



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias en Bioprocesos

**Análisis de la participación del RNA largo intergénico no codificante
TALIR, en el desarrollo y durante el estrés por déficit hídrico en
*Arabidopsis thaliana***

Tesis que para obtener el grado de:
Doctorado en Ciencias en Bioprocesos

Presenta:
Espinoza López Byanka Sthefany

Directora de Tesis:
Dra. Catalina Arenas Huertero

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

Abril 2026



REPOSITORIO INSTITUCIONAL



UASLP-Sistema de Bibliotecas Repositorio Institucional Tesis digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Análisis de la participación del RNA largo intergénico no codificante *TALIR*, en el desarrollo y durante el estrés por déficit hídrico en *Arabidopsis thaliana* © 2026 por Espinoza López Byanka Sthefany se distribuye bajo una licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International.

Este proyecto se realizó en Laboratorio de Metabolismo del RNA adscrito a la Facultad de Ciencias, en el periodo comprendido entre agosto de 2018 y enero de 2026, bajo la dirección de Dra. Catalina Arenas Huertero y no contó con financiamiento externo, asumiendo la investigadora la totalidad de los costos asociados con recursos personales.

El programa de Doctorado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONAHCYT, registro 000590. Número de la beca otorgada por CONAHCYT, 718765. Número de CVU, 490578.

Los datos del trabajo titulado *Análisis de la participación del RNA largo intergénico no codificante TALIR, en el desarrollo y durante el estrés por déficit hídrico en Arabidopsis thaliana* se encuentran bajo el resguardo del Facultad de Ciencias Químicas y pertenecen a la Universidad Autónoma de SanLuis Potosí.



POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS
Tel: 826-23-00 ext. 6542

San Luis Potosí, S.L.P.
agosto 19, 2025

DRA. CATALINA ARENAS HUERTERO
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP
Presente. _

Estimada Dra. Catalina Arenas Huertero:

En base a su solicitud emitida a esta coordinación donde solicita cambio de tema de tesis realizado por la estudiante de Doctorado **Byanka Sthefany Espinoza López** cuyo título original es: **"Participación de FIP37 en el mecanismo de metilación en m⁶-adenosina de los mRNAs durante la morfogénesis de raíces y en estrés por déficit hídrico en *Arabidopsis thaliana*".**

Esta coordinación a mi cargo, y en común acuerdo con el Comité Académico del Posgrado (CAP), le comunica lo siguiente:

Ha sido **APROBADO** el cambio de título de tesis al trabajo de investigación de la estudiante de Doctorado **Byanka Sthefany Espinoza López**, el cual fue avalado previamente por su correspondiente Comité Tutorial, quedando registrado de la siguiente manera: **"Análisis de la participación del RNA largo intergénico no codificante TALIR, en el desarrollo y durante el estrés por déficit hídrico en *Arabidopsis thaliana*".**

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE



DR. JAIME DAVID PÉREZ MARTÍNEZ POSGRADO EN CIENCIAS
EN BIOPROCESOS
Coordinador del Posgrado en Ciencias en Bioprocésos
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP
01 (444) 826-2300 Ext. 6485 y 6542

www.uaslp.mx

Av. Dr. Manuel Nava Núm. 6
Zona Universitaria - CP 78210
San Luis Potosí, S.L.P.
tel. (444) 826 24 40 al 46
fax (444) 826 2372



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias en Bioprocesos

**Análisis de la participación del RNA largo intergénico no codificante
TALIR, en el desarrollo y durante el estrés por déficit hídrico en
*Arabidopsis thaliana***

Tesis que para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias en Bioprocesos

Presenta:

Espinoza López Byanka Sthefany

SINODALES:

Presidente:

Dra. Claudia Escudero Lourdes

Secretario:

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez-Kessler

Vocal: Dr. José Luis Reyes Taboada

Vocal: Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado

Vocal: Dra. Catalina Arenas Huertero

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

Abril 2026

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO

Dra. Catalina Arenas Huertero: Directora de tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. José Luis Reyes Taboada: Sinodal de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor.

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler: Sinodal de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Claudia Escudero Lourdes: Sinodal de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias XXXXXX
Programa de Doctorado

Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a abril/ 24 /2026

En la ciudad de San Luis Potosí el día 24 del mes de abril del año 2026. El que suscribe Byanka Sthefany Espinoza López del programa de posgrado Ciencias en Bioprocesos adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dra. Catalina Arenas Huertero y cede los derechos del trabajo titulado “Análisis de la participación del RNA largo intergénico no codificante *TALIR*, en el desarrollo y durante el estrés por déficit hídrico en *Arabidopsis thaliana*” a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección catalina.arenas@uaslp.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Byanka Sthefany Espinoza López

Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a abril/ 16 /2026

L.B. Reyna Nayeli Ortiz Quintero
Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada Análisis de la participación del RNA largo intergénico no codificante *TALIR*, en el desarrollo y durante el estrés por déficit hídrico en *Arabidopsis thaliana* presentada por el autor Espinoza López Byanka Sthefany. La tesis es requisito para obtener el grado de Doctorado en el Posgrado en Ciencias Bioprocesos. El análisis reveló un porcentaje de similitud de Porcentaie de Similitud de 7% excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envió un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Dra. Alicia Grajales Lagunes

Coordinadora Académica del Posgrado
en Ciencias en Bioprocesos

Con el corazón colmado de amor, admiración y eterna gratitud a Marianita y Esteban.

Los amores de mi vida.

Sin su apoyo constante e incondicional esto no sería posible.

A Ana y a Carito por apoyarme y acompañarme en los momentos felices y tristes.

A Flor y a David por estar en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este trayecto he tenido la fortuna de encontrar personas talentosas, generosas y maravillosas, cuya presencia enriqueció profundamente mi formación académica y humana. A cada una de ellas expreso mi más sincera gratitud.

Agradezco profundamente a mi mentora, la Dra. Catalina Arenas Huertero por su guía, sus enseñanzas y por acompañarme a lo largo de este tiempo con paciencia y generosidad.

A la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez-Kessler, por su apoyo invaluable y por su gran generosidad con la que compartió con nosotras los insumos de laboratorio, gesto que siempre valoraré profundamente.

Gracias al Dr. José Luis Reyes Taboada, por acogerme como parte de su laboratorio y por su constante disposición para apoyarnos, así como por compartir generosamente su experiencia personal y profesional.

A la Dra. Claudia Escudero Lourdes, quien me acompañó durante esta etapa y realizó valiosas observaciones a mi trabajo, enriqueciéndolo y fortaleciéndolo.

Agradezco al Dr. Joseph Dubrovsky por abrirme las puertas de su laboratorio, enseñarme y permitirme adentrarme en el interesante mundo de las raíces.

A la Dra. Selene Napsucialy Mendivil, por su invaluable apoyo técnico durante mi estancia en el Instituto de Biotecnología, UNAM; así como por sus valiosas enseñanzas que me acompañaron a lo largo de todo el doctorado.

A la M. C. Beatriz Pérez Morales, por brindarme acompañamiento técnico durante mi estancia en el Instituto de Biotecnología, UNAM.

A la Biól. Carla Jasso, por tenderme la mano en los momentos difíciles y permitirme hacer uso de los equipos de su laboratorio con tanta generosidad.

Al Dr. Adrián Báez y al Dr. Roberto Salgado, por las facilidades que nos ofrecieron para el uso de los equipos y por su disposición para apoyar nuestro trabajo.

Mi gratitud a la Dra. Nadia Saderi por brindarme la oportunidad de impartir clases en la licenciatura en Biología; en los momentos más oscuros, la docencia se convirtió en una luz que me impulsó a continuar.

A la Dra. Mónica Isabel Miguel, por sus valiosos comentarios para la sección de materiales y métodos del artículo de investigación.

Reconozco y agradezco la presencia del Dr. Luis Antonio Salazar Olivo, quien sin saberlo me animó a creer en mí.

Agradezco a la M. C. Gabriela Rodríguez Tenorio por brindarme generosamente las muestras para complementar un experimento del artículo de investigación.

Gracias a mis fantásticas y talentosas amigas Mariana Morquecho y Araceli Rodríguez (la pandilla), porque con su amistad iluminaron mi camino y lo llenaron de colores. Gracias por ser mi sostén emocional, por animarme siempre a seguir adelante, incluso cuando todo parecía desolador.

A mi amiga Omayra Bolaños, quien aún en la distancia ha sabido acompañarme y animarme a no rendirme.

A mis compañeros del laboratorio: Jesús Nieto, Gabriela Rodríguez, Susana Vargas, Emily Oyarvide, Arantza Rodríguez, Juan Manuel Portales, Paulina Alvarado, Erick Peña, Jaime Cortéz y Daniel Cortés, con quienes compartí innumerables conversaciones académicas y personales, que inspiran a crecer, cuestionar y aprender cada día más.

Con el corazón lleno de gratitud hacia Ana Espinosa, Roberto Solano y Carito, por su compañía, su apoyo incondicional y la paciencia con la que comprendieron este viaje académico y personal.

A mi hermano Víctor Espinoza, quien me ha escuchado y apoyado mis decisiones, además de compartir conmigo su experiencia a lo largo de esta aventura.

A Flor Espinosa, que me ha brindado un hogar acogedor en el que puedo reír, llorar y descansar tranquilamente.

Agradezco profundamente a mi mamá Marianita y a mi papá Esteban, por sembrar en mí la semilla de la responsabilidad, del trabajo duro y del compromiso, y por ser las raíces que me sostienen, permitiéndome crecer y animándome a florecer.

A Dios, porque cuando mi vida parecía carecer de sentido, llegaste a recordarme que siempre vale la pena vivir.

A ti, Madre María, por convertir cada una de mis oraciones en realidad.

RESUMEN

El desarrollo vegetal es un proceso fisiológico complejo regulado por numerosas proteínas, factores de transcripción y señales ambientales. En este contexto, los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) han emergido como moduladores clave del crecimiento y la respuesta al estrés. Los lncRNAs son transcritos de longitud mayor a 200 nucleótidos de baja o ninguna capacidad codificante que regulan la expresión génica mediante interacciones con DNA, proteínas y otros RNAs. Sin embargo, a pesar de sus funciones relevantes, solo un número limitado de lncRNAs ha sido caracterizado en plantas. En este estudio se describe, a nivel genómico y fenotípico, el lncRNA *TALIR*, localizado en la región intergénica entre *TATA-binding protein 2* (*TBP2*) y el gen que codifica para una ubiquitina ligasa *E3 RINGU* en *Arabidopsis thaliana*. Las plantas mutantes de *TALIR* mostraron hojas y rosetas de menor tamaño, así como una disminución en la densidad de raíces laterales. Además las líneas mutantes de *TALIR* presentan niveles alterados de la abundancia relativa de *TBP2*, lo que conduce a una desregulación de la expresión del *MIR396* y *GRF2*, así como de *MIR156* y *SPL9*, sugiriendo que estas desregulaciones podrían contribuir a la variación del tamaño de las hojas.

Por otro lado, el estrés abiótico es una de las principales causas de pérdida de cultivos a nivel global, por lo que se investigó si *TALIR* está involucrado en la respuesta al estrés hídrico. *TALIR* se acumula en tratamientos con ABA y NaCl en plantas WT, mientras que las mutantes de *TALIR* exhiben insensibilidad a ABA durante la germinación, lo que sugiere un posible papel de *TALIR* en este proceso. En conjunto, estos resultados expanden el conocimiento actual sobre los lncRNAs en el desarrollo y la respuesta al estrés abiótico y aporta nuevos hallazgos del control de la regulación mediada por *MIRNAs*.

Palabras clave

Arabidopsis thaliana, estrés hídrico, desarrollo foliar, raíces, RNAs largos no codificantes, microRNAs.

SUMMARY

Plant development is a complex physiological process regulated by numerous proteins, transcription factors, and environmental signals. In this context, long non-coding RNAs (lncRNAs) have emerged as important modulators of plant growth, development and stress responses. LncRNAs are transcripts longer than 200 nucleotides with little or no protein-coding capacity that regulate gene expression through interactions with DNA, proteins, and other RNAs. However, despite their important regulatory roles, only a limited number of them have been characterized in plants. In this study, we describe the genetic and phenotypic characterization of the *TBP2-associated long intergenic non-coding RNA (TALIR)* encoded upstream of *TATA-binding protein 2 (TBP2)* and downstream of the ubiquitin ligase gene *E3 RINGU* of *Arabidopsis thaliana*. *Talir* mutant plants exhibited smaller leaves and rosette size, as well as reduced lateral root density. Additionally, *talir* mutant lines displayed altered relative levels of *TBP2*, leading to the deregulation of *MIR396* and *GRF2*, as well as *MIR156* and *SPL9* expression, suggesting that these alterations may in part contribute to the altered leaf size observed. Furthermore, abiotic stress is one of the main causes of crop losses worldwide. Therefore, we investigated whether *TALIR* is involved in water-deficit stress responses. *TALIR* is upregulated upon ABA and NaCl treatments in WT plants, whereas *talir* mutants exhibit ABA insensitivity during germination, suggesting a potential role for *TALIR* in plant development and abiotic stress responses. Together, these results widen our current understanding on the roles of lncRNAs in plant development and stress responses and provide new insights into *miRNA*-mediated regulatory mechanisms.

Keywords

Abiotic stress, *Arabidopsis thaliana*, leaf growth, long non-coding RNAs, roots, microRNAs.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	4
2.1	Desarrollo y crecimiento de las plantas.....	4
2.1.1	Formación del sistema radicular.....	5
2.1.1.1	La raíz primaria.....	5
2.1.1.2	Las raíces laterales.....	9
2.1.2	Formación de las hojas	11
2.1.2.1	Organización del meristemo apical del tallo e iniciación del primordio foliar.....	12
2.1.2.2	Polaridad adaxial-abaxial.....	15
2.1.2.3	Polaridad medio-lateral.....	17
2.1.2.4	Polaridad próximo-distal	18
2.1.2.5	Regulación del tamaño y forma de la hoja.....	19
2.1.2.6	Filotaxis: arreglo espacial de las hojas	23
2.1.3	Heteroblastía de las hojas	24
2.1.3.1	Interacción de la heteroblastía con la morfogénesis foliar	26
2.1.4	Senescencia de la hoja	28
2.2	Estrés por déficit hídrico en las plantas.....	29
2.2.1	Efecto del estrés por déficit hídrico en el desarrollo de las plantas	29
2.2.1.1	ABA: homeostasis y transducción de señales	31
2.3	Los RNAs no codificantes regulan la expresión génica	36
2.3.1	Metabolismo de los miRNAs y de los lncRNAs	37
2.3.1.1	Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNA	37
2.3.1.2	Biogénesis, clasificación y mecanismos de acción de los lncRNA	40
2.4	Los lncRNAs en plantas: involucrados en el desarrollo de las raíces y las hojas y en la respuesta a estrés	42
2.4.1	Los lncRNAs en el desarrollo de las raíces	43
2.4.2	Los lncRNAs en el desarrollo de las hojas	45
2.4.3	Los lncRNAs en la respuesta al estrés por déficit hídrico.....	47
2.5	Caracterización previa de <i>TALIR</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	49

3	JUSTIFICACIÓN.....	54
4	HIPÓTESIS.....	55
5	OBJETIVOS.....	56
5.1	Objetivo general.....	56
5.2	Objetivos específicos	56
6	MATERIAL Y MÉTODOS	57
6.1	Material vegetal y condiciones de crecimiento	57
6.2	Generación de líneas transgénicas.....	57
6.3	Análisis foliares	58
6.4	Análisis de raíz.....	59
6.5	Análisis Moleculares	60
6.5.1	Extracción de RNA	60
6.5.2	Determinación de la abundancia de <i>TALIR</i> y genes codificantes.....	60
6.5.3	Determinación de la abundancia de los MIR396 y MIR156 y de sus genes blancos	61
6.6	Histoquímica de GUS.....	63
6.7	Ensayos de estrés hídrico.....	63
6.8	Ensayo de expresión transitoria de <i>TALIR</i>	64
6.9	Análisis estadísticos.....	64
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
7.1	El desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i> es modulado por <i>TALIR</i>	65
7.2	<i>TALIR</i> modula temporalmente la transcripción de sus <i>loci</i> vecinos	72
7.3	Las mutantes de <i>TALIR</i> exhiben una alteración en la acumulación de los miR396b y miR156.....	74
7.4	<i>TALIR</i> se acumula durante el tratamiento con ABA y en NaCl	80
7.5	<i>TALIR</i> se localiza en el núcleo.....	84
8	CONCLUSIONES	87
9	BIBLIOGRAFÍA.....	89
10	CARTA DE ACEPTACIÓN DEL ARTÍCULO	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de los meristemos apicales en <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
Figura 2. Anatomía de la raíz primaria y etapas de desarrollo de las raíces laterales de <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
Figura 3. Mecanismos moleculares involucrados en la iniciación del primordio de la hoja	15
Figura 4. Regulación del tamaño y la forma de la hoja.	19
Figura 5. Heteroblastía en <i>Senecio vulgaris</i>	25
Figura 6. Mecanismo de regulación mediado por miR156/miR157	27
Figura 7. Homeostasis y vía de transducción de ABA.....	35
Figura 8. Biogénesis y mecanismo de acción de miRNAs en plantas.....	39
Figura 9. Mecanismos de acción de los lncRNAs	41
Figura 10. Expresión de <i>TALIR</i> en condiciones de estrés por déficit hídrico.....	50
Figura 11. Análisis fenotípico a los 21 días de desarrollo	51
Figura 12. Análisis fenotípico a los 27 días de desarrollo.....	52
Figura 13. Análisis de expresión de los genes aledaños a <i>TALIR</i> y <i>MIRNAs</i>	53
Figura 14. Análisis de la acumulación de <i>TALIR</i> en las líneas mutantes	66
Figura 15. <i>TALIR</i> es requerido durante el desarrollo de las hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	67
Figura 16. <i>TALIR</i> es requerido durante el desarrollo de las hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	68
Figura 17. <i>TALIR</i> es requerido durante el desarrollo de las hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
Figura 18. Caracterización del crecimiento de la raíz primaria en las mutantes de <i>TALIR</i>	70
Figura 19. <i>TALIR</i> participa en el desarrollo radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
Figura 20. Desregulación la abundancia de genes aledaños a <i>TALIR</i> durante el desarrollo foliar de <i>Arabidopsis thaliana</i>	73
Figura 21. Tinción histoquímica de GUS del promotor de <i>MIR396b</i> en plantas WT y en el fondo genético <i>talir</i>	75

Figura 22. Desregulación del miR396b y miR156 durante el desarrollo de las hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
Figura 23. Análisis bioinformático de la región promotora de TALIR.	80
Figura 24. TALIR se acumula bajo condiciones de estrés y evaluación de la germinación en respuesta a ABA	81
Figura 25. TALIR modula la acumulación de TBP2 durante el tratamiento con ABA.	82
Figura 26. Expresión transitoria de TALIR en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	85

1 INTRODUCCIÓN

Hace aproximadamente 1 200 millones de años, a partir de un evento endosimbiótico en el que una cianobacteria fue engullida por un eucariota unicelular heterótrofo, aparecieron las plantas verdes en la Tierra (Zhang et al, 2022). Este evento marcó el origen de las diversas formas de plantas fotosintéticas que habitan actualmente el planeta. Desde entonces, las plantas han estado sometidas a diversas fuerzas de presión selectiva que han favorecido su capacidad de sobrevivir y adaptarse a distintos ambientes.

Una de las características que sobresale de las diversas formas de vida vegetal es su naturaleza sésil, en la que permanecen ancladas al suelo mediante el sistema radicular. Esta condición ha favorecido el desarrollo sorprendente de su capacidad de resiliencia, por lo que son capaces de percibir y reaccionar rápidamente a todos los estímulos externos activando respuestas eficientes y ajustando su desarrollo a condiciones ambientales cambiantes (Jones et al., 2013).

Como consecuencia, las plantas han generado diversos mecanismos moleculares para crecer y preservarse. En este contexto, la biología molecular y la biología del desarrollo han permitido comprender los mecanismos genéticos y las redes regulatorias que subyacen tanto al desarrollo vegetal como a las respuestas adaptativas frente a su entorno.

El DNA es una de las biomoléculas que desempeña un papel preponderante en los mecanismos moleculares que regulan la expresión génica. En esta molécula se encuentran encriptadas las instrucciones necesarias para la formación, el mantenimiento y la reproducción de los organismos vivos. Estas instrucciones se ejecutan mediante procesos biológicos altamente coordinados, como la replicación del DNA, la transcripción a RNA y la traducción a proteínas. Estos procesos incluyen además mecanismos de regulación postranscripcional, postraducciona y a nivel epigenético, que determinan dónde y cuándo se expresa cada gen (Alberts et al., 2002).

La expresión génica es, por tanto, el resultado de un proceso dinámico y altamente regulado en el que una gran diversidad de moléculas participan. Entre éstas destacan los RNAs no codificantes (ncRNAs) nombrados así por su baja o nula capacidad para codificar proteínas. Con base en su función, los ncRNAs se clasifican como RNAs de mantenimiento y regulatorios y según su tamaño en RNAs pequeños y RNAs largos. Los RNAs de mantenimiento participan en procesos esenciales para la viabilidad celular y presentan una expresión constitutiva; entre ellos se encuentran el RNA ribosomales (rRNAs) y los RNA de transferencia (tRNAs). En contraste, los RNAs con función regulatoria suelen presentar niveles de expresión más bajos y específico de tipo celular, tejido o etapa del desarrollo. Entre estos destacan los microRNAs (miRNAs) y los RNAs largos no codificantes (lncRNAs), los cuales son de interés para esta investigación (Mattick et al., 2023; Saha et al., 2025). Además, se ha demostrado que tanto los miRNAs y los lncRNAs regulan la expresión de genes que contribuyen al desarrollo foliar y radicular, así como a las respuestas a estreses en las plantas (Chen et al., 2005; Ariel et al., 2014; Kim et al., 2022).

En este sentido a pesar de que los lncRNAs presentan niveles de expresión relativamente bajos y una conservación filogenética limitada, se ha demostrado que exhiben una notable especificidad espacial y temporal, lo que sugiere funciones altamente reguladas y dependientes del contexto celular (Saha et al., 2025). En plantas, los lncRNAs han sido implicados en la regulación del desarrollo de las hojas, la arquitectura del sistema radicular, el tiempo de floración, en la fotomorfogénesis y en la respuesta a estreses biótico y abiótico como el estrés hídrico. Además participan en vías de señalización de hormonas como auxina y el ácido abscísico (Jampala et al., 2021).

Derivado de las tecnologías de secuenciación masiva, miles de lncRNAs ha sido identificados en plantas. Sin embargo, solo un limitado número de lncRNAs han sido descritos funcionalmente en plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, arroz, entre otras (Saha et al., 2025).

Por lo que, a la fecha un gran número lncRNAs permanecen sin ser investigados, en este escenario resulta perentorio explorar los mecanismos de acción o la regulación que ejercen durante el desarrollo y la respuesta adaptativa de la plantas a condiciones adversas.

Con base en lo anterior, en esta tesis doctoral se caracterizó la contribución que el RNA largo intergénico no codificante TALIR tiene sobre el desarrollo foliar y radicular, así como en la respuesta al estrés hídrico en *Arabidopsis thaliana*.

Mediante técnicas de biología molecular fue posible generar mutantes de pérdida de función de *talir*. Las mutantes de *talir* se analizaron fenotípica y genotípicamente lo que durante el desarrollo de la hojas y de las raíces, así como en la respuesta a ABA y NaCl. Estos análisis permitieron comprender la contribución de *talir* a estos procesos biológicos ampliando el conocimiento sobre los mecanismos moleculares mediados por lncRNAs en plantas.

Finalmente, el estudio de los lncRNAs contribuye a esclarecer su papel como reguladores clave en la integración de señales de desarrollo y estrés ambiental. Generando bases conceptuales y metodológicas que, en un futuro puedan ser aplicadas al mejoramiento de cultivos y de esta forma contribuir a la seguridad alimentaria global.

2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Desarrollo y crecimiento de las plantas

El desarrollo de órganos vegetales, como las hojas y las raíces, es un proceso esencial para el crecimiento y la adaptación de las plantas a su entorno. Este proceso está regulado por una compleja red de señales genéticas, fitohormonales y ambientales que actúan de manera coordinada para asegurar la correcta formación de estructuras funcionales y la plasticidad necesaria para la supervivencia y la reproducción de la planta.

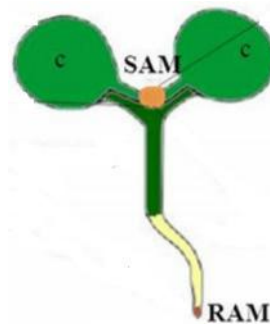


Figura 1. Representación de los meristemos apicales en *Arabidopsis thaliana*. SAM, meristemo apical del tallo; RAM, meristemo apical de la raíz; c, cotiledones. Tomado y modificado de Boscá et al, 2011.

En principio, las semillas de muchas especies vegetales requieren activarse de su estado de latencia y emerger de su semilla. Durante la germinación, dos meristemos apicales desempeñan un papel central en la formación del cuerpo vegetal: el meristemo apical del tallo (shoot apical meristem, SAM) y el meristemo apical de la raíz (root apical meristem, RAM) (Figura 1). Ambos meristemos están constituidos por poblaciones de células indiferenciadas con alta capacidad proliferativa que albergan un nicho de células troncales (stem cell niche, SCN). Estas células conservan la información genética necesaria para dar origen a los distintos tejidos y órganos vegetales a lo largo del ciclo de vida de la planta. Entre los órganos que cumplen funciones esenciales destacan las raíces por su papel crucial como sistema de anclaje

y en la absorción de agua y minerales, así como la percepción de señales ambientales. Por su parte las hojas son el órgano en donde principalmente ocurre la fotosíntesis y desempeñan un papel clave en el intercambio gaseoso y la transpiración. La correcta formación y función de estos órganos dependen de programas de desarrollo finamente regulados que integran señales endógenas y exógenas (Lv et al., 2023; Roth-Nebelsick y Krause, 2023).

En este contexto, la comprensión de los mecanismos moleculares que median el desarrollo vegetal y la identificación de nuevos reguladores implicados en dicho proceso y en las respuestas al estrés, resultan fundamentales para ampliar el conocimiento existente sobre la biología de las plantas. En particular, el estudio de moléculas reguladoras como los lncRNAs, que ofrece una perspectiva novedosa para entender cómo se integran las señales de desarrollo y adaptación ambiental a nivel molecular.

2.1.1 Formación del sistema radicular

El sistema radicular de las plantas está formado por la raíz primaria y un conjunto de raíces laterales que se originan a partir de esta. La arquitectura del sistema radicular es altamente plástica y responde tanto a programas genéticos intrínsecos como a estímulos ambientales, lo que permite a las plantas optimizar la exploración del suelo y la adquisición de recursos. En las siguientes secciones se describen los procesos de formación de la raíz primaria y de las raíces laterales, profundizando en los mecanismos moleculares que subyacen su desarrollo.

2.1.1.1 La raíz primaria

En el extremo distal de la radícula se localiza el meristemo apical de la raíz (RAM), el cual se encarga de generar nuevas células que permiten el crecimiento longitudinal y la formación de los tejidos radiculares. En el RAM se distingue un conjunto de células troncales o células iniciales (SCN) que rodean a un grupo de células mitóticamente

menos activas conocidas como el centro quiescente (quiescent center, QC) (Figura 2a y 2c). Las células iniciales se clasifican como iniciales de cofia lateral y epidermis, iniciales de córtex y endodermis, iniciales de periciclo y tejido vascular y por último las iniciales de caliptra. Estas células dan origen a los diferentes tejidos que forman la raíz. El conjunto formado por las células del QC y las células iniciales SCN, es responsable del mantenimiento del estado indiferenciado y de la organización del meristemo (Figura 2a y 2c). (Petricka y Winter *et al.*, 2012; Di Mambro *et al.*, 2017). La anatomía de la raíz puede describirse a partir de dos ejes principales de desarrollo: el eje radial o transversal, que define la organización concéntrica de los tejidos y el eje longitudinal que se extiende desde la punta de la raíz a su unión con el tallo de la planta (Di Mambro *et al.*, 2017). A lo largo del eje longitudinal, cada célula inicial adyacente al QC se divide asimétricamente para autorenovarse y producir una célula hija que se divide varias veces en la zona meristemática o dominio de proliferación, posteriormente pasa a la zona de transición antes de salir del ciclo celular. Posteriormente, las células dejan de dividirse y comienzan a elongarse hasta adquirir el tamaño característico de una célula funcional, este proceso ocurre en la zona de elongación. Finalmente, en la zona de diferenciación, las células adquieren características funcionales relacionadas con el tejido celular al que pertenecen. A diferencia del resto de iniciales, las células iniciales localizadas por debajo del QC se dividen generando células hijas que tras un número limitado de divisiones, se diferencian en células de caliptra que censan la gravedad (Heidstra *et al.*, 2014) (Figura 2a). En el eje radial, la raíz se organiza como una serie de cilindros concéntricos, en el que la capa externa es la epidermis compuesta por dos tipos celulares diferentes, seguida del córtex y la endodermis compuestas por un solo tipo celular, en la siguiente capa está el periciclo compuesto por células capaces de iniciar la formación de raíces laterales y la región central, donde se encuentra el tejido vascular que da origen al xilema y al floema responsables del transporte de agua y azúcares, respectivamente (Figura 2c) (Benfey y Scheres, 2000). EL QC es esencial para la especificación del SCN y el mantenimiento del estado indiferenciado de las células iniciales (Figura 2d). Los factores de transcripción (FT) *PLETHORA (PLT)* y *SHORTROOT (SHR)/SCARECROW (SCR)* regulan la identidad del QC. Las mutantes

con pérdida de función de estos alelos generan alteraciones en la identidad del QC y muestran una terminación prematura del crecimiento de la raíz (Petricka y Winter *et al.*, 2012). Asimismo, *WUSCHEL-LIKE HOMEODOMAIN BOX5* (*WOX5*), un FT que se expresa específicamente en esta zona, es clave para regular la organización del QC e impedir la proliferación celular. Las mutantes de pérdida de función de *wox5* conducen a la diferenciación prematura de las células iniciales de columela sin afectar significativamente el tamaño del meristemo o el crecimiento de la raíz (Heidstra *et al.*, 2014). La señalización mediada por el péptido CLAVATA3/ESR-RELATED40 (CLE40) constituye otro mecanismo esencial en la organización del SCN. CLE40 es secretado por las células de la caliptra diferenciadas y percibido por los receptores CLAVATA1 (CLV1) y ARABIDOPSIS CRYNCLY4 (ACR4) en el QC. *WOX5* se mueve vía plasmodesmos hacia las células troncales de la caliptra, modelos previos sugerían que el módulo CLV1/ACR4 restringían este movimiento y permitían mantener la identidad de las células troncales de caliptra. No obstante, estudios recientes han demostrado que la función principal del módulo CLE40/CLV1/ACR4 es regular la actividad y posicionamiento del QC. El movimiento de *WOX5* ocurre pero no es esencial para mantener la identidad de las células troncales de caliptra lo que sugiere que otros factores pueden estar involucrados en el control del destino celular (Berckmans *et al.*, 2020). *WOX5* reprime la expresión de la *CYCD3;3* impidiendo las divisiones celulares en el QC y manteniendo el estado de quiescencia en la raíz primaria y en la raíz madura. Además, en las células troncales de la caliptra reprime la expresión del FT CYCLIN DOF FACTOR4 (CDF4) manteniendo el estado indiferenciado de estas células (Drisch y Stahl, 2015).

Adicionalmente, fitohormonas como la auxina tienen un papel predominante en el mantenimiento del estado quiescente del QC. La concentración máxima de auxina es encontrada en el QC debido a la síntesis local y transporte polar de auxina hacia el QC. La expresión de *WOX5* también es regulada por la vía de señalización de auxina, restringiéndolo al QC (Drisch y Stahl, 2015). En contraste, la citoquinina promueve la diferenciación celular una vez que las células han dejado la zona de proliferación

(Kean-Galeno et al., 2024), mientras que fitohormonas como el etileno y ácido abscísico (ABA) regulan las divisiones celulares del QC (Petricka y Winter *et al.*, 2012).

