



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Regulación transcripcional de PIN3 durante el crecimiento  
secundario en *Arabidopsis thaliana*

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Sandoval Cabañero, Lucía

Tutor/a: Agusti Feliu, Javier

Cotutor/a externo: Brunot Garau, Paula

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

# Regulación transcripcional de *PIN3* durante el crecimiento secundario en *Arabidopsis thaliana*

## RESUMEN

El desarrollo de los organismos multicelulares requiere la coordinación de múltiples programas de crecimiento. En plantas, el tallo experimenta dos tipos de crecimiento: el longitudinal (primario) y el radial (secundario). Este trabajo investiga cómo el tallo de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* responde al incremento de peso derivado del crecimiento longitudinal, estimulando su crecimiento radial. Para ello, se centró en la función de la proteína transportadora de auxinas PIN-FORMED 3 (*PIN3*) en el desarrollo de la vasculatura secundaria y su regulación transcripcional en este proceso. Se realizaron experimentos que combinaron una búsqueda *in silico* de factores de transcripción reguladores de *PIN3* y la posterior comprobación de su efecto mediante ensayos de transactivación *in vitro*, además de análisis histológicos de plantas mutantes insensibles al etileno. Los resultados sugieren que (i) la respuesta al incremento peso en forma de crecimiento radial podría implicar la participación de factores de transcripción clave, y (ii) el etileno podría estar implicado en la regulación de *PIN3*. Este conocimiento puede ser útil para entender cómo se coordinan distintos programas de crecimiento durante el desarrollo y podría facilitar aplicaciones biotecnológicas encaminadas a mejorar la resistencia estructural de las plantas y optimizar su crecimiento en condiciones de estrés.

**Palabras clave:** auxina, *PIN3*, crecimiento secundario, etileno, factores de transcripción

Autora: Lucia Sandoval Cabañero

Tutor: Javier Agustí Feliu

Cotutora: Paula Brunot Garau

València, Julio 2024

# Transcriptional regulation of *PIN3* during secondary growth in *Arabidopsis thaliana*

## ABSTRACT

The development of multicellular organisms requires the coordination of multiple growth programs. In plants, the stem undergoes two types of growth: longitudinal (primary) and radial (secondary). This study investigates how the stem of the model plant *Arabidopsis thaliana* responds to increased weight resulting from longitudinal growth, stimulating its radial growth. More specifically, the focus was on the role of the auxin transporter protein PIN-FORMED 3 (*PIN3*) in the development of secondary vasculature and its transcriptional regulation in this process. Experiments combined *in silico* searches for transcription factors regulating *PIN3* with subsequent validation through *in vitro* transactivation assays, as well as histological analysis of ethylene-insensitive mutant plants. The results suggest that (i) the response to increased weight in the form of radial growth may involve key transcription factors, and (ii) ethylene may be implicated in the regulation of *PIN3*. This knowledge can be useful for understanding how different growth programs are coordinated during development and could facilitate biotechnological applications aimed at improving plant structural resistance and optimizing growth under stress conditions.

**Keywords:** auxin, *PIN3*, secondary growth, ethylene, transcription factors

Author: Lucia Sandoval Cabañero

Tutor: Javier Agustí Feliu

Cotutor: Paula Brunot Garau

València, Julio 2024

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mi tutor, Javier Agustí, por su confianza, cercanía y orientación. A mi cotutora, Paula Brunot, por su implicación, dedicación y paciencia constantes, gracias a los cuales este proyecto ha sido llevado a cabo. A Cris y Santi, por brindarme ayuda siempre que la necesitara y recibirme todos los días con una sonrisa sincera. Gracias a todos por los conocimientos adquiridos, por integrarme como un miembro más del laboratorio y haber hecho de mi experiencia en la investigación, algo agradable, estimulante y un posible camino a desarrollar en un futuro cercano.*

*Gracias a mis amigos compañeros de carrera, que han estado ahí desde el principio y con los que he compartido largos días dentro y fuera de la universidad.*

*Gracias a toda la gente a la que quiero y que me quiere, mis amigos y familia, por animarme, motivarme y apoyarme incondicionalmente. Gracias por dar forma a la persona que soy hoy en día.*

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Los meristemas regulan el crecimiento en las plantas .....	1
1.2 Desarrollo vascular .....	1
1.3 Crecimiento secundario .....	2
1.4 El cambium integra señales internas y ambientales durante su desarrollo .....	3
1.5 Regulación hormonal.....	3
1.5.1 Auxina .....	4
1.5.2 Transportadores de auxina: Familia PIN .....	5
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>7</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>8</b>
3.1 Material vegetal.....	8
3.1.1 <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	8
3.1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	8
3.2 Análisis histológico.....	9
3.3 Búsqueda <i>in silico</i> de factores de transcripción reguladores de <i>PIN3</i> .....	10
3.4 Ensayo de transactivación transcripcional .....	11
3.4.1 Construcción de plásmidos.....	11
3.4.2 Agroinfiltración .....	15
3.4.3 Ensayo de luciferasa .....	16
3.5 Análisis estadístico .....	16
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>17</b>
4.1 Estudio de mutantes sometidos a peso .....	17
4.2 Identificación de potenciales factores de transcripción reguladores de la expresión de <i>PIN3</i> utilizando un enfoque <i>in silico</i> .....	19
4.3 Estudio del efecto de ERF2 sobre la expresión de <i>PIN3</i> .....	21
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>24</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>25</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la organización vascular primaria en <i>Arabidopsis</i> .....	2
<b>Figura 2.</b> PIN3 es fundamental para el crecimiento secundario debido a peso. ....	5
<b>Figura 3.</b> Transporte polar de auxina mediante transportadores PIN. ....	5
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de la metodología empleada para el tratamiento con peso en <i>Arabidopsis</i> .....	9
<b>Figura 5.</b> Cuantificación de parámetros vasculares en base de tallo de <i>Arabidopsis</i> . ....	10
<b>Figura 6.</b> Ensamblaje multipartito por reacción <i>GoldenBraid</i> .....	13
<b>Figura 7.</b> Análisis histológico de base de tallo en <i>Arabidopsis</i> . ....	18
<b>Figura 8.</b> Esquema representativo del proceso de agroinfiltración y ensayo de luciferasa. ....	21
<b>Figura 9.</b> Estudio de la interacción entre <i>pPIN3</i> y el FT ERF2 mediante ensayo de luciferasa. ....	22

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cebadores utilizados en la domesticación <i>GoldenBraid</i> .....	12
<b>Tabla 2.</b> Plásmidos empleados en el clonaje <i>GoldenBraid</i> .....	14
<b>Tabla 3.</b> Cebadores empleados en la secuenciación .....	15
<b>Tabla 4.</b> Potenciales FTs de <i>PIN3</i> ordenados según niveles de expresión en el tallo de <i>Arabidopsis</i> .....	19
<b>Tabla 5.</b> Genes comunes a los obtenidos en “Regulation” y habitualmente co- expresados con <i>PIN3</i> .....	20
<b>Tabla 6.</b> Genes comunes a los obtenidos en “Regulation” y el análisis transcriptómico de Ko <i>et al.</i> , (2004).....	20
<b>Tabla 7.</b> Genes comunes a los obtenidos en “Regulation” y análisis transcriptómico de mutantes <i>wox</i> (Suer <i>et al.</i> , 2011).....	20
<b>Tabla 8.</b> Genes comunes a los obtenidos en “Binding” y el análisis transcriptómico de Ko <i>et al.</i> , (2004).....	20

## RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE (ODS)

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				x
ODS 2. Hambre cero.			x	x
ODS 3. Salud y bienestar.				x
ODS 4. Educación de calidad.				x
ODS 5. Igualdad de género.				x
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				x
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.	x			
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				x
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.		x		
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				x
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				x
ODS 12. Producción y consumo responsables.				x
ODS 13. Acción por el clima.			x	
ODS 14. Vida submarina.				x
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				x
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				x
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				x

Este Trabajo Final de Grado presenta un alto grado de relación con el ODS: Energía asequible y no contaminante. La madera representa una importante fuente de energía renovable. Este trabajo estudia una pequeña parte de los complejos mecanismos moleculares responsables del desarrollo de este tejido vascular vegetal, por lo que en un futuro conocer cómo se forma este importante biocombustible podría resultar en un aumento de su producción mediante herramientas biotecnológicas.

Además de ser una de las principales fuentes de energía renovable, la madera es un importante material cuyas propiedades podrían ser diseñadas con fines industriales. Por esta razón cumple un grado de relación medio con el ODS: Industria, innovación e infraestructuras.

Finalmente, cumple un grado bajo de relación con los ODSs “Acción por el clima” y “Hambre cero”. Dado que la madera es uno de los principales sumideros de CO<sub>2</sub> atmosférico, entender su proceso de desarrollo es relevante en relación con la mejora de la calidad del aire. Adicionalmente, el conocimiento molecular de la coordinación de procesos de crecimiento podría facilitar el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas en el campo de la agricultura encaminadas a mejorar la resistencia de las plantas y optimizar su crecimiento en condiciones de estrés.



## ABREVIATURAS

3xF: Etiqueta triple flag

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AIA: Ácido indol-3-acético

AmpR: Gen de resistencia a ampicilina

*Arabidopsis: Arabidopsis thaliana*

AP2: APETALA 2

*A. tumefaciens: Agrobacterium tumefaciens*

CamR: Gen de resistencia a cloranfenicol

Col-0: Ecotipo de *Arabidopsis thaliana* Columbia 0

DOF: DNA binding with one finger

*E.coli: Escherichia coli*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

*ein2-5*: Mutante ethylene insensitive 2-5

ERF: Ethylene Responsive Factor

ESE3: Ethylene and Salt inducible 3

FAE: Formaldehido Acetato glacial Etanol

FT: Factor de transcripción

g: Gramos

HCA2: High Cambial Activity 2

IPTG: Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido

KanR: Gen de resistencia a la kanamicina

L: Litro

LB: Luria Bertani

LUC: Luciferasa de luciérnaga

M: Molar

MES: Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

*N. benthamiana: Nicotiana benthamiana*

NPA: Ácido N1-naftalámico

p19: Proteína viral supresora del silenciamiento por ARN

p35s: Promotor 35s del Virus del Mosaico de la Coliflor

pb: Par de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

pDGB: Vector destino

PIN: Familia de proteínas PIN-FORMED

pPIN3: Promotor de PIN3

pUPD2: Vector de entrada

*Populus: Populus Tremula*

PXY: Receptor de tipo kinasa Phloem and Xylem Inducing

RAM: Root Apical Meristem

REN: Luciferasa de *Renilla Reniformis*

SAM: Shoot Apical Meristem

SpmR: Gen de resistencia a espectinomicina

TAE: Tris Acetato EDTA

TCI: Tejido derivado del Cambium Interfascicular

Tnos: Terminador Nos del plásmido Ti de *A.tumefaciens*

u: Unidad

V: Voltio

v/v: Porcentaje volumen a volumen

WOX4: Factor de transcripción WUSCHEL RELATED HOMEBOX 4

WT: Wild type

X-Gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

# 1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los organismos multicelulares implica la coordinación de múltiples programas de crecimiento. En las plantas, podemos encontrar un ejemplo claro en este sentido en el desarrollo del tallo, en el que coexisten dos tipos de crecimiento: el longitudinal (o primario) y el radial (o secundario). La coordinación de ambos programas de crecimiento es clave para que la parte aérea de la planta pueda maximizar sus capacidades de crecimiento, ya que el crecimiento radial provee al tallo de la estabilidad y robustez que necesita para poder sostener todas sus estructuras y mantener su elongación. En este contexto, este proyecto se centra en entender cómo el tallo de las plantas responde al incremento de su peso estimulando su crecimiento radial.

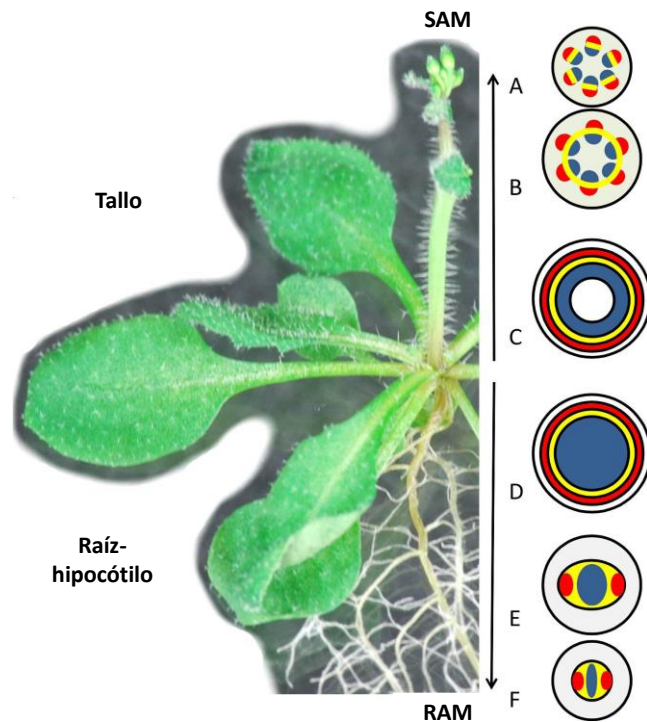
## **1.1 Los meristemos regulan el crecimiento en las plantas**

El crecimiento de las plantas se produce a partir de divisiones celulares que tienen lugar en focos de crecimiento denominados meristemos. En general, podemos distinguir entre dos tipos de meristemos: los primarios y los secundarios. Los meristemos primarios son de origen embrionario, se mantienen activos durante todo el ciclo vital de la planta y son el origen de todos los tejidos y tipos celulares observables en la planta. Estos meristemos son el meristemo apical de la raíz (RAM) y el meristemo apical del tallo (SAM), los cuales impulsan la elongación de la raíz y el tallo, respectivamente. Los meristemos secundarios se establecen post-embrionariamente y dan lugar a estructuras laterales (como ramas y raíces laterales) así como al crecimiento radial (secundario). Este crecimiento secundario está mediado por la actividad del cambium, el cual genera, exclusivamente, vasculatura secundaria.

