320	1.285	nucleolar protein gar2-related
AT5G19240	1.285	Glycoprotein membrane precursor GPI-anchored
AT3G21560	1.289	BRT1, UGT84A2, UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT2G17070	1.290	Arabidopsis protein of unknown function (DUF241)
AT2G33510	1.290	CFL1 is a negative regulator of cuticle development.
AT5G54160	1.290	ATOMT1, COMT1, OMT1, O-methyltransferase 1

AT1G34110	0.569	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
AT5G46460	0.570	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
AT4G15450	0.570	Senescence/dehydration-associated protein-related
AT5G51810	0.572	AT2353, ATGA20OX2, GA20OX2, gibberellin 20 oxidase 2
AT4G36620	0.575	GATA19, HANL2, GATA transcription factor 19
AT1G20530	0.579	Protein of unknown function (DUF630 and DUF632)
AT1G15460	0.581	ATBOR4, BOR4, HCO3- transporter family
AT1G11580	0.582	ATPMEPCRA, PMEPCRA, methyltransferase PCR A
AT4G10640	0.584	IQD16, IQ-domain 16
AT5G25620	0.586	ATYUC6, YUC6, Flavin-binding monooxygenase family protein
AT5G13140	0.588	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
AT3G27950	0.597	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
AT3G20840	0.599	PLT1, Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT5G10278	0.599	other RNA
AT5G41300	0.604	Receptor-like protein kinase-related family protein
AT1G76650	0.604	CML38, calmodulin-like 38
AT3G52490	0.608	Double Clp-N motif-containing P-loop nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT2G04860	0.609	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT5G57340	0.610	unknown protein
AT2G40450	0.612	BTB/POZ domain-containing protein
AT5G56050	0.613	
AT1G23010	0.622	LPR1, Cupredoxin superfamily protein
AT3G26120	0.622	TEL1, terminal EAR1-like 1
AT5G48110	0.624	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
AT3G62700	0.624	ABCC14, ATMRP10, MRP10, multidrug resistance-associated protein 10
AT2G22730	0.627	Major facilitator superfamily protein
AT1G49475	0.627	AP2/B3-like transcriptional factor family protein
AT1G55200	0.628	Protein kinase protein with adenine nucleotide alpha hydrolases-like domain
AT3G28650	0.629	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT3G20460	0.629	Major facilitator superfamily protein
AT3G10520	0.630	AHB2, ARATH GLB2, ATGLB2, GLB2, HB2, NSHB2, haemoglobin 2
AT1G01480	0.634	ACS2, AT-ACC2, 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 2
AT3G15370	0.636	ATEXP12, ATEXPA12, ATHEXP ALPHA 1.24, EXP12, EXPA12, expansin 12
AT1G44050	0.638	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT3G22930	0.641	AtCML11, CML11, calmodulin-like 11

AT1G78370	1.291	ATGSTU20, GSTU20, glutathione S-transferase TAU 20
AT1G14870	1.293	AtPCR2, PCR2, PLANT CADMIUM RESISTANCE 2
AT1G52720	1.293	unknown protein
AT5G06839	1.295	TGA10, bZIP65, bZIP transcription factor family protein
AT4G08555	1.295	unknown protein
AT3G20260	1.297	Protein of unknown function (DUF1666)
AT3G60870	1.297	AHL18, AT-hook motif nuclear-localized protein 18
AT1G29070	1.298	Ribosomal protein L34
AT3G15354	1.299	SPA3, SPA1-related 3
AT1G15490	1.300	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT4G01270	1.301	RING/U-box superfamily protein
AT1G14860	1.302	NUDT18, atnudt18, nudix hydrolase homolog 18
AT1G13930	1.303	
AT1G28670	1.304	ARAB-1, GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
AT1G73010	1.305	ATPS2, ATPsPase1, PPsPase1, PS2, phosphate starvation-induced gene 2
AT4G12300	1.305	CYP706A4, cytochrome P450, family 706, subfamily A, polypeptide 4
AT1G72820	1.306	Mitochondrial substrate carrier family protein
AT1G69600	1.306	ATHB29, ZFHD1, ZHD11, zinc finger homeodomain 1
AT3G16190	1.307	Isochorismatase family protein
AT1G26150	1.308	AtPERK10, PERK10, proline-rich extensin-like receptor kinase 10
AT1G16060	1.308	ADAP, WRI3, ARIA-interacting double AP2 domain protein
AT4G26320	1.309	AGP13, arabinogalactan protein 13
AT5G67030	1.310	ABA1, ATABA1, ATZEP, IBS3, LOS6, NPQ2, ZEP, zeaxanthin epoxidase (ZEP) (ABA1)
AT4G37300	1.310	MEE59, maternal effect embryo arrest 59
AT2G30590	1.310	WRKY21, WRKY DNA-binding protein 21
AT5G52070	1.312	Agenet domain-containing protein
AT1G06180	1.314	ATMYB13, ATMYBLFGN, MYB13, myb domain protein 13
AT4G38620	1.315	ATMYB4, MYB4, myb domain protein 4
AT1G12530	1.315	MOS9, MODIFIER OF SNC1
AT5G67440	1.316	MEL2, NPY3, Phototropic-responsive NPH3 family protein
AT1G27920	1.316	MAP65-8, microtubule-associated protein 65-8
AT5G62070	1.317	IQD23, IQ-domain 23
AT4G34160	1.317	CYCD3, CYCD3;1, CYCLIN D3;1
AT5G67110	1.318	ALC, basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT5G59790	1.319	Domain of unknown function (DUF966)

AT1G58270	0.642	ZW9,TRAF-like family protein
AT4G17970	0.643	ALMT12,ATALMT12,QUAC1,aluminum-activated, malate transporter 12
AT2G36870	0.643	AtXTH32,XTH32,xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 32
AT5G55830	0.645	LecRK-S.7,Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein
AT4G34419	0.646	unknown protein
AT4G11350	0.647	Protein of unknown function (DUF604)
AT3G50010	0.647	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT3G23570	0.648	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT1G70080	0.648	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
AT5G67280	0.650	RLK,receptor-like kinase
AT3G28640	0.652	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT5G62165	0.652	AGL42,FYF,AGAMOUS-like 42
AT3G24240	0.653	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein
AT2G39700	0.653	ATEXP4,ATEXPA4,ATHEXP ALPHA 1.6,EXPA4,expansin A4
AT2G41070	0.654	ATBZIP12,DPBF4,EEL,Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein
AT1G47620	0.655	CYP96A8,cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 8
AT3G57520	0.656	AtSIP2,RS2,SIP2,seed imbibition 2
AT1G19960	0.656	
AT1G63730	0.656	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT5G16570	0.657	GLN1;4,glutamine synthetase 1;4
AT3G60920	0.658	BCHC1, BEACH-DOMAIN HOMOLOG C1
AT5G16340	0.659	AMP-dependent synthetase and ligase family protein
AT3G55310	0.662	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT3G01580	0.662	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT2G35770	0.664	scpl28,serine carboxypeptidase-like 28
AT1G03540	0.666	Pentatricopeptide repeat (PPR-like) superfamily protein
AT2G38230	0.667	ATPDX1.1,PDX1.1,pyridoxine biosynthesis 1.1
AT3G53360	0.667	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT5G50300	0.667	ATAZG2,AZG2,Xanthine/uracil permease family protein
AT3G15680	0.668	Ran BP2/NZF zinc finger-like superfamily protein
AT2G36120	0.669	DOT1,Glycine-rich protein family
AT4G39950	0.669	CYP79B2,cytochrome P450, family 79, subfamily B, polypeptide 2
AT1G23160	0.671	Auxin-responsive GH3 family protein
AT1G68710	0.671	ATPase E1-E2 type family protein / haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein
AT3G54830	0.672	Transmembrane amino acid transporter family protein
AT3G06435	0.673	Expressed protein
AT5G62960	0.675	unknown protein

AT5G13330	1.321	Rap2.6L,related to AP2 6l
AT3G63430	1.322	TRM5,
AT1G20900	1.322	AHL27,ESC,ORE7,Predicted AT-hook DNA-binding family protein
AT4G34800	1.324	SAUR4,SAUR-like auxin-responsive protein family
AT5G07860	1.325	HXXXD-type acyl-transferase family protein
AT1G66820	1.326	glycine-rich protein
AT4G18020	1.326	APRR2,PRR2,CheY-like two-component responsive regulator family protein
AT1G28070	1.326	unknown protein
AT1G15820	1.326	CP24,LHCB6,light harvesting complex photosystem II subunit 6
AT5G21280	1.326	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
AT3G52380	1.327	CP33,PDE322,chloroplast RNA-binding protein 33
AT2G16365	1.329	F-box family protein
AT3G43800	1.330	ATGSTU27,GSTU27,glutathione S-transferase tau 27
AT3G44300	1.331	AtNIT2,NIT2,nitrilase 2
AT5G63790	1.331	ANAC102,NAC102,NAC domain containing protein 102
AT5G64520	1.332	ATXRCC2,XRCC2,homolog of X-ray repair cross complementing 2 (XRCC2)
AT1G31330	1.332	PSAF,photosystem I subunit F
AT5G64250	1.334	Aldolase-type TIM barrel family protein
AT5G01530	1.334	LHCB4.1,light harvesting complex photosystem II
AT5G11650	1.338	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT5G39240	1.339	encodes a member of the BHLH transcription factors family
AT5G35790	1.339	G6PD1,glucose-6-phosphate dehydrogenase 1
AT4G34620	1.339	SSR16,small subunit ribosomal protein 16
AT5G23760	1.342	Copper transport protein family
AT3G56940	1.343	ACSF,CHL27,CRD1,dicarboxylate diiron protein, putative (Crd1)
AT1G69050	1.344	unknown protein
AT1G22400	1.346	ATUGT85A1,UGT85A1,UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT3G25730	1.346	EDF3,ethylene response DNA binding factor 3
AT4G32570	1.346	TIFY8,TIFY domain protein 8
AT3G48700	1.347	ATCXE13,CXE13,carboxyesterase 13
AT2G06520	1.347	PSBX,photosystem II subunit X
AT4G21990	1.351	APR3,ATAPR3,PRH-26,PRH26,APS reductase 3
AT5G64850	1.352	
AT1G26770	1.354	AT-EXP10,ATEXP10,ATEXPA10,ATHEXP ALPHA 1.1,EXP10,EXPA10,expansin A10
AT2G02950	1.354	PKS1,phytochrome kinase substrate 1
AT3G26710	1.354	CCB1,cofactor assembly of complex C
AT3G17020	1.355	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein

AT2G45180	0.677	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT2G22420	0.678	Peroxidase superfamily protein
AT2G43535	0.679	Scorpion toxin-like knottin superfamily protein
AT5G47500	0.681	PME5,Pectin lyase-like superfamily protein
AT2G23010	0.681	SCPL9,serine carboxypeptidase-like 9
AT5G19520	0.683	ATMSL9,MSL9,mechanosensitive channel of small conductance-like 9
AT3G13100	0.684	ABCC7,ATMRP7,MRP7,multidrug resistance-associated protein 7
AT5G45480	0.684	Protein of unknown function (DUF594)
AT5G50720	0.684	ATHVA22E,HVA22E,HVA22 homologue E
AT4G35270	0.685	NLP2,Plant regulator RWP-RK family protein
AT1G38131	0.688	O-fucosyltransferase family protein
AT3G55740	0.692	ATPROT2,PROT2,proline transporter 2
AT4G29690	0.693	Alkaline-phosphatase-like family protein
AT3G20110	0.694	CYP705A20,cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 20
AT2G46850	0.694	Protein kinase superfamily protein
AT4G12270	0.695	Copper amine oxidase family protein
AT1G76470	0.695	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT3G03810	0.696	EDA30,O-fucosyltransferase family protein
AT5G39820	0.696	NAC094,anac094,NAC domain containing protein 94
AT5G46050	0.696	ATPTR3,AtNPF5.2,NPF5.2,PTR3,peptide transporter 3
AT1G27660	0.697	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT5G44260	0.697	AtTZF5,TZF5,Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein
AT3G21510	0.698	AHP1,histidine-containing phosphotransmitter 1
AT4G00955	0.698	unknown protein
AT5G54145	0.698	unknown protein
AT2G42280	0.699	AKS3,FBH4,basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT2G39350	0.700	ABCG1,ABC-2 type transporter family protein
AT3G48000	0.701	ALDH2,ALDH2A,ALDH2B4,aldehyde dehydrogenase 2B4
AT5G45720	0.701	AAA-type ATPase family protein
AT3G26550	0.701	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT5G18860	0.701	NSH3,inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase family protein
AT1G10400	0.702	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT1G10750	0.704	Protein of Unknown Function (DUF239)
AT3G46720	0.704	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT1G29020	0.704	Calcium-binding EF-hand family protein

AT3G20270	1.355	lipid-binding serum glycoprotein family protein
AT1G76680	1.357	ATOPR1,OPR1,12-oxophytodienoate reductase 1
AT5G14120	1.357	Major facilitator superfamily protein
AT1G07260	1.357	UGT71C3,UDP-glucosyl transferase 71C3
AT5G64330	1.358	JK218,NPH3,RPT3,Phototropic-responsive NPH3 family protein
AT2G37660	1.360	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT4G34135	1.361	UGT73B2,UDP-glucosyltransferase 73B2
AT5G08790	1.361	ATAF2,anac081,NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein
AT5G18840	1.362	Major facilitator superfamily protein
AT3G13910	1.366	Protein of unknown function (DUF3511)
AT1G60950	1.366	ATFD2,FD2,FED A,2Fe-2S ferredoxin-like superfamily protein
AT1G61590	1.367	Protein kinase superfamily protein
AT1G02910	1.369	LPA1,tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein
AT1G72970	1.370	EDA17,HTH,Glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase family protein
AT2G43590	1.371	Chitinase family protein
AT3G18050	1.372	unknown protein
AT3G56220	1.372	transcription regulators
AT5G66190	1.375	ATLFR1,FNR1,LFNR1,ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 1
AT5G49710	1.375	unknown protein
AT1G60160	1.375	Potassium transporter family protein
AT5G15070	1.376	Phosphoglycerate mutase-like family protein
AT5G06610	1.376	Protein of unknown function (DUF620)
AT3G62760	1.380	ATGSTF13,Glutathione S-transferase family protein
AT3G48920	1.381	AtMYB45,MYB45,myb domain protein 45
AT2G26980	1.382	CIPK3,SnRK3.17,CBL-interacting protein kinase 3
AT1G07280	1.383	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT5G20380	1.385	PHT4;5,phosphate transporter 4;5
AT2G02080	1.386	AtIDD4,IDD4,indeterminate(ID)-domain 4
AT4G34230	1.387	ATCAD5,CAD-5,CAD5,cinnamyl alcohol dehydrogenase 5
AT4G33770	1.389	ITPK2,Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase family protein
AT1G61520	1.389	LHCA3,photosystem I light harvesting complex gene 3
AT4G25830	1.391	Uncharacterised protein family (UPF0497)
AT1G29930	1.392	AB140,CAB1,CAB140,LHCB1.3,chlorophyll A/B binding protein 1
AT3G43110	1.392	unknown protein
AT1G74470	1.392	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein