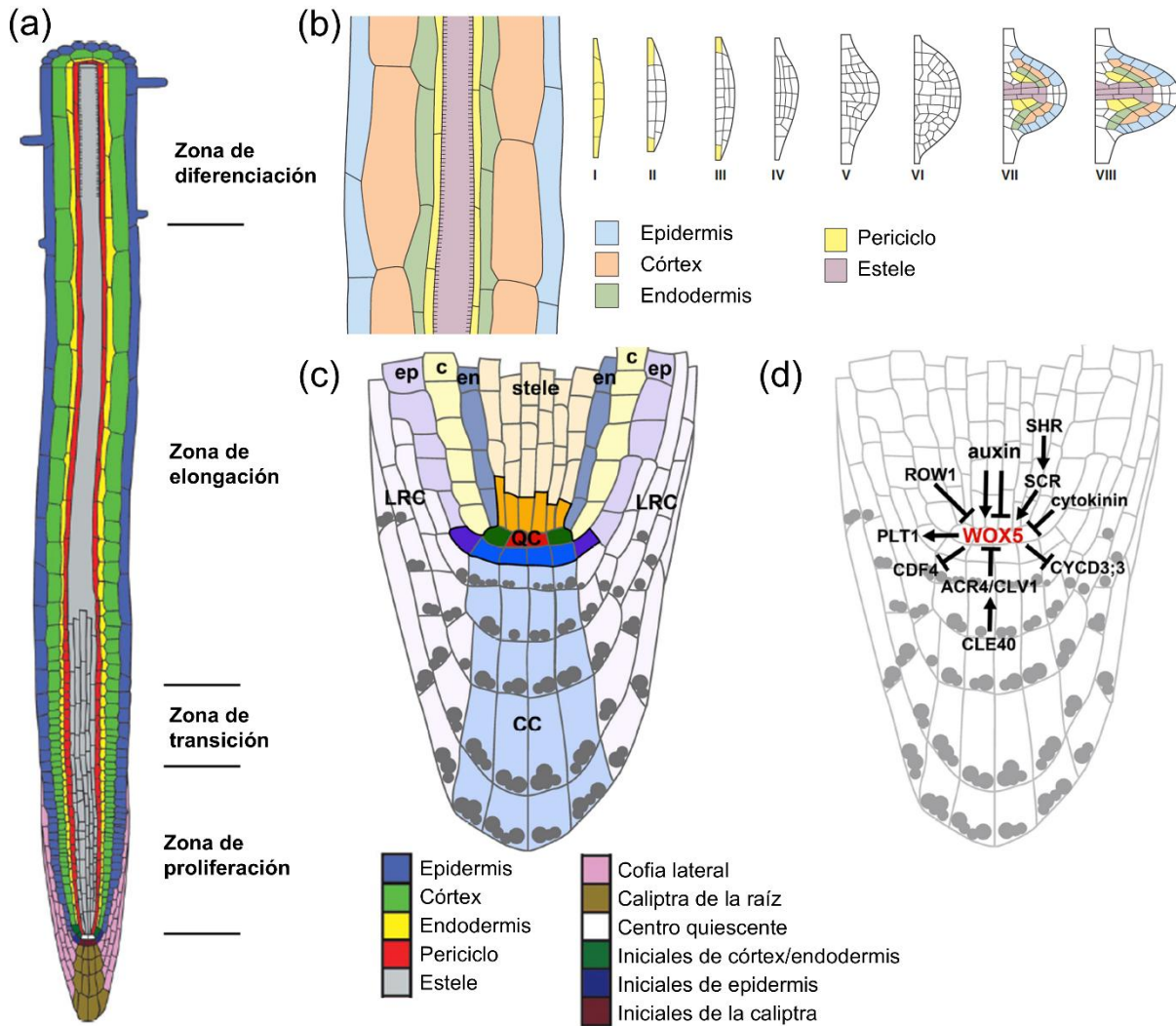


Figura 2. Anatomía de la raíz primaria y etapas de desarrollo de las raíces laterales de *Arabidopsis thaliana*. (a) Representación del eje de desarrollo longitudinal en el que se encuentran indicadas las zonas de proliferación/meristemática, de transición, de elongación y la de diferenciación; modificado de Ubeda-Tomás et al., 2012. (b) Etapas de desarrollo de los PRL; tomando de Jones et al., 2013. (c) Organización de la zona meristemática. El SCN está marcado con una línea negra más intensa; en el interior se encuentran las células del QC (rojo), células iniciales de caliptra (azul), células iniciales de cofia lateral y epidermis (morado), células iniciales de cortex y endodermis (verde) e iniciales del periciclo y tejido vascular (amarillo). ep, epidermis; c, cortex; en, endodermis; stele, estela/tejido vascular; LRC, cofia lateral; CC, células de la caliptra. Los círculos grises indican gránulos de almidón. (d) Regulación de la expresión del QC, en el que se muestra la señalización por TFs, fitohormonas y péptidos. Las flechas indican regulación positiva y las líneas con barra al final indica regulación negativa. (c) y (d) son tomados de Drisch y Stahl, 2015.

2.1.1.2 Las raíces laterales

Las raíces laterales (RLs) desempeñan un papel importante en la adaptación de las plantas a su entorno, particularmente frente a estreses abióticos como la sequía, al incrementar la capacidad de exploración del suelo y la eficiencia de la absorción de agua y nutrientes (Lavenus et al., 2013). En *Arabidopsis thaliana*, las RL se originan a partir de un grupo de células maduras del periciclo, localizadas adyacentes a los polos del xilema, conocidas como células fundadoras. Estas células reingresan al ciclo celular y sufren un serie ordenada de divisiones celulares para formar el primordio de raíz lateral (LRP) (Malamy y Benfey, 1997). El proceso de formación de una RL ha sido descrito de manera detallada por Malamy and Benfey (1997), quienes lo dividieron en ocho etapas sucesivas basadas en criterios anatómicos y patrones de división celular. En la etapa 1, las células fundadoras del periciclo sufren divisiones anticlinales, caracterizadas por la formación de paredes celulares perpendiculares al eje longitudinal de la raíz, que indica la formación del primordio de la raíz lateral (PRL). En la etapa 2 ocurre una división periclinal paralela al eje de la raíz, dando lugar a dos capas dentro del PRL. En esta fase, no todas las células que forman el PRL en la etapa 1 se dividen de manera sincrónica, por lo que contribuyen a la morfología en forma de domo al PRL. En la etapa 3 continúan las divisiones periclínicas/periclinales formando más capas, sin embargo, en los extremo algunas células no se dividen, lo que acentúa la forma de domo en PRL. En la etapa 4 se pueden observar cuatro capas de células en el PRL y en esta etapa penetra la capa endodérmica de la raíz madre. En la etapa 5, se producen divisiones anticlinales en las capas externas del PRL, originando pequeñas células cúbicas; en esta etapa el PRL se encuentra a mitad del córtex de la raíz madre. En la etapa 6, ocurren divisiones periclinales en las capas externas y el PRL ha atravesado el córtex y ha penetrado la epidermis. En la etapa 7 parece que muchas de las células internas han experimentado divisiones anticlinales y el PRL parece a punto de emerger de la raíz madre. En la etapa 8 de emergencia, el PRL ha emergido de la raíz madre, ha alcanzado una mayor longitud que puede deberse principalmente a la expansión celular de las células preexistentes más que por división

celular (Figura 2b). La nueva RL que ha emergido genera un meristemo apical de raíz lateral funcional que mantiene el crecimiento de la RL mediante divisiones celulares. Las RL surgen iterativamente a lo largo de la raíz primaria de modo que las raíces más jóvenes están hacia el ápice de la raíz (Petricka y Winter *et al.*, 2012). La auxina es una fitohormona clave que regula el desarrollo de la RL, ya que controla prácticamente todas las etapas de su formación desde la iniciación hasta la emergencia de la RL (Casimiro *et al.* 2001). La activación de las células fundadoras del periciclo depende de la acumulación de auxina, la cual se logra mediante la síntesis local como a través del transporte polar llevado a cabo por transportadores como PIN-FORMED (PIN) y AUXIN RESISTANT 1 (AUX1). La señalización de auxina es transducida por FT de la familia *AUXIN RESPONSE FACTORS* (ARF) y sus represores, las proteínas AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA) (Okushima *et al.*, 2007; Banda *et al.*, 2019; Ramos *et al.*, 2025). Entre los ARF implicados en la formación de raíces laterales, ARF7 y ARF19 desempeñan un papel importante. En condiciones basales, estos factores se encuentran reprimidos por el represor IAA14. La doble mutante de *arf7arf9* muestra un fenotipo caracterizado por un número reducido de RL que se restablece al expresar constitutivamente genes que codifican para los FT *LATERAL ORGANS BOUNDARIES-DOMAIN16* (*LBD16*) y *LBD29*. De manera consistente, la expresión de *LBD16* y *LBD29* es activada directamente por ARF7 y ARF19 lo que sitúa a estos genes nodos clave en la red regulatoria dependiente de auxinas. Además los ARFs regulan también la transcripción de otros genes río abajo, como *LATERAL ROOT PRIMORDIUM1* (*LRP1*), un gen inducido por auxina y que se expresa en todas las etapas de la formación de un PRL, excepto en la raíz primaria. A su vez, *LRP1* induce la expresión de *YUCCA4* (*YUC4*), involucrado en la biosíntesis de auxina, lo que sugiere la existencia de un circuito de retro-regulación positiva entre la señalización de auxina y su biosíntesis local durante la formación de raíces laterales (Zhang *et al.*, 2023; Yalamanchili *et al.* 2024).

Otras fitohormonas que regulan el proceso de formación de RL son las citoquininas, que funcionan como reguladores negativos al inhibir la iniciación del PRL y las

divisiones anticlinales en la etapa 1 del desarrollo del PRL. Asimismo, el ABA inhibe la formación de PRL manteniéndolos en un estado de dormancia, probablemente mediante la acción del FT ABSCISIC ACID INSENSITIVE4 (ABI4), que inhibe la expresión de PIN1 reduciendo el transporte polar de auxina (Shkolnik-Inbar et al., 2010). Por otro lado, el etileno promueve la emergencia de las RL, al estimular la proliferación celular en etapas finales del desarrollo del primordio (Torres-Martínez et al. 2019).

De manera similar a lo observado en el RAM, los FT PLT juegan un papel importante en la regulación de la formación del PRL, en particular se ha identificado que *PLT3*, *PLT5* y *PLT7* son requeridos para las divisiones periclinales que ocurren entre la etapa 1 y la etapa 2. Además, controlan el inicio de la transcripción de los genes *PLT1*, *PLT2* y *PLT4*, que influyen en el gradiente de respuesta a auxina y regulan la expresión de marcadores de tejido/meristemo. Se ha reportado que la triple mutante de *plt3plt5plt7* exhibe un fenotipo caracterizado por la desorganización severa del PRL y la falta de un meristemo definido. La expresión de cualquiera de los seis genes *PLT* es suficiente para reestablecer el fenotipo normal, lo que sugiere que la identidad del módulo PLT depende del momento y lugar preciso de expresión más que del gen específico involucrado (Banda et al., 2019; Zhang et al., 2022).

2.1.2 Formación de las hojas

Las hojas son órganos vegetativos esenciales en los que se llevan a cabo procesos fisiológicos fundamentales para las plantas, tales como la fotosíntesis, la respiración y la transpiración. En consecuencia, la correcta formación y desarrollo de las hojas resulta crucial para el crecimiento, la productividad y la supervivencia de las plantas. La morfogénesis foliar está regulada por una compleja interacción de señales genéticas, hormonales y ambientales que actúan de manera coordinada a lo largo del desarrollo. La formación de una hoja se lleva a cabo en una serie de etapas que

comprenden la iniciación del primordio de la hoja, el establecimiento de la polaridad, la regulación del tamaño y la forma de la lámina y finalmente la senescencia (Lv et al., 2023). Cada una de estas fases está sujeta a un control molecular altamente coordinado que asegura la correcta diferenciación celular y la adquisición de funciones específicas. En esta sección se abordarán cada una de las etapas que comprenden el desarrollo.

2.1.2.1 Organización del meristemo apical del tallo e iniciación del primordio foliar

El desarrollo de las hojas comienza en el meristemo apical del tallo (shoot apical meristem, SAM) una estructura compuesta por poblaciones de células indiferenciadas con alta capacidad proliferativa que mantiene la actividad meristemática durante el desarrollo de la planta, que dan origen a los órganos aéreos de la planta, incluidas las hojas (Figura 3a). Al igual que el RAM, el SAM contiene un nicho de células troncales, localizado en la región denominada zona central (CZ). Estas células se caracterizan por una tasa de división relativamente baja y por la expresión del gen *CLAVATA3* (*CLV3*). Debajo de la CZ se encuentra el centro organizador (organizing center, OC), una región clave para el mantenimiento del estado indiferenciado de las células troncales, en el que se expresa *WUSCHEL* (*WUS*), un homólogo de *WOX5* en la raíz (Boscá et al., 2011). El SAM se organiza funcionalmente en tres dominios principales: la CZ, la zona periférica (peripheral zone, PZ) y la zona costal (rib zone, RZ). La CZ actúa como reservorio de células troncales para reponerlas y almacenarlas, además es la fuente de células para la zona periférica. La PZ se caracteriza por una mayor actividad mitótica y es el sitio donde se inician los primordios de los órganos laterales. Finalmente, la RZ suministra células para el crecimiento del tallo. Además, el SAM también es organizado en tres capas celulares, L1, L2 y L3 definidas por linaje celular y la orientación de las divisiones, (Heidstra *et al.*, 2014; Lopes et al., 2021). La homeostasis del SAM depende en gran medida del circuito de retroalimentación negativa establecido por *WUS* y *CLV3*. El FT *WUS* que se expresa en el OC es

requerido para mantener el estado indiferenciado de las células y la expresión de *CLV3*. *WUS* es un FT móvil que viaja a las células de la CZ vía plasmodesmos y activa la transcripción de *CLV3*, que codifica para un péptido. Este péptido *CLAV3*, es percibido por el receptor transmembranal *CLAVATA1* (*CLV1*), que induce una cascada de señalización que conduce a la represión de la expresión de *WUS* en el OC. De manera adicional, *WUS* puede reprimir directamente la expresión de *CLV1* mediante la unión al promotor de este gen, añadiendo una capa extra de regulación al sistema (Lopes et al., 2021). Estudios recientes han demostrado que *WUS* forma homodímeros y heterodímeros para regular la expresión de *CLV3*. El homodímero de *WUS* regula negativamente la transcripción de *CLV3* en el OC mientras que los monómeros de *WUS* activan la transcripción de *CLV3* en la CZ (Rodríguez et al., 2016; Perales et al., 2016). Asimismo, *WUS* forma heterodímeros con un miembro de la familia de FT *HAIRY MERISTEM* (*HAM*) para regular negativamente a *CLV3* en el OC y el heterodímero formado con *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) regula positivamente a *CLV3* en la CZ (Zhou et al., 2018; Su et al., 2020). Estos mecanismos resaltan el papel central de *WUS* como integrador de señales que controlan la identidad y el mantenimiento del SAM. Además de su función en la regulación del nicho de células troncales, *WUS* está involucrado en la regulación de las vías de señalización de las fitohormonas citoquininas y auxina, contribuyendo al mantenimiento del estado indiferenciado de las células troncales (Lopes et al., 2021). De forma complementaria, *STM* desempeña una función preponderante en la preservación y carácter meristemático al inhibir la diferenciación celular. Este TF reprime la expresión de genes asociados a la diferenciación, como *ASYMETRIC LEAF1* (*AS1*), regula negativamente la biosíntesis de la fitohormona giberelina y activa la ruta biosintética de la citoquinina (Heidstra y Sabatini, 2014).

Durante la iniciación de los primordios de los órganos aéreos, la expresión de *STM* es reprimida en la PZ, mientras que se favorece la expresión de *AS1*. Los primordios de las hojas se especifican en regiones de la PZ, en las que un aumento en la concentración de auxina coincide con las células fundadoras que inician la formación

de los primordios foliares (Figura 3b). Este patrón de acumulación de auxina es facilitado por el transportador PIN-FORMED 1 (PIN1), cuya polarización en la membrana plasmática dirige el flujo de auxina hacia los sitios de iniciación del primordio. La auxina reprime la expresión de genes *KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN* (*KNOX*) de clase I, que incluye *KNOTTED IN ARABIDOPSIS THALIANA1* (*KNAT1*), *KNAT2* y *KNAT6*, además de *STM* (Gao et al., 2015). De manera adicional, *KNAT1* y *KNAT2* son reprimidos por un complejo formado por AS1, AS2 y LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB) (Du et al 2018). La represión de los genes *KNOX* es necesaria para permitir el estado indiferenciado de las células, ya que los genes *KNOX* mantienen el carácter meristemático, mientras que la máxima concentración de auxina potencializa diferenciación y el crecimiento celular (Ali et al., 2020; Lv et al., 2023). En *Arabidopsis*, las mutantes del gen *pin1* presentan un bloqueo en la formación de primordios foliares, fenotipo que se restaura al aplicar auxina exógena, lo que evidencia la importancia de la auxina en la iniciación de los primordios foliares. Además, la auxina modula una red de regulación positiva en la que induce la expresión de *MONOPTEROS* (*MP/ARF5*); a su vez este FT promueve la expresión de *PIN1* y de otros de genes involucrados en el transporte de auxina, como *AUX1* y *LIKE-AUX1-2* (*LAX2*). MP participa en la regulación de la homeostasis de la citoquinina mediante la regulación positiva de *ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN6* (*AHP6*), un inhibidor de la señalización de citoquininas que previene el crecimiento prematuro del primordio foliar (Lv et al., 2023).

Una vez iniciado el primordio foliar, su correcto desarrollo depende del establecimiento y mantenimiento de la polaridad a lo largo de tres ejes principales: adaxial-abaxial (anverso-reverso), medio-lateral (nervadura principal-borde de la hoja) y proximal-distal (base-punta de la hoja) (Lv et al., 2023). La adquisición y mantenimiento de la polaridad es controlada por una compleja red de regulación génica en la que diversos FT están involucrados.

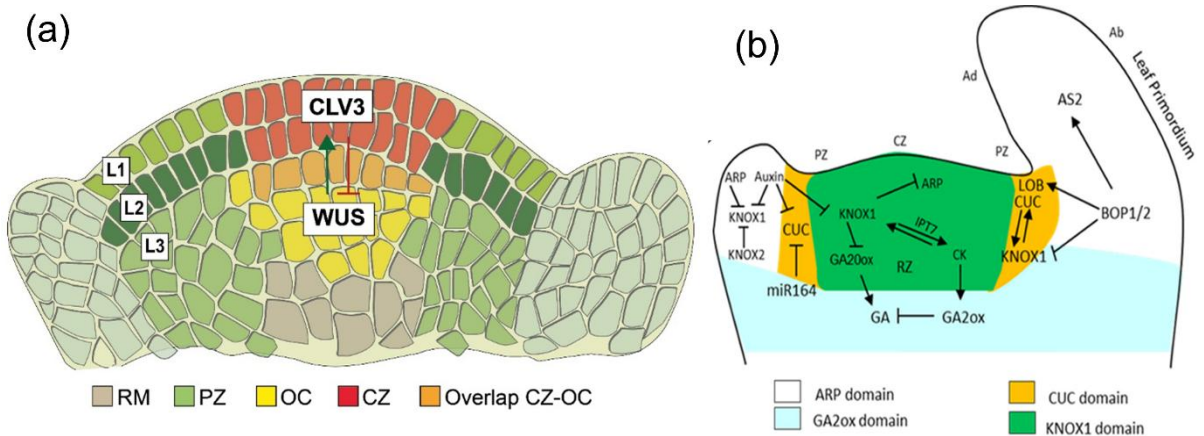


Figura 3. Mecanismos moleculares involucrados en la iniciación del primordio de la hoja. (a) Representación del SAM de Arabidopsis y las diferentes zonas que lo forman. En el centro se muestra la regulación entre CLV3, (CLAVATA3) y WUS (WUSCHEL). Los colores indican las diferentes zonas en las que se divide el SAM. L1, L2 y L3 indican las capas celulares. Imagen tomada de Lopes et al., 2021. (b) Iniciación del primordio foliar. Factores de transcripción específicos como BOP1/2 y ASL regulan la formación del primordio. Tomado y modificado de Ali et al., 2020.

2.1.2.2 Polaridad adaxial-abaxial

Durante el desarrollo foliar se establece una organización dorsoventral conocida como polaridad adaxial-abaxial, se establece antes de la iniciación visible del primordio de las hojas, mediante un patrón inicial de expresión génica que distingue el lado adaxial, orientado hacia el meristemo apical del tallo, del lado abaxial orientado hacia el exterior. Esta polaridad es importante para el correcto desarrollo y funcionamiento de la hoja, ya que determina la organización de los tejidos y la distribución de estructuras especializadas como los estomas. Este patrón está mediado principalmente por la acción antagónica de los FT *REVOLUTA* (*REV*) y *KANADI1* (*KAN1*) (Du et al., 2018). La polaridad adaxial es mantenida por la familia de FT de homeodominio – cremallera de leucina de clase III (*HD-ZIPIII*), que incluyen a *REV*, *PHABULOSA* (*PHB*) y *PHAVOLUTA* (*PHV*). Estos factores actúan de manera coordinada para regular la expresión y la diferenciación celular del SAM hacia el plano adaxial de la hoja. Las mutaciones en estos genes pueden ocasionar anomalías foliares, lo que subraya su papel en el desarrollo normal de las hojas. Asimismo, el complejo formado por *ASYMETRIC LEAF1* (*AS1*) y *ASYMETRIC LEAF2* (*AS2*) desempeñan un papel crucial

en el mantenimiento de la identidad adaxial al promover la expresión de los genes *HD-ZIPIII* y, de manera simultánea, reprimir la expresión de genes asociados al desarrollo abaxial, como *KNOX1* y *YABBY* (*YAB*). Este doble control asegura la estabilidad del plano adaxial durante el crecimiento del primordio (Du et al., 2018). Por otro lado, la expresión de los genes *HD-ZIPIII* son regulados negativamente por los microRNAs (miRNA) 165/166 de forma no autónoma, ya que son expresados en el plano abaxial de la hoja. Además, proteínas involucradas en la regulación transcripcional o en la biogénesis de los miR165/166 tales como AS1, AS2, HASTY (*HST*), ARGONAUTE1 (*AGO1*), *AGO7*, *AGO10* y la RNA polimerasa dependiente de RNA 6 (*RDR6*) también participan en el destino de las células adaxiales de las hojas (Du et al., 2018; Manuela y Xu, 2020).

En contraste, el plano abaxial es promovido por la familia de genes *YAB*, que desempeña un papel crucial en el mantenimiento del plano, mientras que la familia de genes *KANNADI* promueve el destino celular abaxial y se inhibe mutuamente con los genes *HD-ZIPIII*. Esta inhibición mutua entre los programas adaxial y abaxial es esencial para establecer un límite claro entre ambos dominios. Adicionalmente, los FT que participan en la señalización de auxina, como *ARF3* (conocido también como *ETTIN*, *ETT*), *ARF4* y *ARF2* son expresados predominantemente en el plano abaxial y promueven el destino celular abaxial actuando redundantemente. La actividad de *ARF3/ETT* y *ARF4* es regulada negativamente por RNA interferentes pequeños (ta-siRNA), en particular los derivados del locus *TAS3*, lo que añade una capa de regulación postranscripcional al establecimiento de la polaridad abaxial (Ali et al., 2020; Lv et al., 2023). En conjunto, estos mecanismos demuestran la regulación intrincada de la polaridad adaxial-abaxial de la hoja y resalta una compleja red regulatoria que integra factores de transcripción, microRNAs y señalización hormonal, asegurando una identidad celular estable y bien definida a lo largo del desarrollo foliar.

2.1.2.3 Polaridad medio-lateral

Además de la polaridad adaxial-abaxial, el desarrollo de la hoja también implica el establecimiento de la polaridad medio-lateral, la cual determina la expansión lateral desde la lámina foliar y contribuye a la adquisición de la forma característica de cada especie vegetal. Estas son características cruciales para maximizar la captura de la luz para la fotosíntesis. En relación con esto, se ha sugerido que la polaridad adaxial-abaxial subyace al establecimiento de esta polaridad, es decir que esta polaridad se establece como consecuencia de la correcta definición previa del eje adaxial-abaxial, dando lugar a la formación de un dominio intermedio entre ambos planos. En este plano se expresan los FT WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN (WOX1) y PRESSED FLOWER (PRS), los cuales son fundamentales para la expansión de la lámina y establecer el plano medio-lateral. La doble mutante *wox1 prs* presenta una reducción significativa en la anchura de la lámina foliar, lo que confirma su papel central en este proceso. Además, WOX1 y PRS se expresan en el margen de la hoja, contribuyendo al crecimiento lateral en etapas posteriores del desarrollo. La auxina desempeña un papel importante definiendo la región en la que se expresa WOX1 y PRS. Estos genes son activados por *MONOPTEROS (MP)* y reprimidos por los *ARF2*, *ARF3* y *ARF4*, los cuales se expresan en el plano adaxial y abaxial, respectivamente. Este patrón de regulación asegura que la actividad de WOX1 y PRS se restrinja al dominio medio-lateral, permitiendo una expansión controlada de la lámina foliar. Adicionalmente para lograr una lámina de hoja definida, la actividad meristemática debe ser reprimida de manera espaciotemporal, en este contexto, los FT NGATHA (NGA) y TCP tipo CINCINNATA/CINCINNATA-like TCPs actúan redundantemente inhibiendo la expresión de PRS, limitando así el crecimiento excesivo de los márgenes foliares y contribuyendo a la morfogénesis final de la hoja (Du et al., 2018; Manuela y Xu, 2020).

2.1.2.4 Polaridad próximo-distal

El eje próximo-distal se extiende desde la base de la hoja hasta su ápice y define la organización longitudinal de la lámina foliar, determinando la longitud de la hoja y se establece progresivamente a medida que el primordio foliar se aleja del SAM. La región cercana al SAM es el plano proximal que dará lugar al peciolo, mientras que la región más alejada del SAM es el plano distal y dará lugar a la lámina foliar. A diferencia de los ejes adaxial-distal y medio-lateral, cuya definición ocurre tempranamente, la polaridad próximo-distal se consolida durante el crecimiento continuo del primordio. Las células cercanas a la base del primordio mantienen una mayor capacidad proliferativa, mientras que las células localizadas hacia el ápice experimentan procesos de diferenciación progresiva. Este patrón de desarrollo está regulado por redes genéticas y hormonales que controlan la proliferación y diferenciación celular en los distintos dominios de la hoja. Los principales reguladores de la formación del plano próximo-distal son *BLADE-ON-PETIOLE1 (BOP1)*, *BOP2*, *ROTUNDIFOLIA3 (ROT3)*, *ROT4*, *LONGIFOLIA1 (LNG1)* y *LNG2*. Estos factores se expresan predominantemente en las regiones basal y adaxial del primordio foliar, donde promueven la identidad proximal al inducir la expresión de *AS2* y reprimen a *KNOX1* lo que influye el destino celular de las células vegetales. La doble mutante de *bop1 bop2* provoca el crecimiento de la lámina en el peciolo, lo que reduce significativamente el dominio proximal y evidencia la función de estos genes en la delimitación del eje próximo-distal. (Manuela y Xu, 2020; Lv et al., 2023). Otros genes implicados en la regulación de la elongación foliar incluyen *ROT3*, *ROT4* y *LNG2*, los cuales controlan la longitud de la hoja principalmente a través de la modulación de la expansión celular. La acción combinada de estos reguladores asegura una transición gradual y coordinada entre los dominios proximal y distal, permitiendo el desarrollo de hojas con proporciones adecuadas y funcionales.

En conjunto, los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la polaridad próximo-distal se integran con los planos adaxial-abaxial y medio-lateral mediante redes que se regulan entre sí. Una vez establecida la identidad celular a lo largo de

los tres ejes, permite el desarrollo tridimensional adecuado de la hoja y la adquisición de su tamaño y morfología final (Dakhar y Pareek, 2014).

2.1.2.5 Regulación del tamaño y forma de la hoja

La regulación del tamaño de las hojas requiere la coordinación precisa de dos procesos fundamentales: la proliferación y la expansión de las células. Estos eventos son meticulosamente controlados mediante la interacción de factores genéticos, ambientales y de fitohormonas; su integración temporal y espacial es crucial para determinar la dimensión y morfología de la hoja (Figura 4a) (Tsukaya, 2005; Lv et al., 2023).

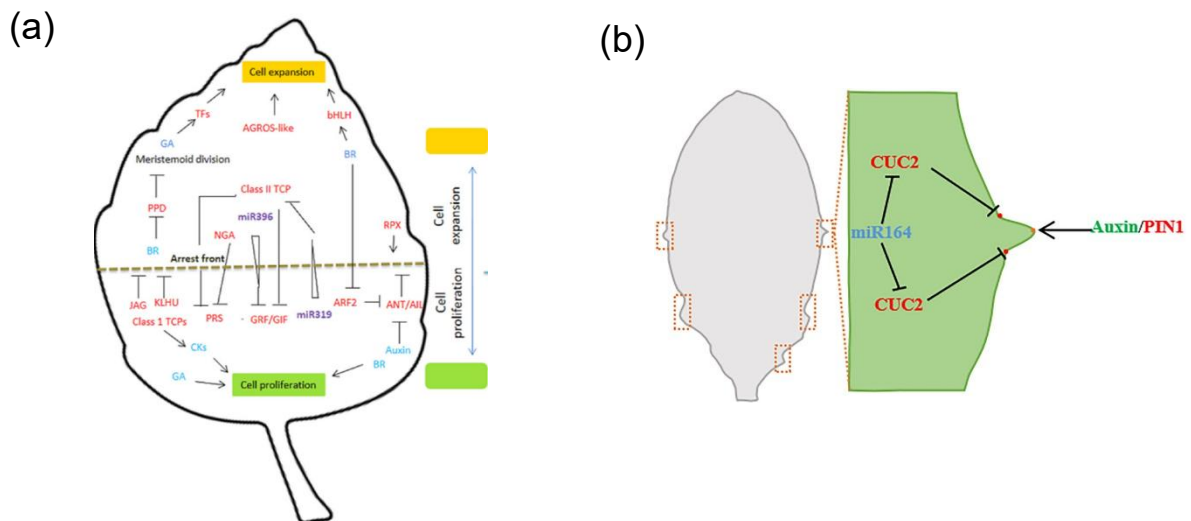


Figura 4. Regulación del tamaño y la forma de la hoja. (a) El tamaño de la hoja es controlado por la proliferación celular (verde) y la expansión celular (amarillo). El miR396 regula negativamente la expresión de los genes GRF. Imagen tomada y modificada de Ali et al., 2020. (b) Desarrollo de los márgenes de las hojas. El miR164 regula negativamente a CUC2. PIN1 promueve el máximo de auxina a lo largo de la punta aserrada del margen, mientras que la auxina inhibe a CUC2 en la aserración y promueve su crecimiento. Tomado de Lv et al., 2023.

Durante la fase inicial del desarrollo foliar, predomina la proliferación celular, las células experimentan ciclos celulares mitóticos sucesivos que aumentan el número de células en las hojas en desarrollo, de manera general el ciclo celular vegetal es regulado por la actividad de complejos proteicos formados por las ciclinas dependientes de quinasas (CDK) y las ciclinas (CYC) que actúan como las subunidades catalíticas y regulatorias, respectivamente (Dakhar y Pareek, 2014; Kalve et al., 2014). En este contexto el complejo formado por la CDKA y la CYCB1 regula el inicio de la mitosis y su expresión es específica de células en proliferación (Scofield et al., 2014). Asimismo, la proliferación es regulada positivamente por la familia de FT GROWTH REGULATING FACTORS (GRF), formada por nueve miembros en *Arabidopsis thaliana* (*GRF1* a *GRF9*). Los GRF interactúan físicamente con los coactivadores transcripcionales GRF-INTERACTING FACTOR1/ANGUSTIFOLIA3 (GIF1/AN3), GIF2 y GIF3 para crear un módulo transcripcional que regula el tamaño mediante la determinación del número de células en las hojas. Las proteínas GIF actúan redundantemente como coactivadores transcripcionales; las mutantes de *gif* dan lugar a hojas más pequeñas y estrechas mientras que las plantas que sobreexpresan a los GIF producen provocan hojas de mayor tamaño. De manera consistente, la sobreexpresión de GIF1 se asocia con un aumento en la expresión de CYCB1;1 y otros genes relacionados con el ciclo celular, que dan como resultado un incremento en la tasa de proliferación celular. Por el contrario, mutaciones en los genes GRFs, como *grf3*, *grf4*, *grf5*, así como la triple mutante *grf1grf2grf3*, generan un fenotipo de hojas pequeñas mientras que la sobreexpresión de los *GRFs* provoca hojas grandes, excepto el *GRF9*, en el que la mutante muestra un fenotipo de hojas grandes y la sobreexpresión produce hojas pequeñas (Ali et al., 2020; Vercruysse et al., 2020; Lv et al., 2023)

La transición de la fase de proliferación a la de expansión celular está controlada espaciotemporalmente por el miR396. Este miRNA reprime transcripcionalmente a siete de los nueve miembros de la familia GRF con excepción *GRF5* y *GRF6*. El miR396 se acumula conforme aumenta la edad de la hoja en un gradiente de expresión creciente de la base a la punta de la hoja, restringiendo de esta manera el patrón de

expresión de GRF a la zona proximal dependiente de la edad. La sobreexpresión del *MIR396* provoca una disminución drástica en el número de células mientras que la represión conduce al aumento en el tamaño de las hojas (Liu et al., 2009; Rodríguez et al., 2010; Wang et al., 2011).

Adicionalmente, el *MIR396* es regulado positivamente por TCP4, miembro de la familia de FTs TCP. Esta familia puede dividirse en dos, la clase I, asociada a la proliferación y al crecimiento vegetal y la clase II, relacionada con la inhibición de la proliferación celular. A su vez, los TCP son regulados negativamente por el miR319. Alteraciones en este módulo regulatorio miR319-TCP y miR396-GRF generan cambios notables en el tamaño y la curvatura de las hojas, evidenciando la importancia de estas redes postranscripcionales en el crecimiento foliar (Schommer et al., 2008; Lv et al., 2023).

Otras proteínas que participan en promover la transición de la etapa de división celular a la expansión son la proteína de unión a la ubiquitina DA1 y la ligasa de ubiquitina E3 BIG BROTHER o ENHANCER OF DA1 (BB/EOD1) que controlan el tamaño de la hoja al restringir la proliferación celular. Otro regulador de la etapa de transición es el gen *AUXIN-REGULATED GENE INVOLVED IN ORGAN SIZE (ARGOS)* que se induce por auxina y codifica para una proteína localizada en el ER. La sobreexpresión o la pérdida de función de *ARGOS* provoca un aumento o una disminución en el tamaño de las hojas, respectivamente. Este fenotipo está principalmente asociado a la alteración en el número de células y a la duración de los periodos de proliferación. En *Arabidopsis* las proteínas ORGAN SIZE RELATED1 (ORS) y ARGOS LIKE (ARL) comparten un dominio conservado con ARGOS y regulan positivamente el crecimiento de la hoja. ARGOS regula la transcripción de AINTEGUMENTA (ANT), un factor de transcripción que mantiene la expresión de la *CYCD3;1*. La pérdida de función de la *CYCD3;1* provoca terminación prematura de la proliferación y en consecuencia cambia el tamaño de la hoja. ARF2 inhibe la expresión de *ANT* y *CYCD3;1* limitando la proliferación y por tanto el tamaño de la hoja (Kalve et al., 2014; Ali et al., 2020; Lv et al., 2023).