## **1.2 Desarrollo vascular**

El sistema vascular de las plantas cumple dos funciones principales: el transporte a larga distancia y el soporte mecánico. Este sistema está compuesto por tres tejidos principales: el xilema (madera), el floema (corteza) y el (pro)cambium. Las células del xilema, con gruesas paredes celulares secundarias ricas en celulosa, hemicelulosa y lignina, cumplen una doble función. Por una parte, son las encargadas del transporte de agua y nutrientes minerales. Esto genera una gran presión hidráulica que se contrarresta, precisamente, desarrollando el ya mencionado refuerzo de sus paredes secundarias. A consecuencia de este refuerzo, las células del xilema son también las principales responsables de proporcionar soporte mecánico a la planta. El floema se encarga del transporte de fotoasimilados y moléculas de señalización tales como las hormonas vegetales y los péptidos. El (pro)cambium es un conjunto de células madre programadas para generar xilema y floema, y se localiza entre el xilema y el floema. La especialización de los tejidos vasculares primarios viene determinada por la actividad del RAM y el SAM.

Generalmente, el patrón anatómico de la vasculatura primaria difiere entre los órganos aéreos y subterráneos de plantas vasculares. En raíces, por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana*, modelo experimental de este trabajo, el tejido vascular primario se dispone en un único haz que sigue una simetría diarca, con el xilema formando un eje central flanqueado por dos polos de floema y células procambiales situadas entre el eje y los polos. Haga clic o pulse aquí para escribir texto. Por otra parte, el tallo presenta varios haces vasculares distribuidos de forma discreta siguiendo un patrón circular. Cada uno de estos haces vasculares contiene xilema en la parte más interior de la planta, floema en la más exterior y procambium en la zona que queda entre ambos tejidos (Figura 1).



**Figura 1. Representación esquemática de la organización vascular primaria en Arabidopsis.**

La anatomía vascular primaria difiere entre órganos aéreos o tallo (A-C) y órganos subterráneos (D-F). Xilema=azul; Floema=rojo; (Pro)cambium= amarillo. Fuente: Nieminen et al., 2015.

### **1.3 Crecimiento secundario**

Los tejidos vasculares secundarios se desarrollan radialmente en un proceso conocido como crecimiento secundario que da lugar al engrosamiento de tallos, raíces e hipocótilo. El crecimiento secundario proporciona una mayor capacidad de transporte, así como soporte mecánico y estabilidad. En términos evolutivos, la aparición de este tipo de crecimiento supuso una importante ventaja, dado que la adquisición de fuerza biomecánica permitió aumentar la altura de la planta, con el beneficio de una mayor competencia por la luz solar, rendimiento fotosintético y capacidad de adaptación a una amplia gama de condiciones ambientales (revisado por Lucas et al., 2013). El xilema acumula la mayor parte de la biomasa vegetal en la tierra, siendo, por tanto una importante fuente de materiales y energías renovables, así como uno de los principales sumideros de CO<sub>2</sub> atmosférico. Por estas razones, se han realizado esfuerzos para identificar los mecanismos genéticos y moleculares subyacentes de la especificación, proliferación y patrón de desarrollo de los tejidos vasculares de las plantas (Shi et al., 2021; Sundell et al., 2017; Zhang et al., 2019).

El estudio del crecimiento secundario se ve dificultado por características intrínsecas de las especies arbóreas como prolongado tiempo de generación, gran tamaño y falta de líneas genéticamente puras. Pese a ello, numerosos estudios revelan a *Arabidopsis* como buen modelo de estudio puesto que esta especie experimenta crecimiento secundario en el tallo, raíz e hipocótilo (Ko et al., 2004; Little et al., 2002) y presenta no sólo los mismos factores reguladores durante el desarrollo primario y secundario que las especies arbóreas sino también una anatomía secundaria análoga (Chaffey et al., 2002; Zhang et al., 2011).

El cambium vascular es el meristemo secundario responsable de la formación de tejidos vasculares secundarios y se forma diferencialmente en el tallo, hipocótilos y raíz de *Arabidopsis*. En el tallo, el cambium vascular se desarrolla en dos regiones diferentes: en los haces vasculares y entre ellos. El cambium fascicular se forma cuando las células procambiales entre el xilema y

el floema primario de los haces vasculares comienzan a dividirse periclinalmente (paralelas al eje de la planta). El cambium desarrollado entre los haces vasculares se denomina cambium interfascicular, y está compuesto por nuevas células cambiales provenientes de la proliferación y transdiferenciación de las regiones interfasciculares de la endodermis, la capa celular cortical más interna de los tallos. La formación de cambium fascicular es anterior a la formación del cambium interfascicular, cuyo desarrollo progresa lateralmente, interconectando los cambia fasciculares para finalmente obtener un anillo continuo de cambium al que se denomina “cambium vascular” (Mazur et al., 2014; Altamura et al., 2001).

#### **1.4 El cambium integra señales internas y ambientales durante su desarrollo**

La proliferación del cambium vascular y, por ende, la formación de tejidos vasculares secundarios varía en respuesta a señales medioambientales e internas. Las señales medioambientales que la regulan son variadas, incluyendo desde variaciones de temperatura y luz a estrés mecánico, disponibilidad de agua o concentración de sales en la tierra (revisado por Agustí & Blázquez, 2020). Por ejemplo, fuerzas mecánicas y gravitacionales como el viento y la inclinación de la planta tienen efecto en el desarrollo secundario, aumentando el grosor del tallo para evitar su ruptura o resultando en un crecimiento asimétrico para corregir la posición de la planta (revisado por Telewski, 2006). Asimismo, señales internas como el propio peso de la planta, derivado del crecimiento longitudinal y ejercido a lo largo de su eje vertical, contribuyen significativamente al desarrollo secundario (Ko et al., 2004).

#### **1.5 Regulación hormonal**

La regulación de la formación de tejido vascular está coordinada de manera precisa por las distintas hormonas vegetales. La aplicación externa de citoquininas deriva en un aumento de grosor del tallo en *Arabidopsis*, y los niveles de esta hormona están fuertemente regulados por cambios ambientales (Matsumoto-Kitano et al., 2008; Ye et al., 2021). Las giberelinas son esenciales para la formación de fibras del xilema, tejido asociado a la fase de expansión del crecimiento secundario, por lo que regulan de manera positiva la acumulación de madera (Chaffey et al., 2002; Mäkilä et al., 2023). El ácido jasmónico, hormona tradicionalmente asociada a la respuesta frente a heridas y estrés mecánico, ha demostrado participar en la regulación y desarrollo del cambium vascular estimulado por fuerzas mecánicas como el peso (Sehr et al., 2010). Asimismo, el etileno es otra hormona cuyo rol en la señalización de estímulos mecánicos en el cambium vascular está bien establecido en *Populus* (Love et al., 2009). Sin embargo, como se explica en mayor detalle en el siguiente párrafo, de entre todas las hormonas, la auxina es la que presenta mayor implicación en el desarrollo vascular y, como sucede en otros procesos del desarrollo, las estrigolactonas interaccionan con la auxina y actúan aguas abajo de la señalización para la formación de tejidos vasculares secundarios (Agusti et al., 2011).

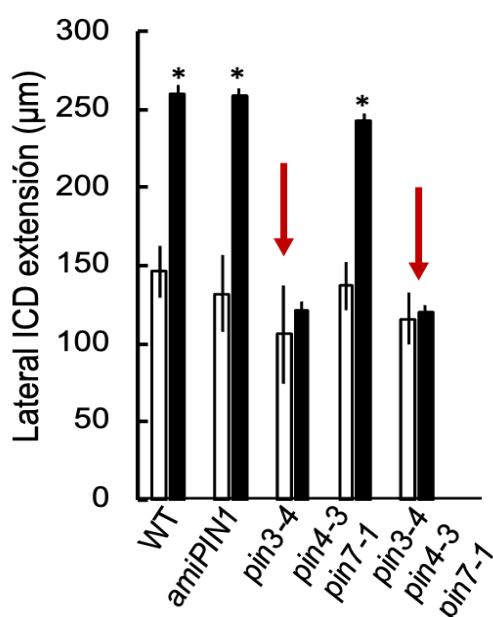
### 1.5.1 Auxina

El ácido indol-3-acético (AIA) es la principal auxina en plantas, hormona que, mediante cambios en su acumulación y distribución, integra numerosas señales medioambientales e internas controlando una gran variedad de procesos del desarrollo como embriogénesis, organogénesis, formación de patrones tisulares y tropismos (revisado por Vanneste & Friml, 2009). En relación con el crecimiento secundario, se ha demostrado que la auxina se transporta basipitalmente en el tallo (del ápice a la base) y que está implicada en la determinación de la polaridad en los tejidos vasculares secundarios (Kramer et al., 2008; Schrader et al., 2003; Brackmann et al., 2018; Suer et al., 2011) habiendo sido observada la desregulación espacial de la división celular del cambium mediante el estudio de mutantes con capacidad reducida de respuesta a auxina en *Populus* (Nilsson et al., 2008).

Por otro lado, la decapitación o el ácido N1-naftalámico (NPA), un inhibidor de transportadores de auxinas, han sido métodos ampliamente utilizados para el estudio del desarrollo del cambium vascular (Little et al., 2002; Suer et al., 2011; Sundberg et al., 1994). Dado que el ápice representa una fuente importante de auxina, el desarrollo del cambium fascicular e interfascicular puede inhibirse mediante la decapitación de la parte superior del tallo, pudiéndose reestablecer posteriormente mediante un tratamiento con AIA (Little et al., 2002). Del mismo modo, el tratamiento local del tallo con NPA conduce a la acumulación de auxina por encima de la posición del tratamiento y estimula la actividad cambial en esa zona (Little et al., 2002; Suer et al., 2011).

En este contexto, un estudio realizado por Ko *et al.*, (2004) observó que el inicio de la diferenciación de cambium vascular para el desarrollo de crecimiento secundario en *Arabidopsis* está correlacionado con la altura de la planta y, por ende, del peso soportado por esta, lo cual fue confirmado mediante un tratamiento con peso artificial. Otro resultado interesante de este mismo estudio se dio al observar plantas decapitadas sometidas a peso artificial y tratadas con o sin ácido naftalenacético, una auxina sintética. De entre las plantas decapitadas, únicamente las sometidas a peso y tratadas con ácido naftalenacético presentaron un aumento de xilema secundario considerable, por lo que se llegó a las conclusiones de que (i) el desarrollo de xilema secundario se ve facilitado por la aplicación de peso en el tallo y (ii) la auxina generada en el ápice es necesaria para este crecimiento secundario derivado de la acción del peso.

En base a estos resultados, el laboratorio de acogida de este trabajo planteó que el transporte de auxinas es importante para el efecto inductor de crecimiento secundario debido a peso. Para probar esta hipótesis, se sometieron a tratamiento de adición de peso artificial plantas de *Arabidopsis* mutantes para los transportadores de auxinas de la familia PIN principales del tallo. Todos los genotipos mutantes testados respondieron de forma análoga al WT, excepto aquellos que contenían mutación en el gen *PIN3*, lo cual implica que *PIN3* es necesario para la respuesta de las plantas al peso en forma de crecimiento radial (Figura 2).

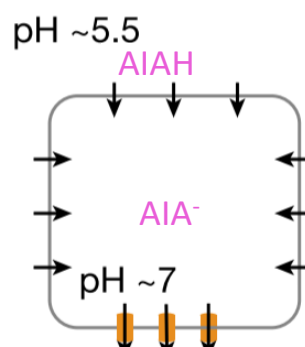


**Figura 2. PIN3 es fundamental para el crecimiento secundario debido a peso.** Representación gráfica de las diferencias en el parámetro medido (extensión lateral del tejido derivado del cambium interfascicular) entre plantas tratadas con adición de peso (en negro) y sin peso (en blanco) para cada genotipo. El mutante *pin3* demuestra ser insensible a este tratamiento. (\*) Representa resultados significativos entre ambas situaciones ( $p < 0,05$ ). Fuente: Carrió-Seguí et al., 2024, en revisión.