AT5G56530	0.704	Protein of Unknown Function (DUF239)
AT2G34930	0.705	disease resistance family protein / LRR family protein
AT2G14820	0.706	MEL3,NPY2,Phototropic-responsive NPH3 family protein
AT3G47760	0.706	ABCA5,ATATH4,ATH4,ABC2 homolog 4
AT5G46450	0.708	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT1G59725	0.708	DNAJ heat shock family protein
AT4G22770	0.709	AHL2,AT hook motif DNA-binding family protein
AT5G05860	0.709	UGT76C2,UDP-glucosyl transferase 76C2
AT1G67120	0.710	AtMDN1,MDN1,ATPases;nucleotide binding;ATP binding;transcription factor binding
AT4G15530	0.711	PPDK,pyruvate orthophosphate dikinase
AT2G07715	0.713	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein
AT3G08970	0.714	ATERDJ3A,TMS1,DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
AT5G50170	0.715	C2 calcium/lipid-binding and GRAM domain containing protein
AT2G21050	0.715	LAX2,like AUXIN RESISTANT 2
AT1G01580	0.715	ATFRO2,FRD1,FRO2,ferric reduction oxidase 2
AT4G21065	0.715	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT2G47160	0.716	AtBOR1,BOR1,HCO3- transporter family
AT3G47800	0.716	Galactose mutarotase-like superfamily protein
AT2G28470	0.717	BGAL8,beta-galactosidase 8
AT4G03292	0.718	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein
AT5G51520	0.718	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
AT4G23590	0.718	Tyrosine transaminase family protein
AT5G66920	0.724	sks17,SKU5 similar 17
AT5G40320	0.724	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT2G23050	0.724	MEL4,NPY4,Phototropic-responsive NPH3 family protein
AT3G48100	0.724	ARR5,ATRR2,IBC6,RR5,response regulator 5
AT2G40720	0.724	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT2G26700	0.724	PID2,AGC (cAMP-dependent, cGMP-dependent and protein kinase C) kinase family protein
AT1G27590	0.725	unknown protein
AT3G26760	0.725	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT1G75250	0.728	ATRL6,RL6,RSM3,RAD-like 6
AT1G63300	0.728	Myosin heavy chain-related protein
AT5G12970	0.729	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) plant phosphoribosyltransferase family protein

AT4G22890	1.392	PGR5-LIKE A,PGR5-LIKE A
AT2G34420	1.393	LHB1B2,LHCB1.5,photosystem II light harvesting complex gene B1B2
AT2G41820	1.394	PXC3,Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT3G10020	1.397	unknown protein
AT5G14780	1.399	FDH,formate dehydrogenase
AT2G02070	1.401	AtIDD5,IDD5,indeterminate(ID)-domain 5
AT4G10340	1.402	LHCB5,light harvesting complex of photosystem II 5
AT3G48180	1.402	unknown protein
AT3G56400	1.402	ATWRKY70,WRKY70,WRKY DNA-binding protein 70
AT1G44446	1.404	ATCAO,CAO,CH1,Pheophorbide a oxygenase family protein with Rieske [2Fe-2S] domain
AT5G45780	1.406	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT4G15550	1.406	IAGLU,indole-3-acetate beta-D-glucosyltransferase
AT5G57660	1.408	ATCOL5,BBX6,COL5,CONSTANS-like 5
AT2G32090	1.409	Lactoylglutathione lyase / glyoxalase I family protein
AT2G47460	1.410	ATMYB12,MYB12,PFG1,myb domain protein 12
AT2G29490	1.410	ATGSTU1,GST19,GSTU1,glutathione S-transferase TAU 1
AT4G15230	1.412	ABCG30,ATPDR2,PDR2,pleiotropic drug resistance 2
AT2G29480	1.413	ATGSTU2,GST20,GSTU2,glutathione S-transferase tau 2
AT1G20816	1.414	unknown protein
AT2G39705	1.415	DVL11,RTFL8,ROTUNDIFOLIA like 8
AT3G47470	1.420	CAB4,LHCA4,light-harvesting chlorophyll-protein complex I subunit A4
AT1G16390	1.421	ATOCT3,OCT3,organic cation/carnitine transporter 3
AT5G48820	1.422	ICK6,KRP3,inhibitor/interactor with cyclin-dependent kinase
AT1G29640	1.422	Protein of unknown function, DUF584
AT2G47400	1.425	CP12,CP12-1,CP12 domain-containing protein 1
AT2G26180	1.426	IQD6,IQ-domain 6
AT1G10095	1.426	Protein prenyltransferase superfamily protein
AT5G50740	1.427	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
AT3G61750	1.427	Cytochrome b561/ferric reductase transmembrane with DOMON related domain
AT5G66590	1.429	CAP (Cysteine-rich secretory proteins and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
AT5G14090	1.429	AtLAZY1,LAZY1,
AT1G52330	1.432	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family
AT1G77450	1.432	NAC032,anac032,NAC domain containing protein 32

AT2G17525	0.729	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
AT1G06310	0.731	ACX6,acyl-CoA oxidase 6
AT4G20820	0.731	FAD-binding Berberine family protein
AT3G06750	0.731	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
AT4G36010	0.732	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein
AT5G37210	0.732	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT1G73400	0.732	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
AT2G16270	0.733	unknown protein
AT1G54020	0.734	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
AT4G39640	0.735	GGT1,gamma-glutamyl transpeptidase 1
AT4G25420	0.735	GA20OX1,GA5,2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT1G02520	0.736	ABCB11,MDR8,PGP11,P-glycoprotein 11
AT1G61740	0.736	Sulfite exporter TauE/SafE family protein
AT1G08430	0.737	ALMT1,ATALMT1,aluminum-activated malate transporter 1
AT1G62770	0.738	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
AT3G53190	0.738	Pectin lyase-like superfamily protein
AT2G40010	0.739	Ribosomal protein L10 family protein
AT2G32280	0.739	VCC,Protein of unknown function (DUF1218)
AT2G45340	0.740	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT5G40390	0.740	RS5,SIP1,Raffinose synthase family protein
AT5G56970	0.740	ATCKX3,CKX3,cytokinin oxidase 3
AT1G62810	0.741	CuAO1,Copper amine oxidase family protein
AT1G73590	0.741	ATPIN1,PIN1,Auxin efflux carrier family protein
AT1G10550	0.742	XET,XTH33,xyloglucan:xyloglucosyl transferase 33
AT5G47260	0.744	ATP binding;GTP binding;nucleotide binding;nucleoside-triphosphatases
AT1G51190	0.744	PLT2,Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT2G43870	0.744	Pectin lyase-like superfamily protein
AT2G12646	0.745	PLATZ transcription factor family protein
AT1G66350	0.745	RGL,RGL1,RGA-like 1
AT3G17860	0.746	JAI3,JAZ3,TIFY6B,jasmonate-zim-domain protein 3
AT2G27060	0.746	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT2G02750	0.747	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
AT2G37390	0.748	NAKR2,Chloroplast-targeted copper chaperone protein
AT1G22030	0.749	
AT2G39180	0.749	ATCRR2,CCR2,CRINKLY4 related 2

AT5G40330	1.432	ATMYB23,ATMYBRTF,MYB23,myb domain protein 23
AT1G31350	1.433	KUF1,KAR-UP F-box 1
AT3G21690	1.433	MATE efflux family protein
AT5G39050	1.433	PMAT1,HXXXD-type acyl-transferase family protein
AT5G43070	1.434	WPP1,WPP domain protein 1
AT4G15215	1.435	ABCG41,ATPDR13,PDR13,pleiotropic drug resistance 13
AT3G24810	1.436	ICK3,KRP5,Cyclin-dependent kinase inhibitor family protein
AT2G20515	1.438	unknown protein
AT1G06570	1.440	HPD,HPPD,PDS1,phytoene desaturation 1
AT3G15356	1.440	Legume lectin family protein
AT1G23880	1.443	NHL domain-containing protein
AT1G06000	1.443	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT2G27550	1.447	ATC,centroradialis
AT1G65520	1.449	ATECI1,ECHIC,ECI1,PEC11,delta(3), delta(2)-enoyl CoA isomerase 1
AT5G22740	1.454	ATCSLA02,ATCSLA2,CSLA02,CSLA2,cellulose synthase-like A02
AT5G57080	1.454	unknown protein
AT4G00905	1.458	NC domain-containing protein-related
AT1G05710	1.464	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT1G18860	1.466	ATWRKY61,WRKY61,WRKY DNA-binding protein 61
AT2G23910	1.467	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT5G45650	1.469	subtilase family protein
AT5G11550	1.470	ARM repeat superfamily protein
AT4G30450	1.470	glycine-rich protein
AT5G13870	1.470	EXGT-A4,XTH5,xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 5
AT1G20340	1.473	DRT112,PETE2,Cupredoxin superfamily protein
AT4G33145	1.478	unknown protein
AT5G02580	1.482	Plant protein 1589 of unknown function
AT2G06255	1.485	ELF4-L3,ELF4-like 3
AT1G67740	1.487	PSBY,YCF32,photosystem II BY
AT5G59780	1.489	ATMYB59,ATMYB59-1,ATMYB59-2,ATMYB59-3,MYB59,myb domain protein 59
AT2G37630	1.490	AS1,ATMYB91,ATPHAN,MYB91,myb-like HTH transcriptional regulator family protein
AT5G37680	1.491	ARLA1A,ATARLA1A,ADP-ribosylation factor-like A1A
AT3G17609	1.491	HYH,HY5-homolog
AT4G33950	1.491	ATOST1,OST1,P44,SNRK2-6,SNRK2.6,SRK2E,Protein kinase superfamily protein
AT1G33110	1.493	MATE efflux family protein

AT2G25790	0.749	SKM1,Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
AT5G23930	0.750	Mitochondrial transcription termination factor family protein
AT1G21090	0.750	Cupredoxin superfamily protein
AT2G01420	0.751	ATPIN4,PIN4,Auxin efflux carrier family protein
AT5G26280	0.751	TRAF-like family protein
AT2G17820	0.751	AHK1,ATHK1,HK1,histidine kinase 1
AT1G18460	0.751	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT1G63420	0.751	Arabidopsis thaliana protein of unknown function (DUF821)
AT5G46060	0.752	Protein of unknown function, DUF599
AT1G09750	0.752	Eukaryotic aspartyl protease family protein
AT5G40780	0.753	LHT1,lysine histidine transporter 1
AT1G71400	0.753	AtRLP12,RLP12,receptor like protein 12
AT4G19420	0.753	Pectinacetyltransferase family protein
AT2G29125	0.754	DVL13,RTFL2,ROTUNDIFOLIA like 2
AT5G53990	0.755	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT2G33170	0.756	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein
AT1G74170	0.756	AtRLP13,RLP13,receptor like protein 13
AT5G63710	0.757	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT4G16447	0.757	unknown protein
AT2G35340	0.757	MEE29,helicase domain-containing protein
AT5G62260	0.758	AHL6,AT hook motif DNA-binding family protein
AT5G56790	0.758	Protein kinase superfamily protein
AT5G59070	0.758	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT5G19160	0.758	TBL11,TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 11
AT3G49630	0.758	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT5G03552	0.758	MIR822A,MIR822a; miRNA
AT5G19200	0.759	TSC10B,NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT2G24070	0.760	QWRF4,Family of unknown function (DUF566)
AT4G18160	0.761	ATKCO6,ATTPK3,KCO6,TPK3,Ca2+ activated outward rectifying K+ channel 6
AT4G10770	0.761	ATOPT7,OPT7,oligopeptide transporter 7
AT4G15300	0.762	CYP702A2,cytochrome P450, family 702, subfamily A, polypeptide 2
AT1G76790	0.762	IGMT5,O-methyltransferase family protein
AT3G05330	0.762	ATN,ATTAN,cyclin family
AT5G51490	0.763	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
AT1G66280	0.764	BGLU22,Glycosyl hydrolase superfamily protein

AT2G20260	1.496	PSAE-2,photosystem I subunit E-2
AT1G06680	1.497	OE23,OEE2,PSBP-1,PSII-P,photosystem II subunit P-1
AT4G22990	1.497	Major Facilitator Superfamily with SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein
AT1G30530	1.497	UGT78D1,UDP-glucosyl transferase 78D1
AT3G01210	1.497	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
AT4G11211	1.499	unknown protein
AT5G35525	1.500	PLAC8 family protein
AT3G22760	1.502	SOL1,Tesmin/TSO1-like CXC domain-containing protein
AT5G62350	1.503	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
AT1G62190	1.505	Kua-ubiquitin conjugating enzyme hybrid localisation domain
AT5G52450	1.507	MATE efflux family protein
AT3G55120	1.510	A11,AtCHI,CFI,CHI,TT5,Chalcone-flavanone isomerase family protein
AT1G70210	1.516	ATCYCD1;1,CYCD1;1,CYCLIN D1;1
AT5G22020	1.517	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein
AT5G64040	1.518	PSAN,photosystem I reaction center subunit PSI-N, chloroplast, putative / PSI-N, putative (PSAN)
AT3G05470	1.520	Actin-binding FH2 (formin homology 2) family protein
AT3G08940	1.521	LHCB4.2,light harvesting complex photosystem II
AT1G31885	1.523	NIP3;1,NOD26-like intrinsic protein 3;1
AT3G25030	1.523	RING/U-box superfamily protein
AT1G35260	1.524	MLP165,MLP-like protein 165
AT1G52710	1.527	Rubredoxin-like superfamily protein
AT5G02230	1.528	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
AT4G28840	1.529	TIE1, TCP INTERACTOR CONTAINING EAR MOTIF PROTEIN 1
AT2G46420	1.531	Plant protein 1589 of unknown function
AT4G25780	1.537	CAP (Cysteine-rich secretory proteins and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
AT3G17640	1.538	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
AT5G02790	1.539	GSTL3,Glutathione S-transferase family protein
AT2G36090	1.539	F-box family protein
AT5G13930	1.541	ATCHS,CHS,TT4,Chalcone and stilbene synthase family protein
AT5G19850	1.541	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT1G55110	1.548	AtIDD7,IDD7,indeterminate(ID)-domain 7
AT1G78060	1.548	Glycosyl hydrolase family protein
AT4G33050	1.549	AtIQM1,EDA39,IQM1,calmodulin-binding family protein
AT5G08050	1.550	Protein of unknown function (DUF1118)
AT3G45430	1.553	LecRK-1.5,Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein

AT1G58400	0.764	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family
AT1G54730	0.764	Major facilitator superfamily protein
AT3G20380	0.764	TRAF-like family protein
AT1G02730	0.765	ATCSLD5,SOS6,cellulose synthase-like D5
AT4G29700	0.766	Alkaline-phosphatase-like family protein
AT1G20190	0.766	ATEXP11,ATEXPA11,ATHEXP ALPHA 1.14,EXP11,EXPA11,expansin 11
AT5G10170	0.767	ATMIPS3,MIPS3,myo-inositol-1-phosphate synthase 3
AT5G26670	0.768	Pectinacetyltransferase family protein
AT3G17360	0.768	POK1,phragmoplast orienting kinesin 1
AT2G31085	0.768	AtCLE6,CLE6,CLAVATA3/ESR-RELATED 6
AT4G19440	0.769	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT1G24090	0.769	RNase H family protein
AT2G32430	0.770	Galactosyltransferase family protein
AT3G28180	0.770	ATCSLC04,ATCSLC4,CSLC04,CSLC4,Cellulose-synthase-like C4
AT4G19700	0.770	AtILP,BOI,ILP,RING,SBP (S-ribonuclease binding protein) family protein
AT1G70370	0.770	PG2,polygalacturonase 2
AT2G36850	0.770	ATGSL08,ATGSL8,CHOR,ET2,GSL08,GSL8,glucan synthase-like 8
AT1G50790	0.771	Plant mobile domain protein family
AT3G50620	0.772	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT2G19590	0.772	ACO1,ATACO1,ACC oxidase 1
AT3G20120	0.773	CYP705A21,cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 21
AT5G57250	0.773	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
AT4G23540	0.773	ARM repeat superfamily protein
AT3G16450	0.773	JAL33,Mannose-binding lectin superfamily protein
AT3G56100	0.774	IMK3,MRLK,meristematic receptor-like kinase
AT1G71220	0.774	EBS1,PSL2,UGGT,UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferases
AT5G65710	0.774	HSL2,HAESA-like 2
AT2G40260	0.775	Homeodomain-like superfamily protein
AT1G65010	0.775	Plant protein of unknown function (DUF827)
AT3G04580	0.775	EIN4,Signal transduction histidine kinase, hybrid-type, ethylene sensor
AT3G07160	0.775	ATGSL10,CALS9,GSL10,glucan synthase-like 10
AT4G10560	0.776	MEE53,Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT2G42920	0.776	Pentatricopeptide repeat (PPR-like) superfamily protein
AT3G15720	0.777	Pectin lyase-like superfamily protein
AT5G48940	0.777	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase family protein