Adicionalmente, los genes *TARGET OF RAPAMYCIN (TOR)* y *KLUH (KLU)* que codifican para una quinasa y un citocromo P450, respectivamente, modulan

positivamente el tamaño de la hoja. *TOR* mediante la expansión celular y *KLU* que actúa de manera no autónoma contribuye para promover la proliferación celular (Kalve et al., 2014).

Además de la regulación genética, el control fitohormonal desempeña un papel importante en el control del tamaño de la hoja, destacando las giberilinas, los brasinosteroides y las citoquininas que promueven el crecimiento de la hoja por proliferación y expansión celular (Lv et al., 2023). Adicionalmente, la auxina que mediante la inducción de *ARGOS* y *ARF2* juega un rol significativo en modular el crecimiento de la hoja también es crucial para determinar la forma de la hoja.

Las hojas muestran una enorme diversidad de formas, se pueden distinguir hojas simples, lobulares y compuestas, con los márgenes lisos o aserrados. Los mecanismos moleculares que controlan estos fenotipos implican la participación de factores de transcripción, microRNAs, fitohormonas y señales ambientales (Runios et al., 2016; Wilson-Sánchez et al., 2022).

En *Arabidopsis*, las hojas de la roseta presentan márgenes aserrados que se vuelven progresivamente más pronunciados a medida que se va desarrollando la roseta (Figura 4b). Uno de los módulos regulatorios mejor caracterizados en este proceso involucra al miR164a y al gen *SHAPED COTYLEDON2 (CUC2)*. Las mutantes con pérdida de la función de *MIR164a* presentan márgenes de hojas con aserraciones más profundas, mientras que la doble mutante de *mir164a cuc2* genera hojas con márgenes lisos, demostrando que miR164a actúa como regulador negativo de *CUC2* (Dkhar y Pareek, 2014). *CUC2* es un regulador clave en la definición de los límites entre dominios celulares y promueve la formación de aserraciones al favorecer la expresión del transportador de auxina *PIN-FORMED (PIN1)*. La auxina desempeña un papel central en la iniciación y el patrón espacial de la aserraciones foliares. La acumulación local de auxina, mediada por la polarización de *PIN1*, establece el sitio de iniciación de la aserración; a su vez *CUC2* favorece este patrón al promover la expresión de *PIN1*, estableciendo un circuito de retroalimentación positiva. Sin embargo, una alta concentración de auxina reprime la expresión de *CUC2*, lo que limita el crecimiento de

las aserraciones y contribuye a la formación de un patrón a lo largo del margen foliar. Adicionalmente este módulo está regulado a nivel epigenético y transcripcional. Por ejemplo, las mutantes de *DEVELOPMENT-RELATED PcG TARGET IN THE APEX 4 (DPA4)* da lugar a hojas con aserraciones más pronunciadas, mientras que la sobreexpresión de *DPA4* muestra una disminución en la expresión de *CUC2*, lo que muestra un rol aditivo a la regulación de *CUC2* sobre el margen foliar (Ali et al., 2020; Wilson-Sánchez et al., 2022). En conjunto, estos mecanismos evidencian que la forma del margen foliar emerge de la interacción dinámica entre gradientes fitohormonales, factores de transcripción y reguladores postranscripcionales, los cuales definen regiones de crecimiento diferencial a lo largo de la lámina. Este control preciso permite la generación de patrones morfológicos reproducibles y adaptativos.

La variedad en el tamaño y la forma de la hojas es un área de estudio que continúa generando conocimiento acerca del desarrollo vegetativo. Dado que no solo se observa entre especies, sino también dentro de una misma planta a lo largo de su desarrollo. Esta plasticidad morfológica está estrechamente relacionada con los cambios temporales en los programas de expresión génica y con la transición entre distintas fases del desarrollo vegetativo. Interesantemente, se han identificado novedosos reguladores que participan en determinar la dimensión y la morfología de las hojas, entre los que se encuentran los lncRNAs y los cuales se abordarán más adelante.

2.1.2.6 Filotaxis: arreglo espacial de las hojas

Otro aspecto trascendental involucrado en el desarrollo y la formación de las hojas es que ocurre en intervalos de tiempo regulares y en posiciones específicas predecibles. Este patrón espacial y temporal altamente ordenado de la emergencia de las hojas entorno al SAM se conoce como filotaxis (Ha et al., 2010). El arreglo de las hojas puede ir desde una sola hoja insertada alternadamente en el tallo o en forma de espiral, hojas dispuestas una frente a la otra, hasta verticilos foliares de tres o más hojas. Siendo la más común la orientación en espiral, como el caso de *Arabidopsis*, en el que las hojas están separadas unas de otras con un ángulo de 137.5° lo que permite la identificación

de la emergencia de cada una de ellas durante el desarrollo (Jones et al., 2013). El patrón de filotaxis es definido durante la iniciación del primordio de la hoja en el SAM y es regulada por la auxina. El transportador PIN1 se polariza en la membrana plasmática especificando el área a la que se transporta la auxina y estabilizando el patrón de filotaxis (Tsuji y Sato, 2024). La filotaxis ayuda a distinguir las diferentes fases del desarrollo de una planta, como lo es la transición de las hojas de fase juvenil a la adulta (Poethig, 2010; Tsuji y Sato, 2024).

2.1.3 Heteroblastía de las hojas

El ciclo de vida de una planta se caracteriza por una serie de transiciones que ocurren progresivamente a través de las diferentes etapas del desarrollo (Tsuji y Sato, 2024). Algunas de estas transiciones pueden ser identificadas por los cambios que ocurren en las hojas, como en la forma, el tamaño y la anatomía. La diversidad morfológica de las hojas entre especies es resultado de factores genéticos, hormonales y adaptaciones ambientales. Sin embargo, esta plasticidad en el desarrollo es posible observarla en la misma especie, en el que la morfología de las hojas cambia junto con las etapas del desarrollo. Este suceso es conocido como heteroblastía o cambio de fase vegetativa (transición de juvenil a adulto) (Figura 5) (Poethig, 2010; Nakayama, 2024).

La heteroblastía o el cambio de fase vegetativo se describió por primera vez en plantas leñosas como la hiedra común (*Hedera hélix*), *Acacia* y *Eucalyptus*, posteriormente caracterizada en especies herbáceas y modelos experimentales, tales como maíz, *Arabidopsis*, *Passiflora edulis*, *Senecio vulgaris*, entre otras (Figura 5) (Willmann y Poething, 2005; Poethig 2010; Silva et al., 2019; Nakayama, 2024).



Figura 5. Heteroblastía en *Senecio vulgaris*. La hoja más vieja (cotiledón) está en el lado izquierdo y la hoja más joven en el lado derecho. Barra = 1 cm. Tomada de Nakayama, 2024.

En *Arabidopsis*, la fase juvenil se distingue por hojas bastante redondeadas, con márgenes lisos, una relación lamina-pecíolo relativamente baja, un sistema vascular menos complejo y la ausencia de tricomas en el lado abaxial; mientras que las hojas de la fase adulta son ovaladas con márgenes aserrados, un pecíolo más corto, bordes que se curvan hacia abajo y tricomas en el lado abaxial. Durante la transición entre ambas fases, es común observar que una misma hoja muestre características intermedias, en las que los rasgos juveniles y adultos se encuentran divididos en la porción distal y la proximal, respectivamente (Willmann y Poethig, 2005; Poethig y Fouracre, 2024). Además de los cambios morfológicos externos, la heteroblastía se asocia con modificaciones anatómicas internas. Por ejemplo, se ha documentado una disminución en el desarrollo de células de transferencia del parénquima del floema durante la transición de la fase juvenil a la adulta, lo que sugiere ajustes funcionales en el transporte de fotoasimilatos a lo largo del desarrollo (Nguyen et al., 2017).

El regulador maestro de la transición de la fase juvenil a la adulta es el miR156, cuya abundancia es alta durante la fase juvenil y disminuye progresivamente conforme las hojas transitan hacia la fase adulta (Wu and Poethig, 2006; Wu et al., 2009, Poethig 2010). La expresión constitutiva del miR156 prolonga la expresión de los rasgos de la fase juvenil, mientras que la pérdida de función del miR156 provoca una transición prematura a la fase adulta, lo que evidencia su papel central en el control temporal del desarrollo vegetativo (Poethig, 2010).

El miR156 ejerce su función mediante la represión de la traducción de la familia de factores de transcripción SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEINS (SBP/SPL), compuesta por 10 miembros en *Arabidopsis*, de los cuales el SPL9 y SPL13 han mostrado tener mayor contribución en el cambio de fase vegetativa. miR156 está estrechamente relacionado con los miR157 y miR529, los cuales también contribuyen a la represión de los SPL (Rhoades et al., 2002; Schwab et al., 2005; Poethig 2010). Adicionalmente, algunos de los efectos del módulo miR156-SPL se extienden a otros niveles regulatorios que son mediados por el miR172, que actúa río abajo del módulo miR156-SPL. El miR172 regula negativamente a los factores de transcripción APETALA2-like (AP2-like), que actúan como represores del tiempo de floración y de las características adultas. De esta manera, la interacción secuencial miR156-SPL-miR172 establece un marco regulatorio que coordina el cambio de fase vegetativa con la transición reproductiva (Poethig y Fouracre, 2024).

2.1.3.1 Interacción de la heteroblastía con la morfogénesis foliar

El mecanismo por el cual las hojas adquieren las características propias de cada una de las fases juvenil y adulta es ilustrado en la figura 6. En las hojas juveniles los factores de transcripción *BLADE-ON-PETIOLE 1* (BOP1) y BOP2 promueven el desarrollo del peciolo y reprimen la expansión de la lámina. En las hojas adultas, su transcripción es reprimida por SPL9 y SPL13, lo que permite la expansión de la lámina foliar. La formación de aserraciones también está regulada de manera diferencial durante la heteroblastía. En las hojas juveniles, los TFs TCP inhiben la actividad de CUC, limitando el desarrollo de los márgenes. Mientras que en las hojas adultas, esta interacción es atenuada por la unión entre TPC4 y SPL9, lo que favorece la formación de aserraciones más pronunciadas. Asimismo, la distribución de los tricomas es en parte mediada por SPL9 y SPL15, que promueven la expresión de *MIR172B*, aumentando la acumulación del miR172 en las hojas adultas. Un mecanismo adicional involucra el factor de transcripción TARGET OF EAT1 (TOE1), el cual interactúa con KANADI1 (KAN1), que es expresado en el plano abaxial para reprimir la transcripción

de *GLABRA1* (*GL1*), en la superficie de la hoja es un regulador clave de la formación de los tricomas. Dado que la abundancia de *TOE1* es mayor en las hojas juveniles, se explica en parte la ausencia de tricomas en esa etapa. En las hojas adultas los SPL activan genes que participan en el desarrollo de inflorescencias (Poethig y Fouracre, 2024).

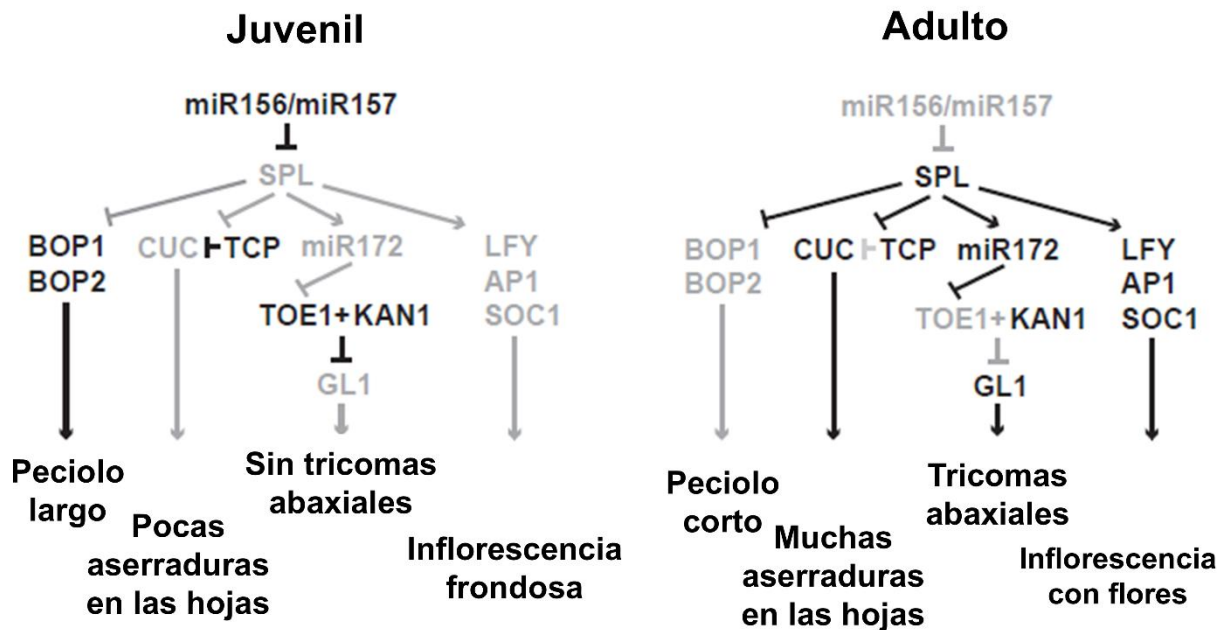


Figura 6. Mecanismo de regulación mediado por miR156/miR157. Los genes activos y las funciones están representados por líneas y el texto en color negro, los genes y las funciones inactivos están representados por líneas y el texto en color gris. Las flechas indican activación y las líneas terminadas en barra indican represión. Tomado de Poethig y Fouracre, 2024.

La transición entre fases vegetativas también está influida por señales metabólicas. La glucosa, fructosa y sacarosa reprimen la expresión del *MIR156A/C*, promoviendo el cambio de fase vegetativo. Este mecanismo ha sido documentado en *Passiflora edulis*, en el que la glucosa regula el módulo miR156/*PeSPL9* y promueve las características de hojas adultas (Silva et al., 2019; Nakayama, 2024; Poethig y Fouracre, 2024).

Por otro lado, las fitohormonas desempeñan un papel modulando la heteroblastía. Se ha reportado que las giberelinas aceleran o aplazan el cambio de fase vegetativa en las plantas leñosas, mientras que en el maíz y *Arabidopsis* aceleran el proceso. En

contraste, el ácido jasmónico ha sido asociado con retardar esta transición (Poethig y Fouracre, 2024).

Adicionalmente, se ha reportado que la pérdida de función de *ABSCISIC ACID INSENSITIVE5* (ABI5), un regulador clave de la señalización de ABA, promueve la transición de la etapa juvenil a la adulta mientras que la sobreexpresión retrasa esta transición. Esta regulación ocurre río arriba de la vía miR156-SPL e involucra al miR159. El miR159 reprime a MYB33, un factor de transcripción que promueve la expresión de ABI5 y a su vez, participa en la regulación de módulo miR156-SPL, participando en ambas vías para controlar el cambio de fase vegetativo (Guo et al., 2021). En conjunto, estos hallazgos aportan una nueva capa de regulación en la transición de la etapa juvenil a adulto de la hoja, en el que moléculas como ABI5, conocido por su papel principal en la señalización de ABA y clave en la respuesta a estrés se asocian a vías ya existentes y/o se describe su participación en procesos a los que no habían sido vinculados. Este contexto regulatorio plantea interrogantes relevantes sobre la posible participación de otras moléculas, como los lncRNAs en la transición de las hojas de la fase juvenil a la adulta, así como sobre su participación en las vías clásicas que regulan la transición o actúan de manera independiente.

2.1.4 Senescencia de la hoja

La última etapa del desarrollo de la hoja es la senescencia, distinguida por cambios transcripcionales y metabólicos masivos que desestabilizan órganos celulares y macromoléculas. Los factores internos como la edad y externos como la temperatura, la luz, la sequía y los patógenos influyen en el inicio de la senescencia, así como una compleja red regulatoria de genes que controlan este proceso. A una edad apropiada, la hojas comienzan con la movilización de los nutrientes de las hojas senescentes a las semillas, órganos de almacenamiento y otros tejidos en crecimiento. La senescencia es también regulada por las fitohormonas que tienen una función crucial, el etileno, los brasinoesteroides, el ácido jasmónico, el ácido salicílico, ABA y las estrigolactonas promueven la senescencia mientras que las auxinas y citoquininas desempeñan un rol antagónico (Sakuraba, 2021; Lv et al., 2023).

2.2 Estrés por déficit hídrico en las plantas

Las condiciones ambientales ejercen una influencia preponderante en promover la plasticidad de las plantas, en repetidas ocasiones el medio ambiente somete a la vida vegetal a diferentes tipos de estreses induciéndola a adaptar su desarrollo y crecimiento a las condiciones adversas. Esto a través de modular redes de regulación génica y el metabolismo resultado de una retroalimentación entre la severidad y la duración del estímulo (Jones et al., 2013).

Dependiendo del origen del estrés, se clasifica en biótico, cuando es generado por la interacción de la planta con otro ser vivo y abiótico cuando proviene de condiciones químicas, físicas y energéticas. Dentro del estrés abiótico existe un gran número de variables que afectan las reacciones de las plantas entre los que destacan la intensidad lumínica, disponibilidad de los nutrientes, la temperatura y la disponibilidad de agua, siendo este último de los principales factores que más limitan la productividad agrícola a nivel global (Zhu, 2002). La sequía y la salinidad representan las principales causas de reducción en la disponibilidad de agua para las plantas y conducen al establecimiento de un estado de estrés hídrico. Este tipo de estrés afecta de manera directa procesos fundamentales como la expansión celular, la fotosíntesis y el transporte de nutrientes, y desencadena una serie de respuestas adaptativas que buscan minimizar la pérdida de agua y optimizar su uso (Muhammad Aslam et al., 2022).

2.2.1 Efecto del estrés por déficit hídrico en el desarrollo de las plantas

El estrés hídrico generalmente inhibe el crecimiento y la productividad de las plantas, lo que pone en riesgo a la seguridad alimentaria global (Zhu, 2002; Muhammad Aslam et al., 2022). Una de las respuestas tempranas al déficit hídrico es el aumento en las concentraciones endógenas de la fitohormona ABA después de 2.5 a 6 h de exposición

a deficiencia de agua (Muhammad Aslam et al., 2022; Waadt et al., 2022). Después de que la planta ha percibido el estrés desencadena las respuestas de tolerancia dependientes de ABA, produciendo una variedad de procesos fisiológicos como cierre de estomas, modulación del sistema radicular, activación de la expresión de genes y alteraciones metabólicas (Muhammad Aslam et al., 2022).

A nivel de la planta, ABA es considerado un inhibidor del crecimiento de los órganos aéreos y de las raíces que le permite restringir la transpiración y el uso del agua y energía en condiciones de estrés. No obstante, en algunos casos, ABA promueve el crecimiento del sistema radicular, para permitirles acceder al agua en capas más profundas del suelo (Skubacz et al., 2016). Este efecto dual ha sido documentado en especies como el maíz, que bajo un déficit hídrico leve o moderado aumenta el crecimiento de las raíces mientras que bajo un estrés severo se inhibe el crecimiento (Feng et al., 2016).

Una de las respuestas fisiológicas más conocidas mediadas por ABA es el cierre estomático. Su acumulación en las células guarda desencadena la actividad de los canales iónicos que resulta en el cierre estomático permitiendo a las plantas reducir la pérdida de agua disminuyendo la tasa de transpiración y contribuye a la conservación hídrica durante condiciones de sequía (Muhammad Aslam et al., 2022; Khan, 2025).

A nivel celular, ABA regula la biosíntesis de osmolitos compatibles, la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la producción de enzimas requerida para la protección al daño asociado a la deshidratación celular (Skubacz et al., 2016). Además, contribuye al mantenimiento de la presión de turgor y a la estabilidad estructural de la pared celular y la membrana plasmática bajo condiciones de baja disponibilidad de agua (Feng et al., 2016; Skubacz et al., 2016).

Además de regular la adaptación de las plantas al estrés, ABA participa en la regulación de múltiples aspectos del desarrollo vegetal, incluyendo la abscisión de la hoja, la inhibición de la maduración de los frutos, la maduración del embrión, la

inhibición de la germinación temprana, la dormancia y la germinación de la semilla (Agarwal y Jha, 2010; Vishwakarma et al., 2017).

Estos procesos en su mayoría son mediados por las vías de señalización de ABA, que involucran factores de transcripción, enzimas y receptores para influir en la adaptación de las plantas al estrés.

2.2.1.1 ABA: homeostasis y transducción de señales

La fitohormona ABA es conocida como la hormona del estrés, aunque no es la única que interviene en este proceso, actúa de manera predominante regulando el comportamiento de las plantas ante las situaciones hostiles producidas por el entorno. No obstante, su función no se limita a situaciones de estrés, ya que también participa activamente en procesos normales del desarrollo vegetal. (Waadt et al., 2022). Las concentraciones endógenas de ABA son controladas por el equilibrio entre la biosíntesis y el catabolismo, conjugación y transporte (Skubacz et al., 2016). Las hojas y las raíces perciben el estrés, induciendo la biosíntesis de ABA en los brotes, específicamente en los plástidos a partir del β -caroteno, el cual sufre una serie de reacciones de hidroxilación y epoxidación catalizadas por enzimas como zeaxantina epoxidasa (ZEP). En las últimas etapas, la acción de la 9'-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) convierte a los intermediarios 9'-*cis*-violaxantina y 9'-*cis*-neoxantina en xantoxina que es exportada al citoplasma. En donde la alcohol deshidrogenasa reductasa (SDR/ABA2) convierte a la xantoxina en un aldehído del abscísico que sirve de sustrato para la aldehído oxidasa de abscísico (AAO3) y la molibdeno sulfurasa (MCSU/LOS5/ABA3) para oxidarlo y formar el ácido abscísico (Figura 7a). (Vishwakarma et al., 2017; Muhammad Aslam et al., 2022). Un paso limitante en la biosíntesis de ABA es el catalizado por NCED, en condiciones de estrés por sequía *NCED* es sobreexpresado en plantas como *Arabidopsis*, maíz, tomate, frijol y aguacate al igual que en la deshidratación inducida los niveles del transcrito de *NCED* aumentan considerablemente después de 15 a 30 min del tratamiento (Vishwakarma

et al., 2017). En respuesta a estrés por sequía se ha documentado que en la vasculatura de las raíces se produce el péptido CLE25 que viaja a los tejidos aéreos para inducir la expresión de *NCED* probablemente por la acción de las quinasas similares a receptores BARELY ANY MERISTEM (BAM1 y BAM3). Además se han identificado que los factores de transcripción ATAF1 y NGATHA participan como activadores transcripcionales de *NCED*, reforzando la complejidad del control transcripcional de la biosíntesis de ABA (Waadt et al., 2022).

Para que ABA funcione como una molécula señalizadora, debe ser transportada desde su lugar de biosíntesis hacia los tejidos y células diana. Este transporte ocurre tanto a corta como a larga distancia y está mediado por proteínas especializadas y localizadas en la membrana plasmática. Entre los transportadores de ABA se encuentran las proteínas ABCG25 y ABCG40 localizadas en la membrana plasmática (Muhammad Aslam et al., 2022). ABCG25 también participa en la disminución de la concentración de ABA en citosol, expulsando la fitohormona hacia el apoplasto, contribuyendo a la distribución de ésta. Del mismo modo, plantas que sobreexpresan *ABCG25* muestran un aumento en la tolerancia a la sequía (Vishwakarma et al., 2017). Adicionalmente, se ha demostrado que el transportador NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER (NPF/ AT1), como NPF4.6 media la absorción celular de ABA, lo que evidencia que múltiples sistemas de transporte cooperan para regular la distribución espacial de esta fitohormona (Muhammad Aslam et al., 2022).

Por otra parte, la homeostasis de ABA es regulada por procesos de catabolismo y conjugación. El ABA es catabolizado por la actividad enzimática de ABA 8' hidroxilasa, una monoxigenasa de tipo P-450 codificada por genes de la familia *CYP707A*. Esta enzima cataliza la hidroxilación del ABA para formar el ácido faseico y posteriormente el ácido dihidroxifaseico, metabolitos inactivos que contribuyen a la reducción de los niveles hormonales (Figura 7b). Mientras que la conjugación de ABA con la glucosa es mediante la acción de UDP-glucosiltransferasas, para producir el glucosil éster de ABA (ABA-GE) que es almacenado en el retículo endoplásmico y en las vacuolas, funcionando así como una reserva inactiva de la hormona (Figura 7c) (Leng et al.,

2014). En *Arabidopsis* y arroz se han identificado β -glucosidasas que hidrolizan el ABA-GE y resulta en la liberación del ABA activo en respuesta a estímulos de estrés, proporcionando un mecanismo eficiente de ajuste dinámico de los niveles hormonales (Kongdin et al., 2021).

En la célula vegetal los componentes centrales de la señalización de ABA se basan en un módulo central altamente conservado compuesto por los receptores de la familia PYRABACTIN RESISTANCE PROTEINS / PYR LIKE PROTEINS / REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTOR (PYR/PYL/RCAR), las fosfatasas PHOSPHATASA 2C (PP2C) y las quinasas SNF1-RELATED PROTEIN KINASE2 (SnRK2) y genes que codifican para factores de transcripción y otras proteínas (Skubacz et al., 2016). Este sistema permite una percepción rápida y específica de la hormona y la activación de respuestas transcripcionales y fisiológicas adecuadas. El modelo de transducción de la señal ha sido descrito de la siguiente manera: en ausencia de ABA, las PP2C interactúan con las SnRK2 inhibiendo su acción mediante su actividad de fosfatasa. Bajo estas condiciones, la señalización dependiente de ABA permanece reprimida. Cuando las concentraciones celulares de ABA aumentan, la fitohormona se une a los receptores PYR/PYL/RCAR y conduce a cambios estructurales en el receptor que le permiten interactuar con las PP2C. Esta interacción interrumpe la actividad de PP2C, liberando a las SnRK2 de la represión para activar sus genes diana (Figura 7d) (Le et al., 2014). Una vez activadas, las SnRK2 fosforilan una amplia gama de sustratos, incluyendo canales iónicos involucrados en el cierre estomático y factores de transcripción que regulan la expresión de genes dependientes de ABA. Entre los genes inducidos por ABA se encuentran aquellos que codifican para proteínas protectoras, enzimas antioxidantes y reguladores del metabolismo, los cuales contribuyen a la tolerancia al estrés hídrico (Skubacz et al., 2016).

Los genes dependientes de ABA incluyen a factores de transcripción que pertenecen a múltiples familias, entre las que destacan basic LEUCINE ZIPPER (bZIP), MYELOBLASTOSIS (MYB), MYELOCYTOMATOSIS (MYC), WRKY DNA BINDING PROTEIN (WRKY), APETALA2/ETHYLENE REPOSNSIVE FACTOR (AP2/ERF) Y HD-

ZIP (Agarwal y Jha, 2010; Skubacz et al., 2016). Entre los miembros de la familia bZIP, los factores de transcripción ABRE binding factors/ABA-responsive element binding factors (ABF/AREB) compuesta por cuatro ABFs/AREBs y ABA INSENSITIVE5 (ABI5) desempeñan un papel central en la regulación de genes inducidos por ABA (Waadt et al., 2022). Estos factores de transcripción reconocen y se unen a secuencias ABRE (ABA responsive element PyACGTGGC) localizadas en los promotores de los genes blanco (Agarwal y Jha, 2010).

ABI5 ha sido ampliamente estudiado en respuesta a varios estreses, en condiciones no estresantes, la acumulación de los mRNAs de *ABI5* son bajos, mientras que después de la exposición a ABA o estrés osmótico aumenta la transcripción. Durante la germinación de las semillas y el establecimiento temprano de la plántula, así como en condiciones de estrés por sequía y salinidad aumenta la expresión de *ABI5* en un periodo de 48 a 60 h post estratificación provocando la inhibición de la germinación de las semillas y el crecimiento temprano de las plántulas, lo que representa una estrategia adaptativa para evitar el establecimiento en ambientes desfavorables (Skubacz et al., 2016; Waadt et al., 2022). La activación funcional de *ABI5* requiere de la fosforilación de su dominio de transactivación mediado por las SnRK2.2, SnRK2.3 y SnRK2.6. Esta fosforilación cambia su configuración y le permite interactuar con otras proteínas, los genes *EARLY METHIONINE-LABELED1*, *EM6* que codifican para las proteínas LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT (LEA) esenciales para la maduración de la semilla en el control de la desecación. Así también, controla la expresión de *DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE 1* (DGAT1) que codifica para una enzima clave en la biosíntesis de triacilglicerol que se acumula durante el estrés en plantas. A su vez la expresión de *ABI5* es regulada positivamente por los TFs *MYB96* y negativamente por *MYB7* (Skubacz et al., 2016).

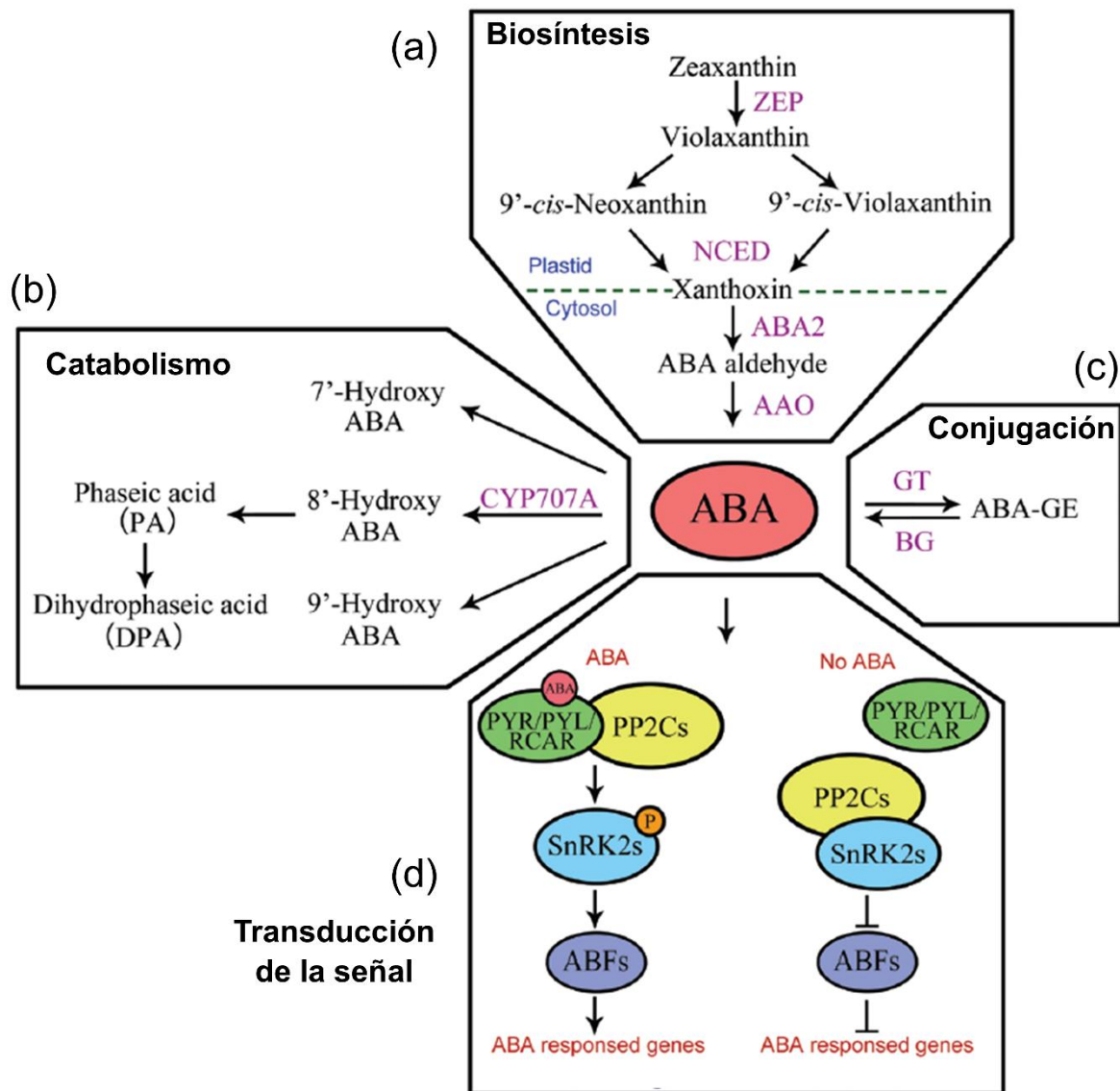


Figura 7. Homeostasis y vía de transducción de ABA. (a) La biosíntesis de ABA comienza en los plastidos y termina en la citosol. (b) Durante el catabolismo, ABA es convertido a ácido faseico (PA) y posteriormente a ácido dihidrofaseico (DPA). (c) El ABA es conjugado con la glucosa para formar un *e*/ glucosil éster de ABA (ABA-GE). (d) Transducción de la señal de ABA. Tomado y modificado de Leng et al., 2014.

Otros efectores de la vía de señalización de ABA son los factores de transcripción ABF1 al ABF4. La mutante cuádruple de *abf1 abf2 abf3 abf4* presenta una mayor sensibilidad al déficit hídrico como resultado de la alteración en la expresión de los genes inducidos por ABA, lo que confirma el papel redundante pero esencial de factores involucrados en el estrés osmótico y la tolerancia (Martignago et al., 2025).