### 1.5.2 Transportadores de auxina: Familia PIN

La proteína PIN3 forma parte de la familia de transportadores de auxinas PIN-FORMED (PIN). El gradiente de distribución y/o acumulación de esta hormona es fundamental para desempeñar su función en los diversos procesos del desarrollo en los que está involucrada y es por ello que requiere de un transporte direccional efectivo (revisado por Vanneste & Friml, 2009).

La auxina se distribuye por toda la planta a través del floema o por un sistema de transporte de célula a célula más controlado que depende de proteínas transportadoras de entrada y de salida (PIN). La hipótesis quimioosmótica (Rubery y Sheldrake, 1974) explica el mecanismo de transporte polar de la auxina (Figura 3). Este se produce debido a que a pH ácido, la AIA extracelular se encuentra protonada (AIAH) y entra a la célula de manera pasiva mientras que a pH neutro, la AIA citosólica se desprotona (AIA<sup>-</sup>). Esta auxina desprotonada requiere de transportadores específicos para la salida de la célula de manera activa (revisado por Vieten et al., 2007).



**Figura 3. Transporte polar de auxina mediante transportadores PIN.** Figura adaptada de Su *et al.*, (2022)

*Arabidopsis* cuenta con 8 genes *PIN* (Paponov et al., 2005). Mientras que PIN1 es el principal transportador de auxina en el tallo (Bennett et al., 2016), PIN3 ha demostrado participar en diversos procesos tales como la formación de raíces laterales, la formación del gancho apical, así como respuestas gravitrópicas y fototrópicas (Friml et al., 2002; Haga & Sakai, 2012; Rakusová et al., 2016). Como se ha mencionado ya, PIN1, PIN3, PIN4 y PIN7 son los principales transportadores de auxina en el tallo, y la implicación de estos cuatro transportadores de auxinas en el crecimiento secundario desarrollado a partir del aumento de peso en plantas *Arabidopsis* fue puesta a prueba por el laboratorio de acogida (ver Figura 2).

El estudio de mutantes demostró que el mutante *pin3* fue el único que no respondió al tratamiento de adición de peso. Este resultado implica que la respuesta de las plantas *Arabidopsis* al peso en forma de crecimiento secundario, depende de PIN3 (Carrió-Seguí et al., 2024, en revisión).

Así pues, basándose en estudios que muestran la importancia del gradiente de auxina y, por tanto, de los transportadores de la familia PIN, en el desarrollo de xilema secundario inducido por peso, se plantea la siguiente pregunta: ¿Qué proteínas regulan la actividad de PIN3 durante el tratamiento con peso? Simultáneamente y dada la comprobada relevancia de la implicación del etileno en la regulación del crecimiento secundario por estrés mecánico (Love et al., 2002; Sehr et al., 2010), este trabajo pretende elucidar qué papel podría tener el etileno en la inducción del crecimiento secundario como respuesta al aumento de peso.



## 2. OBJETIVOS

En base al marco contextual expuesto en la introducción, los objetivos del presente proyecto son:

- Identificar posibles reguladores de la transcripción de *PIN3* durante el crecimiento secundario en plantas de *Arabidopsis* tratadas con peso, realizando una búsqueda *in silico* de posibles factores de transcripción reguladores de la expresión de este gen y estudiando su efecto mediante ensayos de transactivación.
- Determinar la posible implicación de la hormona etileno en la respuesta al peso de las plantas en forma de crecimiento secundario, estudiando la respuesta al peso de plantas mutantes *ein2-5*, las cuales son insensibles a esta hormona.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 Material vegetal**

#### **3.1.1 *Nicotiana benthamiana***

Las plantas de *N. benthamiana* utilizadas para el ensayo de transactivación (ver apartado 3.4) fueron crecidas durante aproximadamente 5-6 semanas en condiciones controladas en un fitotrón; a una temperatura de 24/20 °C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

#### **3.1.2 *Arabidopsis thaliana***

Las semillas utilizadas en este estudio pertenecen al ecotipo Columbia-0 (col-0) de *A. thaliana*. Los mutantes *ein2-5* y *pin3-4* se obtuvieron del Nottingham Arabidopsis Stock Center.

##### **3.1.2.1 Esterilización de semillas**

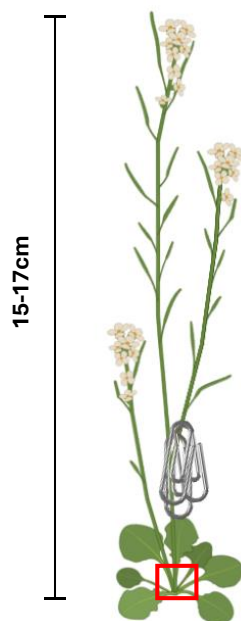
Las semillas fueron esterilizadas siguiendo el método modificado de Parsa *et al.*, (2018). Las semillas se trataron con etanol al 70% con tritón X 100 (0,05%) durante 10 minutos y seguidamente se introdujeron en etanol al 96% durante 2 minutos. Posteriormente, se dejaron secar sobre papel estéril en la cabina de flujo laminar para eliminar los restos de etanol y, al manteniendo las condiciones de esterilidad.

##### **3.1.2.2 Condiciones de crecimiento**

Las semillas fueron sembradas en placas con medio de cultivo con un contenido de 4,3 g/L de sales Murashige y Skoog, 5 g/L de Phyto agar y 10 g/L de sacarosa a un pH de 5,7 tras lo cual se almacenaron en oscuridad a 4°C durante alrededor de 3 días para su estratificación. Las semillas ya estratificadas germinaron en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 22°C. Tras la germinación, se dejó crecer las plantas durante 3 semanas. Tras esto, se procedió a sembrar en tierra una única plántula por maceta, sacándolas del medio cuidadosamente. Las plantas sembradas en tierra se cultivaron a 22°C en un fitotrón con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Como sustrato se utilizó una mezcla de 3:1 (v/v) de compost de semillas y vermiculita respectivamente.

##### **3.1.2.3 Tratamiento con peso**

Para los ensayos de tratamiento con peso de plantas adultas, estas se dejaron crecer hasta que el tallo alcanzó una altura de entre 15 y 17 cm y para cada genotipo se seleccionaron 8 plantas control y 8 plantas que se sometieron al tratamiento. Se colgaron de diversas ramas caulinares 3 clips (Figura 4), lo cual representa 1,6 g. El tratamiento se llevó a cabo durante 10 días.



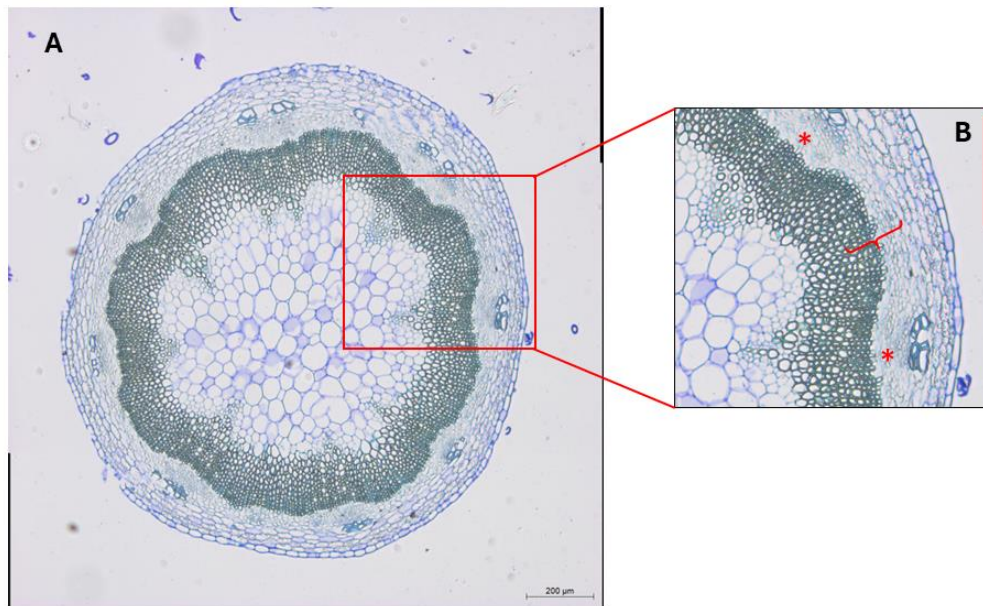
**Figura 4. Representación esquemática de la metodología empleada para el tratamiento con peso en *Arabidopsis*.** Se seleccionaron plantas *Arabidopsis* col-0, *pin3-4* y *ein2-5* de entre 15-17 cm. Se colgaron de diversas ramas caulinares 3 clips equivalentes a 1,6 g y se trataron durante 10 días. El cuadrado rojo indica la zona seguidamente superior a las hojas de la roseta, que será recogida para el posterior análisis histológico. Figura realizada con BioRender.com

### **3.2 Análisis histológico**

Pasados 10 días se recogieron muestras de la base del tallo de aproximadamente 0,5cm (ver Figura 4). Estos fueron inmediatamente introducidos en FAE (etanol 50%, ácido acético glacial 5%, formaldehído (37%)10% y H<sub>2</sub>O) para su fijación. Para asegurar una correcta y homogénea fijación de las muestras recolectadas, se procedió a la infiltración de FAE sometiendo las muestras presentes en dicho tampón a vacío durante 10 minutos. Tras la infiltración, las muestras fueron traspasadas a una nueva solución de FAE y almacenadas a 4°C durante una noche. Finalmente, las muestras fueron lavadas con etanol al 50% durante 30 minutos y almacenadas en etanol 70% a 4°C para su conservación.

Las muestras fueron embebidas en parafina tras ser procesadas con el procesador automático de tejidos Leica TP 1020. Se generaron secciones transversales de 8 µm usando el microtomo Microm HM 310. Las secciones fueron posteriormente montadas en agua sobre portaobjetos de vidrio y fijadas por calor. Las muestras fueron desparafinadas con Histoclear, lavadas con concentraciones decrecientes de etanol y teñidas con azul de toluidina al 0,02% durante 30 segundos para la visualización diferencial de tejidos secundarios (Feder & O'Brien, 1968). Una vez teñidas y secas, se aplicaron 2 gotas de Mercko-Glass para la fijación del cubreobjetos y se dejó endurecer para la correcta conservación de las muestras.

Las imágenes de las muestras histológicas fueron tomadas con el microscopio Leica DM5000 B. Como parámetro indicador del aumento de crecimiento secundario se analizó la longitud del tejido derivado del cambium interfascicular (TCI) para cada región interfascicular (Figura 5). Todas las muestras se midieron con ImageJ/Fiji (v. 2.14.0).



**Figura 5. Cuantificación de parámetros vasculares en base de tallo de *Arabidopsis*.** (A) Corte transversal realizado en la base de tallo de plantas de *A. thaliana* ecotipo col-0 de entre 15 y 17 cm de altura. Tinción realizada con azul de toluidina. (B) Región ampliada de la misma imagen. Los asteriscos indican los haces vasculares primarios. El parámetro a medir (TCI) indicado mediante una llave. Barra de escala= 200  $\mu\text{m}$ , representada en (B) como una línea roja.

### **3.3 Búsqueda *in silico* de factores de transcripción reguladores de PIN3**

La secuencia del promotor de *PIN3* (*pPIN3*) se obtuvo seleccionando 2669 pb de la región no codificante en *cis* del gen *PIN3* utilizando la base de datos TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>). La búsqueda de posibles factores de transcripción (FTs) reguladores de la secuencia promotora de *PIN3* fue realizada gracias a las herramientas "Regulation Prediction" y "Binding Prediction" de la base de datos PlantRegMap (<https://plantregmap.gao-lab.org/>). En paralelo, se llevó a cabo, un análisis de co-expresión utilizando la base de datos ATTED-II v11.1 (<https://atted.jp/>) para identificar genes que coexpresan de forma habitual con *PIN3* en *Arabidopsis*. Los resultados fueron comparados con los obtenidos con la herramienta "Regulation Prediction" de la base de datos PlantRegMap. Además, también se tuvo en cuenta el análisis transcriptómico de tallos de *Arabidopsis* sometidos a tratamientos con peso realizado por Ko *et al.*, (2004), así como el realizado por Suer *et al.*, (2011) en el que se comparó el transcriptoma de la base del tallo (parte del tallo sometida a más peso de forma natural) con otra región del tallo sometida a menos peso. La comparación de estos resultados permitió identificar posibles candidatos. Los resultados fueron filtrados para determinar el tipo celular exacto en el que se expresa cada factor de transcripción, con el fin de identificar aquellos que se expresan en los mismos tipos celulares que *PIN3*. Para ello, se utilizó la base de datos generada por Shi *et al.*, (2021).