AT5G05270	1.562	AtCHIL,CHIL,Chalcone-flavanone isomerase family protein
AT1G05680	1.562	UGT74E2,Uridine diphosphate glycosyltransferase 74E2
AT1G05100	1.570	MAPKKK18,mitogen-activated protein kinase kinase kinase 18
AT1G79040	1.575	PSBR,photosystem II subunit R
AT5G10695	1.579	unknown protein
AT1G01720	1.582	ANAC002,ATAF1,NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein
AT5G27730	1.587	Protein of unknown function (DUF1624)
AT1G61890	1.589	MATE efflux family protein
AT5G44190	1.598	ATGLK2,GLK2,GPRI2,GOLDEN2-like 2
AT4G27440	1.599	PORB,protochlorophyllide oxidoreductase B
AT2G48020	1.603	Major facilitator superfamily protein
AT4G32770	1.620	ATSDX1,VTE1,tocopherol cyclase, chloroplast / vitamin E deficient 1 (VTE1)
AT2G33530	1.620	scpl46,serine carboxypeptidase-like 46
AT5G43870	1.627	Plant protein of unknown function (DUF828) with plant pleckstrin homology-like region
AT3G63200	1.633	PLA IIIB,PLP9,PATATIN-like protein 9
AT3G28910	1.644	ATMYB30,MYB30,myb domain protein 30
AT1G30380	1.647	PSAK,photosystem I subunit K
AT3G50750	1.648	BEH1,BES1/BZR1 homolog 1
AT3G26932	1.649	DRB3,dsRNA-binding protein 3
AT2G18196	1.649	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
AT2G30150	1.651	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT1G64625	1.655	Serine/threonine-protein kinase WNK (With No Lysine)-related
AT5G08640	1.663	ATFLS1,FLS,FLS1,flavonol synthase 1
AT5G48880	1.665	KAT5,PKT1,PKT2,peroxisomal 3-keto-acyl-CoA thiolase 2
AT5G39580	1.666	Peroxidase superfamily protein
AT4G23515	1.669	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain family protein
AT1G54780	1.676	AtTLP18.3,TLP18.3,thylakoid lumen 18.3 kDa protein
AT4G34190	1.677	SEP1,stress enhanced protein 1
AT1G63020	1.677	NRPD1,NRPD1A,POL IVA,SDE4,SMD2,nuclear RNA polymerase D1A
AT5G51550	1.679	EXL3,EXORDIUM like 3
AT1G74710	1.682	ATICS1,EDS16,ICS1,SID2,ADC synthase superfamily protein
AT3G45780	1.684	JK224,NPH1,PHOT1,RPT1,phototropin 1
AT1G23380	1.695	KNAT6,KNAT6L,KNAT6S,KNOTTED1-like homeobox gene 6
AT1G14430	1.701	glyoxal oxidase-related protein
AT3G04040	1.707	unknown protein

AT3G02620	0.777	Plant stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase family protein
AT5G16000	0.777	AtNIK1, NIK1, NSP-interacting kinase 1
AT4G18570	0.777	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT1G71692	0.777	AGL12, XAL1, AGAMOUS-like 12
AT3G27170	0.778	ATCLC-B, CLC-B, chloride channel B
AT5G38550	0.779	Mannose-binding lectin superfamily protein
AT3G53480	0.779	ABCG37, ATPDR9, PDR9, PIS1, pleiotropic drug resistance 9
AT3G61150	0.779	HD-GL2-1, HDG1, homeodomain GLABROUS 1
AT1G05280	0.779	Protein of unknown function (DUF604)
AT3G07000	0.779	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT3G03305	0.780	Calcineurin-like metallo-phosphoesterase superfamily protein
AT5G35940	0.781	Mannose-binding lectin superfamily protein
AT4G36520	0.781	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein
AT3G13080	0.781	ABCC3, ATMRP3, MRP3, multidrug resistance-associated protein 3
AT1G68825	0.781	DVL5, RTFL15, ROTUNDIFOLIA like 15
AT1G33750	0.782	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
AT5G53500	0.782	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
AT1G73620	0.782	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein
AT5G24350	0.782	MIP2,
AT3G06530	0.783	ARM repeat superfamily protein
AT4G32000	0.783	Protein kinase superfamily protein
AT5G57500	0.783	Galactosyltransferase family protein
AT2G43880	0.783	Pectin lyase-like superfamily protein
AT2G28960	0.783	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT4G04970	0.783	ATGSL01, ATGSL1, GSL01, GSL1, glucan synthase-like 1
AT3G21180	0.784	ACA9, ATACA9, autoinhibited Ca(2+)-ATPase 9
AT1G70320	0.784	UPL2, ubiquitin-protein ligase 2
AT5G40480	0.784	EMB3012, embryo defective 3012
AT4G17140	0.784	pleckstrin homology (PH) domain-containing protein
AT2G33360	0.785	Protein of unknown function (DUF3527)
AT1G44318	0.785	hemb2, Aldolase superfamily protein
AT1G64790	0.785	ILA, ILITYHIA
AT4G27010	0.785	EMB2788,
AT2G40230	0.786	HXXXD-type acyl-transferase family protein
AT4G23950	0.786	Galactose-binding protein
AT5G49110	0.786	unknown protein
AT2G29740	0.786	UGT71C2, UDP-glucosyl transferase 71C2
AT3G48090	0.787	ATEDS1, EDS1, alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT5G28540	0.787	BIP1, heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein

AT3G22550	1.711	Protein of unknown function (DUF581)
AT3G60070	1.713	Major facilitator superfamily protein
AT4G28660	1.716	PSB28, photosystem II reaction center PSB28 protein
AT3G22420	1.717	ATWNK2, WNK2, ZIK3, with no lysine (K) kinase 2
AT4G16270	1.719	Peroxidase superfamily protein
AT5G59220	1.720	HAI1, SAG113, highly ABA-induced PP2C gene 1
AT4G20930	1.726	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein
AT4G34760	1.726	SAUR50, SAUR-like auxin-responsive protein family
AT5G14370	1.729	CCT motif family protein
AT2G47450	1.731	CAO, CPSRP43, chloroplast signal recognition particle component (CAO)
AT5G59540	1.739	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT5G01900	1.750	ATWRKY62, WRKY62, WRKY DNA-binding protein 62
AT3G15990	1.781	SULTR3;4, sulfate transporter 3;4
AT4G16610	1.784	C2H2-like zinc finger protein
AT1G69260	1.785	AFP1, ABI five binding protein
AT4G39925	1.791	AT hook motif DNA-binding family protein
AT5G57910	1.798	unknown protein
AT2G16580	1.802	SAUR8, SAUR-like auxin-responsive protein family
AT2G45480	1.802	AtGRF9, GRF9, growth-regulating factor 9
AT5G67370	1.803	CGLD27, Protein of unknown function (DUF1230)
AT5G66570	1.806	MSP-1, OEE3, OEE1, OEE3, PSBO-1, PSBO1, PS II oxygen-evolving complex 1
AT1G05560	1.809	UGT1, UGT75B1, UDP-glucosyltransferase 75B1
AT3G16140	1.812	PSAH-1, photosystem I subunit H-1
AT4G25707	1.819	encondes for a samll protein
AT5G05410	1.829	DREB2, DREB2A, DRE-binding protein 2A
AT5G46610	1.836	Aluminium activated malate transporter family protein
AT2G39800	1.837	ATP5CS, P5CS1, delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase 1
AT4G12290	1.840	Copper amine oxidase family protein
AT1G05835	1.850	PHD finger protein
AT3G45730	1.861	unknown protein
AT2G30130	1.865	ASL5, LBD12, PCK1, Lateral organ boundaries (LOB) domain family protein
AT3G28050	1.867	UMAMIT41, nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
AT1G28190	1.877	unknown protein
AT5G13700	1.884	APAO, ATPAO1, PAO1, polyamine oxidase 1
AT5G51110	1.894	Transcriptional coactivator/pterin dehydratase
AT1G76080	1.895	ATCDSP32, CDSP32, chloroplastic drought-induced stress protein of 32 kD
AT4G23550	1.917	ATWRKY29, WRKY29, WRKY family transcription factor
AT1G68640	1.924	PAN, TGA8, bZIP transcription factor family protein
AT2G39890	1.928	ATPROT1, PROT1, proline transporter 1

AT5G13000	0.787	ATGSL12,CALS3,GSL12,glucan synthase-like 12
AT5G51690	0.788	ACS12,1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 12
AT5G57350	0.789	AHA3,ATAHA3,HA3,H(+)-ATPase 3
AT5G45800	0.789	MEE62,Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT1G53070	0.789	Legume lectin family protein
AT5G25900	0.790	ATKO1,CYP701A3,GA3,GA requiring 3
AT2G20290	0.790	ATXIG,XIG,myosin-like protein XIG
AT4G30990	0.791	ARM repeat superfamily protein
AT5G27920	0.791	F-box family protein
AT5G41765	0.791	DNA-binding storekeeper protein-related transcriptional regulator
AT4G30610	0.792	BRS1,SCPL24,alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT2G02810	0.792	ATUTR1,UTR1,UDP-galactose transporter 1
AT1G64910	0.792	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT3G24480	0.792	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
AT1G48090	0.792	calcium-dependent lipid-binding family protein
AT1G50630	0.793	Protein of unknown function (DUF3537)
AT1G19220	0.793	ARF11,ARF19,IAA22,auxin response factor 19
AT1G78610	0.794	MSL6,mechanosensitive channel of small conductance-like 6
AT1G54570	0.794	PES1,Esterase/lipase/thioesterase family protein
AT3G19930	0.795	ATSTP4,STP4,sugar transporter 4
AT5G60200	0.795	TMO6,TARGET OF MONOPTEROS 6
AT5G41080	0.795	AtGDPD2,GDPD2,PLC-like phosphodiesterases superfamily protein
AT1G04610	0.795	YUC3,YUCCA 3
AT3G45600	0.796	TET3,tetraspanin3
AT4G20940	0.796	GHR1,Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
AT1G54385	0.796	ARM repeat superfamily protein
AT1G23720	0.796	Proline-rich extensin-like family protein
AT5G65560	0.797	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
AT4G30190	0.797	AHA2,HA2,PMA2,H(+)-ATPase 2
AT2G47550	0.797	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
AT1G66270	0.798	BGLU21,Glycosyl hydrolase superfamily protein
AT1G56310	0.798	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein
AT4G13750	0.798	EMB2597,NOV,Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase family protein
AT5G48540	0.798	receptor-like protein kinase-related family protein
AT2G17930	0.798	Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein with FAT

AT1G21670	1.931	
AT5G54270	1.931	LHCB3,LHCB3*1,light-harvesting chlorophyll B-binding protein 3
AT2G30370	1.933	CHAL,EPFL6,allergen-related
AT2G26520	1.986	unknown protein
AT3G21670	1.987	AtNPF6.4,NPF6.4,Major facilitator superfamily protein
AT4G12800	1.991	PSAL,photosystem I subunit I
AT1G07985	2.059	Expressed protein
AT3G22810	2.071	Plant protein of unknown function (DUF828) with plant pleckstrin homology-like region
AT5G07990	2.076	CYP75B1,D501,TT7,Cytochrome P450 superfamily protein
AT3G48690	2.092	ATCXE12,CXE12,alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT4G38330	2.094	Integral membrane protein hemolysin-III homolog
AT5G13750	2.105	ZIFL1,zinc induced facilitator-like 1
AT2G33860	2.147	ARF3,ETT,Transcriptional factor B3 family protein / auxin-responsive factor AUX/IAA-related
AT2G26330	2.166	ER,QRP1,Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
AT1G22275	2.193	ZYP1,ZYP1b,Myosin heavy chain-related protein
AT5G02120	2.219	OHP,PDE335,one helix protein
AT1G05675	2.233	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT3G11580	2.240	AP2/B3-like transcriptional factor family protein
AT1G65060	2.308	4CL3,4-coumarate:CoA ligase 3
AT4G27460	2.370	CBSX5,Cystathionine beta-synthase (CBS) family protein
AT5G57920	2.551	AtENODL10,ENODL10,early nodulin-like protein 10
AT3G20600	2.602	NDR1,Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family
AT4G24972	2.608	TPD1,tapetum determinant 1
AT3G61880	2.687	CYP78A9,cytochrome p450 78a9
AT3G63445	2.956	other RNA
AT3G17680	3.212	Kinase interacting (KIP1-like) family protein
AT4G35070	3.489	SBP (S-ribonuclease binding protein) family protein
AT1G12900	3.615	GAPA-2,glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2
AT2G06200	3.690	AtGRF6,GRF6,growth-regulating factor 6
AT2G29380	3.787	HAI3,highly ABA-induced PP2C gene 3
AT2G37640	3.894	ATEXP3,ATEXPA3,ATHEXP ALPHA 1.9,EXP3,Barwin-like endoglucanases superfamily protein
AT1G64970	4.324	G-TMT,TMT1,VTE4,gamma-tocopherol methyltransferase
AT4G36220	4.520	CYP84A1,FAH1,ferulic acid 5-hydroxylase 1
AT1G10640	4.911	Pectin lyase-like superfamily protein
AT1G12330	5.025	unknown protein

		domain
AT2G23093	0.798	Major facilitator superfamily protein
AT1G76580	0.799	Squamosa promoter-binding protein-like (SBP domain) transcription factor family protein
AT1G02640	0.799	ATBXL2,BXL2,beta-xylosidase 2
AT1G33610	0.799	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
AT1G49560	0.800	Homeodomain-like superfamily protein

AT4G37810	5.084	APEPFL2
AT5G48890	9.708	LATE,C2H2-like zinc finger protein
AT1G21460	10.144	AtSWEET1,SWEET1,Nodulin MtN3 family protein
AT5G66780	27.754	unknown protein
AT3G13960	499.956	AtGRF5,GRF5,growth-regulating factor 5

**Tabla A5.** Resultados del RNAseq para el sistema inducible *35S:miR396 x rGRF3-GR-GFP*. Cambios de expresión de al menos 25% y un FDR<0.05. E.R expresión relativa *35S:miR396 x rGRF3-GR-GFP dex/sin dex*.