Las consecuencias del estrés hídrico en las plantas pueden ser letales por lo que el efecto puede ser imitado por tratamientos exógenos con ABA, esto ha sido ampliamente empleado como estrategia experimental para identificar genes dependientes de ABA y para estudiar las respuestas adaptativas de las plantas al estrés hídrico. En este contexto, los lncRNAs han emergido como reguladores potenciales de la respuesta al estrés en plantas incluyendo aquellas mediadas por ABA. No obstante, la investigación en este campo aún se encuentra en una fase incipiente y muchos de sus mecanismos de acción y/o su contribución a la respuesta adaptativa al estrés y/o a las vías de señalización de ABA aún son desconocidas.

2.3 Los RNAs no codificantes regulan la expresión génica

En las últimas cuatro décadas, la visión clásica del genoma como un conjunto de secuencias dedicadas exclusivamente a codificar proteínas ha cambiado drásticamente. El análisis realizado a los genomas completos en una amplia diversidad de organismos eucariontes ha revelado que una proporción significativa del transcriptoma corresponde a transcritos de RNA con baja o ninguna capacidad para codificar proteínas, denominados colectivamente como RNAs no codificantes (ncRNAs) (Szymański & Barciszewski, 2002; Chen y Kim, 2024). Este hallazgo ha transformado de manera sustancial la comprensión de la regulación génica y ha puesto de manifiesto la complejidad del control de la expresión génica más allá del dogma central. En la última versión del ensamblaje del genoma humano (Ensembl GRCh38.p14), se han anotado 42,124 genes que codifican a ncRNAs, en contraste con 19,869 genes que codifican a proteínas, lo que destaca la importancia funcional de estas moléculas. Aunque la proporción exacta varía entre especies, en plantas también se ha identificado una abundancia considerable de ncRNAs, muchos de los cuales muestran patrones de expresión específicos de tejido, etapa del desarrollo o condición ambiental. Es importante profundizar en el estudio de las funciones y los mecanismos de acción mediados por los ncRNAs.

Los ncRNAs constituyen un grupo heterogéneo de moléculas que desempeñan funciones diversas en la célula. De manera general, pueden clasificarse en RNAs de mantenimiento y RNAs regulatorios. Los RNAs de mantenimiento generalmente suelen expresarse de forma constitutiva y son necesarios para la viabilidad de las células; entre estos se encuentran el RNA ribosomal (rRNA), el RNA de transferencia (tRNA), los RNAs nucleares pequeños (snRNA) y los RNAs nucleolares pequeños (snoRNA) (Szymański & Barciszewski, 2002; Morey y Avner, 2004). En contraste, los RNAs regulatorios presentan patrones de expresión dinámicos y responden señales del desarrollo de un organismo o en la diferenciación celular; o como respuesta a un estímulo externo, modulando la expresión de otros genes. En este grupo se incluyen los RNAs circulares (circRNA), los RNAs interferentes pequeños (siRNA), los microRNAs (miRNA) y los lncRNAs (Szymański & Barciszewski, 2002; Zhang et al., 2023).

La identificación y caracterización funcional de los ncRNAs regulatorios ha ampliado la comprensión sobre los mecanismos que modulan la expresión génica en diversos organismos, incluidas las plantas, particularmente en procesos de desarrollo, la diferenciación celular y la respuesta a estrés. Entre los ncRNAs, los miRNA y los lncRNA destacan por su capacidad para modular redes regulatorias y por su participación en la integración de múltiples señales moleculares, motivo por el cual son de especial interés del presente estudio.

2.3.1 Metabolismo de los miRNAs y de los lncRNAs

2.3.1.1 Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNA

Los miRNAs son moléculas de RNA de cadena sencilla con una longitud entre 20-24 nucleótidos (nt), altamente conservadas entre eucariontes que cumplen un rol fundamental en la regulación de la expresión génica de manera postranscripcional tanto en animales como en plantas (Meng et al., 2021; Iacomino, 2023).

En plantas, los miRNAs controlan la expresión de genes que codifican principalmente FT, proteínas involucradas en la señalización hormonal y componentes clave de las respuestas a estrés. La biogénesis ocurre a través de una serie de etapas en las que los miRNAs son transcritos a partir de los genes *MIR* localizados principalmente en las regiones intergénicas (Rogers y Chen, 2013). En los promotores de los genes *MIR* se encuentra sobrerrepresentado el motivo TATA-box y el de al menos otras 21 secuencias regulatorias en *cis* lo que sugiere que la regulación de la transcripción de los *MIR* depende de numerosos factores que actúan en *trans* (Xie et al., 2005; Rogers y Chen, 2013). Los genes *MIR* son transcritos por la RNA Polimerasa II (Pol II), que es reclutada hacia los promotores de los *MIR* a través del coactivador transcripcional general Mediator resultando en transcritos primarios largos de miRNAs (pri-MIR) modificados en los extremos 5' y 3' (Rogers y Chen, 2013; Islam et al., 2022). La proteína DAWDLE (DDL) junto a otras proteínas CBP20 y CBP80 cataliza la formación de un tallo-bucle del pri-MIR. Este pri-MIR es procesado en los D-bodies, donde se localizan un conjunto de proteínas formado por TOUGH (TGH), SERRATE (SE), HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1/DRB1), CPL1 y proteínas DICER-like (DCL). TGH interacciona con la proteína TATA-box BINDING PROTEIN2 (TBP2) (Calderón-Villalobos et al.), esta unión afecta la capacidad de HYL para unirse al RNA y aumenta la actividad de DCL1. Esta última es la responsable del corte del pri-MIR para generar al pre-MIR. El pre-MIR es cortado principalmente por DCL1, para formar una doble cadena de RNA compuesta por una cadena guía y una cadena pasajera (miRNA/miRNA*) con extremos 3' salientes. Los diferentes miembros de la familia DCL producen los distintos tamaños de miRNAs, DCL1 y DCL4 cortan a intervalos de 21 nt y DCL2 y DCL3 a 22 nt y 24 nt, respectivamente. El dúplex miRNA/miRNA* es metilado en los extremos 3' por la metiltransferasa HUA ENHANCER 1 (HEN1), que previene la uridilación y la degradación. Estas etapas del procesamiento ocurren en el núcleo, posteriormente el dúplex miRNA/miRNA* es transportado al citoplasma por HASTY (HST). Las plantas deficientes en HST han mostrado solo una disminución en el nivel de la acumulación de algunos miRNAs por lo que se sugiere otra vía de exportación independiente de HST como ocurre en animales (O'Brien et al., 2018; Zhang et al.,

2023). La vía alterna depende del transporte de AGO1 al núcleo, donde carga miRNAs para llevarlos al citoplasma. Aparentemente esta sería la vía principal de exportación de miRNAs (Bologna et al., 2018 y revisado en Yu et al 2026).

En el citoplasma, la cadena guía es reconocida por proteínas ARGONAUTA (AGO1) para formar el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). La cadena pasajera es degradada por la nucleasa SMALL RNA NUCLEASE (SDN) y la polimerasa poli(A) no canónica HEN1 SUPRESOR (HESO1) (Figura 8) (Zhang et al., 2023).

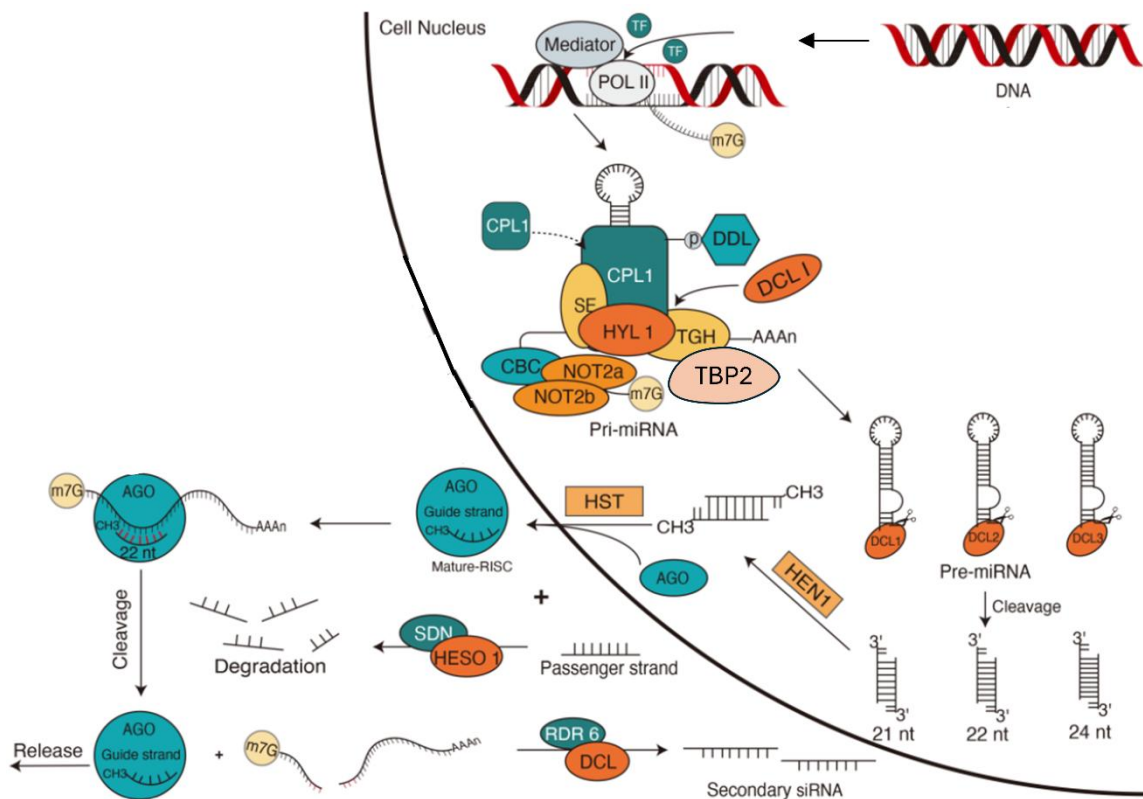


Figura 8. Biogénesis y mecanismo de acción de miRNAs en plantas. Los genes MIR son transcritos por la Pol II a un estructura de tallo-asa llamado pri-MIRNA, en la que participa un conjunto de proteínas entre las que se incluyen TGH y TBP2 que forman el complejo D-body. Las proteínas DCL escinden secuencias redundantes en los extremos 5' y 3' de la base del tallo pri-miRNA para formar el pre-miRNA y seguidamente formar dos RNA bicatenarios cortos complementarios (dsRNA). Los dsRNA son metilados por HEN1 y transportados al citoplasma por HST. El complejo RISC guía al miRNA hacia su diana. Tomado y modificado de Zhang et al., 2023.

El complejo de RISC reconoce secuencias complementarias mediante los miRNAs asociados, actúan silenciando la expresión de sus genes blanco a través de la escisión del transcrito por acción de la proteína AGO1 y al actuar sobre la región 5' no traducida para impedir la traducción (Yadav et al., 2024).

En plantas los miRNAs controlan la expresión de genes que codifican a factores de transcripción, proteínas de respuesta a estrés y otras proteínas que regulan el desarrollo, crecimiento y la fisiología vegetal (Roger y Chen, 2013), como es el caso de los miR156 y miR396, descritos anteriormente.

2.3.1.2 Biogénesis, clasificación y mecanismos de acción de los lncRNA

Los lncRNAs han sido encontrados en eucariotas desde animales hasta plantas revolucionando el campo de la biología del RNA; son definidos como transcritos de RNA con una longitud mayor a 200 nt que no codifican a proteínas (Koop y Mendell, 2018; Yu et al., 2019). No obstante, se ha demostrado que algunos de ellos contienen marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican a pequeños péptidos y se ha sugerido que pueden ser la fuente para el origen de nuevos péptidos (Ruíz-Orera et al., 2014). En comparación con los genes que codifican a proteínas, los lncRNAs exhiben un bajo nivel de expresión con predisposición a ser más célula y/o tejido específico y con tendencia a poseer menos intrones. Así como menos restricciones de secuencia y una limitada conservación filogenética (Ruíz- Orera et al., 2014; Hung et al., 2020)

Los lncRNAs son transcritos por la Pol II y procesados de forma similar a la de los RNAs mensajeros (mRNAs) con adición del CAP (7-metilguanosina) en el extremo 5' y la cola de poly(A) en el extremo 3' (Schmitz et al., 2016).

Dependiendo de su localización genómica respecto a la ubicación de genes vecinos u hospederos, se pueden clasificar en diferentes categorías que incluyen: 1) los lncRNA en sentido, transcritos en la misma hebra que los exones; 2) los lncRNA antisentido naturales que se transcriben en la hebra opuesta a los exones; 3) los lncRNA intrónicos transcritos a partir de intrones; 4) los lncRNA intergénicos transcritos entre dos genes

diferentes y 5) los lncRNA “enhancers” transcritos a partir de las regiones “enhancer” de genes que codifican a proteínas, esta clasificación refleja la diversidad de contextos genómicos en los que actúan y sugieren funciones regulatorias diferenciadas (Chao et al., 2022).

De manera general, la función de los lncRNA se puede clasificar en aquellos que actúan en *cis*, modulando la expresión y/o el estado de la cromatina de genes cercanos a su sitio de transcripción y aquellos que actúan en *trans*, ejerciendo su función a distancia (Koop y Mendell, 2018). Entre sus mecanismos de acción incluyen la remodelación de la cromatina, la activación y la represión transcripcional, la modulación del *splicing* alternativo y la regulación postranscripcional mediante interacciones con otros RNAs o proteínas (Hung et al., 2020).

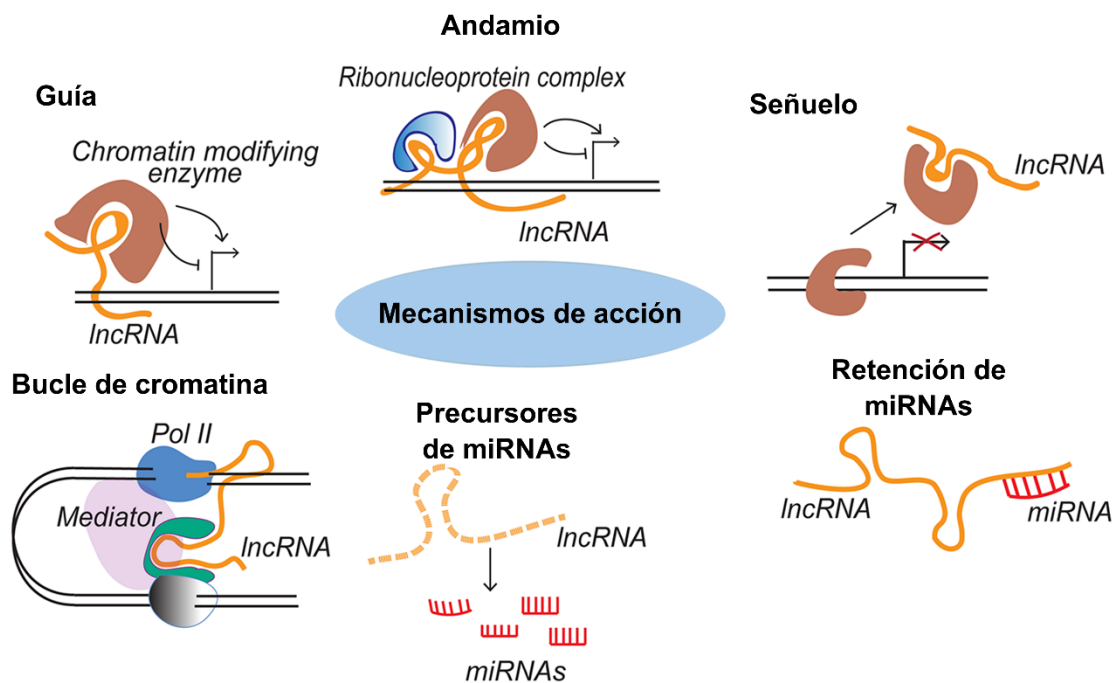


Figura 9. Mecanismos de acción de los lncRNAs. Los lncRNA pueden reclutar complejos proteicos funcionando como andamiaje, engañar a los componentes de remodelación de la cromatina como señuelo o “secuestrando” a miRNA, guiar a enzimas remodeladores de la cromatina y actuar como precursores de miRNA. Tomado y modificado de Sweta et al., 2019.

Una característica distintiva de los lncRNAs es su capacidad para adoptar estructuras secundarias y terciarias que facilitan su interacción con DNA, RNA y proteínas. En este sentido, las estructuras 3D cumplen un papel crítico en las interacciones con estas macromoléculas. Este proceso está favorecido por el potencial de los lncRNAs para formar tallos de doble cadena, bucles y otras estructuras de cadena sencilla que posteriormente se pliegan en conformaciones tridimensionales y median la interacción (Schmitz et al., 2016). Los lncRNAs exhiben una diversidad de mecanismos de acción, funcionando como señuelos, guías o moléculas de andamiaje. Es decir, pueden unirse a proteínas o reclutar factores de transcripción, modificadores de la cromatina u otros factores reguladores involucrados en la expresión génica tanto en *cis* como en *trans* (Figura 9) (Chen et al., 2018; Zhang et al., 2023).

La regulación del control génico influye en la diferenciación celular, el desarrollo y el crecimiento tanto de animales como de plantas. Asimismo, los lncRNAs están asociados a diversas enfermedades como cáncer, depresión, diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares (Schmitz et al., 2016; Hung et al., 2020; Squillaro et al., 2020; Shi et al., 2021)

Para profundizar en la influencia que ejercen lncRNAs en la vida de las plantas, en la siguiente sección se describirán algunos de los que están involucrados en el desarrollo de las raíces, las hojas y la respuesta a estrés.

2.4 Los lncRNAs en plantas: involucrados en el desarrollo de las raíces y las hojas y en la respuesta a estrés

El estudio de los lncRNAs en plantas es un campo fascinante y en constante crecimiento. El primer lncRNA descrito en plantas es *EARLY NODULIN40 (ENOD40)* fue identificado en *Medicago truncatula* y está implicado en el crecimiento de la planta (Staehelein et al., 2001). En las plantas se ha observado una alta diversidad en la expresión de los lncRNAs en diferentes tejidos y bajo diferentes condiciones de

crecimiento; sin embargo, su nivel de expresión suele ser menor que en animales (Hung et al., 2020, Mattick et al., 2023).

Del mismo modo, los lncRNAs en plantas son transcritos principalmente por la Pol II; sin embargo, dos RNAs polimerasas específicas de plantas, la Pol IV y la Pol V, también participan en la transcripción de algunos lncRNAs (Wang y Chekanova, 2017).

Como se ha indicado previamente, los lncRNAs son moléculas multifuncionales que regulan diversos procesos biológicos, particularmente en las plantas abarcan la germinación, el control del tiempo de floración, la fotomorfogénesis, el desarrollo de raíces laterales hasta la respuesta a estrés en plantas (Wang y Chekanova, 2017; Palos et al., 2023; Motor et al., 2025).

2.4.1 Los lncRNAs en el desarrollo de las raíces

En *Arabidopsis* y arroz se han descrito algunos lncRNAs que regulan la arquitectura de las raíz a través de diferentes mecanismos de acción (Chen et al., 2018). El lncRNA *AUXIN REGULATED PROMOTER LOOP (APOLO)* ha mostrado ser esencial para el desarrollo de las raíces laterales. La auxina induce la expresión del factor transcripcional ARF7, que a su vez induce la transcripción de *APOLO* y su gen vecino, que codifica para PINOID (*PID*), una proteína quinasa relacionada a PIN involucrada en el transporte polar de auxina y favoreciendo el gravitropismo. Esta inducción es mediada por la interrupción de un bucle de cromatina que comprende la región de *APOLO* y el promotor de *PID* en el que se observa una disminución en la H3K27me3 en el bucle. *APOLO* es transcrito tanto por la RNA Pol II y la RNA Pol V, específicamente la transcripción de *APOLO* mediada por la Pol II recluta componentes del complejo represivo polycomb (PRC1 y PRC2) para metilar el DNA en la región genómica *APOLO-PID* y cerrar el bucle inhibiendo la transcripción (Ariel et al., 2014). Por otro lado, *APOLO* puede funcionar en *trans* reconociendo genes blanco mediante complementariedad de secuencia y la formación de un dúplex de RNA:DNA llamado

R-loop. *APOLO* sirve como señuelo de LHP1 que forma parte de PRC1 lo que permite modular la conformación de la cromatina y coordinar la expresión de genes sensibles a la auxina. Entre los genes blanco de *APOLO* se encuentran *WAG2*, homólogo de PID, involucrado en el transporte de auxina, el gen *LEUCINE RICH EXTENSIN2 (LRX2)*, implicado en la remodelación de la pared celular después de la emergencia de la raíz lateral y *ROOT HAIR DEFECTIVE6 (RHD6)*, un modulador clave de la iniciación de los pelos radiculares (Ariel et al., 2020; Crespi, 2022).

Adicionalmente, se ha reportado que el lncRNA *Alternative Splicing COmpetitor (ASCO)* interactúa físicamente con proteínas de unión a RNA de los speckle nucleares (NSRs). Las NSRs son reguladores del splicing alternativo que se unen a pre-mRNAs blanco modulando la maduración de diferentes isoformas en respuesta a auxina. Por lo que, la unión de las NSR con ASCO afecta el *splicing* alternativo de múltiples genes relacionados con auxina. Influenciando, de esta manera la formación de raíces laterales dependiente de auxina (Bardou et al., 2014).

Por otra parte, Roulé y colaboradores (2023) caracterizaron el lncRNA intergénico *AUXIN REGULATOR ELEMENT DOWNSTREAM SOLITARYROOT (ARES)*, codificado río abajo de un regulador maestro del desarrollo de las raíces laterales *IAA14/SLR*. Las plantas mutantes de *ARES* exhiben alteraciones en el desarrollo de las raíces laterales; sin embargo, no muestran una disminución en la expresión de su gen vecino *IAA14*. En concordancia con estos resultados, un análisis transcriptómico evidenció la desregulación de diversos genes asociados con el desarrollo radicular. No obstante, el mecanismo de acción aún no ha sido completamente elucidado; sin embargo, se ha propuesto que *ARES* pudiera actuar en *trans* o alternativamente mediar la acción de proteínas en el núcleo (Roulé et al., 2023).

En otro escenario de la organogénesis vegetal se encuentran las raíces adventicias, las cuales se forman a partir de tejidos no radiculares durante el desarrollo normal o en respuesta a condiciones de estrés. Las raíces adventicias son importantes desde el punto de vista económico, ya que la propagación de plantas mediante esquejes es fundamental para las industrias forestales y hortícolas. Asimismo, cumplen un papel

sobresaliente en la estabilización de ambientes cambiantes, como las regiones costeras o los estuarios (Steffens and Rasmussen, 2016). Interesantemente, en la especie *Populus* se ha descrito el *IncWOX11a*, codificado aproximadamente a 50 kpb de *PeWOX11a*, localizado en la cadena reversa de *WOX11* en el cromosoma 13. Este lncRNA actúa como un regulador negativo de la expresión de *WOX11*, un gen involucrado en la formación de raíces adventicias (Ran et al., 2023).

Estos ejemplos muestran cómo los lncRNAs participan en modular la arquitectura radicular mediante mecanismos epigenéticos y transcripcionales, contribuyendo a la plasticidad del sistema radicular frente a estímulos ambientales. Sin embargo, también se demuestra lo poco que se sabe de ellos por lo que profundizar en esta área es crucial para el entendimiento del sistema radicular.

2.4.2 Los lncRNAs en el desarrollo de las hojas

El crecimiento y la forma de la lámina de la hoja son dos características que determinan el área final que es esencial para maximizar la captación de la luz solar. A nivel molecular además de ser regulados por factores de transcripción como la familia de genes *GRFs*, *GIF*, *SPLs*, *BOP1* y *BOP2* y proteínas como ARGOS descritos anteriormente, en la últimas décadas se ha demostrado que los lncRNAs son reguladores potenciales de estos procesos. No obstante, solo algunos de ellos han sido identificados en plantas como arroz, *Arabidopsis* y *Brassica campestris*.

Ben Amor y colaboradores (2009) han identificado algunos de los primeros lncRNAs que participan en el desarrollo vegetal, entre estos se encuentra *npc48*, que participa en el desarrollo foliar. La sobreexpresión de *npc48* provoca un aumento en el diámetro de la roseta y en las aserraciones de las hojas, así como un rezago en el tiempo de floración, probablemente ocasionado por la regulación que ejerce *npc48* sobre algunos *miRNAs* (Ben Amor et al., 2009).

En arroz se ha descrito que el lncRNA *TWISTED LEAF (TL)*, es transcrito a partir de la cadena opuesta del gen *OsMYB60*. Ambos genes son co-expresados en diversos tejidos entre los que se incluyen la lámina de la hoja y las raíces, mostrando una mayor acumulación de *TL* que *OsMYB60* en dichos tejidos. Las mutantes de *TL* mostraron un aumento significativo en la expresión de *OsMYB60* y las plantas desarrollaron láminas de la hoja retorcidas, fenotipo que también observaron en las plantas sobreexpresoras de *OsMYB60*, por lo que sugieren que *TL* regula en *cis* directa o indirectamente a *OsMYB60* para mantener el aplanamiento de la lámina de la hoja. No obstante, el mecanismo de acción no está elucidado, pero niveles alterados en modificaciones de histonas de los *locus TL/OsMYB60* pueden sugerir que *TL* probablemente regula la expresión de *OsMYB60* a través de modificaciones de histonas (Liu et al., 2018)

En *Brassica campestris* se ha identificado el lncRNA *bra-miR156aHG* que actúa como precursor del miR156a. La sobreexpresión del *bra-miR156aHG* en *B. campestris* provoca modificaciones en los ángulos de la punta de las hojas y en la relación longitud-ancho de la hoja. Además, la expresión del *bra-miR156aHG* en *Arabidopsis* genera plantas transgénicas con un mayor número de hojas en roseta, cambios en la morfología de la hojas caulinares y rezago en el tiempo de floración. Hallazgos que sugieren que *bra-miR156aHG* es un regulador importante en el desarrollo foliar en *Arabidopsis* y en *B. campestris* (Zhou et al., 2023).

Adicionalmente se han descrito en *Arabidopsis* los lncRNAs antisentido naturales *NAT1_{UGT73C6}* y *NAT2_{UGT73C6}* transcritos a partir del gen *UGT73C6* que codifica para una UDP-glicosiltransferasa. La disminución en la expresión de estos *NATs* conduce a una disminución del tamaño de la roseta, mientras que la sobreexpresión provoca el fenotipo contrario. Meena y colaboradores (2023) mostraron que los niveles alterados de los *NATs* afectan la proliferación celular a través de la regulación de la expresión en trans de genes de la familia de GRF y GIF, reguladores importantes del tamaño de la lámina de la hoja (Meena et al. 2023).

Finalmente, en especies como *Liriodendron chinense* se han realizado estudios masivos en el que se han encontrado modulos regulatorias entre lncRNA-mRNA que potencialmente participan en la modulación de la forma de la hoja y en el establecimiento de la polaridad (Tu et al., 2022).

De manera general, aunque los mecanismos moleculares específicos aún no se han dilucidado por completo, estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que los lncRNAs participan en la modulación fina de los programas de desarrollo foliar.

2.4.3 Los lncRNAs en la respuesta al estrés por déficit hídrico

La respuesta de las plantas al estrés abiótico, incluyendo la salinidad, las temperaturas extremas y el estrés por déficit hídrico, implica una reprogramación transcripcional profunda en la que los lncRNAs desempeñan un papel emergente. Numerosos lncRNAs han sido identificados como inducidos por sequía y por tratamiento con ABA, lo que sugiere su participación directa o indirecta en las vías de señalización asociadas al estrés hídrico (Ben Amor et al., 2009; Zhang et al., 2014; Qin et al., 2017).

Sin embargo, son escasos los lncRNA asociados con la respuesta a ABA que han sido caracterizados funcionalmente. Entre ellos se encuentra el lncRNA *DROUGHT INDUCED lncRNA (DRIR)*, el cual se induce por ABA y estrés salino. La sobreexpresión de *DRIR* confiere un aumento en la tolerancia al estrés hídrico, mientras que su silenciamiento reduce la capacidad adaptativa de la planta. *DRIR* regula la expresión de genes asociados a la señalización de ABA y al metabolismo de ROS, posicionándose como un regulador positivo de la tolerancia al estrés (Qin et al., 2017).

Adicionalmente, se ha descrito el lncRNA *ABA Response regulation TE-lincRNA (ARTA)* en *Arabidopsis*. La fitohormona ABA induce la expresión de *ARTA* y *ABI5*. A su vez, las mutantes de *arta* muestran desensibilización a la fitohormona, disminución en la tolerancia a la sequía y una reducción en la expresión de *ABI5*, validando que *ARTA*

es un regulador positivo de la expresión de *ABI5*. El modo de acción por el cual *ARTA* regula la expresión de *ABI5*, es mediante el secuestro de *SAD2*, una proteína que participa en el tráfico nuclear de *MYB7*, un regulador negativo de *ABI5*. *SAD2* media el tráfico nuclear de *MYB7*, no obstante, en presencia de *ABA*, *ARTA* interactúa con la región de unión a lncRNAs ubicada en el extremo terminal de *SAD2*. Esta interacción que ocurre dentro del núcleo altera el transporte nuclear de *MYB7*, lo que resulta en una inhibición de la regulación negativa de *ABI5* mediada por *MYB7* y en la transcripción de *ABI5* (Yang et al., 2023).

Asimismo, se ha descrito que el lncRNA *drought-induced long intergenic noncoding RNA 1 (DANA1)* promueve la tolerancia a la sequía en *Arabidopsis*. El mecanismo propuesto implica la interacción de *DANA1* con la proteína *DANA1-INTERACTING PROTEIN1 (DIP1)* que también promueve la resistencia a la sequía. En condiciones de estrés por sequía aumenta la expresión de *DANA1*; la interacción de *DANA1* con *DIP1*, junto con otros componentes, promueven la desacetilación de los *loci* de *CYP707A1* y *CYP707A2*, genes que codifican enzimas que participan en el catabolismo de *ABA*. El reclutamiento de la desacetilasa de histonas *HDA9* mediado por *DANA1-DIP1* a los *loci* diana promueve la disminución de los niveles de *H3K9ac* y *H3K27ac* lo que reprime la expresión de *CYP707A1* y *CYP707A2* y por tanto, produce un aumento en la concentración de *ABA* y, en consecuencia, en la tolerancia a la sequía de las plantas (Cai et al., 2024).

Por otro lado, en plantas de interés agroeconómico, como el arroz, se ha identificado que el lncRNA *TCONS_00021861* confiere resistencia a la sequía. No obstante, se ha propuesto que esta respuesta está asociada con la regulación de la señalización de auxina (Chen et al., 2021).

Dado el escaso número de ejemplos descritos en la literatura de lncRNAs asociados a la respuesta al estrés hídrico mediada por *ABA* es necesario profundizar en el análisis funcional de otros lncRNAs potencialmente involucrados en este proceso, ya que su estudio podría revelar nuevos mecanismos regulatorios en la adaptación de las plantas a condiciones ambientales adversas.

En este contexto, la identificación y caracterización de nuevos lncRNAs que participen en la señalización de ABA y en la respuesta al estrés hídrico representa un aspecto fundamental para comprender la regulación transcripcional de estos procesos en plantas. Entre estos candidatos se encuentra **TALIR**, cuyo posible papel en la regulación del crecimiento y de la respuesta al estrés se aborda en las secciones siguientes.

2.5 Caracterización previa de **TALIR** en *Arabidopsis thaliana*

Después de la revisión de la literatura sobre los mecanismos moleculares que sustentan el desarrollo y la respuesta al estrés hídrico vegetal, así como el papel que desempeñan los lncRNAs en estos procesos; en esta sección se presenta el conocimiento previo sobre **TALIR**. En particular, se resumen los hallazgos previos sobre su caracterización en *Arabidopsis*, incluyendo estudios realizados por nuestro grupo de trabajo y por otros investigadores, los cuales constituyen la base conceptual y experimental del presente estudio.

El lncRNA **TALIR** (*TBP2-associated long intergenic non-coding RNA*), identificado como AT1G55525 en The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR, www.arabidopsis.org), fue inicialmente reportado en una base de datos de lncRNAs de plantas desarrollada por Jin y colaboradores (2013). **TALIR** (anteriormente denominado *lncTATA* por nuestro grupo de trabajo), se localiza en el cromosoma uno de *A. thaliana*, entre los genes *TATA-box binding protein 2* (*TBP2*, At1g55520) y *E3 RINGU* (At1g55530), que codifica para una proteína ubiquitina ligasa tipo E3.

Jin y colaboradores (2013) mostraron que **TALIR** se induce en condiciones de estrés por déficit hídrico, tales como salinidad, sequía y tratamiento con ABA (Figura 10), por lo que esta evidencia nos motivó la investigación de su posible papel biológico en la respuesta al estrés hídrico.