## **3.4 Ensayo de transactivación transcripcional**

### **3.4.1 Construcción de plásmidos**

#### *3.4.1.1 Obtención de secuencias*

Las secuencias fueron obtenidas de diferentes fuentes. En concreto, se utilizaron las bases de datos de TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) y de Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>).

#### *3.4.1.2 Ensamblaje mediante GoldenBraid*

*GoldenBraid* es un sistema de clonaje basado en el uso de endonucleasas de restricción de tipo IIS (especialmente Bsmbl y Bsal) que permite el ensamblaje multipartito de módulos simples para la construcción de estructuras genéticas complejas. El proceso de ensamblaje implica reacciones de digestión con endonucleasas y ligación con ADN ligasas (T4 ligasa) para unir todas las “partes” (promotor, secuencia codificante, terminador...) de manera precisa y ordenada. Esto es posible dado que tras la digestión se generan extremos cohesivos únicos para cada parte que definen su identidad y cumplen la función de posicionar la secuencia de forma ordenada en la construcción final resultado del ensamblaje (Sarrión-Perdigones et al., 2011). *GoldenBraid* es, por tanto, una herramienta eficiente, sencilla y precisa para la construcción de vectores necesarios en este proyecto.

El ensamblaje de todas las piezas se realizó tras la domesticación (ver apartado 3.4.1.3 de esta sección) y clonación de las secuencias codificantes para el *pPIN3* y el FT *AT5G47220* en el plásmido de entrada pUPD2, siguiendo el esquema ilustrado en la Figura 6(a) y 6(b), respectivamente.

#### *3.4.1.3 Domesticación*

La metodología de clonaje *GoldenBraid* requiere que todos los componentes del sistema estén libres de dianas internas para las enzimas de restricción Bsal y Bsmbl. Sin embargo, es común que algunos fragmentos de ADN a clonar contengan estos sitios de restricción. En estos casos, se procede a su eliminación -sin perjuicio para la funcionalidad de las construcciones finales-. Este proceso recibe el nombre de “domesticación”, y se suele llevar a cabo en dos pasos: (i) añadir las secuencias flanqueantes de 4 nucleótidos necesarias para el ensamblaje y (ii) eliminar las dianas internas de las enzimas de restricción en las secuencias a clonar. En la domesticación se incorporarán a la secuencia codificante mediante PCR, las secuencias flanqueantes de 4 oligonucleótidos para el correcto ensamblaje y las dianas de restricción para el enzima Bsmbl que permite, mediante una reacción de digestión-ligación, la inserción de la secuencia en el plásmido de entrada pUPD2. Además, en caso necesario, las dianas internas para Bsal y Bsmbl pueden ser eliminadas mediante mutagénesis dirigida por PCR.

Los oligonucleótidos para este propósito (Tabla 1) fueron diseñados adecuadamente para cada secuencia según la herramienta “GB Domesticator” de *GoldenBraid* (<https://gbcloning.upv.es/do/domestication/>). El gen que codifica el factor de transcripción *AT5G47220* presentó 3 dianas internas para las enzimas de restricción por lo que se realizaron 3 reacciones de PCR según el protocolo provisto para la ADN polimerasa Phusion High-Fidelity

(*ThermoFisher*) (1u). El *pPIN3* no precisó de mutagénesis dirigida y fue amplificado de igual manera en una única reacción de PCR.

CDS	Forward	Reverse
<i>pPIN3</i>	5' <b>GCGCCGTCT</b> CGCTCGGGAGCTTTAA GAGTGAGTAAATTGAAAAGT 3'	5' <b>GCGCCGTCT</b> CGCTCACATTCTTGA AGGGACAAAAATGGAAAAC 3'
<i>AT5G47220</i> parche 1	5' <b>GCGCCGTCT</b> CGCTCGAATGTACGGA CAGTGCAATATAG 3'	5' <b>GCGCCGTCT</b> CGCAGTCTCCGTAAC CGGTATC 3'
<i>AT5G47220</i> parche 2	5' <b>GCGCCGTCT</b> CGACTGCAGTGAAGG CGAAGCATTACAGAGGAGTGAGGCA GAGGCCGTGGGGG 3'	5' <b>GCGCCGTCT</b> CGGCAGTCTCAAAC GTCCCTAA 3'
<i>AT5G47220</i> parche 3	5' <b>GCGCCGTCT</b> CGCTGCGGAAGATGC GGCTTTA 3'	5' <b>GCGCCGTCT</b> CGCTCACGAACCTGA AACCAATAACTCATCAACACG 3'

**Tabla 1. Cebadores utilizados en la domesticación GoldenBraid.** Secuencias de cebadores utilizados en el proceso de domesticación obtenidas del sitio web “GB Cloning”. Secuencia de reconocimiento de la endonucleasa Bsmbl en negrita.

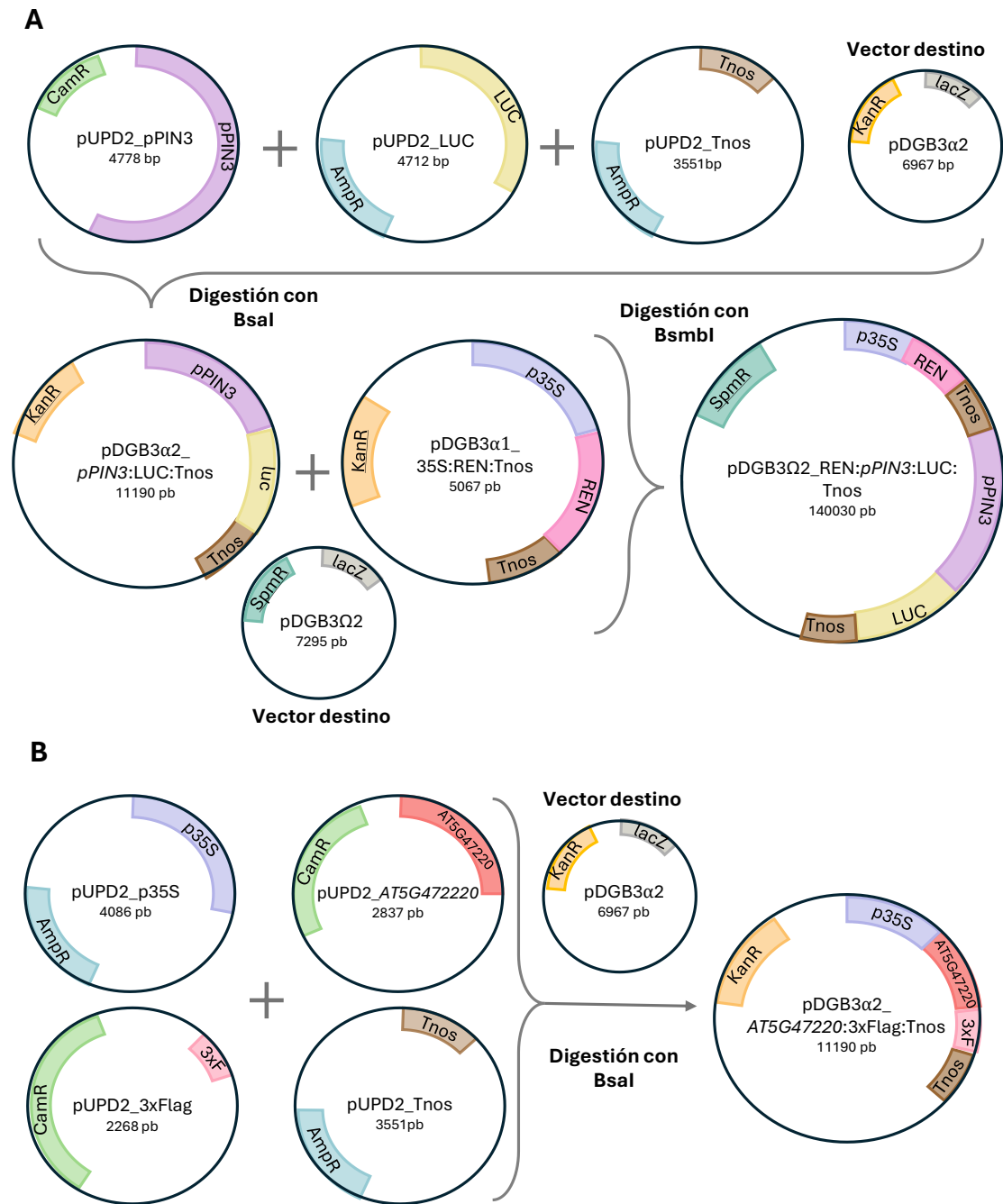
#### 3.4.1.4 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR con las secuencias ya domesticadas fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa. Los geles se prepararon con TAE 1x (40mM de Tris-acetato y 1mM de EDTA), 1% (v/v) de bromuro de etidio y 1,2% de agarosa. Como tampón de carga se utilizó *Orange Loading Dye* (*Thermo Scientific*) y los marcadores empleados fueron *Gene Ruler DNA Ladder 1kb y 100bp* (*Thermo Scientific*). Los geles se visualizaron con un transiluminador y se capturaron las imágenes con el software *GeneSnap*. A continuación, se comprobó el tamaño de todos los productos, se cortaron las bandas correspondientes con ayuda de una cuchilla y se procedió a su purificación utilizando el kit comercial *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (*Macherey-Nagel*).

Por otro lado, se realizó en cada nivel de clonaje y previo a la secuenciación, reacciones de digestión y visualización en geles de agarosa realizados como se ha descrito previamente. Adicionalmente, el programa *Benchling* se empleó para simular *in silico* los patrones de bandas resultado de las digestiones. El objetivo de estas digestiones es verificar que las construcciones se habían efectuado correctamente, al escoger enzimas de restricción que permiten la identificación diferencial de estas construcciones frente al vector vacío.

#### 3.4.1.5 Digestión

Como se muestra en la Figura 6 fueron necesarias varias digestiones. La primera digestión y ligación fue realizada con Bsmbl y T4 ligasa respectivamente, para la inserción de ambas secuencias domesticadas en sus respectivos vectores de entrada pUPD2. Como se aprecia en la figura 6(b) para el gen *AT5G47220*, el ensamblaje multipartito de las distintas piezas (promotor 35s, *AT5G47220*, 3xFlag y Terminador Nos) tuvo lugar en una sola reacción de digestión-ligación, liberándose estas de pUPD2 y clonándose finalmente en el vector destino pDGB3\_α2 en el orden correcto. Las enzimas utilizadas para el paso a nivel de clonaje Alpha son BsaI y T4 ligasa.



**Figura 6. Ensamblaje multipartito por reacción GoldenBraid. (A)** La secuencia del *pPIN3* (representada en violeta) clonada en el plásmido de entrada pUPD2 fue digerida por BsaI junto con el vector destino  $\alpha 2$  y dos piezas correspondientes al gen de la luciferasa y el terminador Nos. La construcción resultante fue a su vez digerida con BsmBI junto con un nuevo vector destino  $\Omega 2$  y una pieza preformada con Renilla para la obtención de la construcción final. **(B)** La secuencia de *AT5G47220* (representada en rojo) clonada en el plásmido de entrada pUPD2 fue digerida por BsaI de igual manera para la obtención de una construcción final que presentara el FT, el promotor 35s (*p35s*), el terminador Nos (*Tnos*) y la etiqueta 3xFlag. CamR: gen de resistencia a cloranfenicol. AmpR: gen de resistencia a ampicilina. KanR gen de resistencia a kanamicina. SpmR: gen de resistencia a espectinomicina.

Este procedimiento fue realizado de igual manera para el ensamblaje de la secuencia promotora de *PIN3* junto con el gen que codifica la proteína LUCIFERASA y Tnos en el vector destino pDGB3\_α2. Sin embargo, para obtener la construcción final se utilizó también una pieza preformada de la colección *GoldenBraid* compuesta el p35s, Renilla (REN) y Tnos. Estas dos construcciones se fusionaron en el vector destino pDGB3\_Ω2 gracias, de nuevo, a una reacción de digestión (Bsmbl)- ligación. En todas las reacciones se utilizaron 8u de enzima Bsmbl o Bsal, según fuera correspondiente y 2,4u de T4 ligasa. Todos los elementos están disponibles en <https://www.gbcloning.org/> y especificados en la Tabla 2.

Denominación	Código GB
pUPD2	GB0307
pDGB3_alpha2	GB0017
pDGB3_omega2	GB0021
pP35S	GB0030
pLuciferase	GB0096
pTnos	GB0037
3xFlag	sin código
pEGB 35s:Renilla:tNOS	GB0109

**Tabla 2. Plásmidos empleados en el clonaje *GoldenBraid*.** Nombre y código GB identificativo de los vectores de entrada, de destino y piezas preformadas empleadas en este trabajo.