Reprimidos en <i>35S:miR396 x rGRF3-GR-GFP</i>		
AGI	E.R	Anotación
AT2G23760	0.271	BLH4,SAW2,BEL1-like homeodomain 4
AT4G38410	0.284	Dehydrin family protein
AT5G21482	0.320	ATCKX5,CKX7,cytokinin oxidase 7
AT5G15725	0.328	GLV9,
AT4G14860	0.355	AtOFP11,OFP11,ovate family protein 11
AT4G33220	0.359	ATPME44,PME44,pectin methylesterase 44
AT3G52561	0.360	unknown protein
AT4G19980	0.371	unknown protein
AT2G29330	0.376	TRI,tropinone reductase
AT3G44990	0.380	ATXTR8,AtXTH31,XTH31,XTR8,xyloglucan endo-transglycosylase-related 8
AT3G22120	0.385	CWLP,cell wall-plasma membrane linker protein
AT5G51810	0.391	AT2353,ATGA20OX2,GA20OX2,gibberellin 20 oxidase 2
AT4G27590	0.395	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
AT3G59440	0.398	Calcium-binding EF-hand family protein
AT5G06270	0.401	unknown protein
AT3G16300	0.405	Uncharacterised protein family (UPF0497)
AT5G25380	0.411	CYCA2;1,cyclin a2;1
AT2G03830	0.412	GLV6,RGF8,
AT3G56980	0.416	BHLH039,ORG3,bHLH39,basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT5G11160	0.417	APT5,adenine phosphoribosyltransferase 5
AT1G70080	0.422	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
AT5G09570	0.423	Cox19-like CHCH family protein
AT2G36870	0.426	AtXTH32,XTH32,xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 32
AT3G50200	0.437	Plant protein of unknown function (DUF247)
AT5G62210	0.441	Embryo-specific protein 3, (ATS3)

Activados en <i>35S:miR396 x rGRF3-GR-GFP</i>		
AGI	E.R	Anotación
AT2G29490	1.250	ATGSTU1,GST19,GSTU1,glutathione S-transferase TAU 1
AT4G00560	1.251	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT5G67110	1.251	ALC,basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT4G22840	1.251	Sodium Bile acid symporter family
AT2G45960	1.251	ATHH2,PIP1;2,PIP1B,TMP-A,plasma membrane intrinsic protein 1B
AT1G60960	1.252	ATIRT3,IRT3,iron regulated transporter 3
AT5G58000	1.253	Reticulon family protein
AT2G30590	1.253	WRKY21,WRKY DNA-binding protein 21
AT1G74470	1.253	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein
AT4G22530	1.253	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT1G20850	1.254	XCP2,xylem cysteine peptidase 2
AT3G06483	1.256	ATPDHK,PDK,pyruvate dehydrogenase kinase
AT2G16390	1.256	CHR35,DMS1,DRD1,SNF2 domain-containing protein / helicase domain-containing protein
AT4G34860	1.256	A/N-InvB,Plant neutral invertase family protein
AT2G33710	1.257	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT5G05600	1.259	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT5G13760	1.259	Plasma-membrane choline transporter family protein
AT2G35270	1.260	AHL21,GIK,Predicted AT-hook DNA-binding family protein
AT5G63790	1.260	ANAC102,NAC102,NAC domain containing protein 102
AT5G57090	1.260	AGR,AGR1,ATPIN2,EIR1,MM31,PIN2,WAV6,Auxin efflux carrier family protein
AT5G50210	1.262	OLD5,QS,SUFE3,quinolinate synthase
AT1G55920	1.262	ATSERAT2;1,SAT1,SAT5,SERAT2;1,serine acetyltransferase 2;1
AT2G36400	1.262	AtGRF3,GRF3,growth-regulating factor 3
AT5G08790	1.263	ATAF2,anac081,NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein
AT3G47570	1.263	Leucine-rich repeat protein kinase family protein

AT1G50720	0.456	Stigma-specific Stig1 family protein
AT3G54830	0.459	Transmembrane amino acid transporter family protein
AT3G57500	0.470	unknown protein
AT3G19200	0.473	unknown protein
AT3G25770	0.478	AOC2,allene oxide cyclase 2
AT5G48800	0.482	Phototropic-responsive NPH3 family protein
AT4G36240	0.497	GATA7,GATA transcription factor 7
AT5G28640	0.500	AN3,ATGIF1,GIF,GIF1,SSXT family protein
AT4G28410	0.501	RSA1,Tyrosine transaminase family protein
AT1G01453	0.509	unknown protein
AT1G33790	0.511	jacalin lectin family protein
AT2G22420	0.512	Peroxidase superfamily protein
AT4G22730	0.513	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT1G12860	0.515	ICE2,SCRM2,basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT3G20840	0.517	PLT1,Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT3G53450	0.518	LOG4,Putative lysine decarboxylase family protein
AT4G36010	0.520	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein
AT3G06750	0.523	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
AT2G45450	0.533	ZPR1,protein binding
AT1G35610	0.533	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT2G45210	0.534	SAG201,SAUR36,SAUR-like auxin-responsive protein family
AT5G54490	0.535	PBP1,pinoid-binding protein 1
AT4G14020	0.538	Rapid alkalization factor (RALF) family protein
AT1G15460	0.547	ATBOR4,BOR4,HCO3- transporter family
AT1G68360	0.549	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein
AT1G16500	0.550	unknown protein
AT1G55610	0.550	BRL1,BRI1 like
AT1G26945	0.552	KDR,PRE6,basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT3G26120	0.554	TEL1,terminal EAR1-like 1
AT4G39590	0.556	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein

AT1G67720	1.263	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT3G24030	1.265	hydroxyethylthiazole kinase family protein
AT4G34710	1.265	ADC2,ATADC2,SPE2,arginine decarboxylase 2
AT4G17350	1.266	Plant protein of unknown function (DUF828) with plant pleckstrin homology-like region
AT1G64720	1.267	CP5,Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
AT2G43820	1.267	ATSAGT1,GT,SAGT1,SGT1,UGT74F2,UDP-glucosyltransferase 74F2
AT3G05155	1.268	Major facilitator superfamily protein
AT1G64920	1.270	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT2G28840	1.270	XBAT31,XB3 ortholog 1 in Arabidopsis thaliana
AT3G54500	1.271	LNK2,
AT5G23050	1.271	AAE17,acyl-activating enzyme 17
AT3G56220	1.271	transcription regulators
AT5G63530	1.272	ATFP3,FP3,farnesylated protein 3
AT4G37260	1.273	ATMYB73,MYB73,myb domain protein 73
AT3G18050	1.273	unknown protein
AT1G70790	1.275	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein
AT4G34131	1.275	UGT73B3,UDP-glucosyl transferase 73B3
AT5G43810	1.275	AGO10,PNH,ZLL,Stabilizer of iron transporter SufD / Polynucleotidyl transferase
AT4G00240	1.276	PLDBETA2,phospholipase D beta 2
AT2G18280	1.277	AtTLP2,TLP2,tubby like protein 2
AT5G59520	1.278	AtZIP2,ZIP2,ZRT/IRT-like protein 2
AT2G43330	1.278	ATINT1,INT1,inositol transporter 1
AT4G38400	1.278	ATEXLA2,ATEXPL2,ATHEXP BETA 2.2,EXLA2,EXPL2,expansin-like A2
AT2G16660	1.280	Major facilitator superfamily protein
AT5G16190	1.280	ATCSLA11,CSLA11,cellulose synthase like A11
AT4G20430	1.282	Subtilase family protein
AT1G76520	1.282	PILS3,Auxin efflux carrier family protein
AT1G76500	1.283	AHL29,SOB3,Predicted AT-hook DNA-binding family protein
AT1G21730	1.284	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT5G58600	1.286	PMR5,TBL44,Plant protein of unknown function (DUF828)

AT4G09760	0.556	Protein kinase superfamily protein
AT2G25770	0.557	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
AT1G75250	0.559	ATRL6,RL6,RSM3,RAD-like 6
AT1G80520	0.559	Sterile alpha motif (SAM) domain-containing protein
AT3G15680	0.561	Ran BP2/NZF zinc finger-like superfamily protein
AT5G57340	0.562	unknown protein
AT2G39180	0.564	ATCRR2,CCR2,CRINKLY4 related 2
AT1G76470	0.565	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT5G13140	0.566	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
AT4G35720	0.567	Arabidopsis protein of unknown function (DUF241)
AT3G45080	0.570	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT5G62260	0.572	AHL6,AT hook motif DNA-binding family protein
AT1G16160	0.576	WAKL5,wall associated kinase-like 5
AT4G19690	0.584	ATIRT1,IRT1,iron-regulated transporter 1
AT2G42660	0.587	Homeodomain-like superfamily protein
AT5G40780	0.588	LHT1,lysine histidine transporter 1
AT2G22850	0.589	AtbZIP6,bZIP6,basic leucine-zipper 6
AT4G00390	0.591	DNA-binding storekeeper protein-related transcriptional regulator
AT4G36900	0.593	DEAR4,RAP2.10,related to AP2 10
AT4G36620	0.594	GATA19,HANL2,GATA transcription factor 19
AT5G07450	0.598	CYCP4;3,cyclin p4;3
AT5G05860	0.598	UGT76C2,UDP-glucosyl transferase 76C2
AT2G23010	0.599	SCPL9,serine carboxypeptidase-like 9
AT1G64220	0.599	TOM7-2,translocase of outer membrane 7 kDa subunit 2
AT4G20210	0.601	TPS08,Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
AT4G32000	0.601	Protein kinase superfamily protein
AT1G62500	0.606	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT4G15450	0.607	Senescence/dehydration-associated protein-related
AT3G22930	0.608	AtCML11,CML11,calmodulin-like 11
AT4G10640	0.609	IQD16,IQ-domain 16

AT5G45500	1.287	RNI-like superfamily protein
AT3G47160	1.287	RING/U-box superfamily protein
AT1G55740	1.287	AtSIP1,RS1,SIP1,seed imbibition 1
AT3G43800	1.287	ATGSTU27,GSTU27,glutathione S-transferase tau 27
AT1G78000	1.290	SEL1,SULTR1;2,sulfate transporter 1;2
AT1G49030	1.291	PLAC8 family protein
AT5G22140	1.292	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein
AT5G57930	1.293	APO2,emb1629,Arabidopsis thaliana protein of unknown function (DUF794)
AT3G58620	1.293	TTL4,tetratricopeptide-repeat thioredoxin-like 4
AT2G06850	1.294	EXGT-A1,EXT,XTH4,xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 4
AT2G20515	1.296	unknown protein
AT5G02840	1.296	LCL1,LHY/CCA1-like 1
AT1G70290	1.296	ATTPS8,ATTPSC,TPS8,trehalose-6-phosphatase synthase S8
AT5G23580	1.297	ATCDPK9,ATCPK12,CDPK9,CPK12,calmodulin-like domain protein kinase 9
AT2G35060	1.299	KUP11,K+ uptake permease 11
AT1G14390	1.300	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT2G17150	1.301	NLP1,Plant regulator RWP-RK family protein
AT4G16770	1.301	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT1G17300	1.302	unknown protein
AT1G48480	1.302	RKL1,receptor-like kinase 1
AT3G11385	1.304	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT5G48180	1.304	AtNSP5,NSP5,nitrile specifier protein 5
AT1G72970	1.306	EDA17,HTH,Glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase family protein
AT3G57830	1.306	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT3G22750	1.309	Protein kinase superfamily protein
AT1G51790	1.311	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT1G33110	1.311	MATE efflux family protein
AT1G64950	1.311	CYP89A5,cytochrome P450, family 89, subfamily A, polypeptide 5
AT1G58030	1.312	CAT2,cationic amino acid transporter 2
AT2G02610	1.315	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein

AT4G19700	0.611	AtILP,BOI,ILP,RING,SBP (S-ribonuclease binding protein) family protein
AT4G20362	0.615	other RNA
AT5G51440	0.615	HSP20-like chaperones superfamily protein
AT4G34419	0.615	unknown protein
AT3G50190	0.617	Plant protein of unknown function (DUF247)
AT3G07490	0.619	AGD11,AtCML3,CML3,ARF-GAP domain 11
AT1G33170	0.620	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT4G03292	0.620	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein
AT2G22330	0.621	CYP79B3,cytochrome P450, family 79, subfamily B, polypeptide 3
AT1G23160	0.621	Auxin-responsive GH3 family protein
AT1G33612	0.622	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
AT2G18620	0.622	Terpenoid synthases superfamily protein
AT5G57540	0.626	AtXTH13,XTH13,xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 13
AT5G67620	0.626	unknown protein
AT2G14920	0.629	ATST4A,ST4A,sulfotransferase 4A
AT1G10400	0.630	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT5G37500	0.630	GORK,gated outwardly-rectifying K <sup>+</sup> channel
AT5G62960	0.638	unknown protein
AT3G44450	0.639	BIC1, BLUE-LIGHT INHIBITOR OF CRYPTOCHROMES 1
AT1G23010	0.640	LPR1,Cupredoxin superfamily protein
AT2G25964	0.644	unknown protein
AT2G31085	0.645	AtCLE6,CLE6,CLAVATA3/ESR-RELATED 6
AT1G27950	0.645	LTPG1,glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid protein transfer 1
AT3G49630	0.646	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT3G55310	0.646	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT5G35770	0.646	SAP,Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
AT5G57530	0.646	AtXTH12,XTH12,xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 12
AT1G51190	0.647	PLT2,Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT3G06840	0.648	unknown protein
AT2G41070	0.648	ATBZIP12,DPBF4,EEL,Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor

AT2G48020	1.315	Major facilitator superfamily protein
AT5G61820	1.317	
AT2G34710	1.317	ATHB-14,ATHB14,PHB,PHB-1D,Homeobox-leucine zipper family protein / lipid-binding START domain-containing protein
AT1G66470	1.318	AtRHD6,RHD6,ROOT HAIR DEFECTIVE6
AT2G20750	1.318	ATEXPB1,ATHEXP BETA 1.5,EXPB1,expansin B1
AT5G48450	1.319	sks3,SKU5 similar 3
AT2G39830	1.319	DAR2,LRD3,DA1-related protein 2
AT4G21850	1.320	ATMSRB9,MSRB9,methionine sulfoxide reductase B9
AT1G69040	1.322	ACR4,ACT domain repeat 4
AT1G65920	1.324	Regulator of chromosome condensation (RCC1) family with FYVE zinc finger domain
AT5G13550	1.325	SULTR4;1,sulfate transporter 4.1
AT2G42320	1.326	nucleolar protein gar2-related
AT2G23300	1.328	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT5G20250	1.329	DIN10,RS6,Raffinose synthase family protein
AT5G14730	1.329	unknown protein
AT1G29400	1.330	AML5,ML5,MEI2-like protein 5
AT4G15550	1.332	IAGLU,indole-3-acetate beta-D-glucosyltransferase
AT1G72810	1.332	Pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme family protein
AT4G21830	1.333	ATMSRB7,MSRB7,methionine sulfoxide reductase B7
AT5G04330	1.333	CYP84A4,Cytochrome P450 superfamily protein
AT1G51800	1.333	IOS1,Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT1G30410	1.334	ABCC12,ATMRP13,MRP13,multidrug resistance-associated protein 13
AT4G04700	1.334	CPK27,calcium-dependent protein kinase 27
AT5G02350	1.336	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT5G28300	1.337	AtGT2L,GT2L,Duplicated homeodomain-like superfamily protein
AT1G73010	1.337	ATPS2,AtPPsPase1,PPsPase1,PS2,phosphate starvation-induced gene 2
AT4G34230	1.339	ATCAD5,CAD-5,CAD5,cinnamyl alcohol dehydrogenase 5
AT3G28910	1.340	ATMYB30,MYB30,myb domain protein 30
AT1G29020	1.341	Calcium-binding EF-hand family protein
AT5G62330	1.344	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein

		family protein
AT1G10750	0.650	Protein of Unknown Function (DUF239)
AT3G30350	0.650	GLV3, RGF4,
AT2G21640	0.652	
AT5G07190	0.653	ATS3, seed gene 3
AT5G44260	0.653	ATTZF5, TZF5, Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein
AT3G43720	0.655	LTPG2, Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT1G61740	0.655	Sulfite exporter TauE/SafE family protein
AT1G33090	0.656	MATE efflux family protein
AT1G20190	0.658	ATEXP11, ATEXPA11, ATHEXP ALPHA 1.14, EXP11, EXPA11, expansin 11
AT2G46650	0.660	ATCB5-C, B5 #1, CB5-C, CYTB5-C, cytochrome B5 isoform C
AT1G10550	0.660	XET, XTH33, xyloglucan:xyloglucosyl transferase 33
AT1G34110	0.662	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
AT1G68825	0.664	DVL5, RTFL15, ROTUNDIFOLIA like 15
AT1G44575	0.667	CP22, NPQ4, PSB5, Chlorophyll A-B binding family protein
AT5G06630	0.667	proline-rich extensin-like family protein
AT3G52490	0.668	SMXL3, Double Clp-N motif-containing P-loop nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT1G18690	0.669	XXT4, Galactosyl transferase GMA12/MNN10 family protein
AT4G14690	0.670	ELIP2, Chlorophyll A-B binding family protein
AT5G18840	0.670	Major facilitator superfamily protein
AT1G13420	0.670	ATST4B, ST4B, sulfotransferase 4B
AT5G60200	0.671	TMO6, TARGET OF MONOPTEROS 6
AT1G30820	0.672	CTP synthase family protein
AT5G51310	0.672	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT3G16390	0.673	NSP3, nitrile specifier protein 3
AT5G40030	0.674	Protein kinase superfamily protein
AT5G51750	0.674	ATSBT1.3, SBT1.3, subtilase 1.3
AT4G03330	0.675	ATSYP123, SYP123, syntaxin of plants 123
AT2G43880	0.677	Pectin lyase-like superfamily protein
AT5G05880	0.677	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT1G76790	0.677	IGMT5, O-methyltransferase family protein