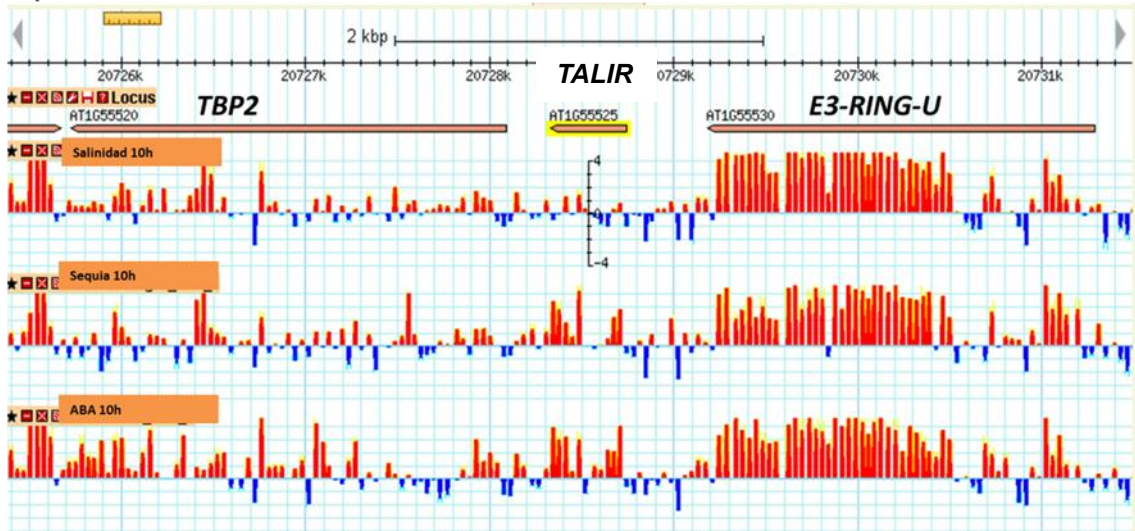


Figura 10. Expresión de *TALIR* en condiciones de estrés por déficit hídrico. *TALIR*, se encuentra ubicado en la región intergénica entre *TBP2* y *E3 RINGU*. Las barras anaranjadas y azules indican inducción y represión de la expresión del gen, respectivamente. En los recuadros anaranjados se muestran las condiciones de estrés hídrico analizadas.

Por otro lado, Vargas-Camacho (2022) junto con el grupo de trabajo generaron mutantes para *TALIR*, silenciado el gen mediante tres estrategias diferentes: (i) la identificación de una mutante de inserción de un T-DNA, (ii) la de un RNA de interferencia (RNAi) y (iii) a través de la expresión constitutiva de un microRNA artificial (amiR). Posteriormente, en su tesis de maestría mostró que las mutantes de *talir* presentan una disminución del tamaño de la roseta (Figura 11a y c), resultado de una disminución en el área individual de las hojas en comparación con las plantas WT (Figura 11 c y d). Esto fue observado a los 21 días del desarrollo y persistió a los 27 días del desarrollo (Figura 12). Estos hallazgos sugieren que *TALIR* contribuye al desarrollo foliar, sin embargo estos resultados requieren una caracterización más robusta complementándolos con réplicas biológicas e incluyendo otras etapas del desarrollo.

Adicionalmente, se evaluó si la disminución de *TALIR* influía en la transcripción de sus genes vecinos. Para este propósito extrajeron RNA total de la hoja 5 de plantas de 27 días de edad, mostrando un aumento en la acumulación de los transcritos *TBP2* y *E3 RINGU* en comparación con la WT (Figura 13 a y b). Estos resultados sugieren que *TALIR* influye en la transcripción de *TBP2* y *E3 RINGU*. No obstante, estos resultados corresponden a una evaluación inicial, por lo que resulta pertinente profundizar en su análisis mediante un diseño experimental más robusto que incluya réplicas biológicas.

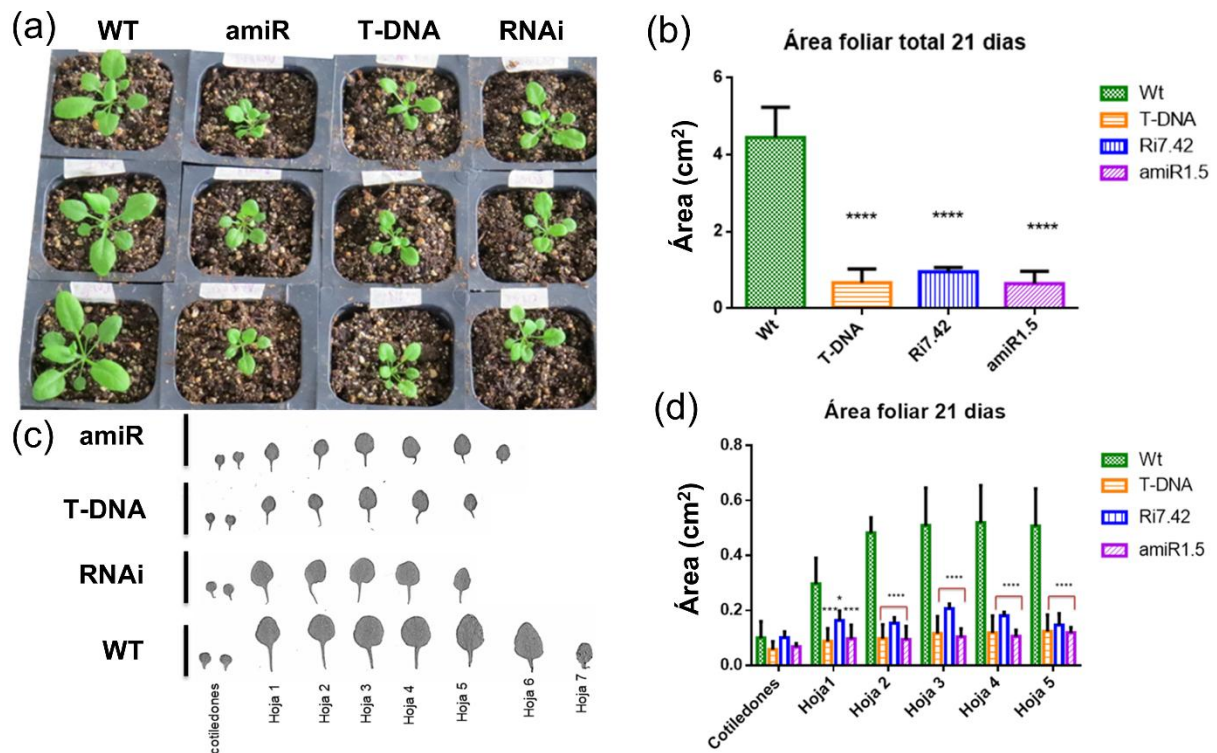


Figura 11. Análisis fenotípico a los 21 días de desarrollo. (a) Fotografía de líneas silenciadas de *TALIR* a los 21 días comparadas con la WT. (b) Área foliar total de cada línea silenciada de *TALIR*. (c) hojas de roseta de las líneas T-DNA, Ri7.42, amiR1.5 y WT, incluyendo cotiledones. Barra = 1 cm. (d) Análisis del área foliar de cada hoja de roseta de *Arabidopsis*. Los asteriscos indican **** $p < 0.001$, *** $p \leq 0.001$, * $p \leq 0.05$, con una $n=3$. Tomado y modificado de Vargas-Camacho 2022.

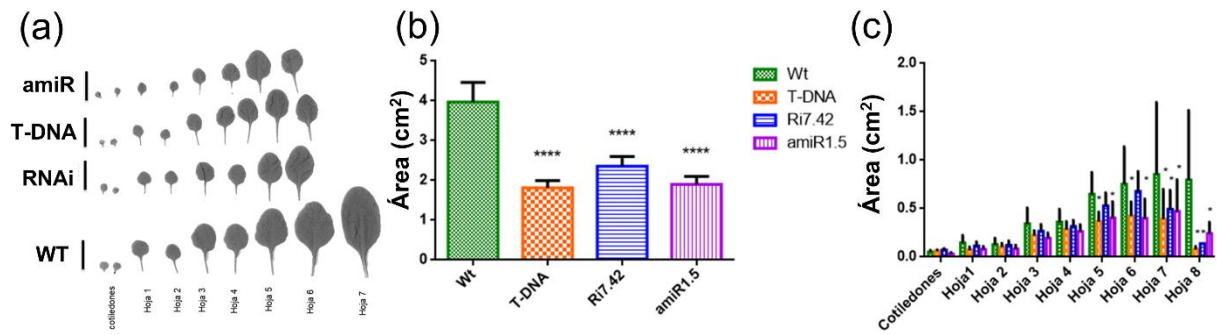


Figura 12. Análisis fenotípico a los 27 días de desarrollo. (a) Hojas de roseta de las líneas T-DNA, Ri7.42, amiR1.5 y WT, incluyendo cotiledones. Barra = 1 cm. (b) Área foliar total de cada línea silenciante de TALIR. (c) Análisis del área foliar de cada hoja de roseta de *Arabidopsis*. Los asteriscos indican **** $p < 0.001$, *** $p \leq 0.001$, * $p \leq 0.05$, con una $n=13$. Tomado y modificado de Vargas-Camacho 2022.

Como se mencionó anteriormente, los genes *MIRNA* contienen en sus promotores motivos de unión para la proteína TBP2. Además, TBP2 interactúa con TOUGH, una proteína que participa en la biogénesis de los MIRNAs, dado este escenario se decidió evaluar la abundancia relativa del miR396b y del miR156 durante tres etapas del desarrollo en las líneas mutantes de *talir*. Este análisis reveló que las líneas mutantes muestran una desregulación de la acumulación de los miRNAs (Figura 13, Vargas-Camacho, tesis de Maestría, 2022), sugiriendo que este comportamiento está asociado de manera indirecta a la ausencia de *talir*, sin embargo, estos análisis requieren ser complementados con una caracterización más profunda que incluya réplicas biológicas y la evaluación de los genes diana de los miRNAs.

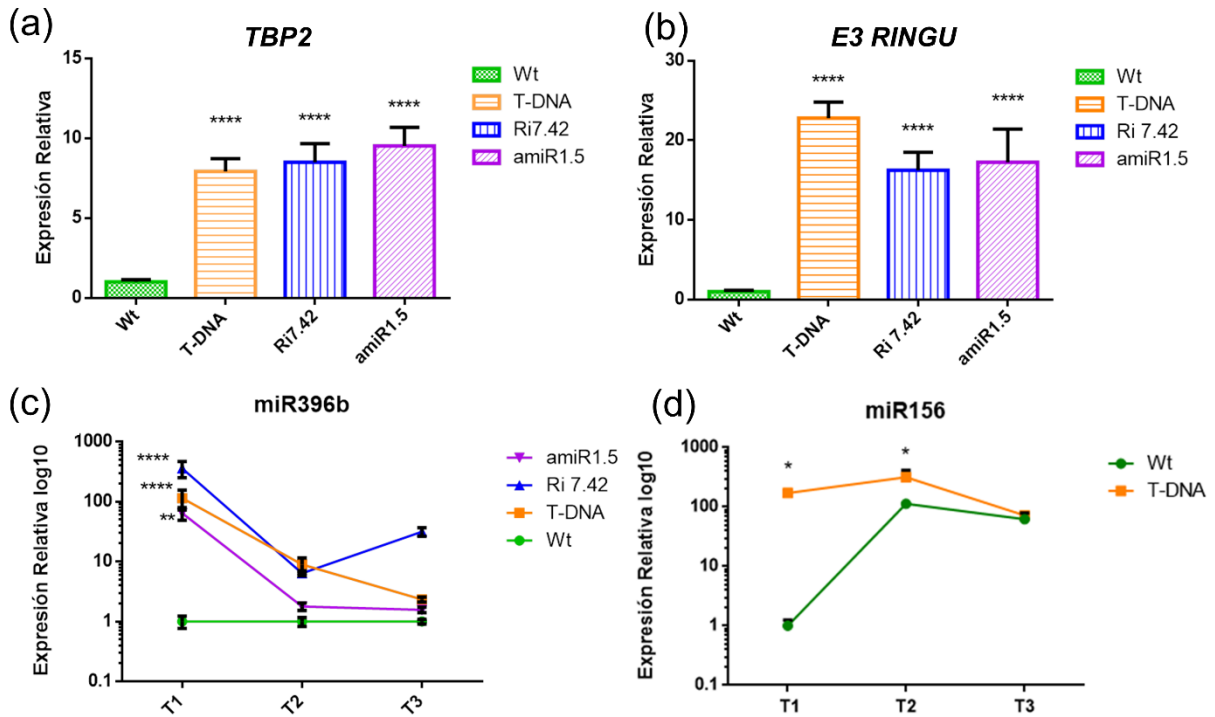


Figura 13. Análisis de expresión de los genes alelados a *TALIR* y *MIRNAs*. (a) Niveles de abundancia de *TBP2*. (b) Niveles de abundancia de *E3 RINGU*. **** $p < 0.001$, $n = 6$. (c) Abundancia relativa del *miR396b* en diferentes etapas del desarrollo foliar. **** $p < 0.001$, ** $P < 0.05$ con $n = 6$. (d) Abundancia relativa del *miR156* en diferentes etapas del desarrollo foliar. * $p \leq 0.05$ con $n = 6$. T1, 21 días de edad; T2, 24 días de edad y T3, 27 días de edad. Tomado y modificado de Vargas–Camacho, 2022.

En conjunto, los resultados obtenidos por Vargas–Camacho (2022) establecen bases conceptuales para implicar a *TALIR* en el desarrollo foliar. No obstante, los análisis realizados presentan un alcance exploratorio y requieren ser complementados con una caracterización más rigurosa que incluya la incorporación de réplicas biológicas. Adicionalmente, la posible participación de *TALIR* en el desarrollo radicular y en la respuesta a estrés por déficit hídrico, no fue abordada previamente, lo que da origen a las preguntas de investigación planteadas en esta tesis doctoral.

3 JUSTIFICACIÓN

El estudio de los mecanismos moleculares que regulan el desarrollo vegetal y la respuesta a factores ambientales constituye un área de interés de la biología molecular de plantas. En los últimos años, los lncRNAs han emergido como reguladores importantes de la expresión génica que participan en la regulación de numerosos procesos fisiológicos de las plantas.

Sin embargo, a pesar del creciente número de lncRNAs identificados en plantas, el conocimiento sobre sus mecanismos de acción y su contribución funcional a procesos específicos del desarrollo y a la respuesta al estrés sigue siendo limitado. En particular, la mayoría de los lncRNAs caracterizados hasta la fecha corresponden a un número reducido de ejemplos, mientras que la función de miles de lncRNAs permanece sin explorar.

En este contexto, el RNA largo intergénico no codificante *TALIR* emerge como un candidato de interés para el estudio de la integración entre el desarrollo vegetal y la respuesta al estrés por déficit hídrico en *Arabidopsis thaliana*. La caracterización funcional de *TALIR* permitirá evaluar su posible papel como regulador de la arquitectura del sistema radicular, del desarrollo foliar y de la señalización mediada por ABA.

El análisis funcional de *TALIR* no solo contribuirá a ampliar el conocimiento sobre la biología de los lncRNAs en plantas, sino que también proporcionará información relevante sobre los mecanismos moleculares que subyacen a la plasticidad del desarrollo vegetal tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés hídrico.

Asimismo, este enfoque tiene el potencial de generar bases conceptuales y metodológicas que, a largo plazo, puedan ser aplicadas al mejoramiento de cultivos de interés agroeconómico para que tengan mayor tolerancia a condiciones ambientales adversas y de esta manera contribuir a la seguridad alimentaria global.

4 HIPÓTESIS

El RNA largo intergénico no codificante asociado al gen *TBP2* (*TALIR*) participa en la modulación del desarrollo de *Arabidopsis thaliana* y en la respuesta al estrés por déficit hídrico, mediante la regulación de procesos moleculares y fenotípicos dependientes del contexto ambiental.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la participación funcional, a nivel fenotípico y molecular, del lncRNA *TALIR*, asociado al gen *TBP2*, en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* y en la respuesta a estrés por déficit hídrico.

5.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar fenotípica y molecularmente las líneas mutantes con pérdida de función del lncRNA *TALIR*, bajo condiciones control y en estrés por déficit hídrico.
2. Analizar la relación transcripcional entre el lncRNA *TALIR* y los genes codificantes adyacentes *TBP2* y *E3 RINGU*, en condiciones control y bajo estrés por déficit hídrico.
3. Evaluar la relación del lncRNA *TALIR* con redes de regulación genética implicadas en el desarrollo vegetal, mediante el análisis de cambios en la expresión de miRNAs seleccionados.
4. Determinar la localización subcelular del lncRNA *TALIR* en condiciones control.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las plantas silvestres (WT) y las líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* pertenecen al ecotipo Columbia-0. La mutante de inserción de T-DNA (Salk_089677) fue obtenida de la colección de T-DNA de Salk (Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre). Las mutantes de RNA de interferencia (RNAi) y la microRNA artificial (amiR) fueron generadas en nuestro laboratorio, como se describe en la siguiente sección. La línea *pMIR396:GUS* fue generosamente donada por el Dr. Javier Palatnik, del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (Santa Fe, Argentina). Las semillas fueron esterilizadas en etanol al 96% por 2 min, seguido de cloro comercial (hipoclorito de sodio) al 30% por 7 min, y posteriormente se realizaron siete lavados con agua destilada estéril. Las plántulas se cultivaron en cajas de Petri, en posición vertical para los análisis de desarrollo radicular y en posición horizontal para el resto de los ensayos. Se empleó el medio Murashige y Skoog (MS) 0.2 X o 0.5X con MES, sacarosa 1% y agar 0.8%. Todas las plantas se cultivaron a 21 °C bajo un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

6.2 Generación de líneas transgénicas

Para la obtención de plantas transgénicas en las que el gen *TALIR* fue silenciado mediante un RNA de interferencia, se amplificó un fragmento de 227 pb, mientras que para la generación de la línea transgénica de microRNA artificial 808 pb. El fragmento correspondiente a RNAi fue clonado en el vector pENTR (Invitrogen) y el fragmento para el amiR en el vector pCR8 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los vectores fueron transformados por choque térmico a células de *Escherichia coli* DH5 α , las cuales fueron cultivadas y seleccionadas en medio LB suplementado con kanamicina 50 μ g/mL. Para confirmar la presencia del fragmento de interés, las clonas positivas fueron secuenciadas. Posteriormente los vectores se recombinaron con pKGWIWGII.2 para RNAi (Karimi et al., 2002) y con pMDC32

(Zhang et al.,2005), usando la enzima LR clonasa II (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los vectores binarios resultantes fueron transformados por choque térmico en *E. coli* DH5 α y seleccionados en medio LB suplementado con espectinomicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Finalmente, el plásmido que contenía el inserto de interés, fue purificado y transformado por choque térmico a células de *Rhizobium radiobacter* (anteriormente *Agrobacterium tumefaciens*) C58. Estas células fueron cultivadas y seleccionadas en medio LB con espectinomicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La clona positiva a la inserción, previa verificación por PCR se utilizó para transformar a *A. thaliana* por medio del método floral dip (Zhang et al., 2006). Se obtuvieron tres y dos líneas transgénicas homocigotas independientes para las mutantes de RNAi y amiR, respectivamente; las cuales fueron seleccionadas en medio MS 0.5X suplementado con kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o higromicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Para los análisis subsecuentes solo se utilizó una línea transgénica representativa por mutante.

Las líneas reporteras *pMIR396:GUS* en el fondo mutante amiR-*TALIR* se generaron mediante el método floral dip, en el que plantas transgénicas homocigotas de *pMIR396:GUS* estuvieron en contacto con células de *R. radiobacter* C58 portadoras del plásmido binario pMDC32. Las plantas *pMIR296:GUS*-amiR-*TALIR* fueron seleccionadas con higromicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se obtuvieron tres líneas transgénicas homocigotas independientes y se emplearon para la tinción histoquímica de *GUS*.

6.3 Análisis foliares

Las plantas utilizadas para este análisis se cultivaron bajo condiciones de día largo durante dos semanas. Posteriormente, fueron transferidas a suelo y analizadas a los 21, 24 y 27 días después de la siembra (dds). Las rosetas completas de *A. thaliana* fueron observadas y fotografiadas con el dispositivo Samsung A50. Las hojas de cada roseta, incluidos los cotiledones, fueron separadas individualmente y clasificadas de acuerdo con su orden de emergencia, el cual se asumió como indicador de la edad relativa de cada hoja. Una vez separadas, las hojas fueron escaneadas utilizando un escáner HP Scanjet G4050 para analizar su forma y medir su área superficial usando

el software Fiji (Schindelin et al., 2012). Se utilizaron tres plantas por genotipo en cada réplica biológica y se realizaron tres réplicas biológicas independientes.

6.4 Análisis de raíz

Para evaluar el crecimiento de las raíces de las plantas WT y las mutantes, se analizó el desplazamiento de la punta de la raíz en plántulas cultivadas verticalmente. La posición de la punta de la raíz se marcó cada 24 horas durante 7 días después de la germinación (ddg). Posteriormente, las cajas de Petri fueron fotografiadas y las imágenes obtenidas se utilizaron para estimar los incrementos en el crecimiento de la raíz mediante el software Fiji (Schindelin et al., 2012). La densidad de raíces laterales (LR) fue determinada siguiendo el procedimiento descrito por Malamy y Benfey (1997), con modificaciones reportadas por Dubrovsky y colaboradores (2006). Las raíces se fijaron con paraformaldehído al 4% y se incubaron por 24 h a 4°C. Posteriormente, se incubaron en una solución de HCl 0.24 N y metanol al 20% y se incubaron por 20 min a 62°C. Esta solución se reemplazó por NaOH 7% en etanol 60% y se incubó por 20 min a temperatura ambiente. Las raíces fueron rehidratadas mediante lavados sucesivos con etanol al 40%, 20%, 10%, y posteriormente se incubaron con una solución de etanol al 5% y glicerol al 25%, se incubaron en cada solución por 24 h. Finalmente, las raíces fueron montadas en una solución de glicerol 50% en portaobjetos para visualizarlas en el microscopio óptico (Leica DM500, Alemania). En las raíces aclaradas, se determinó el número de LR y la longitud de las zonas de ramificación, definida como la distancia entre el hipocótilo a la última LR emergida. Todos los parámetros se evaluaron en sistemas radiculares de plantas individuales. Se realizaron tres réplicas biológicas independientes.

6.5 Análisis Moleculares

6.5.1 Extracción de RNA

El RNA total se extrajo a partir de plántulas completas de dos semanas de edad o de la quinta hoja de plantas de 21 y 24 dds, tanto de las plantas WT y de las mutantes. El tejido se maceró en nitrógeno líquido, posteriormente se homogenizó con 500 μ L de TRIzol LS Reagent (Thermo Fisher) y las muestras fueron incubadas por 5 min a temperatura ambiente, para permitir la completa disociación de complejos nucleoprotéicos. Se le añadió cloroformo (100 μ L por cada 500 μ L de TRIzol), los tubos fueron agitados vigorosamente manualmente por 15 s y posteriormente incubados por 3 min a temperatura ambiente. Seguido de esto fueron centrifugados a 12,000 x g durante 15 min a 4 °C. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se adicionaron 250 μ L de isopropanol por cada 500 μ L de TRIzol usado en la homogenización inicial. Las muestras fueron incubadas durante 10 min a temperatura ambiente y después centrifugadas a 12,000 x g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue removido y el RNA precipitado fue lavado con 1 mL de etanol al 75%. Las muestras fueron centrifugadas a 7,500 x g durante 5 min a 4 °C. El RNA fue secado al aire y resuspendido con agua miliQ estéril. Se determinó la concentración del RNA total usando un NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) y se visualizó mediante un gel de agarosa 1% desnaturalizante para determinar su integridad.

6.5.2 Determinación de la abundancia de *TALIR* y genes codificantes

Para este análisis se realizó la síntesis de cDNA siguiendo las instrucciones del fabricante de la transcriptasa reversa (Thermo Fischer Scientific). Brevemente, 1 μ g de RNA total se trató con 1 μ L de DNAsa I y 1 μ L de Buffer 10X de DNAsa I en un volumen final de 10 μ L y se incubó por 30 min a 37 °C. La DNAsa I se inactivó con 1 μ L de EDTA 25 mM y se incubó a 65 °C por 10 min. Seguidamente se añadió oligo dT y la mezcla se incubó por 5 min a 65 °C, posteriormente se añadieron dNTPs, transcriptasa reversa y el buffer de la enzima para tener un volumen total de 20 μ L. La reacción se incubó por 70 min a 42 °C, seguido de 10 min a 65 °C para desactivar la

enzima. El cDNA obtenido fue diluido 1:2 en agua destilada estéril. Para cada reacción se empleó 1 μL excepto para el control negativo. Las reacciones se realizaron empleando 5 μL del reactivo Power SYBR Green PCR Master Mix for CFX (AppliedBiosystems, Thermo Fischer Scientific), 0.5 μL de cada oligonucleótido (forward y reverse) y 3 μL de agua para completar un volumen de 10 μL . La cuantificación relativa de *TALIR* y los genes codificantes fue realizada empleando el equipo Real-time PCR detection System (Bio-Rad, CA, USA). El nivel de abundancia fue calculado en relación con la expresión del gen *ACT2* como normalizador, utilizando el comparativo del número de ciclo cuantificado (quantification cycle, Cq), método de $\Delta\Delta\text{Cq}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Los oligonucleótidos que se usaron para este análisis están enlistados en la tabla 1. Se realizaron tres réplicas técnicas por cada muestra y dos réplicas biológicas independientes.

6.5.3 Determinación de la abundancia de los MIR396 y MIR156 y de sus genes blancos

En este análisis se empleó el RNA total extraído de la quinta hoja de las plantas WT y las mutantes de *TALIR*. La síntesis de cDNA se realizó usando los reactivos de Clontech Kit (Takara Bio). Este método se basa en la poliadenilación del RNA y la retrotranscripción del mismo llevado a cabo en una misma mezcla de reacción. Se añadieron 2.5 μL del buffer MRQ 2X, 0.625 μL de la enzima mRQ y entre 0.5 – 1.0 μg de RNA total, ajustando un volumen final de 5 μL . La mezcla se incubó 1 h a 37 °C seguido de 5 min a 85 °C para desactivar la enzima. A la mezcla final se le añadieron 45 μL de agua para tener un volumen de 50 μL . Para cada reacción de RT-qPCR se empleó 1 μL excepto para el control negativo. Las reacciones de cuantificación se prepararon con 5 μL del reactivo SYBR Green, 0.5 μL del oligonucleótido específico para cada microRNA y el oligonucleótido mRQ3' y 3 μL de agua para completar un volumen de 10 μL . Para el análisis de los genes *GRF2* y *SPL9* se empleó el mismo cDNA y las mismas condiciones descritas para los microRNAs, empleando oligonucleótidos específicos. La cuantificación relativa fue realizada empleando el equipo Real-time PCR detection System (Bio-Rad, CA, USA). La acumulación relativa

se determinó empleando el método comparativo $\Delta\Delta Cq$, usando como genes normalizadores *U6 snRNA* o *ACT2*. Los oligonucleótidos utilizados en este análisis se indican en la tabla 1. Se realizaron tres réplicas técnicas por cada muestra y dos replicas biológicas independientes.

Table 1. Secuencias de oligonucleótidos usados en este estudio.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos (5' a 3')
<i>ACT2</i>	Fw: AAGGCCAACAGAGAGAAGATGACTCA Rv: AGAAACCCTCGTAGATTGGCACAG
<i>TUB</i>	Fw: CCGCCTCGTCTCTCAGGTTATTTCTTC Rv: GAAGGCTTTCTCTGCGGAGATGACTG
<i>GEA6</i>	Fw: GATGAGAGGGCAAAGAAGGG Rv: GGCTTGTCTCCGGTGCTAAG
<i>TALIR</i>	Fw: TGATTATTCTCTTGGTCTCCG Rv: CATGAAGGTGCCAACTAAAAC
<i>E3 RINGU</i>	Fw: CTTCAATTTTCAAAACTCAAATCC Rv: AGTTTGAGAACACATATGACACC
<i>TBP2</i>	Fw: ATGAGAGAAGAGACTTATACCGC Rv: ACCAAGCGCCTGCCAACACC
<i>TBP1</i>	Fw: ATGAGAGATGAGACCTACAAAGC Rv: AGGTGAGAGTCTAGCTACTGTG
<i>MIR396b</i>	Fw: TTCCACAGCTTTCTTGA ACTT
<i>MIR156b</i>	Fw: TGACAGAAGAGAGTGAGCAC
<i>GRF2</i>	Fw: CACATCAACAGAGGCCGTCATCG Rv: TGACTTCCAATGGCGAGGCTGCG
<i>SPL9</i>	Fw: CAAGGTTCA GTTGGTGGAGGA Rv: TGAAGAAGCTCGCCATGTATTG
<i>RNAi</i>	Fw: AGATTAGTCATAATCCAAAAGAAG Rv: TATTATAAATTGATGAGTGAT

6.6 Histoquímica de GUS

Para evaluar el patrón de expresión de *pMIR396* en el fondo mutante de *TALIR*, se sembraron veinte semillas de plantas homocigotas *pMIR396:GUS* –en medio MS 0.5X y cultivadas *in vitro* durante dos semanas. El protocolo de tinción de *GUS* fue llevado a cabo siguiendo el protocolo descrito por Jefferson et al. (1987), con modificaciones menores. Las plántulas de dos semanas se incubaron en el buffer X-Gluc (Amortiguador de fosfatos pH 7 100 mM, EDTA 10 mM, $K_4[Fe(CN)_6]$ 0.5 mM, $K_3[Fe(CN)_6]$ 0.5 mM, Triton X-100 0.5 mM, X-Gluc en DMSO 2 mM) durante 12 h a 37°C. Posteriormente, la solución fue retirada y las plántulas se lavaron cuatro veces con una solución de etanol – glicerol 9:1 por 15 min. Los tejidos se mantuvieron en esta solución durante 3 días reemplazándola cada 24 h. La quinta y sexta hoja fueron observadas y fotografiadas usando un microscopio Leica DM500.

6.7 Ensayos de estrés hídrico

Las semillas de plantas WT y de las mutantes fueron esterilizadas y sembradas en medio MS 0.5 X en condiciones control o suplementado con concentraciones crecientes de ácido abscísico (ABA 1 μ M, 3 μ M y 5 μ M). Posterior a la vernalización, las semillas fueron expuestas a luz (16 h / 8 h) y monitoreadas cada 24 h durante 5 días. Se consideró como semilla germinada a todas aquellas en las que se observó mediante un estereoscopio Zeiss Stemi DV4 (Oberkochen, Germany) que la radícula había atravesado la testa. Para los tratamientos con ABA se realizaron dos réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas. Para medir la acumulación de *TALIR* en plantas WT, estas fueron crecidas en condiciones control durante dos semanas y posteriormente tratadas con 5 μ M ABA o 175 mM de NaCl durante 24 h. Este procedimiento se repitió para las mutantes de *TALIR* tratadas con 5 μ M de ABA. Las plántulas completas fueron colectadas y congeladas en nitrógeno líquido y empleadas para la extracción de RNA total.

6.8 Ensayo de expresión transitoria de *TALIR*

Para determinar la localización subcelular de *TALIR* se llevó a cabo un ensayo de expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*, siguiendo el protocolo desarrollado por Kinoshita y colaboradores (2018). Se generaron dos construcciones de la siguiente manera: a) una que contiene *TALIR* bajo el promotor 35S fusionado a seis repetidos de un RNA altamente estructurado proveniente del bacteriófago MS2, que sirve como sitio de unión para proteínas de unión a RNA y además expresa la proteína mCherry (35S-*TALIR*-6xMS2-mCherry) y b) una segunda construcción que contiene la proteína de la cápside del bacteriófago MS2 (MSCP), que se une al RNA altamente estructurado, fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) y etiquetado con un señal de localización nuclear, bajo el promotor 35S (35S-MSCP-GFP-NLS). Ambos plásmidos se transformaron de manera independiente a células de *R. radiobacter* C58 y cultivadas a 28 °C durante dos días. Las cepas que portaban los constructos, previamente validadas mediante PCR, fueron mezcladas y co-infiltradas en la epidermis de hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana* de cuatro semanas de edad. Previamente las plantas fueron mantenidas durante 24 h en oscuridad. Las células fueron visualizadas dos días post infiltración usando un microscopio confocal ZEISS de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. La longitud de onda de excitación y emisión para GFP y mCherry fue de 488–559/30 nm y 561–617/30 nm, respectivamente.

6.9 Análisis estadísticos

Todos los datos se graficaron utilizando RStudio y se analizaron con el software SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc. San Jose, Ca, USA). La Prueba t de Student fue usada para evaluar las diferencias entre plantas control y las experimentales. El análisis de ANOVA de una vía se utilizó para comparar el nivel de abundancia de la WT a 21 dds contra las WT y las mutantes a 21, 24 y 27 dds.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 El desarrollo de *Arabidopsis thaliana* es modulado por *TALIR*

Comprender las bases moleculares que subyacen al desarrollo de las plantas es crucial para entender cómo las plantas sobreviven y se adaptan a un medio ambiente en constante cambio. En este contexto, los lncRNAs desempeñan un papel crítico en la regulación de procesos fisiológicos que abarcan desde la germinación, el crecimiento y la fotomorfogénesis, hasta la adaptación a distintos tipos de estreses. Por ello, en este estudio se ha caracterizado un lincRNA previamente no descrito. Este gen fue identificado en una base de datos de lncRNAs de plantas desarrollada por Jin y colaboradores (2013) y actualizada siete años más tarde (2020). Este gen se localiza en el cromosoma uno de *A. thaliana*, entre los genes *TATA-box binding protein 2* (*TBP2*, At1g55520) y *E3 RINGU* (At1g55530), gen que codifica una proteína ubiquitina ligasa tipo E3. Debido a su posición genómica, se nombró como *TBP2-associated long intergenic non-coding RNA* (*TALIR*, At1g55525) que codifica para un transcrito de 417 nt.

Para la caracterización de *TALIR* de *A. thaliana* se realizó un análisis fenotípico utilizando tres líneas mutantes diferentes de *talir*, generadas mediante: (i) la inserción de un T-DNA, (ii) RNA de interferencia (RNAi) y (iii) expresión constitutiva de un microRNA artificial (amiR) (Figura 14a). Mediante un análisis de RT-qPCR se evaluó la alteración de la abundancia del transcrito de *TALIR*, confirmando la disminución de su acumulación en las líneas utilizadas (Figura 14b).