#### 3.4.1.6 Transformación *E. coli*

Todas las construcciones fueron transformadas en *Escherichia Coli Top10 (Thermofisher)* competentes vía electroporación. Para ello, se añadieron 2μL del plásmido correspondiente en alícuotas de *E.coli* (25μL) previamente almacenadas a -80°C y se aplicó una corriente de 1500V. Las células fueron inmediatamente pre-cultivadas en medio LB a 37°C durante 1 hora y posteriormente sembradas en placas de LB que contenían X-Gal, IPTG y el antibiótico correspondiente: cloranfenicol en caso de plásmidos pUPD2, kanamicina en caso de pDGB3\_α2 y espectinomicina en caso de pDGB3\_Ω2.

El añadir el X-Gal y el IPTG está basado en la expresión del Operón Lac y es de gran utilidad para reconocer aquellas bacterias que han integrado el inserto de interés. De esta manera, si el inserto no se ha integrado correctamente el gen *lacZ* intacto sintetiza β-galactosidasa inducido por IPTG y esta degrada X-Gal, un substrato cromogénico que aporta a las bacterias no transformadas un color azul. Dado que el sitio de clonación del plásmido se encuentra en el interior del gen *lacZ*, este será interrumpido y las colonias con inserto serán de color blanco.

Las colonias blancas fueron seleccionadas y cultivadas en LB líquido a 37°C durante 1 día para la posterior extracción de ADN plasmídico.

#### 3.1.4.7 Transformación de *A. tumefaciens*

Generadas las construcciones finales para ambas secuencias de interés se transformó la cepa GV3101 de células *A. tumefaciens* electrocompetentes. El procedimiento se realizó de manera similar a la transformación en *E. coli* utilizando, sin embargo, un voltaje menor de 1440V en la electroporación. El pre-cultivo de las células en medio LB se llevó a cabo en una cámara de cultivo a 28°C en agitación durante 2 horas. Posteriormente, las células transformadas se sembraron en placas de LB con un contenido en kanamicina o espectomicina, por ser el antibiótico de selección



para los plásmidos de nivel  $\alpha$  o  $\Omega$  respectivamente, además de rifampicina y gentamicina, a los cuales esta cepa de *A. tumefaciens* es resistente, en proporción 1:3:1. Las células sembradas se dejaron crecer durante 2 días a 28°C.

Adicionalmente, se transformó de igual manera la proteína de origen viral p19, supresora del silenciamiento con el objetivo de evitar los mecanismos defensivos de las plantas frente a sobre-expresión de transgenes (Lakatos et al., 2004).

#### 3.4.1.8 Extracción de plásmidos o Miniprep

Las extracciones plasmídicas se realizaron mediante *kits* comerciales siguiendo los protocolos recomendados por los proveedores. En el caso de *E. coli*, se utilizó el *kit E.Z.N.A.® Plasmid Minikit II* (Omega Bio-Tek) y en *A. tumefaciens* *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Quiagen).

#### 3.4.1.9 Secuenciación

Para confirmar con exactitud el correcto clonaje de las secuencia promotora y factor de transcripción, se secuenciaron en cada nivel de clonaje los plásmidos pUPD2 y pDGB. Para ello se emplearon 10µL de plásmido y 5µL de los cebadores *Forward* y *Reverse* (Tabla 3). La secuenciación se llevó a cabo por el servicio de Secuenciación y Análisis de expresión génica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Las secuenciaciones se realizaron por el método *Sanger* mediante el Secuenciador capilar ABI 3130 XL.

Plásmido	Cebadores	Secuencia
pUPD2	GBS1 (Forward)	5' GCTTTCGCTAAGGATGATTTCTGG 3'
	GBS2 (Reverse)	5' GGCAAGGTGTCACCACCCTG 3'
pDGB3_α2	Pcambia Forward	5' GGTGGCAGGATATATTGTGG 3'

**Tabla 3. Cebadores empleados en la secuenciación.**

#### 3.4.2 Agroinfiltración

Para este trabajo se realizó la agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* de: (i) una solución con p19 y la construcción  $\Omega$ 2-*pPIN3* que actúa de control y (ii) una segunda solución con p19,  $\Omega$ 2-*pPIN3* y  $\alpha$ 2-*AT5G47220*. Para la preparación de las soluciones de *A. tumefaciens* se partió de cultivos en fase exponencial y se resuspendieron las bacterias en 10mL de solución de infiltración (10 mM MES, pH=5.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 200 µM acetosiringona). Tras una incubación de 2 horas, se ajustó la densidad óptica (600nm) final a 0,5 y se realizaron las mezclas apropiadas de los distintos cultivos a co-infiltrar. Las dos distintas soluciones se obtuvieron añadiendo los cultivos indicados en la concentración adecuada (p19 0,05M,  $\Omega$ 2-*pPIN3* 0,1 M y  $\alpha$ 2-*AT5G47220* 0,1M) con solución de infiltración.

Las infiltraciones se llevaron a cabo mediante una jeringa exenta de aguja (BD *Plastipak 1mL de Becton Dickinson S.A.*). Se infiltraron tres hojas por planta y una planta por solución, y las muestras se recogieron 3 días post-infiltración mediante el uso de un sacabocados, generando discos de 0,8cm de diámetro y aproximadamente de 18-19 mg de 3 hojas independientes para cada planta. Las muestras inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta el día del ensayo de luciferasa.

### **3.4.3 Ensayo de luciferasa**

El ensayo de luciferasa se llevó a cabo con el kit Dual-Glo® Luciferase Assay System (*Promega*). Para realizar la extracción proteica se machacaron los discos de *N. benthamiana* durante 30 segundos, se utilizaron 150µL de *passive lysis buffer* (1x) por muestra discal. Para la reacción de luciferasa, se añadieron en una placa multipocillo 3µL del extracto recogido tras centrifugación (10 minutos, a 4º, a velocidad máxima) y 40µL del sustrato de la luciferasa de luciérnaga, *lucII*. Posteriormente, se realizó la primera lectura de luminiscencia. Tras la misma, se adicionaron 40µL del reactivo *stop and glow*, que inhibe la actividad de luciferasa de luciérnaga y que contiene el sustrato para la luciferasa de *Renilla reniformis* (control interno) y finalmente se efectuó la segunda lectura. La medición de la luz emitida se llevó a cabo con el equipo *GloMax 96 Microplate Luminometer*. Se realizaron 2 réplicas técnicas de este ensayo.

Se utilizó el gen reportero de la luciferasa de *Renilla reniformis* bajo el p35s como control interno; para la normalización de los valores obtenidos en los ensayos, evitando así la variación causada por la eficiencia de transformación y manipulación durante el experimento al expresar el reportero de forma transitoria (Shifera & Hardin, 2010).

### **3.5 Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos realizados fueron llevados a cabo empleando la prueba T de Student (Student's T-Test). Se estableció un umbral de significancia de  $\alpha=0,05$ .

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Estudio de mutantes sometidos a peso

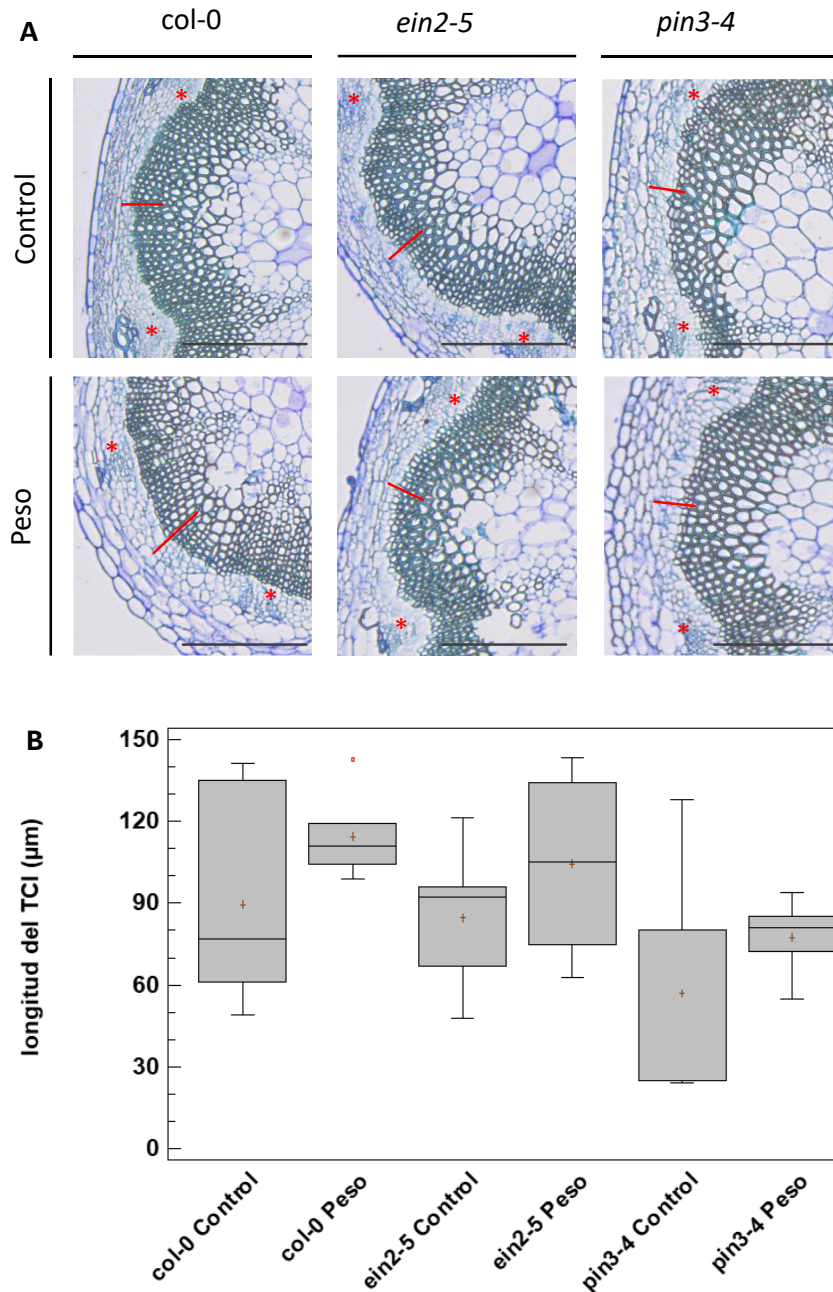
El estrés mecánico y más específicamente, el peso ejercido por la propia planta es una señal interna inductora del desarrollo del cambium vascular y que conlleva la generación de nuevas células vasculares lignificadas (xilema secundario) que contribuyen a contrarrestar esas fuerzas mecánicas (revisado por Agustí & Blázquez, 2020). Este tipo de crecimiento está fuertemente regulado por varias hormonas vegetales que interactúan entre sí (Mazzoni-Putman et al., 2021). Entre ellas, la auxina y el etileno han demostrado estar correlacionadas en el desarrollo del cambium vascular en respuesta a estrés mecánico.

Para el análisis de crecimiento secundario en respuesta a plantas de *Arabidopsis* sometidas a peso se utilizó en este trabajo el mutante *ethylene insensitive 2-5 (ein2-5)* el cual es insensible al etileno (Alonso et al., 1999), además de plantas WT (control positivo) y plantas del mutante *pin3-4* (control negativo). Comparado con la auxina, el papel del etileno en la regulación del cambium vascular y su implicación en estreses mecánicos es menos conocido. En *Arabidopsis*, los mutantes sobreproductores de etileno *1-aminociclopropano 1-carboxilato sintasa 7 (acs7-d)* y el sobreproductor de *ethylene 1 (eto1)* exhiben mayor actividad cambial (Yang et al., 2020). En *Populus* el factor de transcripción ETHYLENE INSENSITIVE 3D (EIN3D) y un grupo de factores de transcripción ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR 118/119 (ERF118/119) demostraron estar implicados en la regulación del crecimiento cambial y la formación de madera (Seyfferth et al., 2018). Además, también se ha demostrado que el etileno afecta a muchas características de la madera que se forma como respuesta a estrés (también conocida como madera de tensión) en *Populus* (Seyfferth et al., 2019). En *Arabidopsis* no se conoce el mecanismo por el cual el etileno está implicado en la inducción del crecimiento secundario como respuesta al incremento de peso, por lo que el estudio de estos mutantes pretende aportar información en este aspecto.

El análisis histológico de plantas control y sometidas a peso para los tres genotipos se realizó en la base del tallo. Para analizar las diferencias en crecimiento secundario se definió el parámetro a estudiar como tejido derivado del cambium interfascicular (TCI). Éste se desarrolla únicamente en la parte más baja del tallo, dado que en la parte más apical no se desarrolla cambium interfascicular (Little et al., 2002). Análisis histológicos previamente realizados indican esta zona del cambium interfascicular como un buen parámetro para la medición de nuevo tejido secundario (Sehr et al., 2010; Agustí et al., 2011). La tinción de las muestras se llevó a cabo con azul de toluidina, siendo así posible la visualización diferencial de la cantidad de tejido secundario diferenciado.