AT5G07870	1.345	HXXXD-type acyl-transferase family protein
AT1G75640	1.349	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
AT3G09780	1.351	ATCRR1, CCR1, CRINKLY4 related 1
AT5G62220	1.351	ATGT18, GT18, XLT2, glycosyltransferase 18
AT3G58690	1.353	Protein kinase superfamily protein
AT3G28740	1.354	CYP81D11, Cytochrome P450 superfamily protein
AT3G14660	1.354	CYP72A13, cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 13
AT2G30150	1.355	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT1G23000	1.356	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
AT3G57630	1.359	exostosin family protein
AT2G02080	1.360	AtIDD4, IDD4, indeterminate(ID)-domain 4
AT1G77580	1.363	Plant protein of unknown function (DUF869)
AT4G16780	1.364	ATHB-2, ATHB2, HAT4, HB-2, homeobox protein 2
AT1G23380	1.365	KNAT6, KNAT6L, KNAT6S, KNOTTED1-like homeobox gene 6
AT3G12920	1.366	BRG3, SBP (S-ribonuclease binding protein) family protein
AT3G15450	1.369	Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs
AT5G53020	1.371	Ribonuclease P protein subunit P38-related
AT1G77760	1.372	GNR1, NIA1, NR1, nitrate reductase 1
AT5G38970	1.374	ATBR6OX, BR6OX, BR6OX1, CYP85A1, brassinosteroid-6-oxidase 1
AT3G25730	1.377	EDF3, ethylene response DNA binding factor 3
AT2G33510	1.378	CFL1
AT3G47470	1.379	CAB4, LHCA4, light-harvesting chlorophyll-protein complex I subunit A4
AT1G70710	1.379	ATGH9B1, CEL1, GH9B1, glycosyl hydrolase 9B1
AT3G02240	1.379	GLV4, RGF7,
AT5G45510	1.379	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
AT3G01710	1.380	TPX2 (targeting protein for Xklp2) protein family
AT1G15820	1.381	CP24, LHCB6, light harvesting complex photosystem II subunit 6
AT1G52710	1.384	Rubredoxin-like superfamily protein
AT2G46420	1.388	Plant protein 1589 of unknown function
AT3G63200	1.390	PLA IIIB, PLP9, PATATIN-like protein 9

AT5G42700	0.678	AP2/B3-like transcriptional factor family protein
AT3G26300	0.681	CYP71B34,cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 34
AT5G59070	0.685	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT1G07740	0.685	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT1G14960	0.685	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
AT5G25900	0.686	ATKO1,CYP701A3,GA3,GA requiring 3
AT5G55250	0.686	AtIAMT1,IAMT1,IAA carboxylmethyltransferase 1
AT3G16690	0.687	AtSWEET16,SWEET16,Nodulin MtN3 family protein
AT1G54940	0.688	GUX4,PGSIP4,plant glycogenin-like starch initiation protein 4
AT5G51590	0.689	AHL4,AT hook motif DNA-binding family protein
AT5G56970	0.690	ATCKX3,CKX3,cytokinin oxidase 3
AT3G10520	0.691	AHB2,ARATH GLB2,ATGLB2,GLB2,HB2,NSHB2,haemoglobin 2
AT3G29410	0.691	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
AT5G23360	0.692	GRAM domain-containing protein / ABA-responsive protein-related
AT5G19875	0.693	unknown protein
AT4G35270	0.694	NLP2,Plant regulator RWP-RK family protein
AT1G29270	0.695	unknown protein
AT2G47160	0.695	AtBOR1,BOR1,HCO3- transporter family
AT2G19590	0.697	ACO1,ATACO1,ACC oxidase 1
AT1G71692	0.699	AGL12,XAL1,AGAMOUS-like 12
AT1G05280	0.699	Protein of unknown function (DUF604)
AT4G24275	0.699	
AT1G51950	0.700	IAA18,indole-3-acetic acid inducible 18
AT3G19400	0.701	Cysteine proteinases superfamily protein
AT1G75450	0.701	ATCKX5,ATCKX6,CKX5,cytokinin oxidase 5
AT5G17600	0.701	RING/U-box superfamily protein
AT5G56530	0.701	Protein of Unknown Function (DUF239)
AT4G39640	0.701	GGT1,gamma-glutamyl transpeptidase 1
AT4G35390	0.702	AGF1,AHL25,AT-hook protein of GA feedback 1
AT2G38230	0.703	ATPDX1.1,PDX1.1,pyridoxine biosynthesis 1.1

AT5G07440	1.390	GDH2,glutamate dehydrogenase 2
AT3G16150	1.391	ASPGB1,N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolases) superfamily protein
AT3G14540	1.393	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
AT5G13330	1.393	Rap2.6L,related to AP2 6l
AT1G30380	1.395	PSAK,photosystem I subunit K
AT5G07860	1.399	HXXXD-type acyl-transferase family protein
AT1G15180	1.400	MATE efflux family protein
AT1G72900	1.400	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain-containing protein
AT5G51550	1.400	EXL3,EXORDIUM like 3
AT5G64250	1.405	Aldolase-type TIM barrel family protein
AT2G39705	1.405	DVL11,RTFL8,ROTUNDIFOLIA like 8
AT5G01530	1.406	LHCB4.1,light harvesting complex photosystem II
AT3G03770	1.408	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT4G18020	1.413	APRR2,PRR2,CheY-like two-component responsive regulator family protein
AT4G32770	1.415	ATSDX1,VTE1,tocopherol cyclase, chloroplast / vitamin E deficient 1 (VTE1) / sucrose export defective 1 (SXD1)
AT1G66140	1.418	ZFP4,zinc finger protein 4
AT5G67030	1.423	ABA1,ATABA1,ATZEP,IBS3,LOS6,NPQ2,ZEP,zeaxanthin epoxidase (ZEP) (ABA1)
AT3G28345	1.424	ABCB15,MDR13,ABC transporter family protein
AT5G64810	1.426	ATWRKY51,WRKY51,WRKY DNA-binding protein 51
AT2G27550	1.426	ATC,centroradialis
AT1G01720	1.428	ANAC002,ATAF1,NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein
AT1G65295	1.432	unknown protein
AT4G15233	1.433	ABCG42,ABC-2 and Plant PDR ABC-type transporter family protein
AT1G28070	1.435	unknown protein
AT5G59540	1.435	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT5G39240	1.436	Encodes a atypical member of the bHLH transcription factor family
AT2G32560	1.436	F-box family protein
AT1G27920	1.444	MAP65-8,microtubule-associated protein 65-8
AT5G15150	1.445	ATHB-3,ATHB3,HAT7,HB-3,homeobox 3
AT4G37520	1.449	Peroxidase superfamily protein

AT5G48110	0.703	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
AT1G18745	0.703	
AT3G21720	0.704	ICL,isocitrate lyase
AT5G15265	0.704	unknown protein
AT5G24960	0.704	CYP71A14,cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 14
AT3G48610	0.704	NPC6,non-specific phospholipase C6
AT5G21080	0.704	Uncharacterized protein
AT5G17800	0.706	AtMYB56,MYB56,myb domain protein 56
AT5G47050	0.706	SBP (S-ribonuclease binding protein) family protein
AT3G50870	0.707	GATA18,HAN,MNP,GATA type zinc finger transcription factor family protein
AT1G22030	0.711	
AT3G50010	0.711	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT1G20160	0.713	ATSBT5.2,Subtilisin-like serine endopeptidase family protein
AT5G58784	0.713	Undecaprenyl pyrophosphate synthetase family protein
AT5G62280	0.714	Protein of unknown function (DUF1442)
AT2G48080	0.714	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein
AT5G24580	0.715	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
AT3G23810	0.715	ATSAHH2,SAHH2,S-adenosyl-l-homocysteine (SAH) hydrolase 2
AT5G47920	0.715	
AT5G59050	0.715	unknown protein
AT2G46860	0.716	AtPPa3,PPa3,pyrophosphorylase 3
AT1G20070	0.718	unknown protein
AT1G54970	0.719	ATPRP1,PRP1,RHS7,proline-rich protein 1
AT3G56360	0.720	unknown protein
AT3G17860	0.720	JAI3,JAZ3,TIFY6B,jasmonate-zim-domain protein 3
AT4G11350	0.721	Protein of unknown function (DUF604)
AT5G03670	0.721	TRM28,
AT3G24450	0.721	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
AT3G21510	0.721	AHP1,histidine-containing phosphotransmitter 1
AT1G74660	0.722	MIF1,mini zinc finger 1
AT5G11440	0.723	CID5,IPD1,CTC-interacting domain 5

AT1G09530	1.450	PAP3,PIF3,POC1,phytochrome interacting factor 3
AT3G24810	1.452	ICK3,KRP5,Cyclin-dependent kinase inhibitor family protein
AT4G34135	1.455	UGT73B2,UDP-glucosyltransferase 73B2
AT2G46830	1.458	AtCCA1,CCA1,circadian clock associated 1
AT4G08930	1.460	APRL6,ATAPRL6,APR-like 6
AT2G43500	1.460	NLP8,Plant regulator RWP-RK family protein
AT3G49160	1.462	pyruvate kinase family protein
AT3G21330	1.466	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT5G43870	1.470	Plant protein of unknown function (DUF828) with plant pleckstrin homology-like region
AT4G24340	1.470	Phosphorylase superfamily protein
AT1G61890	1.472	MATE efflux family protein
AT1G05650	1.473	Pectin lyase-like superfamily protein
AT2G26180	1.473	IQD6,IQ-domain 6
AT1G72820	1.475	Mitochondrial substrate carrier family protein
AT3G22550	1.476	Protein of unknown function (DUF581)
AT3G48690	1.482	ATCXE12,CXE12,alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT3G21250	1.495	ABCC8,ATMRP6,MRP6,multidrug resistance-associated protein 6
AT3G59730	1.499	LecRK-V.6,Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein
AT4G10340	1.500	LHCB5,light harvesting complex of photosystem II 5
AT1G26700	1.503	ATMLO14,MLO14,Seven transmembrane MLO family protein
AT4G08555	1.504	unknown protein
AT1G04425	1.507	other RNA
AT5G11250	1.511	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
AT3G26830	1.512	CYP71B15,PAD3,Cytochrome P450 superfamily protein
AT3G23560	1.517	ALF5,MATE efflux family protein
AT5G56590	1.518	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein
AT5G27730	1.524	Protein of unknown function (DUF1624)
AT1G68640	1.528	PAN,TGA8,bZIP transcription factor family protein
AT5G65990	1.530	Transmembrane amino acid transporter family protein
AT1G28670	1.534	ARAB-1,GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
AT5G15070	1.536	Phosphoglycerate mutase-like family protein

AT3G48100	0.723	ARR5,ATRR2,IBC6,RR5,response regulator 5
AT3G55120	0.725	A11,AtCHI,CFI,CHI,TT5,Chalcone-flavanone isomerase family protein
AT3G02620	0.725	Plant stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase family protein
AT2G46850	0.725	Protein kinase superfamily protein
AT3G48660	0.726	Protein of unknown function (DUF 3339)
AT5G53990	0.727	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT5G66920	0.727	sks17,SKU5 similar 17
AT5G50300	0.727	ATAZG2,AZG2,Xanthine/uracil permease family protein
AT5G60860	0.728	AtRABA1f,RABA1f,RAB GTPase homolog A1F
AT3G59850	0.729	Pectin lyase-like superfamily protein
AT3G61150	0.730	HD-GL2-1,HDG1,homeodomain GLABROUS 1
AT4G39950	0.731	CYP79B2,cytochrome P450, family 79, subfamily B, polypeptide 2
AT1G06320	0.732	unknown protein
AT5G46870	0.732	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
AT1G51940	0.732	AtLYK3,LYK3,protein kinase family protein / peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein
AT1G18650	0.733	PDCB3,plasmodesmata callose-binding protein 3
AT4G25790	0.734	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
AT1G33750	0.734	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
AT5G45920	0.735	SGNH hydrolase-type esterase superfamily protein
AT3G28180	0.736	ATCSLC04,ATCSLC4,CSLC04,CSLC4,Cellulose-synthase-like C4
AT4G37160	0.737	sks15,SKU5 similar 15
AT4G22214	0.737	Defensin-like (DEFL) family protein
AT1G18590	0.738	ATSOT17,ATST5C,SOT17,sulfotransferase 17
AT1G62510	0.738	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT3G05830	0.739	Encodes alpha-helical IF (intermediate filament)-like protein
AT4G15390	0.740	HXXXD-type acyl-transferase family protein
AT1G54385	0.740	ARM repeat superfamily protein
AT1G13830	0.740	Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein
AT3G05320	0.741	O-fucosyltransferase family protein
AT2G42280	0.741	AKS3,FBH4,basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein

AT2G41820	1.541	PXC3,Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT1G02180	1.541	ferredoxin-related
AT1G07280	1.541	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT1G70210	1.544	ATCYCD1;1,CYCD1;1,CYCLIN D1;1
AT5G57910	1.547	unknown protein
AT1G06680	1.554	OE23,OEE2,PSBP-1,PSII-P,photosystem II subunit P-1
AT5G11920	1.557	AtcwINV6,cwINV6,6-&1-fructan exohydrolase
AT2G33530	1.560	scpl46,serine carboxypeptidase-like 46
AT1G28080	1.562	RING finger protein
AT4G25830	1.565	Uncharacterised protein family (UPF0497)
AT3G14550	1.565	GGPS3,geranylgeranyl pyrophosphate synthase 3
AT4G23700	1.567	ATCHX17,CHX17,cation/H+ exchanger 17
AT2G45080	1.576	cycp3;1,cyclin p3;1
AT1G52140	1.582	unknown protein
AT3G28050	1.585	UMAMIT41,nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
AT3G43110	1.586	unknown protein
AT5G14120	1.588	Major facilitator superfamily protein
AT4G34760	1.589	SAUR50,SAUR-like auxin-responsive protein family
AT1G76680	1.589	ATOPR1,OPR1,12-oxophytodienoate reductase 1
AT4G37400	1.590	CYP81F3,cytochrome P450, family 81, subfamily F, polypeptide 3
AT3G62760	1.591	ATGSTF13,Glutathione S-transferase family protein
AT5G02890	1.592	HXXXD-type acyl-transferase family protein
AT4G15215	1.598	ABCG41,ATPDR13,PDR13,pleiotropic drug resistance 13
AT1G05570	1.600	ATGSL06,ATGSL6,CALS1,GSL06,GSL6,callose synthase 1
AT3G58850	1.603	HLH2,PAR2,phy rapidly regulated 2
AT1G63240	1.611	unknown protein
AT1G24320	1.619	Six-hairpin glycosidases superfamily protein
AT3G09940	1.625	ATMDAR3,MDAR2,MDAR3,MDHAR,monodehydroascorbate reductase
AT4G21865	1.626	unknown protein
AT4G23515	1.632	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain family protein

AT5G12950	0.741	Putative glycosyl hydrolase of unknown function (DUF1680)
AT2G43870	0.741	Pectin lyase-like superfamily protein
AT4G35030	0.742	Protein kinase superfamily protein
AT2G43535	0.742	Scorpion toxin-like knottin superfamily protein
AT5G57500	0.743	Galactosyltransferase family protein
AT2G32430	0.743	Galactosyltransferase family protein
AT1G13970	0.743	Protein of unknown function (DUF1336)
AT5G51520	0.743	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
AT1G32440	0.745	PKp3, plastidial pyruvate kinase 3
AT3G62700	0.745	ABCC14,ATMRP10,MRP10,multidrug resistance-associated protein 10
AT4G17970	0.745	ALMT12,ATALMT12,QUAC1,aluminum-activated, malate transporter 12
AT5G26670	0.746	Pectinacylesterase family protein
AT1G69580	0.746	Homeodomain-like superfamily protein
AT4G39070	0.747	BBX20,BZS1,B-box zinc finger family protein
AT2G40475	0.747	ASG8,
AT4G19030	0.747	AT-NLM1,ATNLM1,NIP1;1,NLM1,NOD26-like major intrinsic protein 1
AT5G51460	0.747	ATTPPA,TPPA,Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
AT4G29690	0.748	Alkaline-phosphatase-like family protein
AT2G35930	0.748	AtPUB23,PUB23,plant U-box 23
AT5G46050	0.749	ATPTR3,AtNPF5.2,NPF5.2,PTR3,peptide transporter 3
AT5G50170	0.749	C2 calcium/lipid-binding and GRAM domain containing protein
AT2G12646	0.750	PLATZ transcription factor family protein
AT3G47800	0.750	Galactose mutarotase-like superfamily protein
AT5G35740	0.751	Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein
AT1G13250	0.751	GATL3,galacturonosyltransferase-like 3
AT3G14130	0.752	HAOX1,Aldolase-type TIM barrel family protein
AT3G14850	0.753	TBL41,TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 41
AT3G14510	0.753	Polyprenyl synthetase family protein
AT4G39840	0.754	unknown protein