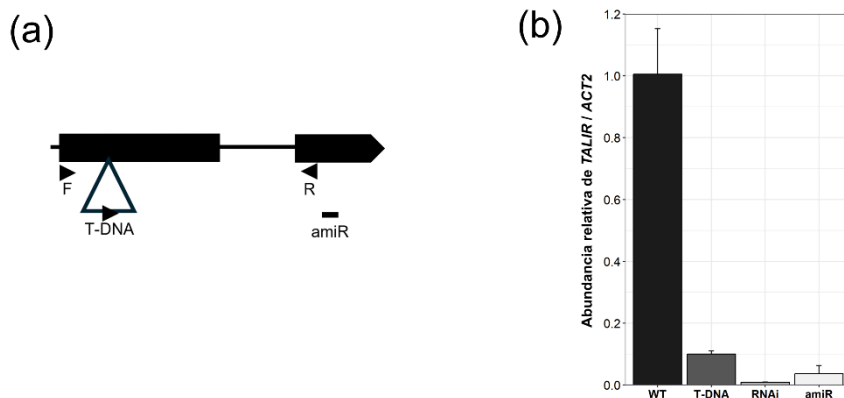


Figura 14. Análisis de la acumulación de *TALIR* en las líneas mutantes. (a) Representación esquemática del locus de *TALIR*, indicando el sitio de inserción de T-DNA y las regiones en las que se diseñaron las mutantes de RNAi (F y R) y amiR. (b) Análisis de RT-qPCR de la abundancia del transcrito de *TALIR* en plántulas WT y de líneas mutantes de dos semanas. El gen *ACT2* fue usado como normalizador. Las barras de error representan la media \pm desviación estándar (SD); n = 3.

Una vez definido el contexto genético de las líneas mutantes, se analizó el crecimiento del tejido aéreo de *A. thaliana* durante tres etapas del desarrollo de la planta, a los 21, 24 y 27 dds. Las observaciones detalladas de las plantas mutantes de T-DNA, RNAi y amiR a los 21 dds presentaron rosetas más pequeñas comparadas con la WT (Figura 15a). Estas observaciones fueron consistentes con los datos cuantitativos del área total de la roseta en las plantas mutantes de *talir* y en las plantas WT (Figura 15c,). Además, se observó que las mutantes de RNAi y amiR mostraron un menor número de hojas de roseta así como una reducción en el tamaño de las hojas en comparación con la WT. En contraste, las mutantes de T-DNA exhibieron un número de hojas similar al de WT, pero con hojas de tamaño menor (Figura 15b, d). Dado que la forma y tamaño de las hojas de *A. thaliana* constituyen rasgos característicos asociados a la transición del brote entre distintas etapas del desarrollo, por consiguiente se analizaron cambios en la morfología de la quinta hoja de las mutantes de *talir*, en concordancia con la literatura previa (Poethig 2013; Manuela and Xu, 2020). Las hojas de las mutantes *talir*, exhibieron una disminución en la elongación y carecieron de las aserraciones típicas de una hoja adulta observadas en las plantas WT (Figura 15b).

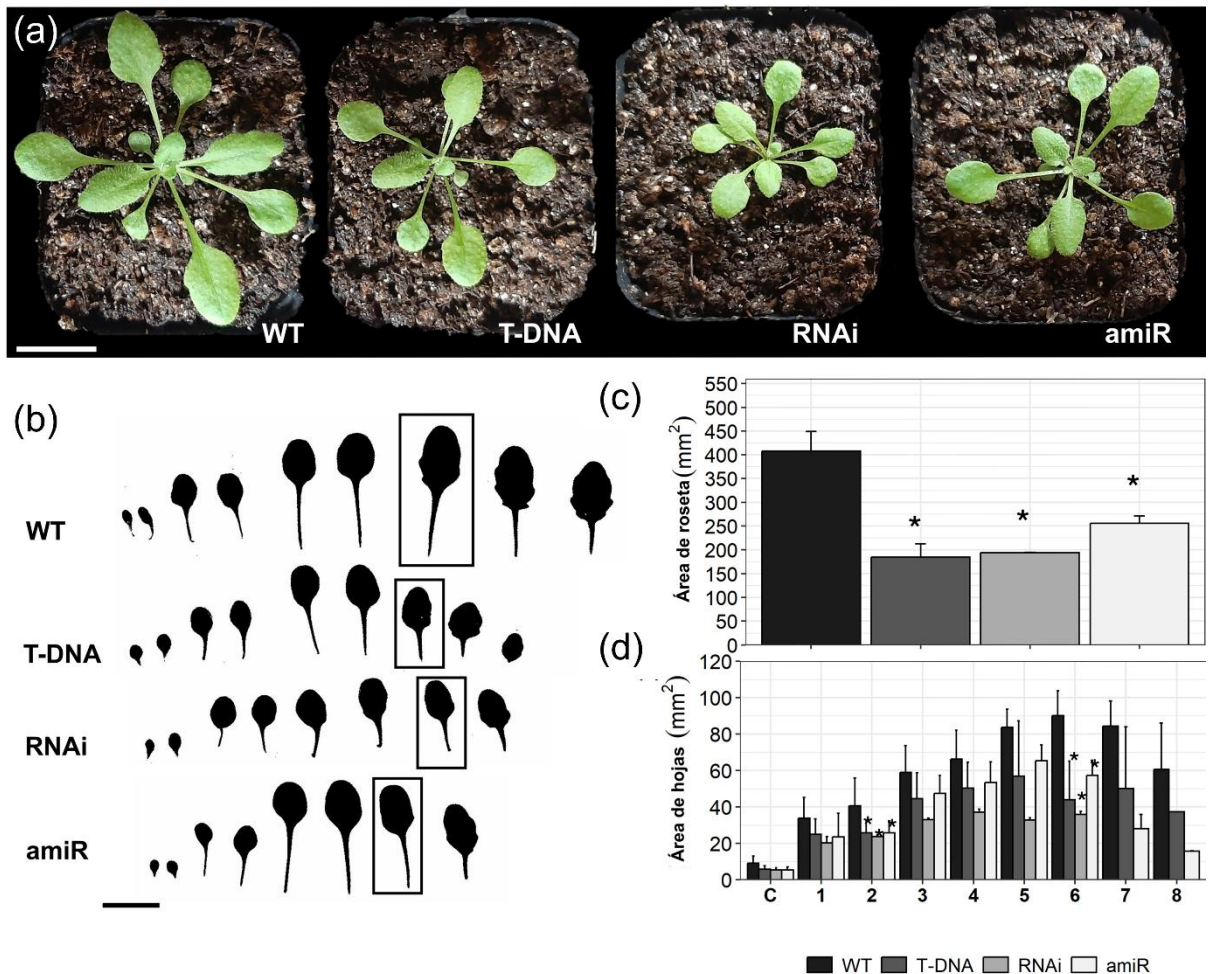


Figura 15. *TALIR* es requerido durante el desarrollo de las hojas de *Arabidopsis thaliana*. (a) Fenotipo de plantas WT y las mutantes de *talir* de 21 dds. Barra de escala = 2 cm. (b) Etapas secuenciales del desarrollo foliar, incluyendo cotiledones. La quinta hoja se encuentra señalada con un recuadro. Barra de escala = 1 cm. (c) Cuantificación del área total de la roseta y de hojas individuales (d) de las plantas WT y las mutantes de *talir*. Las barras de error representan la media \pm SD; n = 4. Los asteriscos (*) indican la significancia estadística ($P \leq 0.05$; t-test). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Además, a los 24 dds, persistió la disminución en el tamaño de la roseta en las mutantes de *talir*, así como el menor número de hojas comparado con la WT en la misma etapa de desarrollo (Figura 16a, b). Esta observación fue consistente con los datos cuantitativos del área total de la roseta de las líneas mutantes comparada con las plantas WT (Figura 16c, d). A los 27 dds, se mantuvo la disminución en el tamaño de la roseta siendo consistente con los datos cuantitativos (Figura 17). Sin embargo, en esta etapa el número de hojas de la roseta en las líneas T-DNA y amiR fue

comparable al de WT (Figura 17b), con excepción de la línea RNAi, en la que el fenotipo mostró mayor penetrancia a lo largo de las etapas evaluadas. En conjunto, estos resultados sugieren que *TALIR* participa en la modulación del crecimiento foliar en *Arabidopsis thaliana*.

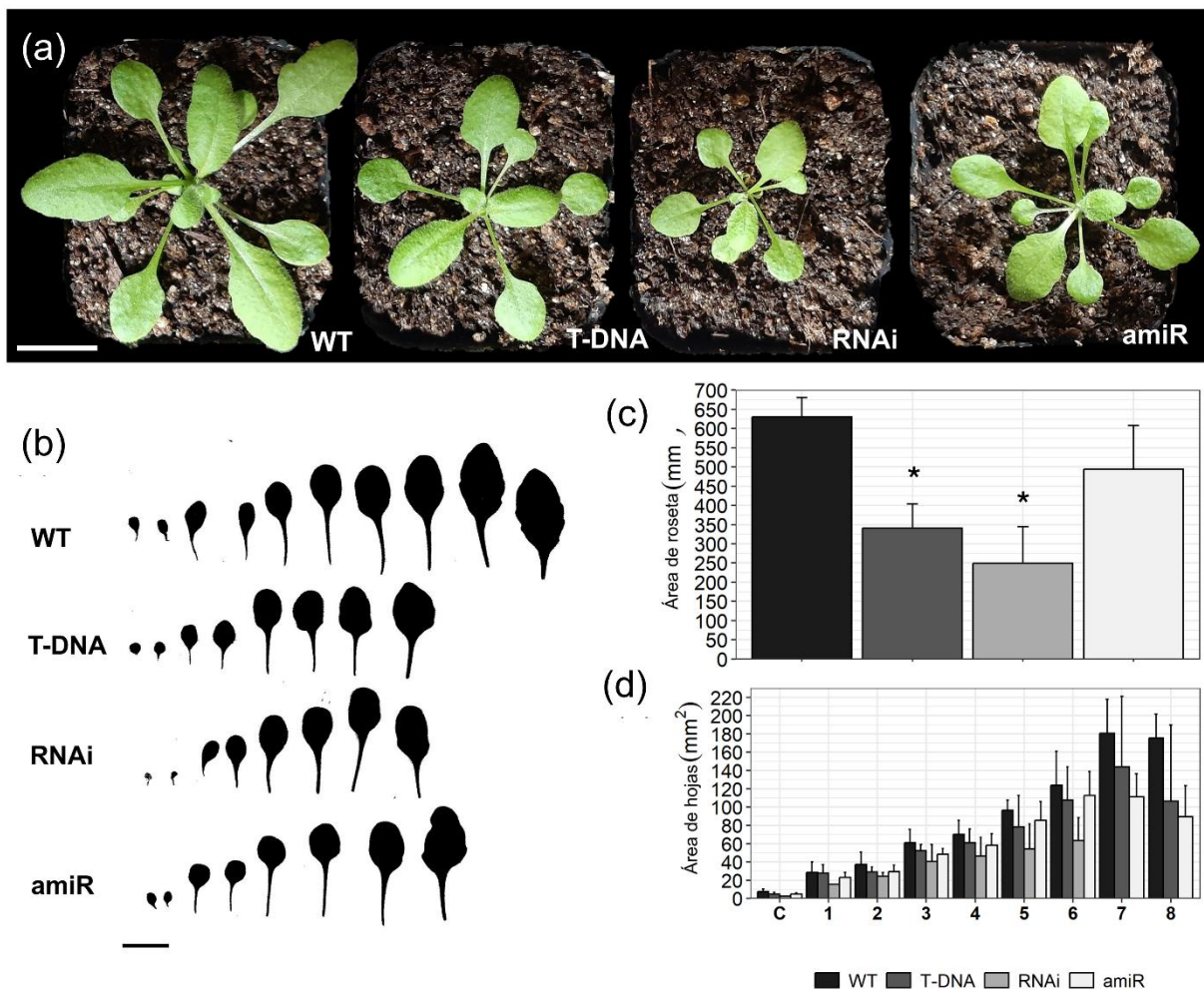
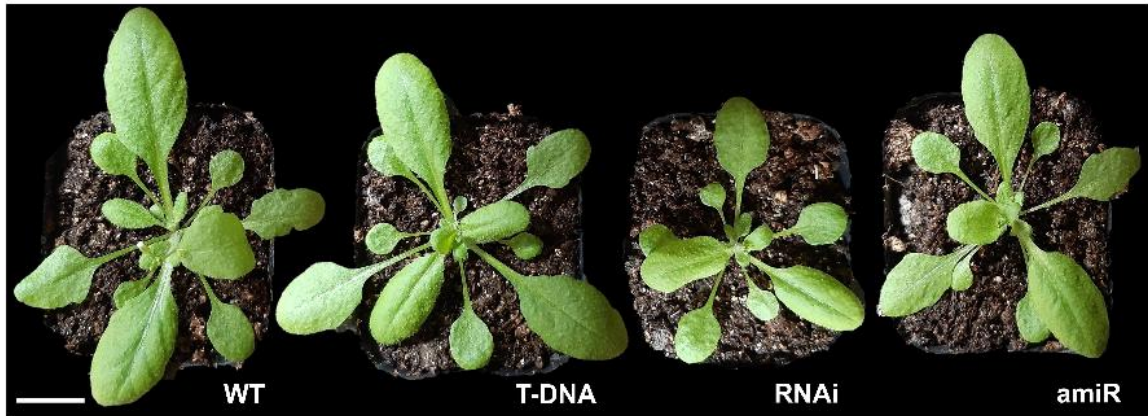
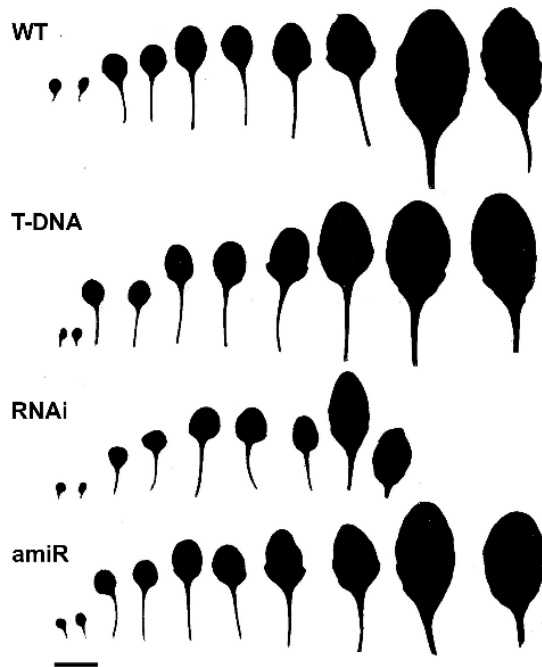


Figura 16. *TALIR* es requerido durante el desarrollo de las hojas de *Arabidopsis thaliana*. (a) Fenotipo de plantas WT y mutantes de *talir* de 24 dds. Barra de escala = 2 cm. (b) Etapas secuenciales del desarrollo foliar, incluyendo cotiledones. Barra de escala = 1 cm. (c) Cuantificación del área total de la roseta y de hojas individuales (d) de las plantas WT y las mutantes de *talir*. Las barras de error representan la media \pm SD; n = 4. Los asteriscos (*) indican la significancia estadística ($P \leq 0.05$; t-test). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

(a)



(b)



(c)

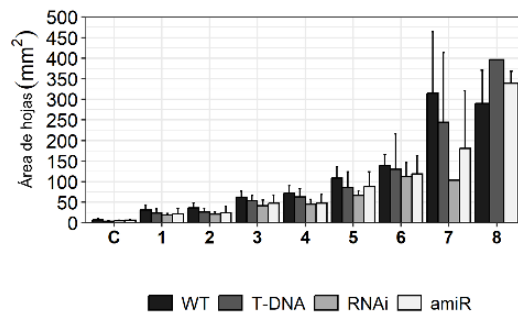
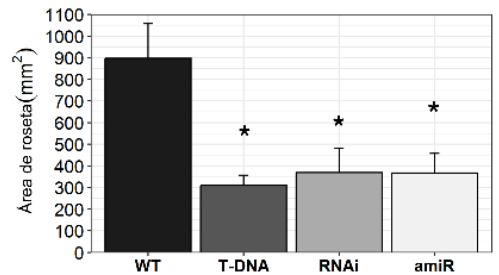


Figura 17. *TALIR* es requerido durante el desarrollo de las hojas de *Arabidopsis thaliana*. (a) Fenotipo de las plantas WT y mutantes de *talir* a los 27 dds. Barra de escala = 2 cm. (b) Etapas secuenciales del desarrollo foliar, incluyendo cotiledones. Barra de escala = 1 cm. (c) Cuantificación del área total de la roseta y de hojas individuales (d) de las plantas WT y las mutantes de *talir*. Las barras de error representan la media \pm SD; n = 4. Los asteriscos (*) indican la significancia estadística ($P \leq 0.05$; t-test). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Para determinar si *TALIR* está involucrado en el desarrollo radicular, se evaluó el crecimiento de la raíz primaria de las plantas durante siete días después de la germinación. Este análisis no mostró diferencias en la longitud de la raíz primaria entre las plantas mutantes con la WT (Figura 18 y 19a). Para profundizar en la caracterización del sistema radicular, se examinó el desarrollo de las raíces laterales. Las plantas WT y las mutantes de *talir* a los 7ddg fueron aclaradas para su observación microscópica. Se encontró que las mutantes presentaron un menor número de raíces laterales (Figura 19b), así como una menor densidad de raíces laterales (Figura 19c) comparadas con las plantas WT. Asimismo, se determinó el número de eventos en el que las RL permanecieron como primordios de raíz lateral (PRL), y se sumaron al número de la RL en la zona de ramificación, definida como la distancia entre el hipocótilo y la última RL emergida. La cuantificación de ambos procesos reveló que las mutantes exhibieron un menor número de eventos acumulativos de (PRL + RL) comparado con las plantas WT (Figura 19d), sugiriendo que *TALIR* participa en la formación de RL, particularmente en etapa previas o durante la iniciación y/o desarrollo de primordios, más que en procesos asociados exclusivamente a la emergencia.

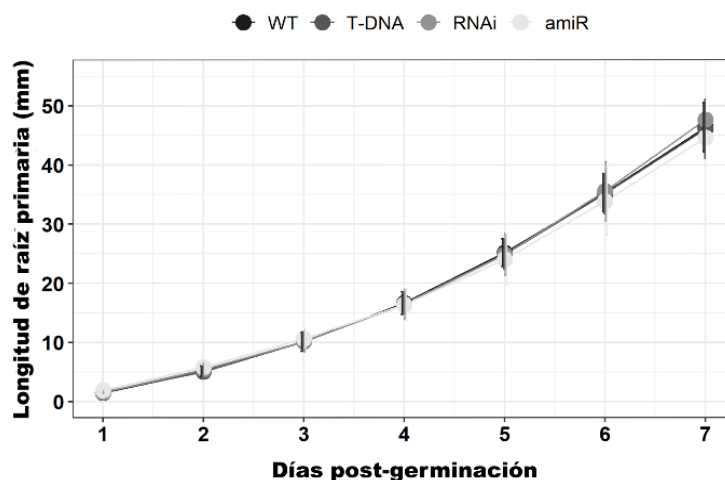


Figura 18. Caracterización del crecimiento de la raíz primaria en las mutantes de *talir*. Cambios temporales en la elongación de la raíz primaria respecto al tiempo. Todos los experimentos se realizaron por duplicado con n = 24 – 32 plantas por genotipo.

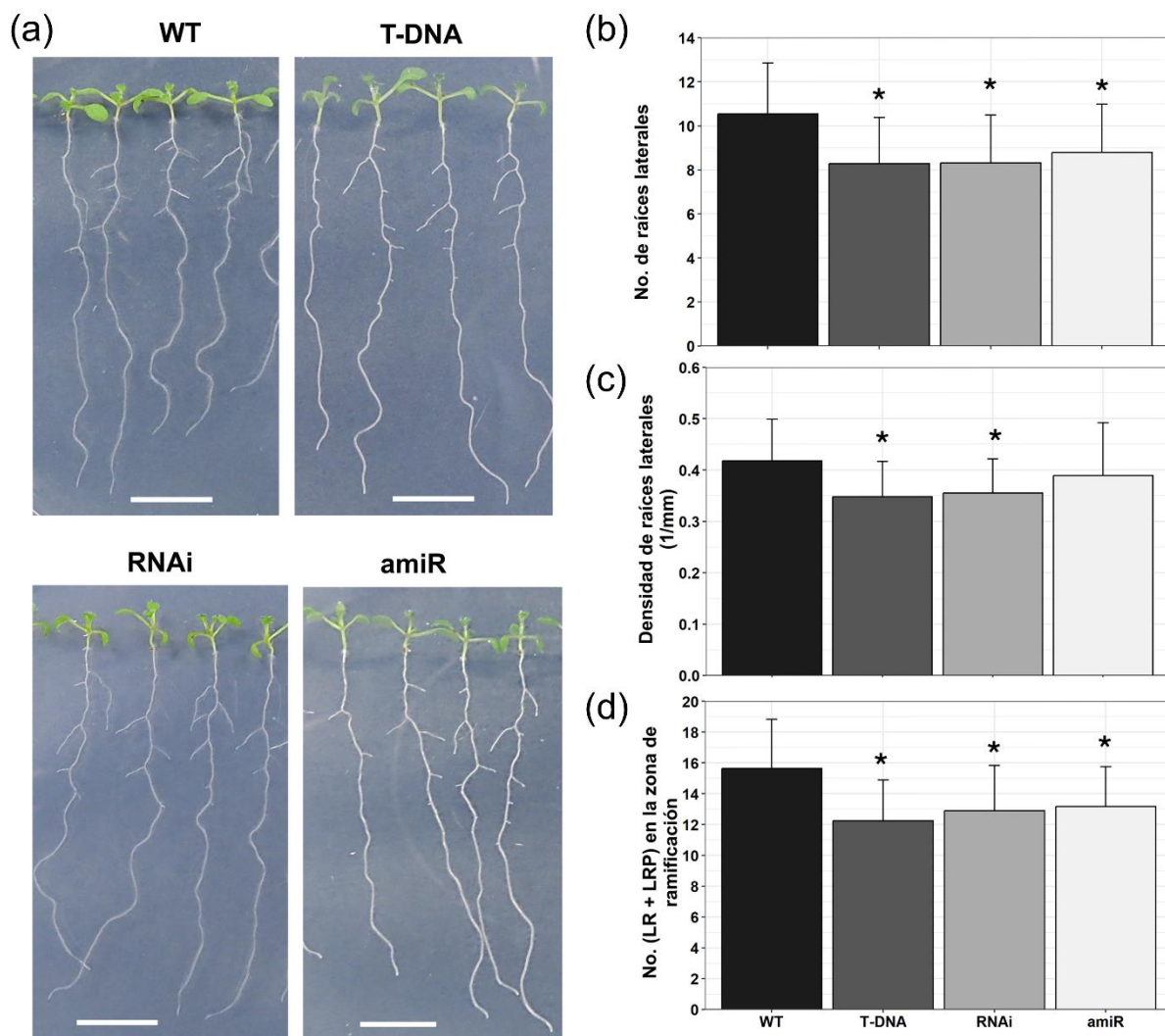


Figura 19. *TALIR* participa en el desarrollo radicular de *Arabidopsis thaliana*. (a) Comparación fenotípica de las raíces entre las plantas WT y las mutantes de *talir* a los 7 dpg. Barra de escala = 1 cm. (b) Número total de raíces laterales en plantas WT y las mutantes de *talir* a los 7 ddg, en la zona de ramificación. (c) Densidad de raíces laterales en plantas WT y las mutantes de *talir* a los 7 ddg. (d) Sumatoria de la densidad de raíces laterales y primordios de raíz lateral encontrados en la zona de ramificación en plantas WT y mutantes de *talir* a los 7 ddg. Las barras de error representan la media \pm SD; n = 24 - 32. Los asteriscos (*) indican la significancia estadística ($P \leq 0.05$; t-test). Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

Estudios previos han identificado algunos lncRNAs involucrados en el desarrollo de las plantas, tales como *TL*, *bra-miR156aHG*, *NAT1_{UGT73C6}* and *NAT2_{UGT73C6}*, descritos en arroz (*Oryza sativa*), *Brassica campestris* y *A. thaliana*, respectivamente. Estos lncRNAs regulan el crecimiento y la morfología foliar, mientras que los lncRNAs *ARES*

y *APOLO* participan en la señalización por auxina modulando la formación de raíces laterales (Ariel et al., 2014; Liu et al., 2018; Zhou et al., 2023; Meena et al., 2023; Roulé et al., 2023). Dado que las líneas mutantes de *talir* exhibieron un menor tamaño de las hojas y una disminución en el tamaño de la roseta, así como una disminución en el número y densidad de RL estos resultados sugieren que *TALIR* modula ambos procesos, potencialmente mediante vías de señalización hormonal.

7.2 *TALIR* modula temporalmente la transcripción de sus *loci* vecinos

Para comprender como *TALIR* influye en el desarrollo, el análisis se enfocó en estudiar las bases moleculares asociadas con el control del tamaño y la forma de las hojas. Existen diversos reguladores moleculares bien descritos que participan en este proceso; a nivel proteico, como *ANGUSTIFOLIA3 (AN3)*, *SPATULA (SPT)*, *CUP SHAPED COTYLEDON2 (CUC2)*, y *PIN FORMED1 (PIN1)* (Horiguchi et al, 2005; Nikovics et al., 2006; Ichihashi et al., 2010; Bilsborough et al., 2011). A nivel postranscripcional, los miRNAs se han descrito como reguladores clave de la formación de las hojas participando en las diferentes etapas de su desarrollo (Pulido & Laufs, 2010).

Un mecanismo por el cual los lncRNAs ejercen su actividad reguladora es mediante la modulación de la transcripción de sus genes vecinos (Ariel et al., 2014; Roulé et al., 2022). Por lo que se investigó si la transcripción de *TALIR* esta correlacionada con la transcripción de sus *loci* cercanos (Figura 20a). Para este propósito se midió la abundancia relativa de los mRNAs de *TBP2*, *E3 RINGU*, y *TBP1 (At3g13445)* en la quinta hoja de las plantas WT y de las mutantes de *talir*, a los 21 y 24 dds. Debido a los cambios observados en el tamaño y las aserraciones durante la transición de la etapa juvenil a la adulta (Figura 15b) se seleccionó la quinta hoja de plantas mutantes *talir* silenciadas a nivel transcripcional (T-DNA) y postranscripcional (amiR) para este y los análisis subsecuentes. Los resultados mostraron que, a los 21 dds ambas líneas mutantes de *talir* presentaron una disminución de la acumulación del transcrito de *E3*

RINGU y una disminución en la abundancia del transcrito de *TBP2* en la línea de T-DNA pero no en la línea amiR. En contraste *TBP1*, un gen homólogo de *TBP2*, no mostró cambios en la acumulación de su transcrito, en ninguna de las líneas evaluadas (Figura 20b). A los 24 dds, se observó una disminución en la acumulación de *E3 RINGU* en la línea amiR, pero no en la T-DNA. Además, fue notorio un aumento en la acumulación de los transcritos de *TBP2* y *TBP1* en ambos genotipos evaluados (Figura 20c). En conjunto, estos resultados sugieren que *TALIR* afecta de manera temporal la transcripción de *TBP2* durante el desarrollo foliar. Asimismo, es posible que los niveles alterados de *TBP2* influyan positivamente sobre la acumulación de *TBP1*, sugiriendo que la actividad de *TALIR* sobre *TBP1* es indirecta.

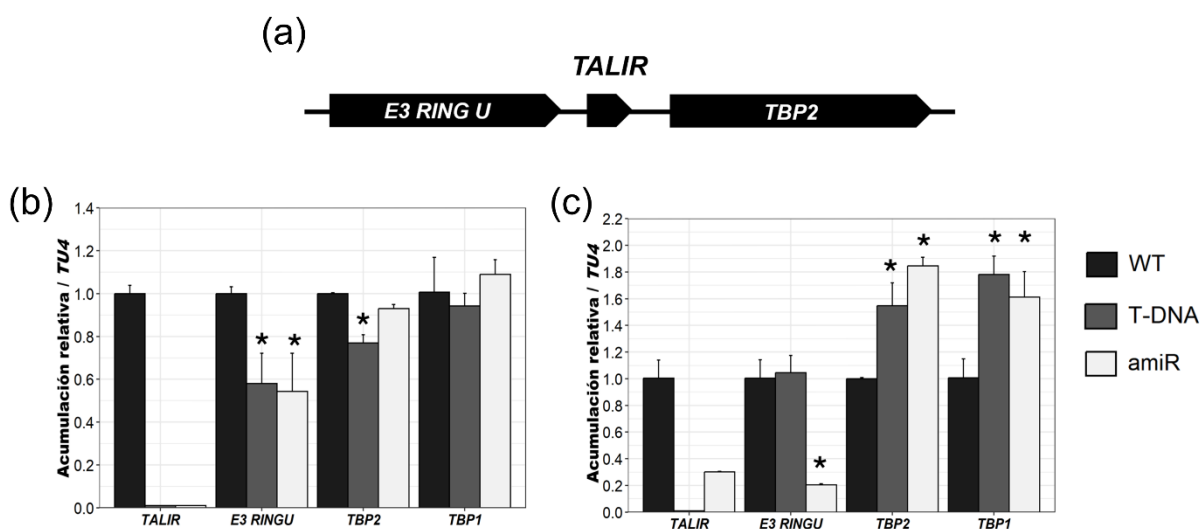


Figura 20. Desregulación la abundancia de genes aledaños a *TALIR* durante el desarrollo foliar de *Arabidopsis thaliana*. (a) Representación esquemática del locus de *TALIR* indicando los genes adyacentes. Análisis RT-qPCR de *TALIR*, *E3 RINGU*, *TBP2* y *TBP1* en la quinta de hoja de plantas WT y plantas mutantes (T-DNA y amiR) a los (b) 21 dds y los (c) 24 dds. La abundancia relativa fue normalizada contra el gen de referencia TUB. Las barras de error representan la media \pm SD; n = 3. Los asteriscos (*) indican la significancia estadística ($P \leq 0.05$; t-test). Figura representativa de dos experimentos realizados de manera independiente.

Estos resultados sugieren que los cambios observados en el tamaño y la forma de las hojas en las mutantes *talir* son parcialmente debidos a la modulación transitoria de *TALIR* sobre sus genes vecinos y al efecto que estos puedan tener sobre otros blancos.

TBP2 es una subunidad del factor de transcripción general IID (TFIID), que junto con otros factores de transcripción generales ensamblan el complejo de pre-iniciación requerido para la transcripción basal (Heard et al., 1993). Un estudio realizado en 2001 por Li y colaboradores reportó que plantas de *A. thaliana* heterocigotas que expresan constitutivamente *TBP2* exhiben un aumento en el número de hojas de roseta y una disminución en el área de las hojas, así como otros defectos en el desarrollo. Mientras que las plantas homocigotas sobreexpresoras de *TBP2* mostraron un fenotipo más severo con hojas de roseta más pequeñas y un aumento en el número de los brotes apicales. Los hallazgos encontrados en este estudio mostraron una correlación parcial con lo previamente publicado respecto al tamaño foliar. Sin embargo, se encontró una reducida acumulación de *TBP2* a los 21dds y un aumento en la abundancia de los transcritos de este gen a los 24 dds en las mutantes de *talir*, lo que sugiere que *TALIR* modula la acumulación de *TBP2* de manera dinámica, pudiendo ejercer tanto efectos positivos como negativos dependiendo del tiempo de desarrollo.

7.3 Las mutantes de *TALIR* exhiben una alteración en la acumulación de los miR396b y miR156

La proteína TBP2 se une a un motivo consenso llamado TATA-box, y se sabe que algunos genes *MIRNA* contienen este motivo en su promotor. Además, se ha descrito que TBP2 interactúa con TGH, una proteína conservada evolutivamente que participa en la biogénesis de los miRNA mediante su asociación con el complejo DCL1 (Xie et al., 2005; Calderón-Villalobos et al., 2005). Con base en este contexto, se evaluó si las mutaciones en *TALIR* se asocian con alteraciones en la acumulación de miRNAs claves en el desarrollo foliar. El miR396 se ha descrito como un modulador clave del tamaño de las hojas mediante el control postranscripcional que ejerce sobre la familia de genes *GROWTH REGULATING FACTOR (GRF)*, involucrados en el control de la proliferación celular (Rodríguez et al., 2010). Mientras que el miR156 está involucrado en la regulación de la transición de la etapa juvenil a la adulta del brote de *A. thaliana*

mediante la regulación de la familia de genes *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (*SPL*) (Wu et al., 2009).

Se evaluó la expresión relativa de estos miRNAs y de sus genes blancos en la quinta hoja de las líneas T-DNA y amiR a los 21 y 24 dds. Como primer acercamiento, se evaluó la actividad del promotor *MIR396b* mediante un ensayo de gen reportero en el que el promotor del *MIR396b* fue fusionado al gen *GUS* y transformado en el fondo genético WT o en *talir*. Se seleccionaron tres líneas transgénicas homocigotas independientes que portaban la construcción *pMIR396b:GUS-amiRTALIR* (Figura 21a). De manera consistente con las observaciones realizadas a los 21 dds, se observó que la quinta hoja de la mutantes *talir* fue más pequeña que la hoja de la WT en las plantas de dos semanas, y que el patrón de expresión asociado al promotor *MIR396b* se observó disminuido en comparación con la línea parental. Estas mismas observaciones se validaron en la sexta hoja, en la que la disminución de la expresión y el tamaño foliar fueron persistentes (Figura 21b).