Los resultados obtenidos revelan grandes variaciones entre diferentes muestras de un mismo genotipo. Esto dificulta considerablemente el análisis al no poder asegurar con certeza que el tratamiento con peso haya sido eficaz en todas las muestras. Aun así, basándonos en la comparación de las medidas de longitud del TCI entre genotipos se pueden observar ciertas tendencias entre plantas tratadas y no tratadas. El genotipo col-0 responde con mayor eficacia al tratamiento y demuestra mayor crecimiento secundario en respuesta al peso, tal y como se ha demostrado en estudios previos (Ko et al., 2004). Las plantas mutantes *ein2-5* mantuvieron niveles parecidos de crecimiento secundario en ambas situaciones (tratadas y no tratadas) y resultaron en menor crecimiento comparado con col-0. Esto concuerda con otros estudios en los que se demuestra que el etileno interactúa con el transporte polar de auxinas y tiene un importante rol en la formación de xilema secundario en situaciones de estrés mecánico (Love et al., 2008; Sehr et al., 2010). En cuanto a *pin3-4* tanto las plantas control como las sometidas a peso

demonstraron menor crecimiento que *col-0*. El análisis de las réplicas realizadas demuestra mucha variabilidad (ver Figura 5), por lo sería necesario repetir el experimento para comprobar el efecto, ya conocido, del mutante *pin3* tratado con peso (ver Figura 2). Se realizó un análisis estadístico T-test para plantas tratadas y no tratadas de cada genotipo que indicó los resultados como no significativos por lo que para obtener resultados concluyentes sería necesario repetir el experimento (pvalor del T-test: *col-0*=0,143; *ein2-5*= 0,397; *pin3-4*= 0,369)



**Figura 7. Análisis histológico de base de tallo en *Arabidopsis*.** (A) Cortes transversales de base de tallo para plantas *Arabidopsis col-0*, *ein2-5* y *pin3-4*, teñidas con azul de toluidina. Los asteriscos rojos indican los haces vasculares primarios. El parámetro indicador de crecimiento secundario (TCI) medido indicado con una línea roja. Barra de escala= 200µm. (B) Gráfica resultado de las medias obtenidas por réplica de la longitud derivada de la extensión del TCI (µm) para cada haz vascular. El análisis estadístico T-test entre plantas tratadas y no tratadas resultó no significativa (pvalor >0,05) para todos los genotipos.

## **4.2 Identificación de potenciales factores de transcripción reguladores de la expresión de *PIN3* utilizando un enfoque *in silico***

Con el objetivo de tener una visión más cercana de los posibles mecanismos reguladores de la expresión de *PIN3* para el desarrollo del cambium y formación de xilema secundario en respuesta al aumento de peso, este trabajo ha empleado un enfoque que combina el análisis de aproximaciones transcriptómicas previamente realizadas (Ko et al., 2004; Suer et al., 2011; Shi et al., 2021) y herramientas predictoras disponibles en bases de datos.

Para comenzar se obtuvo, gracias a la base de datos PlantRegMap (Tian et al., 2019), una lista de FTs que potencialmente regulan la expresión de *PIN3*. Para ello, se llevó a cabo un análisis de motivos de unión de FTs en la secuencia del *pPIN3*. Además se elaboró una lista de genes que co-expresan de forma habitual con *PIN3* en *Arabidopsis*, empleando la base de datos ATTED (Obayashi et al., 2022). Las listas obtenidas de los potenciales FTs y genes co-expresados fueron comparadas y este análisis reveló 2 FTs de la superfamilia APETALA 2 (AP2) /Ethylene Response factor (ERF) comunes a ambas y, por tanto, posibles reguladores transcripcionales habituales de *PIN3*.

El análisis transcriptómico llevado a cabo en *Arabidopsis* por Ko et al., (2004) identificó 700 genes diferencialmente expresados durante la inducción de crecimiento secundario en el tallo como respuesta al aumento de peso, por lo que resulta un buen punto de partida para el descubrimiento de FTs implicados en este proceso específico. Dicha lista de genes fue comparada tanto con los potenciales FTs reguladores como con los genes de posible unión al promotor. El análisis de los genes diferencialmente expresados en el desarrollo de crecimiento secundario reveló 2 FTs potencialmente reguladores de *PIN3* pertenecientes a la familia AP2/ERF y 16 genes de unión a *pPIN3* de los cuales el 56% eran miembros de la familia de FTs AP2/ERF.

Adicionalmente, se tuvo en cuenta el análisis transcriptómico de Suer et al., (2011) realizado en plantas *Arabidopsis* mutantes *wox4-1*. WUSCHEL RELATED HOMEBOX 4 (WOX4) es un factor de transcripción expresado en el cambium vascular que, estimulado por el receptor tipo kinasa PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM (PXY), participa en la proliferación del cambium y desarrollo de crecimiento secundario y actúa aguas abajo en la ruta de señalización auxina-dependiente (Suer et al., 2011). Asimismo, WOX4 es requerido para la proliferación de las células cambiales estimuladas por el etileno (Yang et al., 2020) y se ha sugerido que las rutas mediadas por auxinas y etileno podrían converger en WOX-4 en la regulación de la división de células cambiales (Etchells et al., 2012). Por ello, se analizaron los genes que habían resultado ser menos expresados en mutantes *wox4-1* en comparación con WT en tallos con formación de xilema secundario. De este análisis, se descubrió un FT que, potencialmente, podría controlar la expresión de *PIN3*: *HIGH CAMBIAL ACTIVITY 2*, *HCA2* (AT5G62940).

A continuación, se estudió la expresión de dichos genes en los diferentes tejidos del tallo empleando una página web desarrollada por Shi et al., (2021). De entre todos los tejidos del tallo (floema, xilema, células cambiales, fibras, elementos traqueales, endodermis y epidermis) se priorizó aquellos genes preferencialmente expresados en la endodermis, células del xilema en proceso de diferenciación, células cambiales proximales, floema o células cambiales distales, dado que son los tejidos más implicados en la transición de crecimiento primario a secundario. Especialmente se tuvo en cuenta aquellos genes expresados en la endodermis, tejido donde *PIN3* se expresa mayoritariamente.

Del número inicial de genes obtenidos (22), se seleccionaron 4 FTs que potencialmente podrían regular la expresión de *PIN3*. Para ello, se filtraron los resultados en base a la expresión en los tejidos de interés y la recurrencia de dichos genes a lo largo del análisis. Los FTs finales fueron *AT5G47220*, *AT5G62940*, *AT5G25190* y *AT1G75490*, de los cuales únicamente *AT5G62940* no pertenece a la familia AP2/ERF sino a DNA BINDING WITH ONE FINGER (DOF) y es conocido por ser un regulador de la formación de cambium interfascicular y desarrollo vascular en *Arabidopsis* (Guo et al., 2009), así como promover la regeneración de tejido en respuesta a estrés por daño (Zhang et al., 2022). La superfamilia de FTs AP2/ERF está compuesta por 147 miembros en *Arabidopsis* y su implicación en la respuesta a diversos estreses bióticos y abióticos mediada por etileno es bien conocida (Illgen et al., 2020; Müller & Munné-Bosch, 2015). Asimismo, se ha demostrado la importancia de estos FTs en desarrollo vascular, siendo fundamentales para el crecimiento secundario y formación de madera de tensión en *Populus* (Seyfferth et al., 2018, 2019). El mecanismo por el cual estos ERFs regulan el desarrollo vascular no está hoy en día bien caracterizado, sin embargo, la cantidad de ERFs analizados en esta búsqueda *in silico* e implicados en formación de crecimiento secundario debido a peso, indica una importante función con relación a *PIN3* y el transporte de auxinas en este tipo de estrés mecánico.

Finalmente, se decidió un orden de prioridad basado en los niveles de expresión indicados por la herramienta “eFP Browser” (Klepikova et al., 2016) en la base de datos TAIR (Huala et al., 2001). Este trabajo se centró, por tanto, en el estudio del FT prioritario *AT5G47220* (ERF2), altamente expresado en la endodermis.

Prioridad	Gen ID	Familia	Tejido de expresión
1	<i>AT5G47220</i>	ERF2	Endodermis
1	<i>AT5G62940</i>	HCA2	Floema
2	<i>AT5G25190</i>	ESE3, AP2/ERF	Xilema y células cambiales
3	<i>AT1G75490</i>	AP2/ERF	Xilema y células cambiales

Tabla 4. Potenciales FTs de *PIN3* ordenados según niveles de expresión en el tallo de *Arabidopsis*.

Gen ID	Descripción
<i>AT1G75490</i>	ERF
<i>AT5G25190</i>	Ethylene and salt inducible 3 (ESE3), ERF

Tabla 5. Genes comunes a los obtenidos en “Regulation” y habitualmente co-expresados con *PIN3*.

Gen ID	Descripción
<i>AT5G47230</i>	ERF5
<i>AT5G47220</i>	ERF2
<i>AT5G25190</i>	ESE3, ERF

Tabla 6. Genes comunes a los obtenidos en “Regulation” y el análisis transcriptómico de Ko et al., (2004).

Gen ID	Descripción
<i>AT5G62940</i>	High cambial activity 2 (HCA2), DOF5.6

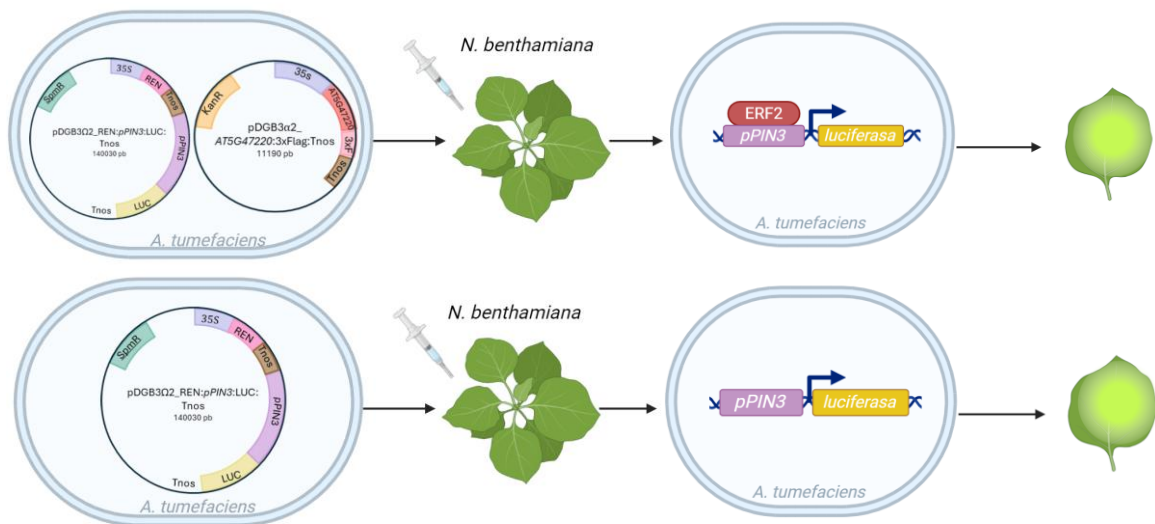
Tabla 7. Genes comunes a los obtenidos en “Regulation” y análisis transcriptómico de mutantes *wox* (Suer et al., 2011).

Gen ID	Descripción
<i>AT1G63030</i>	DDF2, ERF
<i>AT2G38470</i>	WRKY33
<i>AT5G61600</i>	ERF104
<i>AT5G47220</i>	ERF2
<i>AT1G44830</i>	ERF014
<i>AT3G24520</i>	HSFC1
<i>AT1G51700</i>	DOF1
<i>AT5G15830</i>	bZIP3
<i>AT1G21910</i>	DREB26, AP2/ERF
<i>AT1G71450</i>	FUF1, ERF
<i>AT5G25190</i>	ESE3, ERF
<i>AT5G22990</i>	GAL3, C2H2
<i>AT4G18880</i>	HSF A4A
<i>AT3G11280</i>	MYB
<i>AT4G32800</i>	ERF043
<i>AT5G47230</i>	ERF5

Tabla 8. Genes comunes a los obtenidos en “Binding” y el análisis transcriptómico de Ko et al., (2004).

### 4.3 Estudio del efecto de ERF2 sobre la expresión de *PIN3*

Para validar (i) la interacción del FT AT5G47220 con el promotor de *PIN3* y (ii) la posible regulación de la expresión de *PIN3* por medio de dicho FT, se optó por un ensayo de transactivación, utilizando como gen reportero la luciferasa de luciérnaga (LUC) y la luciferasa de *Renilla reniformis* como control interno (REN). Este tipo de ensayos son ampliamente utilizados en biología molecular para estudiar pequeños cambios en transcripción mediante el uso de genes reporteros bioluminiscentes. Para realizar este estudio, se generaron dos construcciones distintas mediante ensamblaje *GoldenBraid*, obteniendo una construcción con el gen codificante del FT a estudiar (*AT5G47220*) y una segunda construcción con la secuencia *pPIN3*, ambos clonados bajo el p35s (ver apartado 3.4.1). Las construcciones transformadas en *A. tumefaciens* fueron co-infiltradas junto p19, proteína viral represora del silenciamiento debido a sobreexpresión, obteniendo plantas *N.benthamiana* infiltradas con ERF2 y plantas *N.benthamiana* sin el FT a modo de control positivo (Figura 8).