AT3G03680	1.633	C2 calcium/lipid-binding plant phosphoribosyltransferase family protein
AT4G34420	1.648	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT5G66570	1.653	MSP-1,OE33,OEE1,OEE33,PSBO-1,PSBO1,PS II oxygen-evolving complex 1
AT4G33950	1.654	ATOST1,OST1,P44,SNRK2-6,SNRK2.6,SRK2E,Protein kinase superfamily protein
AT3G10020	1.655	unknown protein
AT4G21280	1.664	PSBQ,PSBQ-1,PSBQA,photosystem II subunit QA
AT5G22740	1.670	ATCSLA02,ATCSLA2,CSLA02,CSLA2,cellulose synthase-like A02
AT1G14350	1.679	AtMYB124,FLP,MYB124,Duplicated homeodomain-like superfamily protein
AT2G45660	1.681	AGL20,ATSOC1,SOC1,AGAMOUS-like 20
AT4G22890	1.685	PGR5-LIKE A,PGR5-LIKE A
AT4G21990	1.686	APR3,ATAPR3,PRH-26,PRH26,APS reductase 3
AT5G38200	1.689	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein
AT3G22760	1.702	SOL1,Tesmin/TSO1-like CXC domain-containing protein
AT3G60870	1.703	AHL18,AT-hook motif nuclear-localized protein 18
AT1G79110	1.706	BRG2,zinc ion binding
AT1G80100	1.707	AHP6,HP6,histidine phosphotransfer protein 6
AT1G07175	1.717	unknown protein
AT1G20030	1.718	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein
AT1G60190	1.725	AtPUB19,PUB19,ARM repeat superfamily protein
AT5G42600	1.725	MRN1,marneral synthase
AT4G16610	1.736	C2H2-like zinc finger protein
AT3G45780	1.736	JK224,NPH1,PHOT1,RPT1,phototropin 1
AT1G28660	1.739	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
AT1G05680	1.746	UGT74E2,Uridine diphosphate glycosyltransferase 74E2
AT1G62190	1.746	Kua-ubiquitin conjugating enzyme hybrid localisation domain
AT2G43470	1.752	Protein of unknown function (DUF3755)
AT1G71870	1.754	MATE efflux family protein
AT3G48700	1.758	ATCXE13,CXE13,carboxyesterase 13
AT2G37630	1.771	AS1,ATMYB91,ATPHAN,MYB91,myb-like HTH transcriptional regulator family protein

AT2G47930	0.754	AGP26,ATAGP26,arabinogalactan protein 26
AT5G06990	0.755	Protein of unknown function, DUF617
AT1G59940	0.755	ARR3,response regulator 3
AT5G47960	0.756	ATRA4C,RABA4C,SMG1,RAB GTPase homolog A4C
AT3G21560	0.756	BRT1,UGT84A2,UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT5G44130	0.757	FLA13,FASCICLIN-like arabinogalactan protein 13 precursor
AT4G22230	0.757	Arabidopsis defensin-like protein
AT1G08590	0.757	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
AT3G53210	0.757	UMAMIT6,nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
AT5G08350	0.758	GRAM domain-containing protein / ABA-responsive protein-related
AT5G45200	0.758	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT5G18860	0.758	NSH3,inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase family protein
AT1G16170	0.759	unknown protein
AT5G51490	0.759	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
AT5G45720	0.759	AAA-type ATPase family protein
AT4G33790	0.759	CER4,FAR3,G7,Jojoba acyl CoA reductase-related male sterility protein
AT3G50660	0.759	AtDWF4,CLM,CYP90B1,DWF4,PSC1,SAV1,SNP2,Cytochrome P450 superfamily protein
AT5G65710	0.760	HSL2,HAESA-like 2
AT4G23590	0.760	Tyrosine transaminase family protein
AT2G39795	0.761	Mitochondrial glycoprotein family protein
AT5G25830	0.761	GATA12,GATA transcription factor 12
AT3G51600	0.761	LTP5,lipid transfer protein 5
AT5G62165	0.762	AGL42,FYF,AGAMOUS-like 42
AT2G45180	0.762	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT1G23100	0.762	GroES-like family protein
AT3G50640	0.763	
AT1G17140	0.763	ICR1,RIP1,interactor of constitutive active rops 1
AT4G30610	0.764	BRS1,SCPL24,alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT1G49560	0.764	Homeodomain-like superfamily protein
AT3G50900	0.764	
AT1G70850	0.765	MLP34,MLP-like protein 34

AT2G39890	1.805	ATPROT1,PROT1,proline transporter 1
AT4G36880	1.806	CP1,RDL1,cysteine proteinase1
AT4G28840	1.808	TIE1,
AT2G15830	1.812	unknown protein
AT1G60160	1.821	Potassium transporter family protein
AT3G29430	1.826	Terpenoid synthases superfamily protein
AT5G57660	1.827	ATCOL5,BBX6,COL5,CONSTANS-like 5
AT1G64970	1.831	G-TMT,TMT1,VTE4,gamma-tocopherol methyltransferase
AT4G30975	1.866	other RNA
AT1G05835	1.872	PHD finger protein
AT1G01060	1.881	LHY,LHY1,Homeodomain-like superfamily protein
AT3G60070	1.894	Major facilitator superfamily protein
AT3G21670	1.906	AtNPF6.4,NPF6.4,Major facilitator superfamily protein
AT2G16580	1.921	SAUR8,SAUR-like auxin-responsive protein family
AT3G11580	1.924	AP2/B3-like transcriptional factor family protein
AT1G21670	1.958	
AT2G47450	1.967	CAO,CPSRP43,chloroplast signal recognition particle component (CAO)
AT4G22900	1.976	Protein of unknown function (DUF1191)
AT2G39800	1.979	ATP5CS,P5CS1,delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase 1
AT4G16270	1.988	Peroxidase superfamily protein
AT5G57920	1.992	AtENODL10,ENODL10,early nodulin-like protein 10
AT3G12220	2.005	scpl16,serine carboxypeptidase-like 16
AT1G67750	2.017	Pectate lyase family protein
AT2G47240	2.020	CER8,LACS1,AMP-dependent synthetase and ligase family protein
AT1G74710	2.029	ATICS1,EDS16,ICS1,SID2,ADC synthase superfamily protein
AT5G35525	2.049	PLAC8 family protein
AT1G60750	2.062	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein
AT1G60270	2.090	BGLU6,beta glucosidase 6
AT1G07180	2.095	ATNDI1,NDA1,alternative NAD(P)H dehydrogenase 1
AT4G16990	2.108	RLM3,disease resistance protein (TIR-NBS class), putative
AT1G69260	2.109	AFP1,ABI five binding protein

AT4G01410	0.765	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family
AT2G25480	0.766	TPX2 (targeting protein for Xklp2) protein family
AT1G69240	0.766	ATMES15,MES15,RHS9,methyl esterase 15
AT1G54730	0.767	Major facilitator superfamily protein
AT1G54890	0.767	Late embryogenesis abundant (LEA) protein-related
AT3G26240	0.768	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT2G14820	0.768	MEL3,NPY2,Phototropic-responsive NPH3 family protein
AT1G66350	0.768	RGL,RGL1,RGA-like 1
AT1G31650	0.768	ATROPGEF14,ROPGEF14,RHO guanyl-nucleotide exchange factor 14
AT5G02050	0.768	Mitochondrial glycoprotein family protein
AT5G09440	0.768	EXL4,EXORDIUM like 4
AT5G45210	0.769	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT3G57010	0.770	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein
AT3G50620	0.771	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT2G24980	0.771	EXT6,Proline-rich extensin-like family protein
AT3G15240	0.771	Serine/threonine-protein kinase WNK (With No Lysine)-related
AT5G62680	0.771	AtNPF2.11,GTR2,NPF2.11,Major facilitator superfamily protein
AT1G06930	0.772	unknown protein
AT4G29700	0.772	Alkaline-phosphatase-like family protein
AT3G52910	0.773	AtGRF4,GRF4,growth-regulating factor 4
AT5G40390	0.774	RS5,SIP1,Raffinose synthase family protein
AT1G63300	0.774	Myosin heavy chain-related protein
AT3G19390	0.774	Granulin repeat cysteine protease family protein
AT1G76550	0.775	Phosphofructokinase family protein
AT1G28130	0.775	GH3.17,Auxin-responsive GH3 family protein
AT4G39660	0.776	AGT2,alanine:glyoxylate aminotransferase 2
AT4G36640	0.777	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein
AT3G22840	0.778	ELIP,ELIP1,Chlorophyll A-B binding family protein
AT5G51780	0.779	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
AT5G14880	0.779	KUP8,Potassium transporter family protein

AT2G30370	2.114	CHAL,EPFL6,allergen-related
AT1G78370	2.117	ATGSTU20,GSTU20,glutathione S-transferase TAU 20
AT3G24340	2.121	CHR40,chromatin remodeling 40
AT2G30130	2.127	ASL5,LBD12,PCK1,Lateral organ boundaries (LOB) domain family protein
AT3G45440	2.149	LecRK-I.6,Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein
AT2G30890	2.171	Cytochrome b561/ferric reductase transmembrane protein family
AT5G41460	2.193	Protein of unknown function (DUF604)
AT5G05410	2.203	DREB2,DREB2A,DRE-binding protein 2A
AT1G05560	2.207	UGT1,UGT75B1,UDP-glucosyltransferase 75B1
AT3G15990	2.217	SULTR3;4,sulfate transporter 3;4
AT5G13700	2.255	APAO,ATPAO1,PAO1,polyamine oxidase 1
AT5G13870	2.280	EXGT-A4,XTH5,xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 5
AT1G62580	2.294	NOGC1,Flavin-binding monooxygenase family protein
AT2G26520	2.319	unknown protein
AT2G26330	2.321	ER,QRP1,Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
AT5G66052	2.354	unknown protein
AT2G33860	2.354	ARF3,ETT,Transcriptional factor B3 family protein / auxin-responsive factor AUX/IAA-related
AT3G22810	2.366	Plant protein of unknown function (DUF828) with plant pleckstrin homology-like region
AT1G22275	2.457	ZYP1,ZYP1b,Myosin heavy chain-related protein
AT5G14070	2.576	ROXY2,Thioredoxin superfamily protein
AT5G13750	2.634	ZIFL1,zinc induced facilitator-like 1
AT1G04150	2.675	C2 calcium/lipid-binding plant phosphoribosyltransferase family protein
AT5G39050	2.748	PMAT1,HXXXD-type acyl-transferase family protein
AT5G59220	2.900	HAI1,SAG113,highly ABA-induced PP2C gene 1
AT1G26770	2.953	AT-EXP10,ATEXP10,ATEXPA10,ATHEXP ALPHA 1.1,EXP10,EXPA10,expansin A10
AT3G17680	2.993	Kinase interacting (KIP1-like) family protein
AT5G20710	3.040	BGAL7,beta-galactosidase 7
AT3G26932	3.115	DRB3,dsRNA-binding protein 3
AT2G06200	3.621	AtGRF6,GRF6,growth-regulating factor 6
AT5G39220	3.739	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein

AT1G06310	0.779	ACX6,acyl-CoA oxidase 6
AT5G67450	0.780	AZF1,ZF1,zinc-finger protein 1
AT3G03810	0.780	EDA30,O-fucosyltransferase family protein
AT2G32440	0.783	ATKAO2,CYP88A4,KAO2,ent-kaurenoic acid hydroxylase 2
AT5G64570	0.783	ATBXL4,XYL4,beta-D-xylosidase 4
AT2G38170	0.784	ATCAX1,CAX1,RCI4,cation exchanger 1
AT4G11290	0.784	Peroxidase superfamily protein
AT3G09035	0.785	Concanavalin A-like lectin family protein
AT1G62770	0.785	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
AT5G56790	0.785	Protein kinase superfamily protein
AT2G42870	0.785	H LH1,PAR1,phy rapidly regulated 1
AT3G25780	0.786	AOC3,allene oxide cyclase 3
AT2G41800	0.787	Protein of unknown function, DUF642
AT2G04025	0.788	GLV7,RGF3,
AT1G11580	0.788	ATPMEPCRA,PMEPCRA,methylesterase PCR A
AT1G17190	0.789	ATGSTU26,GSTU26,glutathione S-transferase tau 26
AT3G02140	0.790	AFP4,TMAC2,AFP2 (ABI five-binding protein 2) family protein
AT3G07410	0.790	AtrABA5b,RABA5b,RAB GTPase homolog A5B
AT4G31890	0.791	ARM repeat superfamily protein
AT1G21090	0.791	Cupredoxin superfamily protein
AT3G13380	0.792	BRL3,BRI1-like 3
AT5G22410	0.792	RHS18,root hair specific 18
AT1G62810	0.793	CuAO1,Copper amine oxidase family protein
AT1G30550	0.793	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT3G23580	0.793	RNR2,RNR2A,ribonucleotide reductase 2A
AT2G29740	0.793	UGT71C2,UDP-glucosyl transferase 71C2
AT5G52250	0.793	EFO1,RUP1,Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
AT5G14690	0.794	unknown protein
AT5G61030	0.794	GR-RBP3,glycine-rich RNA-binding protein 3
AT5G15130	0.796	ATWRKY72,WRKY72,WRKY DNA-binding protein 72
AT3G48260	0.797	W NK3,with no lysine (K) kinase 3

AT3G12230	3.752	scpl14,serine carboxypeptidase-like 14
AT4G24972	4.795	TPD1,tapetum determinant 1
AT5G61290	5.097	Flavin-binding monooxygenase family protein
AT2G37640	5.119	ATEXP3,ATEXPA3,ATHEXP ALPHA 1.9,EXP3,Barwin-like endoglucanases superfamily protein
AT1G10640	5.659	Pectin lyase-like superfamily protein
AT4G35070	7.910	SBP (S-ribonuclease binding protein) family protein
AT5G66780	11.486	unknown protein
AT3G13960	636.509	AtGRF5,GRF5,growth-regulating factor 5

---

AT3G48000	0.797	ALDH2,ALDH2A,ALDH2B4,aldehyde dehydrogenase 2B4
AT5G01620	0.797	TBL35,TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 35
AT5G57130	0.797	SMXL5,Clp amino terminal domain-containing protein
AT1G17970	0.798	RING/U-box superfamily protein
AT3G15357	0.798	unknown protein
AT4G13390	0.799	EXT12,Proline-rich extensin-like family protein
AT4G31000	0.799	Calmodulin-binding protein

**Tabla A6.** Resultado del análisis de la lista de genes inducidos en AN3-GR-GFP y rGRF3-GR-GFP para evaluar el enriquecimiento en diferentes Ontologías génicas. El análisis fue realizado utilizando AgriGo (GO Analysis Toolkit and Database for Agricultural Community).