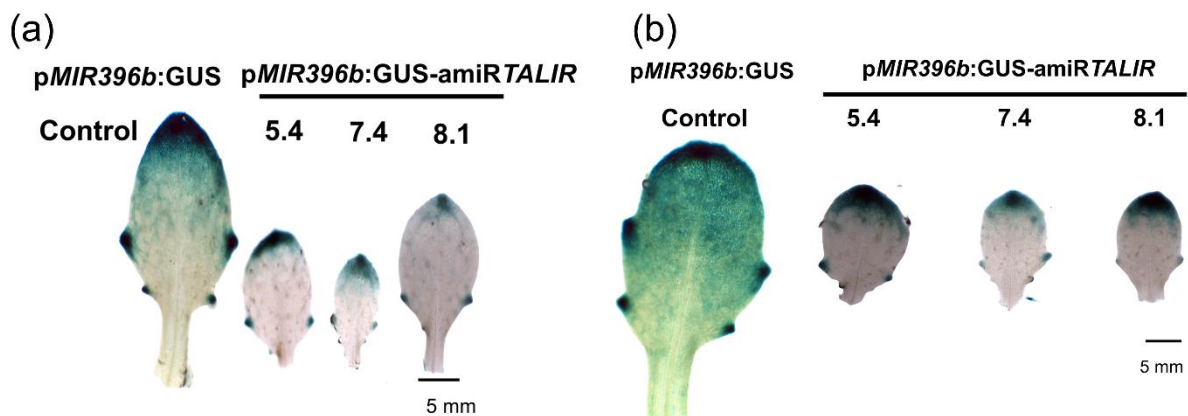


Figura 21. Tinción histoquímica de GUS del promotor de *MIR396b* en plantas WT y en el fondo genético *talir*. (a) Quinta hoja y (b) sexta hoja de plántulas de dos semanas crecidas en condiciones in vitro en condiciones control. Figura representativa de dos experimentos realizados de forma independiente.

El análisis de la acumulación relativa del miR396b en la quinta hoja de las plantas WT mostró que la acumulación del miR396b alcanza un punto máximo a los 21 dds y disminuye a los 27 dds. Este patrón de expresión del miR396b es consistente con lo reportado por Rodríguez y colaboradores (2010) (Figura 22a). En contraste, la línea T-DNA a los 21 y 24 dds mostró una disminución de los niveles de miR396b, mientras que a los 27 dds se detectó una mayor acumulación comparado con las plantas WT. En la línea amiR, se observó una disminución de la acumulación del miR396b a lo largo de las etapas evaluadas (Figura 22a). Para evaluar el efecto sobre uno de sus genes blanco, se midió la abundancia de *GRF2* mediante RT-qPCR (Figura 22b). Se observó que al aumentar la abundancia del miR396b, disminuye la acumulación de *GRF2*, tanto en la línea amiR y la T-DNA, dicho comportamiento es típico de los genes que son regulados por miRNAs. A los 21 dds, hubo una mayor acumulación de *GRF2* en la línea amiR, mientras que en la línea T-DNA el incremento fue notable a los 27 dds (Figura 22b). Estos resultados mostraron una evidente desregulación temporal del módulo miR396b-*GRF2*, lo que sugiere que la contribución de *TALIR* al desarrollo de la hoja podría depender del tiempo.

Las observaciones realizadas en plantas WT en este estudio son consistentes a lo previamente publicado por Rodríguez y colaboradores (2010) tanto en el ensayo de gene reportero con *GUS* como en el análisis por RT-qPCR. No obstante, las mutantes de *talir* exhibieron una desregulación transitoria de la abundancia del miR396b que condujo a un aumento temporal en la acumulación de *GRF2*. Por otro lado, a diferencia de las plantas que expresan constitutivamente *GRF2* y exhiben hojas más grandes que la WT, nuestros datos no mostraron un aumento en el área hoja, contrastando con la evidencia publicada (Rodríguez et al., 2010). Esto apunta a que el tamaño de la hoja puede ser regulado de forma negativa independientemente de la función de *GRF2* o de los GRFs (*GRF1-4* y *GRF7-8*) regulados por el miR396, ya que las mutantes sencillas de los genes *GRF* no muestran plantas con fenotipo lo que indica que estos GRFs actúan redundantemente (Lazzara et al., 2024). Sin embargo, se ha observado que las plantas mutantes de *GRF5*, que no es regulado por el miR396, produce hojas

con menor área, lo que coincide con las observaciones realizadas (Horiguchi et al., 2005), sugiriendo que *TALIR* actúa río debajo de *GRF2* o que participa en la regulación de *GRF5* o en la modulación de una vía alterna que regula genes involucrados en el crecimiento celular.

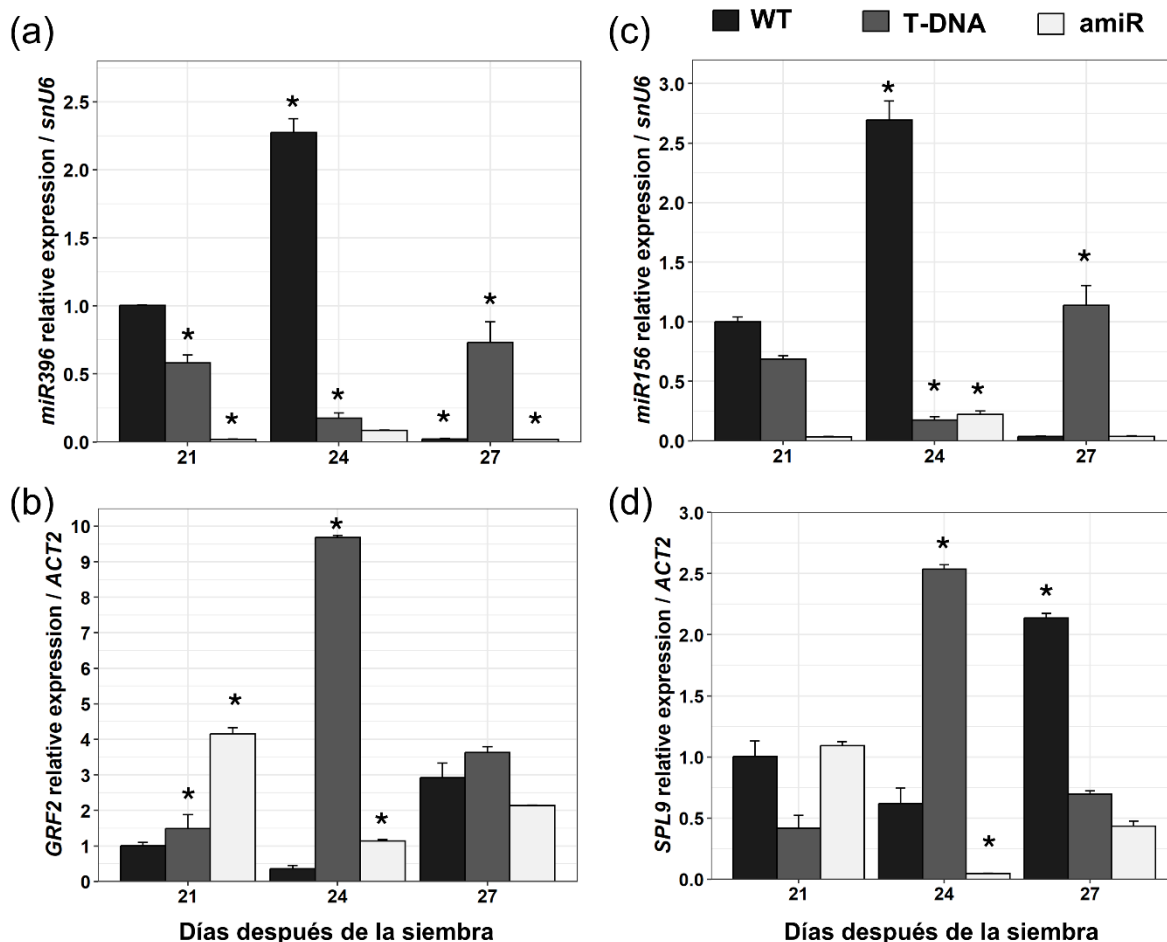


Figura 22. Desregulación del miR396b y miR156 durante el desarrollo de las hojas de *Arabidopsis thaliana*. (a) Análisis RT-qPCR del miR396b y (b) el gen blanco *GRF2* en la quinta hoja de plantas WT y plantas mutantes (T-DNA y amiR) a los 21, 24 y 27 dds. (c) Análisis RT-qPCR del miR156 y (d) el gen blanco *SPL9* en la quinta hoja de plantas WT y plantas mutantes (T-DNA y amiR) a los 21, 24 y 27 dds. Las barras de error representan la media \pm SD; n = 3. Los asteriscos (*) indican la significancia estadística ($P \leq 0.05$; determinada por ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett). Figura representativa de dos experimentos realizados de manera independiente.

El análisis de la acumulación del miR156 en la quinta hoja de las plantas WT mostró un incremento posterior a los 21 dds hasta alcanzar su máximo nivel de abundancia a

los 24 dds, seguido de una disminución a los 27 dds (Figura 22c). Por otro lado, en las líneas T-DNA y amiR la acumulación del miR156 se mantuvo por debajo de la WT a los 21 y 24 dds. Sin embargo, a los 27 dds, la línea T-DNA mostró una mayor acumulación de miR156, en contraste con la línea amiR, que presentó niveles similares a los de la WT (Figura 22c). Para corroborar la abundancia de uno de sus genes diana, se cuantificó el nivel del transcrito del gen *SPL9* (Figura 22d). En la WT, *SPL9* mostró un patrón de expresión consistente para un gen sujeto a regulación postranscripcional por el miR156, con una máxima acumulación a los 27 dds mientras que las líneas T-DNA y amiR exhibieron una disminución de *SPL9* en esta misma etapa del desarrollo. Este análisis sugiere que la ausencia de los rasgos característicos de las hojas en la fase adulta de las mutantes de *talir* es en parte debida a la ausencia de *SPL9*, aunque otros genes *SPL* como *SPL13* y *SPL15*, también contribuyen a las características de las hojas en la etapa adulta (Wu et al., 2009; Xu et al., 2016).

En 2009, Wu y colaboradores reportaron que las mutantes de *SPL9* exhibieron un fenotipo en el que las hojas eran más redondas y la roseta tenía un mayor número de hojas comparado con la WT, las plantas fueron crecidas en condiciones de 8 h de luz y 16 h de oscuridad (día corto). Sin embargo, los resultados mostrados en este análisis evidencian un fenotipo opuesto a lo previamente publicado, una razón a esta diferencia pueden ser las condiciones de crecimiento, que fueron 16 h de luz y 8 h de oscuridad (día largo). Además, las mutantes de *SPL9* y *SPL15* crecidas en condiciones de día largo muestran en promedio una hoja más que las plantas WT (Schwarz et al., 2008).

En conjunto estos hallazgos sugieren que la regulación de *TBP2* dependiente de *TALIR* se asocia con la desregulación de los *MIRNA* y sus genes diana en las mutantes de *talir*, resultando en un fenotipo alterado del desarrollo de la hoja.

El panorama general mostró que las mutantes de pérdida de función de *TALIR* tienen una regulación diferencial temporal de *TBP2* resultando en un fenotipo pleiotrópico. Sumando a esto, las plantas que carecen de *TGH* exhiben una disminución en la acumulación de miRNAs y defectos severos en el desarrollo (Ren et al., 2012). De

acuerdo con los resultados obtenidos en este análisis, la disminución en la acumulación de los miRNAs correlaciona con la disminución de *TBP2* en las mutantes de *talir* a los 21 dds, no así a los 24 dds, donde la acumulación transitoria de *TBP2* no correlaciona con la sobreexpresión de los miRNAs. Por lo tanto, se sugiere que la regulación de *TBP2* dependiente de *TALIR* influye indirectamente en la expresión de los *MIRNAs*. Los fenotipos observados en las mutantes *talir* pueden ser resultado de un proceso sinérgico, en el que se añada la regulación que *TBP2* pueda ejercer sobre otros genes que participan en la regulación del crecimiento y desarrollo de las hojas, tales como *STM* and *KNAT1* (Li et al., 2001). Asimismo, se observó que en la hoja 5 a los 21 dds *TALIR* regula negativamente a *E3 RINGU*, una proteína con actividad de poliubiquitinación y que además se autopoliubiquitina, lo que sugiere que podría tener un rol biológico en la degradación mediada por proteasoma (Takahashi et al., 2009). No obstante, hipotetizamos que la disminución en el transcrito de *E3 RINGU* también contribuye al desarrollo de la hoja de *Arabidopsis*, ya que se ha visto que otras proteínas de tipo E3 que ligan ubiquitinas como *TEAR1* controlan el desarrollo de la hoja (Zhang et al., 2017). Por lo que sugerimos que la combinación de ambos procesos podrían contribuir para regular el tamaño de la hoja en las mutantes de *TALIR*.

Cabe señalar que los niveles de abundancia de los miRNAs y sus genes diana mostraron variaciones entre las dos líneas *talir* analizadas a los 24 dds. Esta variación es probablemente debida al método empleado para generar la pérdida de función de *TALIR*. En la línea T-DNA, *TALIR* es reprimido a nivel transcripcional, mientras que en la línea amiR, la inactivación de *TALIR* es a nivel postranscripcional. Por lo que es posible que *TALIR* forme una estructura secundaria capaz de mediar la regulación de la expresión génica y que podría ser inaccesible para la escisión dirigida por el amiRNA, como se ha descrito para otros lncRNAs cuya estructura secundaria es esencial para su función, por ejemplo *HID1* (Wang et al., 2014).

7.4 *TALIR* se acumula durante el tratamiento con ABA y en NaCl

Un análisis bioinformático realizado por Nieto-Hernandez a la región promotora de *TALIR* indicó que esta región genómica contiene motivos de unión, en *cis*, a factores de transcripción de la familia MYB/MYC, asociados a la señalización dependiente de ABA y con la regulación de genes de respuesta a estrés abiótico (Abe et al., 2003) (Figura 23).

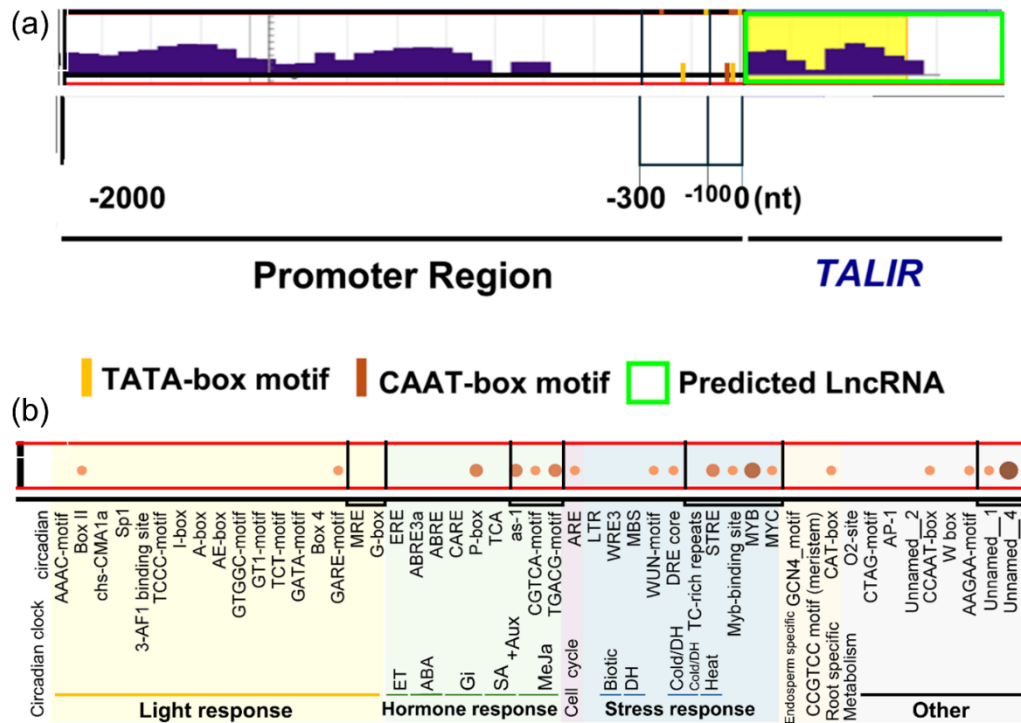


Figura 23. Análisis bioinformático de la región promotora de *TALIR*. (a) Representación esquemática de la región promotora analizada (0 a 2000 nt). Los motivos TATA-box y CAAT-box se indican en barras amarillas y naranjas, respectivamente. En 0 se indica el inicio de la transcripción, en el rectángulo verde se indica el nivel de transcripción de *TALIR*. (b) Representación de los motivos encontrados en el promotor de *TALIR*, clasificados por proceso biológico. Los círculos de naranja a marrón (menor a mayor) representan la frecuencia con la que el motivo fue encontrado en la región promotora.

Esto condujo a analizar el comportamiento transcripcional de *TALIR* bajo condiciones de estrés. Para ello, se cultivaron plantas WT durante dos semanas en condiciones control que posteriormente se trataron con ABA (5 μ M) o NaCl (175 mM) durante 24 h. Los análisis de RT-qPCR revelaron un incremento claro en la acumulación de *TALIR* después del tratamiento con ABA y en respuesta a NaCl comparado con WT (Figura

24a). Adicionalmente, se evaluó la acumulación del gen *GEA6* (At2g40170), que codifica a una proteína que pertenece a la familia *LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT (LEA)* y es activada por ABI5, como marcador de estrés (Figura 24b). ABI5 es un factor de transcripción clave en la vía de señalización de ABA (Gaubier et al., 1993; Chen et al., 2014).

Adicionalmente se evaluó el porcentaje de germinación de las líneas WT y las mutantes de *talir* en condiciones control y con concentraciones crecientes de ABA durante cinco días. Se observó que las líneas mutantes mostraron una reducida sensibilidad a ABA en una concentración de 5 μ M comparado con la WT (Figura 24c).

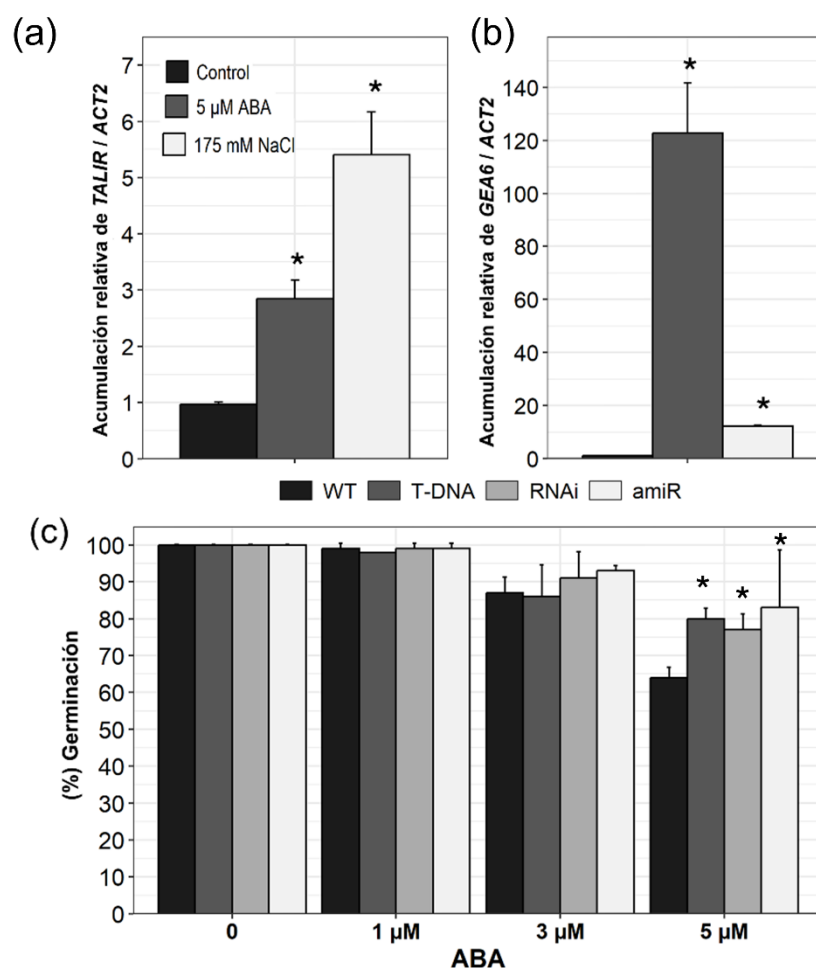


Figura 24. *TALIR* se acumula bajo condiciones de estrés y evaluación de la germinación en respuesta a ABA. (a) Análisis de RT-qPCR de la abundancia de *TALIR* y (b) *GEA6* en plántulas WT de dos semanas de edad. Las plantas WT cultivadas en condiciones control y evaluadas después del tratamiento con ABA 5 μ M y NaCl 175 mM durante 24 h o sin tratamiento. La abundancia relativa fue

normalizada contra el gen de referencia *ACT2*. Las barras de error representan la media \pm SD; $n = 3$. Los asteriscos (*) indican la significancia estadística a $P \leq 0.01$ (determinada por t-test). (c) Ensayo de germinación realizado en condiciones control o en tratamiento con ABA 1 μ M, 3 μ M, y 5 μ M durante cinco días. Se muestra el porcentaje de germinación de cada genotipo en el día cinco. Las barras de error representan la media \pm SD; $n = 50$. Los asteriscos (*) indican la significancia estadística a $P \leq 0.01$ (determinada por t-test).

Para profundizar en el análisis, se examinó la actividad transcripcional de los *loci* asociados a *TALIR*. Las plántulas WT y las mutantes se trataron con ABA 5 μ M durante 24 h. En dicho análisis se corroboró el aumento en la abundancia de *TALIR* en las plántulas WT y se observó una reducida acumulación de *TALIR* en las líneas mutantes, ambas comparaciones realizadas en las plántulas tratadas con ABA (Figura 25a).

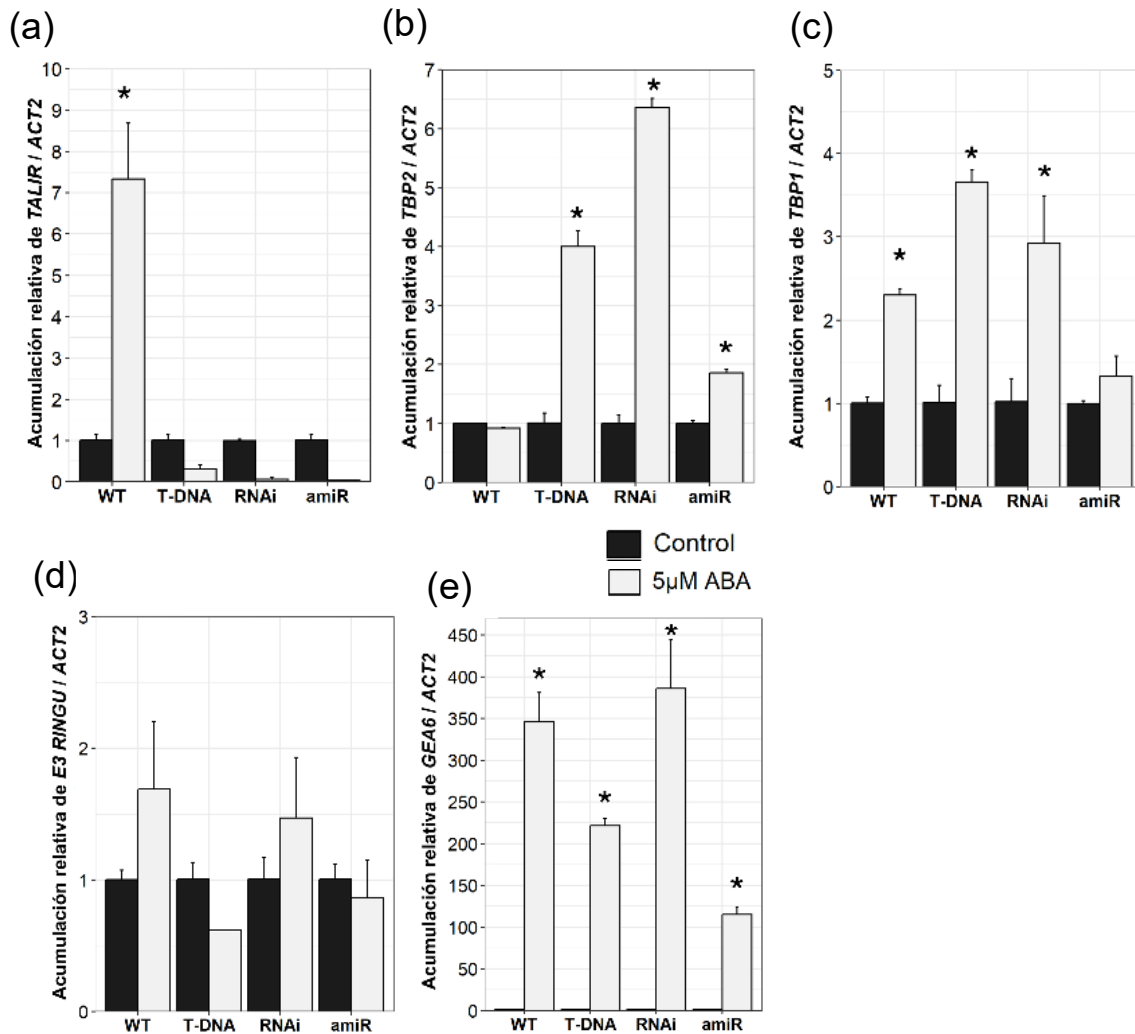


Figura 25. *TALIR* modula la acumulación de *TBP2* durante el tratamiento con ABA. Análisis RT-qPCR de plántulas WT y mutantes de *talir* de dos semanas tratadas con ABA 5 μ M durante 24 h

muestran la abundancia relativa de (a) *TBP2*, (b) *TBP1*, (c) *E3 RINGU*, (d) *TALIR*, y (e) *GEA6*. La abundancia relativa fue normalizada contra el gen de referencia *ACT2*. Las barras de error representan la media \pm SD; n = 3. Los asteriscos (*) indican la significancia estadística ($P \leq 0.001$; t-test). Figura representativa de dos experimentos realizados de manera independiente.

Además, se encontró una mayor acumulación de *TBP2* en las líneas mutantes comparado con las WT en plántulas tratadas con ABA (Figura 25b). No obstante, *TBP1* mostró una mayor acumulación tanto en las plántulas WT como en las líneas mutantes en tratamiento con ABA (Figura 25c). No se observó diferencia estadísticamente significativa para la acumulación de *E3 RINGU* (Figura 25d). La acumulación de *GEA6* corroboró que las plántulas fueron sometidas a condiciones de estrés (Figura 25e). En conjunto, estos resultados sugieren que la respuesta de *TBP1* a ABA es independiente de la presencia de *TALIR*, mientras que *TALIR* podría regular negativamente a *TBP2* en estas condiciones.

Se ha reportado que los lncRNAs *DRIR* y *ARTA* están involucrados en respuesta a ABA, mediante la inducción de estos para mejorar la tolerancia a la sequía de las plantas y promoviendo la expresión de genes de respuesta a estrés y participando en la inhibición de *ABI5* (Qin et al., 2017; Yang et al., 2023). Se encontró que *TALIR* se induce en tratamiento de ABA y NaCl por lo que sugiere que el aumento en la acumulación de *TALIR* es necesario para mantener el control transcripcional de *TBP2*. Las mutantes de pérdida de función de *TALIR* resultaron en una desregulación de la transcripción de *TBP2* sugiriendo que este puede actuar como un regulador negativo de *TBP2* durante el tratamiento con ABA. También se observó el fenotipo de germinación insensible a ABA potencialmente relacionado a la regulación de *TBP2* sobre genes dependientes de ABA. En la especie *Vigna radiata L.* se ha identificado que TBP, una proteína estrechamente relacionada a *TBP2*, actúa como un regulador positivo del estrés salino (Wu et al., 2024), mientras que en arroz *TBP2* se acumula durante condiciones de sequía concordando con los hallazgos que se obtuvieron en este estudio. Además, mutantes de *TBP2* mostraron una reducida tolerancia al estrés por sequía (Zhang et al., 2020). Estos ejemplos indican que la expresión de *TBP2* es

regulada en condiciones de estrés abiótico y que podría involucrar las vías de señalización dependientes e independientes de ABA, sugiriendo que TBP2 tiene una función en la respuesta al estrés en las plantas y que probablemente *TALIR* esté involucrado. Cabe resaltar que en condiciones control no se observaron diferencias en la germinación entre las líneas WT y las mutantes de *talir*, lo que indica que *TALIR* funciona como regulador de la respuesta a ABA durante la germinación pero no es requerido para el desarrollo normal en esta etapa.

7.5 *TALIR* se localiza en el núcleo

Diversos lncRNAs se localizan en el núcleo, donde participan en la regulación transcripcional mediante mecanismos que involucran interacciones con DNA, otros RNAs y proteínas (Statello et al., 2021). Para determinar la localización de *TALIR*, se empleó un método desarrollado por Kinoshita y colaboradores (2010). En este método se emplearon dos construcciones: i) un RNA de tallo-asa, MS2, fue fusionado a *TALIR* y expresado bajo el promotor viral 35S junto con el gen reportero mCherry, que incluía una señal de localización nuclear (NLS), como una unidad de transcripción independiente y ii) un componente proteico derivado de la proteína de la cubierta de la cápside del bacteriófago MS2 (MSCP) fusionada a GFP y a una NLS o a una señal de exportación nuclear (NES). Estos constructos fueron expresados en hojas de *Nicotiana benthamiana* vía co-infiltración con *Rhizobium* C58 y las hojas fueron observadas en microscopio confocal. La señal de MS2-TALIR-mCherry-NLS se observó como puntos discretos, indicando núcleos transformados. Mientras tanto, la señal de MSCP-GFP fue localizada en el núcleo tanto con la NLS como con NES. Cuando ambas construcciones fueron coexpresadas se observaron pequeños puntos amarillos en la misma posición nuclear, esto ocurrió únicamente con la construcción etiquetada con NES (Figura 26) mientras que la construcción etiquetada con NLS, aunque ambas señales se ubicaron en la misma región nuclear, no se observó una colocalización clara (ausencia de señal amarilla). Estos resultados concuerdan con el experimento realizado de manera independiente por Vargas-Camacho (2021) y corresponde a una

réplica biológica. En conjunto, ambos experimentos sugieren que *TALIR* se localiza predominantemente en el núcleo, lo cual es consistente con una probable función en la modulación de la expresión de *TBP2*.

Un mecanismo común mediante el cual los lncRNAs reprimen la transcripción de sus genes vecinos consistente en reclutar remodeladores de la cromatina, tal es el caso de *COOLAIR* que recluta a *PRC2* para reprimir el locus *FLC* o *AG-inRNA4*, el cual se une a *CLF* para inactivar la transcripción de *AGAMOUS* (Heo & Sung, 2011; Wu et al., 2018). Asimismo, se ha descrito un lncRNA denominado *lncRNA-TBP* que interactúa con la proteína TBP para silenciar genes involucrados en la proliferación de mioblastos promoviendo así el desarrollo de los músculos de contracción lenta y la hipertrofia, lo anterior fue observado en el músculo de los pollos Xinghua (Ma et al, 2023). Elucidar la localización subcelular de un lncRNA es clave para entender su función y su mecanismo de acción.

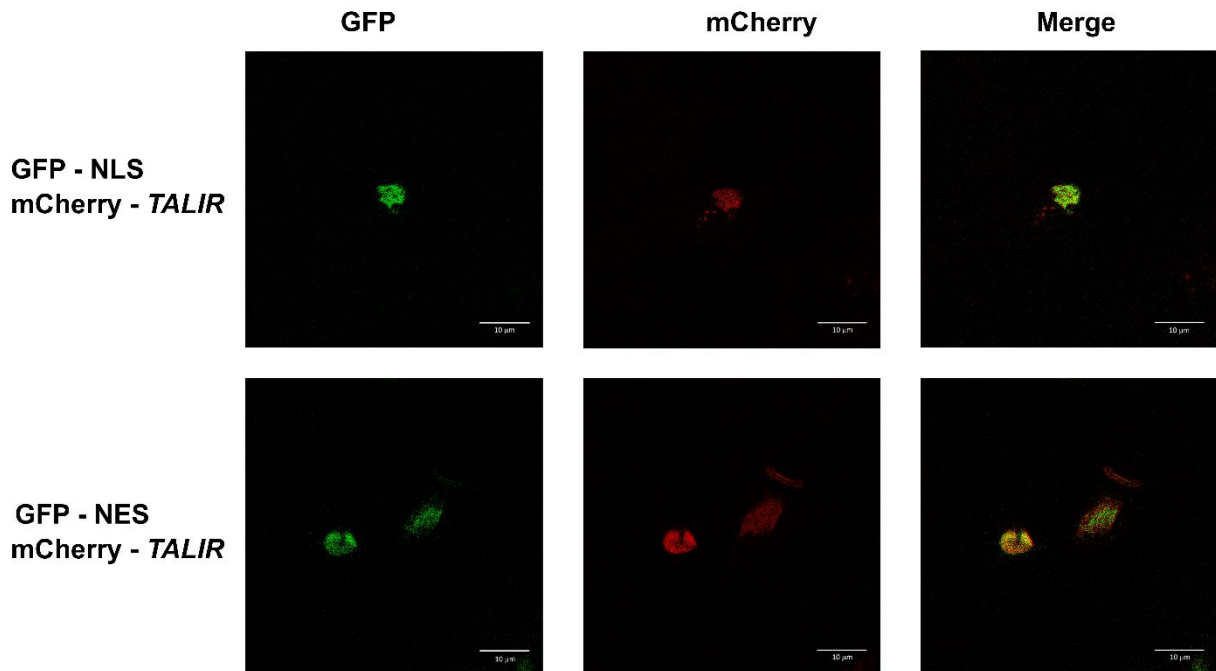


Figura 26. Expresión transitoria de *TALIR* en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Co-localización de la proteína MSCP fusionada a GFP con NLS o NES junto con *TALIR* fusionado a 6X-MS2-mCherry. Barra de escala = 10 µm. Objetivo 60X.