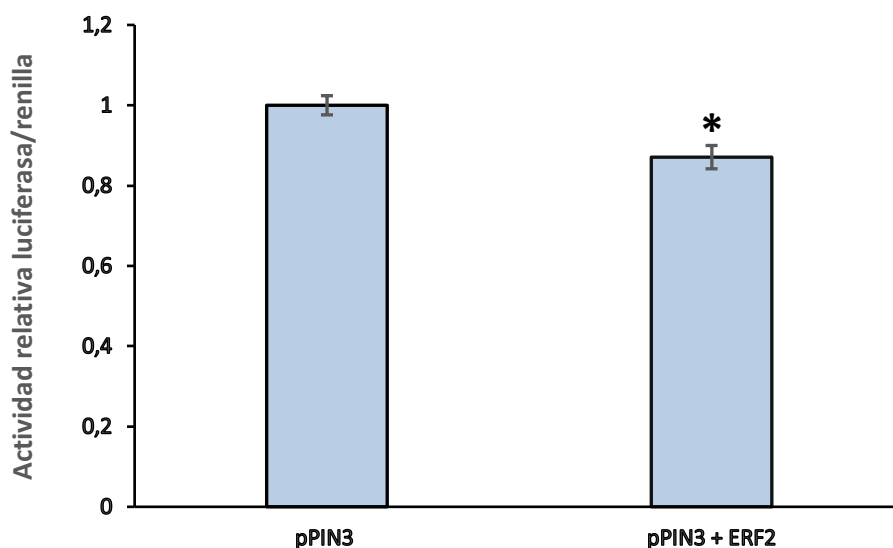


**Figura 8. Esquema representativo del proceso de agroinfiltración y ensayo de luciferasa.** Figura realizada con BioRender.com

En este tipo de ensayos de doble gen reportero se mide simultáneamente la expresión de las dos enzimas utilizadas, siendo REN necesario para la normalización de la actividad de LUC ya que minimiza la variabilidad experimental causada por diferencias en viabilidad celular o eficacia de transfección. Por esa razón, los resultados están expresados como actividad relativa normalizada de luciferasa/renilla.

Los resultados ya normalizados, mostraron una disminución pequeña, pero significativa, de la actividad de LUC en la primera réplica técnica realizada (ver Figura 9). Este efecto podría sugerir que ERF2 se une al promotor de *PIN3* y ejerce una actividad represora para sobre la expresión del gen. En la segunda réplica, sin embargo, aunque la tendencia represora se mantuvo, la diferencia no fue significativa. Por una parte, para poder elucidar si la actividad represora del FT testado sobre la expresión de *PIN3* es significativa, sería necesario repetir más veces el experimento, ya que como se ha comentado, la segunda repetición mostró una tendencia, pero no un resultado estadísticamente significativo.

Por otra parte, para explicar estos resultados se ha de tener en cuenta que, aunque el factor de transcripción presente motivos de unión a una región reguladora y se pueda demostrar su interacción e incluso un efecto regulatorio (en este caso represivo) sobre la expresión del gen diana estudiado (en este caso *PIN3*), esto no implica que se pueda concluir una relevancia funcional *in vivo* (Sparks et al., 2016). Para poder determinar un posible efecto funcional haría falta combinar estos resultados con otros de tipo genético.



**Figura 9. Estudio de la interacción entre *pPIN3* y el FT ERF2 mediante ensayo de luciferasa.** Representación gráfica de la actividad relativa de la enzima reportera (luciferasa) normalizada con el control interno (renilla). El efecto de la interacción entre *pPIN3* y ERF2 fue comparado con el efecto *pPIN3* sin el FT. (\*) Representa significancia ( $p$ valor<0,05) entre ambas situaciones. Barras de error representan desviación estándar relativa.

Como ya se ha mencionado, la familia de FTs AP2/ERF es una familia muy grande, que actúa en diversos procesos del desarrollo y situaciones de estrés biótico y abiótico, además de regular la interacción entre hormonas y la señalización de estas en respuestas de estrés. Uno de los ejemplos más estudiados es ERF1, que media la inhibición de la elongación de la raíz debido a etileno favoreciendo la acumulación de auxina en este tejido (Mao et al., 2016). Asimismo, ERF109 ha demostrado participar en la regulación de la interacción entre la señalización de ácido jasmónico y la biosíntesis de auxina en raíces laterales (Cai et al., 2014). Numerosos estudios han mostrado también la un importante rol en desarrollo vascular (Seyfferth et al., 2018), biosíntesis de lignina (Vahala et al., 2013) y acumulación de pared celular secundaria (Wessels et al., 2019), procesos fundamentales para la formación de madera.

Como ya se ha demostrado, la implicación de esta familia de FT en procesos del desarrollo lleva siendo estudiada años, especialmente en relación con estreses abióticos como frío, calor, sequía y respuesta a estrés salino (Illgen et al., 2020; Müller & Munné-Bosch, 2015; Xie et al., 2019). Sin embargo, la presencia de estos FTs en otros estreses abióticos de tipo mecánico no ha sido del todo investigada. En *Arabidopsis*, el estudio de diferentes análisis transcriptómicos nos ha llevado a identificar el gen *AT5G47220* como sobre-expresado en procesos de crecimiento secundario en tallo debido a peso (Ko et al., 2004) y en regulación de células vasculares en mutantes *pxy* (Etchells et al., 2012) por lo que sería posible que cumpliera alguna función



regulatoria en este proceso de desarrollo. Adicionalmente, los resultados del ensayo de transactivación verifican la interacción entre este FT y el promotor de *PIN3* y sugieren una posible regulación represora de este transportador de auxinas en crecimiento secundario de tallo. Conviene recordar que, además, nuestro estudio *in silico* identificó varios FTs más que, potencialmente, podrían regular la expresión de *PIN3*, por lo que no es descartable que la expresión de este gen se controle por múltiples FTs que puedan aportar una actividad aditiva que, por sí misma, pueda no ser mayoritaria. Esto explicaría el efecto determinado por nuestros experimentos.

La familia de AP2/ERF es capaz de activar o reprimir la expresión de un gen diana mediante un complejo mecanismo que implica la presencia de motivos de unión activadores o represores (Xie et al., 2019). Recientemente, la combinación de microarrays de unión a proteína e información transcriptómica relevante ha demostrado que los FTs con alta identidad estructural comparten también motivos de unión a ADN similares (Franco-Zorrilla et al., 2014). Por ello, el análisis de motivos de unión en genes *ERF* co-regulados en procesos de crecimiento secundario podría resultar una buena herramienta para explicar su redundancia funcional y predecir su función biológica con relación al control de la expresión de *PIN3*.

## 5. CONCLUSIONES

El crecimiento radial y la formación de xilema secundario en el tallo es un proceso fundamental para aportar estabilidad y robustez a las plantas, permitiéndoles sostener su propio peso y mantener así su elongación. Este crecimiento secundario requiere de una fuerte regulación ambiental y hormonal por lo que su estudio resulta complejo. La metodología empleada en este trabajo para estudiar el efecto de los mutantes sometidos a peso, aunque en este caso el resultado sea todavía inconcluso, ha sido previamente utilizada por el laboratorio de acogida con resultados significativos (Carrió-Seguí et al. 2024, en revisión), por lo que resultaría interesante repetir el experimento en el futuro para poder resolver las dudas que todavía suscitan nuestros resultados actuales.

Por otro lado, la búsqueda *in silico* de potenciales reguladores de la expresión de *PIN3*, ha revelado un total de 22 genes con motivos de unión al *pPIN3*, de los cuales 4 de ellos han sido indicados como de especial interés gracias al análisis de tejidos de expresión coincidentes con *PIN3* y su intensidad de expresión. De los genes obtenidos en este análisis *in silico*, se verificó la interacción del que, según los criterios utilizados en este trabajo, superaba mejor los filtros llevados a cabo. Los resultados del ensayo de transactivación realizado confirmaron la unión del FT al *pPIN3* y mostraron un ligero efecto represor sobre este, lo que sugiere la existencia de un posible mecanismo regulatorio de la expresión de *PIN3* en crecimiento secundario debido a peso, aunque esto deberá ser comprobado con futuros experimentos. El enfoque empleado, que combina análisis *in silico* y ensayos *in vitro*, ha resultado, por tanto, exitoso en el proceso de aumentar nuestro conocimiento en mecanismos biológicos tan complicados como la regulación transcripcional. Los FTs que también fueron seleccionados con nuestros criterios de filtrado de datos pero que, por razones de tiempo, no se pudieron estudiar, representan, además, una posible continuación en el avance para elucidar los mecanismos moleculares que regulan la expresión de *PIN3*.

Finalmente, la presencia mayoritaria de FTs de la familia ERF en el análisis *in silico*, sugiere un importante rol de estos factores en la regulación transcripcional de *PIN3* y abre la puerta al estudio de la implicación del etileno, conocido por mediar otras respuestas de desarrollo y estrés a través de esta familia de FTs, en las rutas de regulación de *PIN3* para el desarrollo vascular y formación de crecimiento secundario. Este concepto, podría verse reforzado mediante la repetición de los estudios anatómicos de mutantes insensibles a etileno, como *ein2-5*, sometidos a aumento de peso, ya que los presentados en este trabajo no fueron concluyentes.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Agustí, J., & Blázquez, M. A. (2020). Plant vascular development: mechanisms and environmental regulation. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 77(19), 3711–3728. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03496-w>
- Agusti, J., Herold, S., Schwarz, M., Sanchez, P., Ljung, K., Dun, E. A., Brewer, P. B., Beveridge, C. A., Sieberer, T., Sehr, E. M., & Greb, T. (2011). Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(50), 20242–20247. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111902108>
- Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., & Ecker, J. R. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science*, 284(5423), 2148–2152. <https://doi.org/10.1126/science.284.5423.2148>
- Altamura, M. M., Possenti, M., Matteucci, A., Baima, S., Ruberti, I., & Morelli, G. (2001). Development of the vascular system in the inflorescence stem of Arabidopsis. *New Phytologist*, 151(2), 381–389. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646x.2001.00188.x>
- Bennett, T., Hines, G., van Rongen, M., Waldie, T., Sawchuk, M. G., Scarpella, E., Ljung, K., & Leyser, O. (2016). Connective Auxin Transport in the Shoot Facilitates Communication between Shoot Apices. *PLoS Biology*, 14(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002446>
- Brackmann, K., Qi, J., Gebert, M., Jouannet, V., Schlamp, T., Grünwald, K., Wallner, E. S., Novikova, D. D., Levitsky, V. G., Agustí, J., Sanchez, P., Lohmann, J. U., & Greb, T. (2018). Spatial specificity of auxin responses coordinates wood formation. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03256-2>
- Cai, X. T., Xu, P., Zhao, P. X., Liu, R., Yu, L. H., & Xiang, C. Bin. (2014). Arabidopsis ERF109 mediates cross-talk between jasmonic acid and auxin biosynthesis during lateral root formation. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6833>
- Chaffey, N., Cholewa, E., Regan, S., & Sundberg, B. (2002). Secondary xylem development in Arabidopsis: a model for wood formation. *Physiologia plantarum*, 114(4), 594–600. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140413.x>
- Etchells, J. P., Provost, C. M., & Turner, S. R. (2012). Plant Vascular Cell Division Is Maintained by an Interaction between PXY and Ethylene Signalling. *PLoS Genetics*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002997>
- Feder, N., & O'Brien, T. P. (1968). PLANT MICROTECHNIQUE: SOME PRINCIPLES AND NEW METHODS. *American Journal of Botany*, 55(1), 123–142. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1968.tb06952.x>
- Franco-Zorrilla, J. M., López-Vidriero, I., Carrasco, J. L., Godoy, M., Vera, P., & Solano, R. (2014). DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), 2367–2372. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316278111>
- Friml, J., Benková, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jürgens, G., & Palme, K. (2002). AtPIN4 Mediates Sink-Driven Auxin Gradients and Root

Patterning in Arabidopsis. *Cell*, 108(5), 661-673. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00656-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00656-6)