Descriptor	Descripción	p-value
GO:0042221	response to chemical stimulus	6.60E-11
GO:0006534	cysteine metabolic process	1.50E-09
GO:0019344	cysteine biosynthetic process	1.30E-09
GO:0009070	serine family amino acid biosynthetic process	2.40E-09
GO:0010033	response to organic substance	6.10E-09
GO:0043436	oxoacid metabolic process	1.40E-08
GO:0006519	cellular amino acid and derivative metabolic process	1.30E-08
GO:0006082	organic acid metabolic process	1.40E-08
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	1.40E-08
GO:0042180	cellular ketone metabolic process	1.70E-08
GO:0009069	serine family amino acid metabolic process	2.00E-08
GO:0009308	amine metabolic process	6.40E-08
GO:0000097	sulfur amino acid biosynthetic process	7.90E-08
GO:0044106	cellular amine metabolic process	7.40E-08
GO:0010114	response to red light	9.50E-08
GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	1.20E-07
<b>GO:0065007</b>	<b>biological regulation</b>	1.30E-07
GO:0050896	response to stimulus	4.90E-07
GO:0006766	vitamin metabolic process	1.50E-06
GO:0009414	response to water deprivation	1.70E-06
<b>GO:0050789</b>	<b>regulation of biological process</b>	1.80E-06
GO:0044283	small molecule biosynthetic process	2.10E-06
GO:0008652	cellular amino acid biosynthetic process	2.00E-06
GO:0009415	response to water	2.00E-06
GO:0044281	small molecule metabolic process	2.40E-06
GO:0046482	para-aminobenzoic acid metabolic process	2.30E-06

GO:0046655	folic acid metabolic process	2.30E-06
GO:0009309	amine biosynthetic process	3.30E-06
GO:0016053	organic acid biosynthetic process	3.80E-06
GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process	3.80E-06
GO:0000096	sulfur amino acid metabolic process	5.10E-06
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process	5.70E-06
GO:0031323	regulation of cellular metabolic process	7.00E-06
GO:0044272	sulfur compound biosynthetic process	7.80E-06
GO:0006790	sulfur metabolic process	1.10E-05
GO:0009744	response to sucrose stimulus	1.40E-05
GO:0010218	response to far red light	1.50E-05
GO:0019222	regulation of metabolic process	1.60E-05
GO:0034285	response to disaccharide stimulus	1.60E-05
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	1.80E-05
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	1.80E-05
GO:0009719	response to endogenous stimulus	2.00E-05
GO:0009644	response to high light intensity	2.20E-05
GO:0042558	pteridine and derivative metabolic process	2.50E-05
GO:0006760	folic acid and derivative metabolic process	2.70E-05
GO:0009753	response to jasmonic acid stimulus	3.10E-05
<b>GO:0009987</b>	<b>cellular process</b>	3.80E-05
GO:0009628	response to abiotic stimulus	4.40E-05
<b>GO:0050794</b>	<b>regulation of cellular process</b>	5.00E-05
GO:0009637	response to blue light	5.30E-05
GO:0010155	regulation of proton transport	5.70E-05
GO:0019684	photosynthesis, light reaction	5.70E-05
GO:0006811	ion transport	6.00E-05
GO:0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic process	6.10E-05
GO:0006752	group transfer coenzyme metabolic process	6.80E-05
GO:0009743	response to carbohydrate stimulus	6.80E-05

GO:0015979	Photosynthesis	8.20E-05
<b>GO:0080090</b>	<b>regulation of primary metabolic process</b>	0.0001
GO:0009642	response to light intensity	0.00011
GO:0009407	toxin catabolic process	0.00011
GO:0009404	toxin metabolic process	0.00011
GO:0014070	response to organic cyclic substance	0.00013
GO:0010583	response to cyclopentenone	0.00013
GO:0009751	response to salicylic acid stimulus	0.00015
GO:0006767	water-soluble vitamin metabolic process	0.00017
GO:0008152	metabolic process	0.00017
GO:0009725	response to hormone stimulus	0.0002
GO:0006950	response to stress	0.0002
<b>GO:0044237</b>	<b>cellular metabolic process</b>	<b>0.00021</b>
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	0.00035
<b>GO:0060255</b>	<b>regulation of macromolecule metabolic process</b>	<b>0.00036</b>
<b>GO:0048519</b>	<b>negative regulation of biological process</b>	0.00055
<b>GO:0031326</b>	<b>regulation of cellular biosynthetic process</b>	0.00062
<b>GO:0009889</b>	<b>regulation of biosynthetic process</b>	0.00063
GO:0006725	cellular aromatic compound metabolic process	0.00068
<b>GO:0048513</b>	<b>organ development</b>	0.00073
<b>GO:0048731</b>	<b>system development</b>	0.00073
GO:0023052	Signaling	0.00076
<b>GO:0045449</b>	<b>regulation of transcription</b>	0.00076
<b>GO:0006355</b>	<b>regulation of transcription, DNA-dependent</b>	0.00075
<b>GO:0051252</b>	<b>regulation of RNA metabolic process</b>	0.00082
GO:0006631	fatty acid metabolic process	0.00084
GO:0006812	cation transport	0.00089
GO:0006818	hydrogen transport	0.001
GO:0015992	proton transport	0.001
GO:0009416	response to light stimulus	0.00099

GO:0043269	regulation of ion transport	0.001
GO:0009620	response to fungus	0.001
GO:0051234	establishment of localization	0.0011
<b>GO:0022621</b>	<b>shoot system development</b>	0.0011
<b>GO:0048367</b>	<b>shoot development</b>	0.0011
GO:0009639	response to red or far red light	0.0011
GO:0019220	regulation of phosphate metabolic process	0.0012
GO:0009605	response to external stimulus	0.0012
GO:0051174	regulation of phosphorus metabolic process	0.0012
GO:0055114	oxidation reduction	0.0014
<b>GO:0010556</b>	<b>regulation of macromolecule biosynthetic process</b>	0.0015
GO:0019219	regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	0.0015
GO:0042538	hyperosmotic salinity response	0.0015
GO:0006810	Transport	0.0015
GO:0009072	aromatic amino acid family metabolic process	0.0016
GO:0015672	monovalent inorganic cation transport	0.0016
GO:0009733	response to auxin stimulus	0.0016
GO:0051171	regulation of nitrogen compound metabolic process	0.0017
GO:0009314	response to radiation	0.0018
<b>GO:0032502</b>	<b>developmental process</b>	0.0018
<b>GO:0010468</b>	<b>regulation of gene expression</b>	0.0019
GO:0051049	regulation of transport	0.002
GO:0046483	heterocycle metabolic process	0.0021
GO:0070887	cellular response to chemical stimulus	0.0021
<b>GO:0048366</b>	<b>leaf development</b>	0.0022
GO:0051179	localization	0.0022
<b>GO:0044238</b>	<b>primary metabolic process</b>	<b>0.0022</b>
GO:0048523	negative regulation of cellular process	0.0023
GO:0032501	multicellular organismal process	0.0026
<b>GO:0006350</b>	<b>transcription</b>	0.0028

<b>GO:0006351</b>	<b>transcription, DNA-dependent</b>	0.0028
<b>GO:0032774</b>	<b>RNA biosynthetic process</b>	0.0028
<b>GO:0048856</b>	<b>anatomical structure development</b>	0.0028
GO:0006979	response to oxidative stress	0.0029
GO:0033554	cellular response to stress	0.0031
GO:0051716	cellular response to stimulus	0.0034
GO:0006629	lipid metabolic process	0.0035
GO:0006970	response to osmotic stress	0.0037
GO:0031976	plastid thylakoid	1.20E-05
GO:0042651	thylakoid membrane	1.10E-05
GO:0009535	chloroplast thylakoid membrane	6.80E-06
GO:0009534	chloroplast thylakoid	1.20E-05
GO:0031984	organelle subcompartment	1.30E-05
GO:0055035	plastid thylakoid membrane	7.20E-06
GO:0010287	plastoglobule	1.90E-06
GO:0034357	photosynthetic membrane	1.50E-05
GO:0009521	photosystem	3.30E-05
GO:0044436	thylakoid part	3.20E-05
GO:0009579	thylakoid	7.20E-05
GO:0031090	organelle membrane	0.00038

## **BIBLIOGRAFÍA.**

## 11. Referencias Bibliográficas.

1. V. Jouannet, K. Brackmann, T. Greb, (Pro)cambium formation and proliferation: two sides of the same coin? *Current opinion in plant biology* 23, 54 (2015).
2. G. V. Reddy, M. G. Heisler, D. W. Ehrhardt, E. M. Meyerowitz, Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Development (Cambridge, England)* 131, 4225 (Sep, 2004).
3. C. Gaillochet, J. U. Lohmann, The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. *Development (Cambridge, England)* 142, 2237 (2015).
4. A. Hay, M. Tsiantis, KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity. *Development (Cambridge, England)* 137, 3153 (Oct, 2010).
5. C. van den Berg, V. Willemsen, G. Hendriks, P. Weisbeek, B. Scheres, Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390, 287 (1997).
6. A. K. Sarkar *et al.*, Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446, 811 (Apr 12, 2007).
7. A. Cruz-Ramirez *et al.*, A SCARECROW-RETINOBLASTOMA protein network controls protective quiescence in the *Arabidopsis* root stem cell organizer. *PLoS biology* 11, e1001724 (Nov, 2013).
8. J. Heyman *et al.*, ERF115 controls root quiescent center cell division and stem cell replenishment. *Science (New York, N.Y)* 342, 860 (Nov 15, 2013).
9. J. Vilarrasa-Blasi *et al.*, Regulation of plant stem cell quiescence by a brassinosteroid signaling module. *Developmental cell* 30, 36 (Jul 14, 2014).
10. B. Scheres *et al.*, Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development (Cambridge, England)* 120, 2475 (1994).
11. R. E. Rodriguez, M. F. Ercoli, J. M. Debernardi, J. F. Palatnik, in *Plant Transcription Factors*. (Academic Press, Boston, 2016), pp. 269-280.
12. E. van der Knaap, J. H. Kim, H. Kende, A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth. *Plant physiology* 122, 695 (Mar, 2000).
13. G. Horiguchi, G. T. Kim, H. Tsukaya, The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 43, 68 (Jul, 2005).
14. J. H. Kim, D. Choi, H. Kende, The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in *Arabidopsis*. *Plant J* 36, 94 (Oct, 2003).

15. I. Treich, B. R. Cairns, T. de los Santos, E. Brewster, M. Carlson, SNF11, a new component of the yeast SNF-SWI complex that interacts with a conserved region of SNF2. *Molecular and cellular biology* 15, 4240 (1995).
16. J. H. Kim, H. Kende, A transcriptional coactivator, AtGIF1, is involved in regulating leaf growth and morphology in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13374 (Sep 7, 2004).
17. D. Raventos *et al.*, HRT, a novel zinc finger, transcriptional repressor from barley. *The Journal of biological chemistry* 273, 23313 (Sep 4, 1998).
18. S. J. Triezenberg, Structure and function of transcriptional activation domains. *Current opinion in genetics & development* 5, 190 (Apr, 1995).
19. D. Choi, J. H. Kim, H. Kende, Whole genome analysis of the OsGRF gene family encoding plant-specific putative transcription activators in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant & cell physiology* 45, 897 (Jul, 2004).
20. H. Liu *et al.*, OsmiR396d-regulated OsGRFs function in floral organogenesis in rice through binding to their targets OsJM1706 and OsCR4. *Plant physiology* 165, 160 (May, 2014).
21. J. S. Kim *et al.*, Arabidopsis growth-regulating factor7 functions as a transcriptional repressor of abscisic acid- and osmotic stress-responsive genes, including DREB2A. *The Plant cell* 24, 3393 (Aug, 2012).
22. D.-F. Zhang *et al.*, Isolation and characterization of genes encoding GRF transcription factors and GIF transcriptional coactivators in Maize (*Zea mays* L.). *Plant Science* 175, 809 (2008).
23. J. M. Debernardi, R. E. Rodriguez, M. A. Mecchia, J. F. Palatnik, Functional specialization of the plant miR396 regulatory network through distinct microRNA-target interactions. *PLoS genetics* 8, e1002419 (Jan, 2012).
24. J. Bazin *et al.*, miR396 affects mycorrhization and root meristem activity in the legume *Medicago truncatula*. *Plant J* 74, 920 (Jun, 2013).
25. J. M. Debernardi *et al.*, Post-transcriptional control of GRF transcription factors by microRNA miR396 and GIF co-activator affects leaf size and longevity. *Plant J* 79, 413 (Aug, 2014).
26. M. Schmid *et al.*, A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nature genetics* 37, 501 (May, 2005).
27. L. Wang *et al.*, A dynamic gene expression atlas covering the entire life cycle of rice. *The Plant Journal* 61, 752 (2010).
28. B. Lemon, R. Tjian, Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes & development* 14, 2551 (Oct 15, 2000).

29. D. R. H. de Bruijn, A. Geurts van Kessel, Common origin of the human synovial sarcoma associated *SS18* and *SS18L1* gene loci. *Cytogenetic and Genome Research* 112, 222 (2006).
30. A. Ferjani, G. Horiguchi, S. Yano, H. Tsukaya, Analysis of leaf development in fugu mutants of *Arabidopsis* reveals three compensation modes that modulate cell expansion in determinate organs. *Plant physiology* 144, 988 (Jun, 2007).
31. L. Wu *et al.*, Overexpression of the maize GRF10, an endogenous truncated growth-regulating factor protein, leads to reduction in leaf size and plant height. *Journal of integrative plant biology* 56, 1053 (Nov, 2014).
32. L. Vercruyssen *et al.*, ANGUSTIFOLIA3 binds to SWI/SNF chromatin remodeling complexes to regulate transcription during *Arabidopsis* leaf development. *The Plant cell* 26, 210 (Jan, 2014).
33. C. R. Clapier, B. R. Cairns, The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry* 78, 273 (2009).
34. C. S. Kwon, D. Wagner, Unwinding chromatin for development and growth: a few genes at a time. *Trends in Genetics* 23, 403.
35. A. Jerzmanowski, SWI/SNF chromatin remodeling and linker histones in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1769, 330 (2007).
36. N. G. Bologna, O. Voinnet, The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. *Annual review of plant biology* 65, 473 (2014).
37. E. J. Chapman, J. C. Carrington, Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature reviews* 8, 884 (Nov, 2007).
38. J. C. Carrington, V. Ambros, Role of microRNAs in plant and animal development. *Science (New York, N.Y)* 301, 336 (Jul 18, 2003).
39. M. J. Axtell, Evolution of microRNAs and their targets: Are all microRNAs biologically relevant? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1779, 725 (2008).
40. O. Voinnet, Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136, 669 (Feb 20, 2009).
41. J. T. Cuperus, N. Fahlgren, J. C. Carrington, Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *The Plant cell* 23, 431 (Feb, 2011).
42. A. Shenoy, R. H. Blelloch, Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 565 (2014).
43. M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel, B. Bartel, MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual review of plant biology* 57, 19 (2006).

44. A. Kozomara, S. Griffiths-Jones, miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research* 42, D68 (2014).
45. Z. Xie *et al.*, Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant physiology* 138, 2145 (Aug, 2005).
46. B. J. Reinhart, E. G. Weinstein, M. W. Rhoades, B. Bartel, D. P. Bartel, MicroRNAs in plants. *Genes & development* 16, 1616 (Jul 1, 2002).
47. S. E. Schauer, S. E. Jacobsen, D. W. Meinke, A. Ray, *DICER-LIKE1*: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends in plant science* 7, 487.
48. M. H. Han, S. Goud, L. Song, N. Fedoroff, The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 1093 (Jan 27, 2004).
49. D. Lobbes, G. Rallapalli, D. D. Schmidt, C. Martin, J. Clarke, SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO Rep* 7, 1052 (Oct, 2006).
50. H. Vaucheret, Plant ARGONAUTES. *Trends in plant science* 13, 350.
51. D. P. Bartel, MicroRNAs. *Cell* 116, 281.
52. N. G. Bologna, J. L. Mateos, E. G. Bresso, J. F. Palatnik, A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *The EMBO journal* 28, 3646 (Dec 2, 2009).
53. M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel, Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular cell* 14, 787 (Jun 18, 2004).
54. R. E. Rodriguez *et al.*, Control of cell proliferation in Arabidopsis thaliana by microRNA miR396. *Development (Cambridge, England)* 137, 103 (2010, 2010).
55. J. H. Kim, B. H. Lee, GROWTH-REGULATING FACTOR4 of Arabidopsis thaliana is required for development of leaves, cotyledons, and shoot apical meristem. *Journal of Plant Biology* 49, 463 (2006).
56. B. H. Lee *et al.*, The Arabidopsis GRF-INTERACTING FACTOR Gene Family Performs an Overlapping Function in Determining Organ Size as well as Multiple Developmental Properties. *Plant physiology*, (Jul 31, 2009).
57. R. E. Rodriguez, J. M. Debernardi, J. F. Palatnik, Morphogenesis of simple leaves: regulation of leaf size and shape. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 3, 41 (2014).
58. P. M. Donnelly, D. Bonetta, H. Tsukaya, R. E. Dengler, N. G. Dengler, Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of Arabidopsis. *Developmental biology* 215, 407 (Nov 15, 1999).
59. H. Nelissen *et al.*, A local maximum in gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. *Curr Biol* 22, 1183 (Jul 10, 2012).

60. D. Liu, Y. Song, Z. Chen, D. Yu, Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in Arabidopsis. *Physiologia plantarum* 136, 223 (Jun, 2009).
61. D. Wagner, E. M. Meyerowitz, SPLAYED, a Novel SWI/SNF ATPase Homolog, Controls Reproductive Development in Arabidopsis. *Current Biology* 12, 85 (2002).
62. S. Farrona, L. Hurtado, J. L. Bowman, J. C. Reyes, The *Arabidopsis thaliana* SNF2 homolog AtBRM controls shoot development and flowering. *Development (Cambridge, England)* 131, 4965 (2004).
63. T. J. Sarnowski *et al.*, SWI3 Subunits of Putative SWI/SNF Chromatin-Remodeling Complexes Play Distinct Roles during Arabidopsis Development. *The Plant cell* 17, 2454 (September 1, 2005, 2005).
64. L. Hurtado, S. Farrona, J. C. Reyes, The putative SWI/SNF complex subunit BRAHMA activates flower homeotic genes in Arabidopsis thaliana. *Plant molecular biology* 62, 291 (2006//, 2006).
65. C. S. Kwon *et al.*, A role for chromatin remodeling in regulation of CUC gene expression in the *Arabidopsis* cotyledon boundary. *Development (Cambridge, England)* 133, 3223 (2006).
66. S. Bezhani *et al.*, Unique, Shared, and Redundant Roles for the Arabidopsis SWI/SNF Chromatin Remodeling ATPases BRAHMA and SPLAYED. *The Plant cell* 19, 403 (February 1, 2007, 2007).
67. R. Archacki *et al.*, Genetic analysis of functional redundancy of BRM ATPase and ATSWI3C subunits of Arabidopsis SWI/SNF chromatin remodelling complexes. *Planta* 229, 1281 (2009//, 2009).
68. N. Gonzalez *et al.*, Increased leaf size: different means to an end. *Plant physiology* 153, 1261 (Jul, 2010).
69. B. H. Lee *et al.*, The Arabidopsis thaliana GRF-INTERACTING FACTOR gene family plays an essential role in control of male and female reproductive development. *Developmental biology* 386, 12 (Feb 1, 2014).
70. J. Candaele *et al.*, Differential Methylation during Maize Leaf Growth Targets Developmentally Regulated Genes. *Plant physiology* 164, 1350 (March 1, 2014, 2014).
71. P. O. Lim, H. J. Kim, H. G. Nam, Leaf senescence. *Annual review of plant biology* 58, 115 (2007).
72. L. Dolan *et al.*, Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development (Cambridge, England)* 119, 71 (Sep, 1993).
73. M. Aida *et al.*, The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell* 119, 109 (Oct 1, 2004).
74. C. van den Berg, V. Willemsen, G. Hendriks, P. Weisbeek, B. Scheres, Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* 390, 287 (Nov 20, 1997).

75. C. Galinha *et al.*, PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* 449, 1053 (Oct 25, 2007).
76. S. Sabatini, R. Heidstra, M. Wildwater, B. Scheres, SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes & development* 17, 354 (Feb 1, 2003).
77. L. Di Laurenzio *et al.*, The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* 86, 423 (Aug 9, 1996).
78. Y. Helariutta *et al.*, The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell* 101, 555 (May 26, 2000).
79. G. Sena, J. W. Jung, P. N. Benfey, A broad competence to respond to SHORT ROOT revealed by tissue-specific ectopic expression. *Development (Cambridge, England)* 131, 2817 (Jun, 2004).
80. K. Nakajima, G. Sena, T. Nawy, P. N. Benfey, Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413, 307 (Sep 20, 2001).
81. M. P. Levesque *et al.*, Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in Arabidopsis. *PLoS biology* 4, e143 (May, 2006).
82. Y. Matsuzaki, M. Ogawa-Ohnishi, A. Mori, Y. Matsubayashi, Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in Arabidopsis. *Science (New York, N.Y)* 329, 1065 (Aug 27, 2010).
83. J. J. Petricka, C. M. Winter, P. N. Benfey, Control of Arabidopsis Root Development. *Annual review of plant biology*, (Feb 9, 2012).
84. J.-P. Verbelen, T. De Cnodder, J. Le, K. Vissenberg, F. Baluška, The Root Apex of Arabidopsis thaliana Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone. *Plant signaling & behavior* 1, 296 (Nov-Dec, 2006).
85. D. J. Cosgrove, How Do Plant Cell Walls Extend? *Plant physiology* 102, 1 (May 1, 1993, 1993).
86. G. T. Beemster, T. I. Baskin, Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in Arabidopsis thaliana. *Plant physiology* 116, 1515 (Apr, 1998).
87. A. P. Mahonen *et al.*, PLETHORA gradient formation mechanism separates auxin responses. *Nature* 515, 125 (Nov 6, 2014).
88. P. N. Benfey, B. Scheres, Root development. *Curr Biol* 10, R813 (Nov 16, 2000).
89. D. Hanahan, Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557 (Jun 05, 1983).

90. P. Jarvis *et al.*, An Arabidopsis mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science (New York, N.Y)* 282, 100 (Oct 2, 1998).
91. J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).
92. D. Weigel, J. Glazebrook, *Arabidopsis : a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor (N.Y.) : Cold Spring Harbor laboratory press, 2002).
93. T. Murashige, F. Skoog, A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia plantarum* 15, 473 (1962).
94. J. Schindelin *et al.*, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9, 676 (Jul, 2012).
95. S. Perilli, S. Sabatini, Analysis of root meristem size development. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J)* 655, 177 (2010).
96. J. G. DUBROVSKY, L. CONTRERAS-BURCIAGA, V. B. IVANOV, Cell Cycle Duration in the Root Meristem of Sonoran Desert Cactaceae as Estimated by Cell-flow and Rate-of-cell-production Methods. *Annals of botany* 81, 619 (May 1, 1998, 1998).
97. C. Chen *et al.*, Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research* 33, e179 (2005).
98. M. W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29, e45 (2001).
99. T. Czechowski, M. Stitt, T. Altmann, M. K. Udvardi, W. R. Scheible, Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant physiology* 139, 5 (Sep, 2005).
100. S. Anders *et al.*, Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat. Protocols* 8, 1765 (2013).
101. Z. Du, X. Zhou, Y. Ling, Z. Zhang, Z. Su, agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic acids research* 38, W64 (2010).
102. A. Pajoro *et al.*, Dynamics of chromatin accessibility and gene regulation by MADS-domain transcription factors in flower development. *Genome biology* 15, R41 (2014).
103. T. Hewezi, T. R. Maier, D. Nettleton, T. J. Baum, The Arabidopsis microRNA396-GRF1/GRF3 regulatory module acts as a developmental regulator in the reprogramming of root cells during cyst nematode infection. *Plant physiology* 159, 321 (May, 2012).
104. S. M. Brady *et al.*, A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science (New York, N.Y)* 318, 801 (Nov 2, 2007).

105. J. M. Franco-Zorrilla *et al.*, Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature genetics* 39, 1033 (Aug, 2007).
106. M. Todesco, I. Rubio-Somoza, J. Paz-Ares, D. Weigel, A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics* 6, e1001031 (Jul, 2010).
107. S. Polyn, A. Willems, L. De Veylder, Cell cycle entry, maintenance, and exit during plant development. *Current opinion in plant biology* 23, 1 (Feb, 2015).
108. M. Menges, S. M. de Jager, W. Gruissem, J. A. Murray, Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* 41, 546 (Feb, 2005).
109. B. Berckmans, L. De Veylder, Transcriptional control of the cell cycle. *Current opinion in plant biology* 12, 599 (Oct, 2009).
110. L. De Veylder, T. Beeckman, D. Inze, The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 655 (Aug, 2007).
111. A. Campilho, B. Garcia, H. V. Toorn, H. V. Wijk, B. Scheres, Time-lapse analysis of stem-cell divisions in the *Arabidopsis thaliana* root meristem. *Plant J* 48, 619 (Nov, 2006).
112. T. L. Rost, The organization of roots of dicotyledonous plants and the positions of control points. *Ann Bot* 107, 1213 (May, 2011).
113. V. Willemsen *et al.*, The NAC domain transcription factors FEZ and SOMBRERO control the orientation of cell division plane in *Arabidopsis* root stem cells. *Developmental cell* 15, 913 (Dec, 2008).
114. T. Bennett *et al.*, SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 regulate root cap maturation in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 22, 640 (Mar, 2010).
115. M. Fendrych *et al.*, Programmed cell death controlled by ANAC033/SOMBRERO determines root cap organ size in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 24, 931 (May 5, 2014).
116. R. Sozzani *et al.*, Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* 466, 128 (Jul 1, 2010).
117. A. Cruz-Ramirez *et al.*, A bistable circuit involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA integrates cues to inform asymmetric stem cell division. *Cell* 150, 1002 (Aug 31, 2012).
118. N. W. Breakfield *et al.*, High-resolution experimental and computational profiling of tissue-specific known and novel miRNAs in *Arabidopsis*. *Genome research* 22, 163 (Jan, 2012).
119. D. H. Jeong *et al.*, Comprehensive investigation of microRNAs enhanced by analysis of sequence variants, expression patterns, ARGONAUTE loading, and target cleavage. *Plant physiology* 162, 1225 (Jul, 2013).

120. T. Nawy *et al.*, Transcriptional profile of the Arabidopsis root quiescent center. *The Plant cell* 17, 1908 (Jul, 2005).
121. C. Liang, X. Liu, Y. Sun, S.-M. Yiu, B. L. Lim, Global small RNA analysis in fast-growing Arabidopsis thaliana with elevated concentrations of ATP and sugars. *BMC Genomics* 15, 116 (2014).
122. C. Schommer, J. M. Debernardi, E. G. Bresso, R. E. Rodriguez, J. F. Palatnik, Repression of cell proliferation by miR319-regulated TCP4. *Molecular plant* 7, 1533 (Oct, 2014).
123. I. Efroni, E. Blum, A. Goldshmidt, Y. Eshed, A protracted and dynamic maturation schedule underlies Arabidopsis leaf development. *The Plant cell* 20, 2293 (Sep, 2008).
124. N. M. Kerk, K. Jiang, L. J. Feldman, Auxin metabolism in the root apical meristem. *Plant physiology* 122, 925 (Mar, 2000).
125. M. Kanei, G. Horiguchi, H. Tsukaya, Stable establishment of cotyledon identity during embryogenesis in Arabidopsis by ANGUSTIFOLIA3 and HANABA TARANU. *Development (Cambridge, England)* 139, 2436 (Jul, 2012).
126. H. Nelissen *et al.*, Dynamic Changes in ANGUSTIFOLIA3 Complex Composition Reveal a Growth Regulatory Mechanism in the Maize Leaf. *The Plant cell* 27, 1605 (Jun, 2015).
127. M. Nagai *et al.*, Analysis of transforming activity of human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT-SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRM/hSNF2 alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 3843 (Mar 27, 2001).
128. M. Perani, C. J. Ingram, C. S. Cooper, M. D. Garrett, G. H. Goodwin, Conserved SNH domain of the proto-oncoprotein SYT interacts with components of the human chromatin remodelling complexes, while the QPGY repeat domain forms homo-oligomers. *Oncogene* 22, 8156 (Nov 6, 2003).
129. K. Hiratsu, K. Matsui, T. Koyama, M. Ohme-Takagi, Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis. *Plant J* 34, 733 (Jun, 2003).
130. L. Santuari *et al.*, The PLETHORA gene regulatory network guides growth and cell differentiation in Arabidopsis roots. *The Plant cell*, (December 5, 2016, 2016).
131. S. Yang *et al.*, The Arabidopsis SWI2/SNF2 Chromatin Remodeling ATPase BRAHMA Targets Directly to PINs and Is Required for Root Stem Cell Niche Maintenance. *The Plant cell* 27, 1670 (Jun, 2015).
132. S.-K. Han *et al.*, The SWI2/SNF2 Chromatin Remodeling ATPase BRAHMA Represses Abscisic Acid Responses in the Absence of the Stress Stimulus in Arabidopsis. *The Plant cell* 24, 4892 (December 1, 2012, 2012).
133. H. Tian, Y. Jia, T. Niu, Q. Yu, Z. Ding, The key players of the primary root growth and development also function in lateral roots in Arabidopsis. *Plant Cell Reports* 33, 745 (2014).

134. J. J. Petricka *et al.*, The protein expression landscape of the Arabidopsis root. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (Mar 23, 2012).
135. E. Truernit *et al.*, High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of Phloem development and structure in Arabidopsis. *The Plant cell* 20, 1494 (Jun, 2008).
136. O. Ortega-Martínez, M. Pernas, R. J. Carol, L. Dolan, Ethylene Modulates Stem Cell Division in the Arabidopsis thaliana Root. *Science (New York, N.Y)* 317, 507 (2007).
137. M. Vanstraelen *et al.*, APC/CCCS52A complexes control meristem maintenance in the Arabidopsis root. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 11806 (July 14, 2009, 2009).
138. Q. Chen *et al.*, The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor MYC2 Directly Represses PLETHORA Expression during Jasmonate-Mediated Modulation of the Root Stem Cell Niche in Arabidopsis. *The Plant cell* 23, 3335 (September 1, 2011, 2011).
139. M. P. Gonzalez-Garcia *et al.*, Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development (Cambridge, England)* 138, 849 (Mar, 2011).
140. Y. Sang *et al.*, Mutations in two non-canonical Arabidopsis SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPases cause embryogenesis and stem cell maintenance defects. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 72, 1000 (2012).
141. K. Kawade, G. Horiguchi, H. Tsukaya, Non-cell-autonomously coordinated organ size regulation in leaf development. *Development (Cambridge, England)* 137, 4221 (Dec, 2010).
142. L. Wang *et al.*, miR396-targeted AtGRF transcription factors are required for coordination of cell division and differentiation during leaf development in Arabidopsis. *Journal of experimental botany* 62, 761 (2011).
143. G. Horiguchi *et al.*, ANGUSTIFOLIA3 plays roles in adaxial/abaxial patterning and growth in leaf morphogenesis. *Plant & cell physiology* 52, 112 (Jan, 2011).
144. M. A. Mecchia, J. M. Debernardi, R. E. Rodriguez, C. Schommer, J. F. Palatnik, MicroRNA miR396 and RDR6 synergistically regulate leaf development. *Mech Dev*, (Aug 4, 2012).
145. A. Lloyd, M. Schena, V. Walbot, R. Davis, Epidermal cell fate determination in Arabidopsis: patterns defined by a steroid-inducible regulator. *Science (New York, N.Y)* 266, 436 (1994).
146. A. Fernandez *et al.*, Transcriptional and Functional Classification of the GOLVEN/ROOT GROWTH FACTOR/CLE-Like Signaling Peptides Reveals Their Role in Lateral Root and Hair Formation. *Plant physiology* 161, 954 (2013).
147. S. Ghorbani *et al.*, The SBT6.1 subtilase processes the GOLVEN1 peptide controlling cell elongation. *Journal of experimental botany* 67, 4877 (2016).

148. Y. Ou *et al.*, RGF1 INSENSITIVE 1 to 5, a group of LRR receptor-like kinases, are essential for the perception of root meristem growth factor 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Res* 26, 686 (2016).
149. R. E. Rodriguez *et al.*, MicroRNA miR396 Regulates the Switch between Stem Cells and Transit-Amplifying Cells in *Arabidopsis* Roots. *The Plant cell* 27, 3354 (Dec, 2015).
150. Ronan C. O'Malley *et al.*, Cistrome and Epicistrome Features Shape the Regulatory DNA Landscape. *Cell* 165, 1280.
151. C. Li *et al.*, Concerted genomic targeting of H3K27 demethylase REF6 and chromatin-remodeling ATPase BRM in *Arabidopsis*. *Nature genetics* 48, 687 (2016).