- Guo, Y., Qin, G., Gu, H., & Qu, L. J. (2009). Dof5.6/HCA2, a dof transcription factor gene, regulates interfascicular cambium formation and vascular tissue development in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21(11), 3518–3534. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064139>
- Haga, K., & Sakai, T. (2012). PIN auxin efflux carriers are necessary for pulse-induced but not continuous light-induced phototropism in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 160(2), 763–776. <https://doi.org/10.1104/pp.112.202432>
- Huala, E., Dickerman, A. W., Garcia-Hernandez, M., Weems, D., Reiser, L., LaFond, F., Hanley, D., Kiphart, D., Zhuang, M., Huang, W., Mueller, L. A., Bhattacharyya, D., Bhaya, D., Sobral, B. W., Beavis, W., Meinke, D. W., Town, C. D., Somerville, C., & Rhee, S. Y. (2001). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic acids research*, 29(1), 102–105. <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.102>
- Illgen, S., Zintl, S., Zuther, E., Hinch, D. K., & Schmülling, T. (2020). Characterisation of the ERF102 to ERF105 genes of Arabidopsis thaliana and their role in the response to cold stress. *Plant Molecular Biology*, 103(3), 303–320. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-00993-1>
- Klepikova, A. V., Kasianov, A. S., Gerasimov, E. S., Logacheva, M. D., & Penin, A. A. (2016). A high resolution map of the Arabidopsis thaliana developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant Journal*, 88(6), 1058–1070. <https://doi.org/10.1111/tpj.13312>
- Ko, J. H., Han, K. H., Park, S., & Yang, J. (2004). Plant body weight-induced secondary growth in Arabidopsis and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling. *Plant Physiology*, 135(2), 1069–1083. <https://doi.org/10.1104/pp.104.038844>
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., & Burgyán, J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO Journal*, 23(4), 876-884. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600096>
- Little, C. H. A., MacDonald, J. E., & Olsson, O. (2002). Involvement of indole-3-acetic acid in fascicular and interfascicular cambial growth and interfascicular extraxylary fiber differentiation in Arabidopsis thaliana inflorescence stems. *International Journal of Plant Sciences*, 163(4), 519–529. <https://doi.org/10.1086/339642>
- Love, J., Björklund, S., Vahala, J., Hertzberg, M., Kangasjärvi, J., & Sundberg, B. (2009). Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of Populus. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 106(14), 5984-5989. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811660106>
- Lucas, W. J., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S., Helariutta, Y., He, X., Fukuda, H., Kang, J., Brady, S. M., Patrick, J. W., Sperry, J., Yoshida, A., López-Millán, A., Grusak, M. A., & Kachroo, P. (2013). The Plant Vascular System: Evolution, Development and Functions <sup>F</sup>. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55(4), 294–388. <https://doi.org/10.1111/jipb.12041>
- Mäkilä, R., Wybouw, B., Smetana, O., Vainio, L., Solé-Gil, A., Lyu, M., Ye, L., Wang, X., Siligato, R., Jenness, M. K., Murphy, A. S., & Mähönen, A. P. (2023). Gibberellins promote polar auxin transport to regulate stem cell fate decisions in cambium. *Nature Plants*, 9(4), 631–644. <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01360-w>

- Mao, J. L., Miao, Z. Q., Wang, Z., Yu, L. H., Cai, X. T., & Xiang, C. Bin. (2016). Arabidopsis ERF1 Mediates Cross-Talk between Ethylene and Auxin Biosynthesis during Primary Root Elongation by Regulating ASA1 Expression. *PLoS Genetics*, 12(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005760>
- Mazur, E., Kurczyńska, E. U., & Friml, J. (2014). Cellular events during interfascicular cambium ontogenesis in inflorescence stems of Arabidopsis. *Protoplasma*, 251(5), 1125-1139. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0620-5>
- Mazzoni-Putman, S. M., Brumos, J., Zhao, C., Alonso, J. M., & Stepanova, A. N. (2021). Auxin interactions with other hormones in plant development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039990>
- Müller, M., & Munné-Bosch, S. (2015). Ethylene response factors: A key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant Physiology*, 169(1), 32–41. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00677>
- Nieminen, K., Blomster, T., Helariutta, Y., & Mähönen, A. P. (2015). Vascular Cambium Development. *The Arabidopsis Book*, 13, e0177. <https://doi.org/10.1199/tab.0177>
- Nilsson, J., Karlberg, A., Antti, H., Lopez-Vernaz, M., Mellerowicz, E., Perrot-Rechenmann, C., Sandberg, G., & Bhalerao, R. P. (2008). Dissecting the molecular basis of the regulation of wood formation by auxin in hybrid aspen. *Plant Cell*, 20(4), 843–855. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055798>
- Obayashi, T., Hibara, H., Kagaya, Y., Aoki, Y., & Kinoshita, K. (2022). ATTED-II v11: A Plant Gene Coexpression Database Using a Sample Balancing Technique by Subagging of Principal Components. *Plant & Cell Physiology/Plant And Cell Physiology*, 63(6), 869-881. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac041>
- Paponov, I. A., Teale, W. D., Trebar, M., Blilou, I., & Palme, K. (2005). The PIN auxin efflux facilitators: Evolutionary and functional perspectives. In *Trends in Plant Science* (Vol. 10, Issue 4, pp. 170–177). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.02.009>
- Parsa, S., Ortiz, V., Gómez-Jiménez, M. I., Kramer, M., & Vega, F. E. (2018). Root environment is a key determinant of fungal entomopathogen endophytism following seed treatment in the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Biological Control*, 116, 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.09.001>
- Rakusová, H., Abbas, M., Han, H., Song, S., Robert, H. S., & Friml, J. (2016). Termination of Shoot Gravitropic Responses by Auxin Feedback on PIN3 Polarity. *Current Biology*, 26(22), 3026–3032. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.067>
- Sarrion-Perdigones, A., Falconi, E. E., Zandalinas, S. I., Juárez, P., Fernández-del-Carmen, A., Granell, A., & Orzaez, D. (2011). GoldenBraid: An iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021622>
- Love, J., Björklund, S., Vahala, J., Hertzberg, M., Kangasjärvi, J., & Sundberg, B. (2009). Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of Populus. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 106(14), 5984-5989. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811660106>
- Sehr, E. M., Agusti, J., Lehner, R., Farmer, E. E., Schwarz, M., & Greb, T. (2010). Analysis of secondary growth in the Arabidopsis shoot reveals a positive role of jasmonate signalling in cambium formation. *Plant Journal*, 63(5), 811–822. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04283.x>

- Seyfferth, C., Wessels, B. A., Gorzsás, A., Love, J. W., Rüggeberg, M., Delhomme, N., Vain, T., Antos, K., Tuominen, H., Sundberg, B., & Felten, J. (2019). Ethylene Signaling Is Required for Fully Functional Tension Wood in Hybrid Aspen. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01101>
- Seyfferth, C., Wessels, B., Jokipii-Lukkari, S., Sundberg, B., Delhomme, N., Felten, J., & Tuominen, H. (2018). Ethylene-related gene expression networks in wood formation. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00272>
- Sheldrake, A. R. (1974). Carrier-mediated Auxin Transport\*. In *Planta (Berl.)* (Vol. 118). Springer-Verlag.
- Shi, D., Jouannet, V., Agustí, J., Kaul, V., Levitsky, V., Sanchez, P., Mironova, V. V., & Greb, T. (2021). Tissue-specific transcriptome profiling of the Arabidopsis inflorescence stem reveals local cellular signatures. *Plant Cell*, 33(2), 200–223. <https://doi.org/10.1093/PLCELL/KOAA019>
- Shifera, A. S., & Hardin, J. A. (2010). Factors modulating expression of Renilla luciferase from control plasmids used in luciferase reporter gene assays. *Analytical biochemistry*, 396(2), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.09.043>
- Sparks, E. E., Drapek, C., Gaudinier, A., Li, S., Ansariola, M., Shen, N., Hennacy, J. H., Zhang, J., Turco, G., Petricka, J. J., Foret, J., Hartemink, A. J., Gordân, R., Megraw, M., Brady, S. M., & Benfey, P. N. (2016). Establishment of Expression in the SHORTROOT-SCARECROW Transcriptional Cascade through Opposing Activities of Both Activators and Repressors. *Developmental Cell*, 39(5), 585–596. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.09.031>
- Su, N., Zhu, A., Tao, X., Ding, Z. J., Chang, S., Ye, F., Zhang, Y., Zhao, C., Chen, Q., Wang, J., Zhou, C. Y., Guo, Y., Jiao, S., Zhang, S., Wen, H., Ma, L., Ye, S., Zheng, S. J., Yang, F., ... Guo, J. (2022). Structures and mechanisms of the Arabidopsis auxin transporter PIN3. *Nature*, 609(7927), 616–621. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05142-w>
- Suer, S., Agustí, J., Sanchez, P., Schwarz, M., & Greb, T. (2011). WOX4 imparts auxin responsiveness to cambium cells in arabidopsis. *Plant Cell*, 23(9), 3247–3259. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087874>
- Sundberg, B., Tuominen, H., & Anthony, C. H. (1994). Effects of the Indole-3-Acetic Acid (IAA) Transport Inhibitors N-1-Naphthylphthalamic Acid and Morphactin on Endogenous IAA Dynamics in Relation to Compression Wood Formation in 1-Year-Old Pinus sylvestris (L.) Shoots. *Plant physiology*, 106(2), 469–476. <https://doi.org/10.1104/pp.106.2.469>
- Sundell, D., Street, N. R., Kumar, M., Mellerowicz, E. J., Kucukoglu, M., Johnsson, C., Kumar, V., Mannapperuma, C., Delhomme, N., Nilsson, O., Tuominen, H., Pesquet, E., Fischer, U., Niittylä, T., Sundberg, B., & Hvidsten, T. R. (2017). Aspwood: High-spatial-resolution transcriptome profiles reveal uncharacterized modularity of wood formation in populus tremula. *Plant Cell*, 29(7), 1585–1604. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00153>
- Tian, F., Yang, D. C., Meng, Y. Q., Jin, J., & Gao, G. (2020). PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants. *Nucleic acids research*, 48(D1), D1104–D1113. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1020>
- Telewski, F. W. (2006). A unified hypothesis of mechanoperception in plants. In *American Journal of Botany* (Vol. 93, Issue 10, pp. 1466–1476). <https://doi.org/10.3732/ajb.93.10.1466>

- Vahala, J., Felten, J., Love, J., Gorzsás, A., Gerber, L., Lamminmäki, A., Kangasjärvi, J., & Sundberg, B. (2013). A genome-wide screen for ethylene-induced Ethylene Response Factors (ERFs) in hybrid aspen stem identifies ERF genes that modify stem growth and wood properties. *New Phytologist*, *200*(2), 511–522. <https://doi.org/10.1111/nph.12386>
- Vanneste, S., & Friml, J. (2009). Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. In *Cell* (Vol. 136, Issue 6, pp. 1005–1016). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.001>
- Vieten, A., Sauer, M., Brewer, P. B., & Friml, J. (2007). Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends In Plant Science*, *12*(4), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.03.006>
- Wessels, B., Seyfferth, C., Escamez, S., Vain, T., Antos, K., Vahala, J., Delhomme, N., Kangasjärvi, J., Eder, M., Felten, J., & Tuominen, H. (2019). An AP2/ERF transcription factor ERF139 coordinates xylem cell expansion and secondary cell wall deposition. *New Phytologist*, *224*(4), 1585–1599. <https://doi.org/10.1111/nph.15960>
- Xie, Z., Nolan, T. M., Jiang, H., & Yin, Y. (2019). AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in Arabidopsis. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00228>
- Yang, S., Wang, S., Li, S., Du, Q., Qi, L., Wang, W., Chen, J., & Wang, H. (2020). Activation of ACS7 in Arabidopsis affects vascular development and demonstrates a link between ethylene synthesis and cambial activity. *Journal of Experimental Botany*, *71*(22), 7160–7170. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa423>
- Ye, L., Wang, X., Lyu, M., Siligato, R., Eswaran, G., Vainio, L., Blomster, T., Zhang, J., & Mähönen, A. P. (2021). Cytokinins initiate secondary growth in the Arabidopsis root through a set of LBD genes. *Current Biology*, *31*(15), 3365–3373.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.05.036>
- Zhang, A., Matsuoka, K., Kareem, A., Robert, M., Roszak, P., Blob, B., Bisht, A., De Veylder, L., Voiniciuc, C., Asahina, M., & Melnyk, C. W. (2022). Cell-wall damage activates DOF transcription factors to promote wound healing and tissue regeneration in Arabidopsis thaliana. *Current Biology*, *32*(9), 1883–1894.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.02.069>
- Zhang, J., Eswaran, G., Alonso-Serra, J., Kucukoglu, M., Xiang, J., Yang, W., Elo, A., Nieminen, K., Damén, T., Joung, J. G., Yun, J. Y., Lee, J. H., Ragni, L., Barbier de Reuille, P., Ahnert, S. E., Lee, J. Y., Mähönen, A. P., & Helariutta, Y. (2019). Transcriptional regulatory framework for vascular cambium development in Arabidopsis roots. *Nature Plants*, *5*(10), 1033–1042. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0522-9>
- Zhang, J., Elo, A., & Helariutta, Y. (2011). Arabidopsis as a model for wood formation. *Current Opinion In Biotechnology*, *22*(2), 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.11.008>