En este estudio se determinó mediante la expresión transitoria de dos componentes, que *TALIR* se localiza en el núcleo, apoyando la hipótesis de que *TALIR* modula la transcripción de *TBP2*. No obstante, el mecanismo por el cual *TALIR* ejerce su función permanece como una pregunta abierta. La mayoría de los lncRNAs localizados en el núcleo participan en interacciones con la cromatina, organización del genoma y regulación transcripcional (Choudhury et al., 2024), por lo que resulta trascendental identificar las moléculas que interaccionan con *TALIR* para que este pueda realizar su función. Enfoques como inmunoprecipitación de RNA (RIP) o ensayos de pull-down de RNA pueden brindar información sobre el modo de acción de *TALIR*.

Esta investigación reveló que *TALIR*, un lncRNA que no había sido caracterizado previamente, está involucrado en el desarrollo foliar y radicular y en la respuesta a ABA. Esta función moduladora de *TALIR* posiblemente se debe a la variación que ejerce sobre sus genes vecinos, lo cual es consistente con su localización nuclear. Al mismo tiempo, estas nuevas evidencias amplían el conocimiento actual sobre los lncRNAs y se generaron novedosas perspectivas en torno a la regulación del *MIR396b* y *MIR156* dependientes de la regulación de *TBP2* mediada por *TALIR*.

8 CONCLUSIONES

La presente tesis doctoral tuvo como objetivo caracterizar funcionalmente a nivel fenotípico y molecular al lncRNA *TALIR* (*TBP2-associated long intergenic non-coding RNA*) y evaluar su participación en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* y en la respuesta a señales asociadas a estrés por déficit hídrico.

En conjunto, los resultados obtenidos permiten concluir lo siguiente acerca de *TALIR*:

Los análisis fenotípicos indican que *TALIR* participa en la modulación del crecimiento foliar y en el desarrollo de las raíces laterales en *A. thaliana*.

A partir de los análisis moleculares se encontró que *TALIR* afecta de manera temporal la transcripción de *TBP2*, con efectos tanto positivos como negativos durante el desarrollo de la hoja. Asimismo, es posible que los niveles de *TBP2* influyan positivamente en la acumulación de *TBP1*, sugiriendo que el efecto de *TALIR* sobre *TBP1* es indirecto.

Además, la regulación de *TBP2* dependiente de *TALIR* se asocia con la desregulación temporal de los miR396b y miR156; así como de sus genes diana *GRF2* y *SPL9*, respectivamente, lo que contribuye al fenotipo alterado del desarrollo de la hoja. Esto sugiere que *TALIR* participa en la integración de redes de regulación postranscripcional que controlan el crecimiento y la transición del desarrollo.

En el contexto de estrés por déficit hídrico, se demostró que *TALIR* se induce durante el tratamiento con ABA y NaCl, sugiriendo que el aumento en la acumulación podría ser necesario para mantener el control transcripcional de *TBP2* bajo estas condiciones.

Asimismo, durante la germinación, las mutantes de *talir* mostraron una sensibilidad reducida a la fitohormona ABA, lo que sugiere que *TALIR* actúa como modulador de la respuesta a ABA durante esta etapa; sin embargo, no es requerido para el desarrollo normal en esta etapa bajo condiciones control.

La localización subcelular de los lncRNAs está ligada a su mecanismo de acción por lo que la identificación de *TALIR* predominantemente en el núcleo permite sustentar la

idea de un papel en la regulación transcripcional y respalda su probable función en la modulación de la expresión de *TBP2*.

Los hallazgos obtenidos en esta tesis evidencian la importancia de *TALIR* en el desarrollo vegetal, particularmente en el crecimiento foliar, la transición del brote de la fase juvenil a la adulta, así como en la respuesta a estrés hídrico y en la germinación durante el estrés. Estos hallazgos confirman el papel de los lncRNAs como moduladores clave en la biología vegetal y extendiendo el conocimiento en el campo de la biología molecular de plantas.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant cell*, 15(1), 63–78. <https://doi.org/10.1105/tpc.006130>
- Agarwal, P. K. & Jha B. (2010). Transcription factors in plant and ABA dependent and independent abiotic stress signaling. *Biologia Plantarum* 54 (2):201-212. <https://doi.org/10.1007/s10535-010-0038-7>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4ta. ed.). Garland Science.
- Ali, S., Khan, N., & Xie, L. (2020). Molecular and Hormonal Regulation of Leaf Morphogenesis in Arabidopsis. *International journal of molecular sciences*, 21(14), 5132. <https://doi.org/10.3390/ijms21145132>
- Ariel, F., Jegu, T., Latrasse, D., Romero-Barrios, N., Christ, A., Benhamed, M., & Crespi, M. (2014). Noncoding transcription by alternative RNA polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. *Molecular Cell*, 55(3), 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.011>
- Ariel, F., Lucero, L., Christ, A., Mammarella, M. F., Jegu, T., Veluchamy, A., Mariappan, K., Latrasse, D., Blein, T., Liu, C., Benhamed, M., & Crespi, M. (2020). R-Loop Mediated trans Action of the APOLO Long Noncoding RNA. *Molecular Cell*, 77(5), 1055–1065.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.015>
- Bardou, F., Ariel, F., Simpson, C. G., Romero-Barrios, N., Laporte, P., Balzergue, S., Brown, J. W., & Crespi, M. (2014). Long noncoding RNA modulates alternative splicing regulators in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 30(2), 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.017>

- Ben Amor, B., Wirth, S., Merchan, F., Laporte, P., d'Aubenton-Carafa, Y., Hirsch, J., Maizel, A., Mallory, A., Lucas, A., Deragon, J. M., Vaucheret, H., Thermes, C., & Crespi, M. (2009). Novel long non-protein coding RNAs involved in Arabidopsis differentiation and stress responses. *Genome research*, *19*(1), 57–69. <https://doi.org/10.1101/gr.080275.108>
- Benfey, P. N., & Scheres, B. (2000). Root development. *Current biology: CB*, *10*(22), R813–R815. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00814-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00814-9)
- Berckmans, B., Kirschner, G., Gerlitz, N., Stadler, R., & Simon, R. (2020). CLE40 Signaling Regulates Root Stem Cell Fate. *Plant physiology*, *182*(4), 1776–1792. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00914>
- Bilsborough, G. D., Runions, A., Barkoulas, M., Jenkins, H. W., Hasson, A., Galinha, C., Laufs, P., Hay, A., Prusinkiewicz, P., & Tsiantis, M. (2011). Model for the regulation of Arabidopsis thaliana leaf margin development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(8), 3424–3429. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015162108>
- Bologna, N. G., Iselin, R., Abriata, L. A., Sarazin, A., Pumplin, N., Jay, F., Grentzinger, T., Dal Peraro, M., & Voinnet, O. (2018). Nucleo-cytosolic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway. *Molecular cell*, *69*(4), 709–719.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.007>
- Boscá, S., Knauer, S., & Laux, T. (2011). Embryonic development in Arabidopsis thaliana: from the zygote division to the shoot meristem. *Frontiers in plant science*, *2*, 93. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00093>
- Cai, J., Zhang, Y., He, R., Jiang, L., Qu, Z., Gu, J., Yang, J., Legascue, M. F., Wang, Z. Y., Ariel, F., Adelson, D. L., Zhu, Y., & Wang, D. (2024). LncRNA DANA1 promotes drought tolerance and histone deacetylation of drought responsive genes in Arabidopsis. *EMBO reports*, *25*(2), 796–812. <https://doi.org/10.1038/s44319-023-00030-4>

- Calderon-Villalobos, L. I., Kuhnle, C., Dohmann, E. M., Li, H., Bevan, M., & Schwechheimer, C. (2005). The evolutionarily conserved TOUGH protein is required for proper development of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell*, *17*(9), 2473–2485. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031302>
- Chen, C., Wu, C., Miao, J., Lei, Y., Zhao, D., Sun, D., Yang, G., Huang, J., & Zheng, C. (2014). Arabidopsis SAG protein containing the MDN1 domain participates in seed germination and seedling development by negatively regulating ABI3 and ABI5. *Journal of experimental botany*, *65*(1), 35–45. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert343>
- Chen, J., Zhong, Y., & Qi, X. (2021). LncRNA TCONS_00021861 is functionally associated with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) via competing endogenous RNA regulation. *BMC plant biology*, *21*(1), 410. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03195-z>
- Chen, L. L., & Kim, V. N. (2024). Small and long non-coding RNAs: Past, present, and future. *Cell*, *187*(23), 6451–6485. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.10.024>
- Chen, L., Shi, S., Jiang, N., Khanzada, H., Wassan, G. M., Zhu, C., Peng, X., Xu, J., Chen, Y., Yu, Q., He, X., Fu, J., Chen, X., Hu, L., Ouyang, L., Sun, X., He, H., & Bian, J. (2018). Genome-wide analysis of long non-coding RNAs affecting roots development at an early stage in the rice response to cadmium stress. *BMC genomics*, *19*(1), 460. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4807-6>
- Chen X. (2005). MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS letters*, *579*(26), 5923–5931. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.071>
- Chen, X., Sun, Y., Cai, R., Wang, G., Shu, X., & Pang, W. (2018). Long noncoding RNA: multiple players in gene expression. *BMB reports*, *51*(6), 280–289. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2018.51.6.025>

- Choudhury, S., Rathore, A. S., & Raghava, G. P. S. (2024) Compilation of resources on subcellular localization of lncRNA. *Frontiers RNA Research*, 2, <https://doi.org/10.3389/frnar.2024.1419979>
- Crespi M. (2023). Long non-coding RNAs reveal new regulatory mechanisms controlling gene expression. *Comptes rendus biologiques*, 345(4), 15–39. <https://doi.org/10.5802/crbiol.106>
- Di Mambro, R., De Ruvo, M., Pacifici, E., Salvi, E., Sozzani, R., Benfey, P. N., Busch, W., Novak, O., Ljung, K., Di Paola, L., Marée, A. F. M., Costantino, P., Grieneisen, V. A., & Sabatini, S. (2017). Auxin minimum triggers the developmental switch from cell division to cell differentiation in the *Arabidopsis* root. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(36), E7641–E7649. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705833114>
- Dkhar, J., & Pareek, A. (2014). What determines a leaf's shape? *EvoDevo*, 5(1), 47. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-5-47>
- Drisch, R. C., & Stahl, Y. (2015). Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Frontiers in plant science*, 6, 505. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00505>
- Du, F., Guan, C., & Jiao, Y. (2018). Molecular Mechanisms of Leaf Morphogenesis. *Molecular plant*, 11(9), 1117–1134. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.06.006>
- Dubrovsky, J. G., Gambetta, G. A., Hernández-Barrera, A., Shishkova, S., & González, I. (2006). Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Annals of botany*, 97(5), 903–915. <https://doi.org/10.1093/aob/mcj604>
- Feng, W., Lindner, H., Robbins, N. E., 2nd, & Dinneny, J. R. (2016). Growing Out of Stress: The Role of Cell- and Organ-Scale Growth Control in Plant Water-

- Stress Responses. *The Plant cell*, 28(8), 1769–1782.
<https://doi.org/10.1105/tpc.16.00182>
- Gao, J., Yang, X., Zhao, W., Lang, T., & Samuelsson, T. (2015). Evolution, diversification, and expression of KNOX proteins in plants. *Frontiers in plant science*, 6, 882. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00882>
- Gaubier, P., Raynal, M., Hull, G., Huestis, G. M., Grellet, F., Arenas, C., Pagès, M., & Delseny, M. (1993). Two different Em-like genes are expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds during maturation. *Molecular & general genetics: MGG*, 238(3), 409–418. <https://doi.org/10.1007/BF00292000>
- Guo, C., Jiang, Y., Shi, M., Wu, X., & Wu, G. (2021). ABI5 acts downstream of miR159 to delay vegetative phase change in *Arabidopsis*. *The New phytologist*, 231(1), 339–350. <https://doi.org/10.1111/nph.17371>
- Ha, C. M., Jun, J. H., & Fletcher, J. C. (2010). Shoot apical meristem form and function. *Current topics in developmental biology*, 91, 103–140.
[https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)91004-1](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)91004-1)
- Heard, D. J., Kiss, T., & Filipowicz, W. (1993). Both *Arabidopsis* TATA binding protein (TBP) isoforms are functionally identical in RNA polymerase II and III transcription in plant cells: evidence for gene-specific changes in DNA binding specificity of TBP. *The EMBO journal*, 12(9), 3519–3528.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06026.x>
- Heidstra, R., & Sabatini, S. (2014). Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(5), 301–312.
<https://doi.org/10.1038/nrm3790>
- Heo, J. B., & Sung, S. (2011). Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6013), 76–79.
<https://doi.org/10.1126/science.1197349>

- Horiguchi, G., Kim, G. T., & Tsukaya, H. (2005). The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 43(1), 68–78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02429.x>
- Hung, F. Y., Chen, C., Yen, M. R., Hsieh, J. A., Li, C., Shih, Y. H., Chen, F. F., Chen, P. Y., Cui, Y., & Wu, K. (2020). The expression of long non-coding RNAs is associated with H3Ac and H3K4me2 changes regulated by the HDA6-LDL1/2 histone modification complex in *Arabidopsis*. *NAR genomics and bioinformatics*, 2(3), lqaa066. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqaa066>
- Iacomino G. (2023). miRNAs: The Road from Bench to Bedside. *Genes*, 14(2), 314. <https://doi.org/10.3390/genes14020314>
- Ichihashi, Y., Horiguchi, G., Gleissberg, S., & Tsukaya, H. (2010). The bHLH transcription factor SPATULA controls final leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology*, 51(2), 252–261. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp184>
- Islam, W., Tauqeer, A., Waheed, A., & Zeng, F. (2022). MicroRNA Mediated Plant Responses to Nutrient Stress. *International journal of molecular sciences*, 23(5), 2562. <https://doi.org/10.3390/ijms23052562>
- Jampala, P., Garhewal, A., & Lodha, M. (2021). Functions of long non-coding RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant signaling & behavior*, 16(9), 1925440. <https://doi.org/10.1080/15592324.2021.1925440>
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal*, 6(13), 3901–3907. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02730.x>

- Jin, J., Liu, J., Wang, H., Wong, L., & Chua, N. H. (2013). PLncDB: plant long non-coding RNA database. *Bioinformatics*, 29, 1068–1071.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt107>
- Jin, J., Lu, P., Xu, Y., Li, Z., Yu, S., Liu, J., Wang, H., Chua, N. H., & Cao, P. (2021). PLncDB V2.0: a comprehensive encyclopedia of plant long noncoding RNAs. *Nucleic acids research*, 49(D1), D1489–D1495.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa910>
- Jones, R., Ougham, H., Thomas, H., & Waaland, S. (2013). The molecular life of plants (1ra. ed.). Wiley-Blackwell.
- Kalve, S., De Vos, D., & Beemster, G. T. (2014). Leaf development: a cellular perspective. *Frontiers in plant science*, 5, 362.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00362>
- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in plant science*, 7(5), 193–195.
[https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02251-3)
- Kean-Galeno, T., Lopez-Arredondo, D., & Herrera-Estrella, L. (2024). The Shoot Apical Meristem: An Evolutionary Molding of Higher Plants. *International journal of molecular sciences*, 25(3), 1519.
<https://doi.org/10.3390/ijms25031519>
- Khan, N. (2025). Molecular Insights into ABA-Mediated Regulation of Stress Tolerance and Development in Plants. *International journal of molecular sciences*, 26(16), 7872. <https://doi.org/10.3390/ijms26167872>
- Kim, J. Y., Lee, J., Kang, M. H., Trang, T. T. M., Lee, J., Lee, H., Jeong, H., & Lim, P. O. (2022). Dynamic landscape of long noncoding RNAs during leaf aging in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1068163.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1068163>

- Kinoshita, N., Arenas-Huertero, C., & Chua, N. H. (2018). Visualizing nuclear-localized RNA using transient expression system in plants. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 23(2), 105–111.
<https://doi.org/10.1111/gtc.12549>
- Kongdin, M., Mahong, B., Lee, S. K., Shim, S. H., Jeon, J. S., & Ketudat Cairns, J. R. (2021). Action of Multiple Rice β -Glucosidases on Abscisic Acid Glucose Ester. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7593.
<https://doi.org/10.3390/ijms22147593>
- Kopp, F., & Mendell, J. T. (2018). Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell*, 172(3), 393–407.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.011>
- Lavenus, J., Goh, T., Roberts, I., Guyomarc'h, S., Lucas, M., De Smet, I., Fukaki, H., Beeckman, T., Bennett, M., & Laplaze, L. (2013). Lateral root development in Arabidopsis: fifty shades of auxin. *Trends in plant science*, 18(8), 450–458.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.04.006>
- Lazzara, F. E., Rodriguez, R. E., & Palatnik, J. F. (2024). Molecular mechanisms regulating GROWTH-REGULATING FACTORS activity in plant growth, development, and environmental responses. *Journal of experimental botany*, 75(14), 4360–4372. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae179>
- Leng, P., Yuan, B., & Guo, Y. (2014). The role of abscisic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. *Journal of experimental botany*, 65(16), 4577–4588. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru204>
- Li, Y. F., Dubois, F., & Zhou, D. X. (2001). Ectopic expression of TATA box-binding protein induces shoot proliferation in Arabidopsis. *FEBS letters*, 489(2-3), 187–191. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02101-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02101-9)
- Liu, D., Song, Y., Chen, Z., & Yu, D. (2009). Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in

- Arabidopsis. *Physiologia plantarum*, 136(2), 223–236.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01229.x>
- Liu, X., Li, D., Zhang, D., Yin, D., Zhao, Y., Ji, C., Zhao, X., Li, X., He, Q., Chen, R., Hu, S., & Zhu, L. (2018). A novel antisense long noncoding RNA, TWISTED LEAF, maintains leaf blade flattening by regulating its associated sense R2R3-MYB gene in rice. *The New phytologist*, 218(2), 774–788.
<https://doi.org/10.1111/nph.15023>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lopes, F. L., Galvan-Ampudia, C., & Landrein, B. (2021). WUSCHEL in the shoot apical meristem: old player, new tricks. *Journal of experimental botany*, 72(5), 1527–1535. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa572>
- Lv, Z., Zhao, W., Kong, S., Li, L., & Lin, S. (2023). Overview of molecular mechanisms of plant leaf development: a systematic review. *Frontiers in plant science*, 14, 1293424. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1293424>
- Ma, M., Cai, B., Zhou, Z., Kong, S., Zhang, J., Xu, H., Zhang, X., & Nie, Q. (2023). LncRNA-TBP mediates TATA-binding protein recruitment to regulate myogenesis and induce slow-twitch myofibers. *Cell communication and signaling: CCS*, 21(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-01001-3>
- Malamy, J. E., & Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development (Cambridge, England)*, 124(1), 33–44. <https://doi.org/10.1242/dev.124.1.33>
- Manuela, D., & Xu, M. (2020). Juvenile Leaves or Adult Leaves: Determinants for Vegetative Phase Change in Flowering Plants. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9753. <https://doi.org/10.3390/ijms21249753>

- Manuela, D., & Xu, M. (2020). Patterning a Leaf by Establishing Polarities. *Frontiers in plant science*, *11*, 568730. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.568730>
- Martignago, D., da Silveira Falavigna, V., Coupland, G., & Conti, L. (2025). Dancing molecules: group A bZIPs and PEBPs at the heart of plant development and stress responses. *Journal of experimental botany*, *76*(8), 2081–2095. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraf034>
- Mattick, J. S., Amaral, P. P., Carninci, P., Carpenter, S., Chang, H. Y., Chen, L. L., Chen, R., Dean, C., Dinger, M. E., Fitzgerald, K. A., Gingeras, T. R., Guttman, M., Hirose, T., Huarte, M., Johnson, R., Kanduri, C., Kapranov, P., Lawrence, J. B., Lee, J. T., Mendell, J. T., ... Wu, M. (2023). Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *24*(6), 430–447. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00566-8>
- Meena, S. K., Heidecker, M., Engelmann, S., Jaber, A., de Vries, T., Triller, S., Baumann-Kaschig, K., Abel, S., Behrens, S. E., & Gago-Zachert, S. (2023). Altered expression levels of long non-coding natural antisense transcripts overlapping the UGT73C6 gene affect rosette size in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, *113*(3), 460–477. <https://doi.org/10.1111/tpj.16058>
- Meng, X., Li, A., Yu, B., & Li, S. (2021). Interplay between miRNAs and lncRNAs: Mode of action and biological roles in plant development and stress adaptation. *Computational and structural biotechnology journal*, *19*, 2567–2574. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.04.062>
- Morey, C., & Avner, P. (2004). Employment opportunities for non-coding RNAs. *FEBS letters*, *567*(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.03.117>
- Motor, A., Puchta-Jasińska, M., Bolc, P., & Boczowska, M. (2025). Long Noncoding RNAs as Emerging Regulators of Seed Development, Germination, and

- Senescence. *International journal of molecular sciences*, 26(17), 8702.
<https://doi.org/10.3390/ijms26178702>
- Muhammad Aslam, M., Waseem, M., Jakada, B. H., Okal, E. J., Lei, Z., Saqib, H. S. A., Yuan, W., Xu, W., & Zhang, Q. (2022). Mechanisms of Abscisic Acid-Mediated Drought Stress Responses in Plants. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1084. <https://doi.org/10.3390/ijms23031084>
- Nakayama H. (2024). Leaf form diversity and evolution: a never-ending story in plant biology. *Journal of plant research*, 137(4), 547–560.
<https://doi.org/10.1007/s10265-024-01541-4>
- Nguyen, S. T., Greaves, T., & McCurdy, D. W. (2017). Heteroblastic Development of Transfer Cells Is Controlled by the microRNA miR156/SPL Module. *Plant physiology*, 173(3), 1676–1691. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01741>
- Nikovics, K., Blein, T., Peaucelle, A., Ishida, T., Morin, H., Aida, M., & Laufs, P. (2006). The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in Arabidopsis. *The Plant cell*, 18(11), 2929–2945.
<https://doi.org/10.1105/tpc.106.045617>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., & Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. *The Plant cell*, 19(1), 118–130.
<https://doi.org/10.1105/tpc.106.047761>
- Palos, K., Yu, L., Railey, C. E., Nelson Dittrich, A. C., & Nelson, A. D. L. (2023). Linking discoveries, mechanisms, and technologies to develop a clearer perspective on plant long noncoding RNAs. *The Plant cell*, 35(6), 1762–1786.
<https://doi.org/10.1093/plcell/koad027>

- Perales, M., Rodriguez, K., Snipes, S., Yadav, R. K., Diaz-Mendoza, M., & Reddy, G. V. (2016). Threshold-dependent transcriptional discrimination underlies stem cell homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(41), E6298–E6306.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1607669113>
- Petricka, J. J., Winter, C. M., & Benfey, P. N. (2012). Control of Arabidopsis root development. *Annual review of plant biology*, *63*, 563–590.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105501>
- Poethig, R. S. (2010). The past, present, and future of vegetative phase change. *Plant physiology*, *154*(2), 541–544.
<https://doi.org/10.1104/pp.110.161620>
- Poethig, R. S. (2013). Vegetative phase change and shoot maturation in plants. *Current topics in developmental biology*, *105*, 125–152.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396968-2.00005-1>
- Poethig, R. S., & Fouracre, J. (2024). Temporal regulation of vegetative phase change in plants. *Developmental cell*, *59*(1), 4–19.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2023.11.010>
- Pulido, A., & Laufs, P. (2010). Co-ordination of developmental processes by small RNAs during leaf development. *Journal of experimental botany*, *61*(5), 1277–1291. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp397>
- Qin, T., Zhao, H., Cui, P., Albeshier, N., & Xiong, L. (2017). A Nucleus-Localized Long Non-Coding RNA Enhances Drought and Salt Stress Tolerance. *Plant Physiology*, *175*, 1321–1336. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00574>
- Ramos, J. R. D., Reyes-Hernández, B. J., Alim, K., & Maizel, A. (2025). Auxin-mediated stress relaxation in pericycle and endoderm remodeling drives lateral root initiation. *Biophysical journal*, *124*(6), 942–953.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2024.06.017>

- Ran, N., Liu, S., Qi, H., Wang, J., Shen, T., Xu, W., & Xu, M. (2023). Long Non-Coding RNA *IncWOX11a* Suppresses Adventitious Root Formation of Poplar by Regulating the Expression of *PeWOX11a*. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5766. <https://doi.org/10.3390/ijms24065766>
- Ren, G., Xie, M., Dou, Y., Zhang, S., Zhang, C., & Yu, B. (2012). Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12817–12821. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204915109>
- Rodriguez, K., Perales, M., Snipes, S., Yadav, R. K., Diaz-Mendoza, M., & Reddy, G. V. (2016). DNA-dependent homodimerization, sub-cellular partitioning, and protein destabilization control WUSCHEL levels and spatial patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(41), E6307–E6315. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607673113>
- Rodriguez, R. E., Mecchia, M. A., Debernardi, J. M., Schommer, C., Weigel, D., & Palatnik, J. F. (2010). Control of cell proliferation in Arabidopsis thaliana by microRNA miR396. *Development*, 137, 103–112. <https://doi.org/10.1242/dev.043067>
- Rogers, K., & Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant cell*, 25(7), 2383–2399. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113159>
- Roth-Nebelsick, A., & Krause, M. (2023). The Plant Leaf: A Biomimetic Resource for Multifunctional and Economic Design. *Biomimetics* (Basel, Switzerland), 8(2), 145. <https://doi.org/10.3390/biomimetics8020145>
- Roulé, T., Legascue, M. F., Barrios, A., Gaggion, N., Crespi, M., Ariel, F., & Blein, T. (2023). The long intergenic noncoding RNA ARES modulates root architecture in Arabidopsis. *IUBMB life*, 75(10), 880–892. <https://doi.org/10.1002/iub.2761>

- Ruiz-Orera, J., Messeguer, X., Subirana, J. A., & Alba, M. M. (2014). Long non-coding RNAs as a source of new peptides. *eLife*, 3, e03523.
<https://doi.org/10.7554/eLife.03523>
- Runions, A., Tsiantis, M., & Prusinkiewicz, P. (2017). A common developmental program can produce diverse leaf shapes. *The New phytologist*, 216(2), 401–418. <https://doi.org/10.1111/nph.14449>
- Saha, C., Saha, S., & Bhattacharyya, N. P. (2025). LncRNAOmics: A Comprehensive Review of Long Non-Coding RNAs in Plants. *Genes*, 16(7), 765.
<https://doi.org/10.3390/genes16070765>
- Sakuraba, Y. (2021). Light-Mediated Regulation of Leaf Senescence. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3291.
<https://doi.org/10.3390/ijms22073291>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676–682.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmitz, S. U., Grote, P., & Herrmann, B. G. (2016). Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 73(13), 2491–2509. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2174-5>
- Schommer, C., Palatnik, J. F., Aggarwal, P., Chételat, A., Cubas, P., Farmer, E. E., Nath, U., & Weigel, D. (2008). Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS biology*, 6(9), e230.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060230>
- Schwab, R., Palatnik, J. F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., & Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant

- transcriptome. *Developmental cell*, 8(4), 517–527.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.01.018>
- Schwarz, S., Grande, A. V., Bujdoso, N., Saedler, H., & Huijser, P. (2008). The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis. *Plant molecular biology*, 67(1-2), 183–195.
<https://doi.org/10.1007/s11103-008-9310-z>
- Scofield, S., Jones, A., & Murray, J. A. (2014). The plant cell cycle in context. *Journal of experimental botany*, 65(10), 2557–2562. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru188>
- Shi, Y., Wang, Q., Song, R., Kong, Y., & Zhang, Z. (2021). Non-coding RNAs in depression: Promising diagnostic and therapeutic biomarkers. *EBioMedicine*, 71, 103569.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103569>
- Shkolnik-Inbar, D., & Bar-Zvi, D. (2010). ABI4 mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in Arabidopsis. *The Plant cell*, 22(11), 3560–3573.
<https://doi.org/10.1105/tpc.110.074641>
- Silva, P. O., Batista, D. S., Cavalcanti, J. H. F., Koehler, A. D., Vieira, L. M., Fernandes, A. M., Barrera-Rojas, C. H., Ribeiro, D. M., Nogueira, F. T. S., & Otoni, W. C. (2019). Leaf heteroblasty in *Passiflora edulis* as revealed by metabolic profiling and expression analyses of the microRNAs miR156 and miR172. *Annals of botany*, 123(7), 1191–1203.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcz025>
- Skubacz, A., Daszkowska-Golec, A., & Szarejko, I. (2016). The Role and Regulation of ABI5 (ABA-Insensitive 5) in Plant Development, Abiotic Stress Responses and Phytohormone Crosstalk. *Frontiers in plant science*, 7, 1884.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01884>

- Squillaro, T., Peluso, G., Galderisi, U., & Di Bernardo, G. (2020). Long non-coding RNAs in regulation of adipogenesis and adipose tissue function. *eLife*, *9*, e59053. <https://doi.org/10.7554/eLife.59053>
- Staehelein, C., Charon, C., Boller, T., Crespi, M., & Kondorosi, A. (2001). *Medicago truncatula* plants overexpressing the early nodulin gene *enod40* exhibit accelerated mycorrhizal colonization and enhanced formation of arbuscules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(26), 15366–15371. <https://doi.org/10.1073/pnas.251491698>
- Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L., & Huarte, M. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *22*(2), 96–118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
- Steffens, B., & Rasmussen, A. (2016). The Physiology of Adventitious Roots. *Plant physiology*, *170*(2), 603–617. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01360>
- Su, Y. H., Zhou, C., Li, Y. J., Yu, Y., Tang, L. P., Zhang, W. J., Yao, W. J., Huang, R., Laux, T., & Zhang, X. S. (2020). Integration of pluripotency pathways regulates stem cell maintenance in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(36), 22561–22571. <https://doi.org/10.1073/pnas.2015248117>
- Sweta, S., Dudnakova, T., Sudheer, S., Baker, A. H., & Bhushan, R. (2019). Importance of Long Non-coding RNAs in the Development and Disease of Skeletal Muscle and Cardiovascular Lineages. *Frontiers in cell and developmental biology*, *7*, 228. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00228>
- Szymański, M., & Barciszewski, J. (2002). Beyond the proteome: non-coding regulatory RNAs. *Genome biology*, *3*(5), reviews0005. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-5-reviews0005>
- Takahashi, H., Nozawa, A., Seki, M., Shinozaki, K., Endo, Y., & Sawasaki, T. (2009). A simple and high-sensitivity method for analysis of ubiquitination and

- polyubiquitination based on wheat cell-free protein synthesis. *BMC plant biology*, 9, 39. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-39>
- Torres-Martínez, H. H., Rodríguez-Alonso, G., Shishkova, S., & Dubrovsky, J. G. (2019). Lateral Root Primordium Morphogenesis in Angiosperms. *Frontiers in plant science*, 10, 206. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00206>
- Tsuji, H., & Sato, M. (2024). The Function of Florigen in the Vegetative-to-Reproductive Phase Transition in and around the Shoot Apical Meristem. *Plant & cell physiology*, 65(3), 322–337. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcae001>
- Tsukaya, H. (2005). Leaf shape: genetic controls and environmental factors. *The International journal of developmental biology*, 49(5-6), 547–555. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041921ht>
- Tu, Z., Xia, H., Yang, L., Zhai, X., Shen, Y., & Li, H. (2022). The Roles of microRNA-Long Non-coding RNA-mRNA Networks in the Regulation of Leaf and Flower Development in *Liriodendron chinense*. *Frontiers in plant science*, 13, 816875. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.816875>
- Vargas Camacho, S. I. (2022). Caracterización de la función del RNA largo no codificante *LNCTATA* sobre sus genes aledaños. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de San Luis Potosí] <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/7652>
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R. G., Pandey, M., & Sharma, S. (2017). Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in plant science*, 8, 161. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00161>
- Waadt, R., Seller, C. A., Hsu, P. K., Takahashi, Y., Munemasa, S., & Schroeder, J. I. (2022). Plant hormone regulation of abiotic stress responses. *Nature reviews*.

Molecular cell biology, 23(10), 680–694. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00479-6>

Wang, H. V., & Chekanova, J. A. (2017). Long Noncoding RNAs in Plants. *Advances in experimental medicine and biology*, 1008, 133–154. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5203-3_5

Wang, L., Gu, X., Xu, D., Wang, W., Wang, H., Zeng, M., Chang, Z., Huang, H., & Cui, X. (2011). miR396-targeted AtGRF transcription factors are required for coordination of cell division and differentiation during leaf development in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 62(2), 761–773. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq307>

Wang, Y., Fan, X., Lin, F., He, G., Terzaghi, W., Zhu, D., & Deng, X. W. (2014). *Arabidopsis* noncoding RNA mediates control of photomorphogenesis by red light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(28), 10359–10364. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409457111>

Willmann, M. R., & Poethig, R. S. (2005). Time to grow up: the temporal role of smallRNAs in plants. *Current opinion in plant biology*, 8(5), 548–552. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.07.008>

Wilson-Sánchez, D., Bhatia, N., Runions, A., & Tsiantis, M. (2022). From genes to shape in leaf development and evolution. *Current biology: CB*, 32(21), R1215–R1222. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.09.021>

Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J. W., Weigel, D., & Poethig, R. S. (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 138(4), 750–759. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.031>

Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S. A., & Carrington, J. C. (2005). Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant Physiology*. 138(4), 2145–2154. <https://doi.org/10.1104/pp.105.062943>

- Xu, M., Hu, T., Zhao, J., Park, M. Y., Earley, K. W., Wu, G., Yang, L., & Poethig, R. S. (2016). Developmental Functions of miR156-Regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics*, *12*(8), e1006263. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006263>
- Yadav, A., Mathan, J., Dubey, A. K., & Singh, A. (2024). The Emerging Role of Non-Coding RNAs (ncRNAs) in Plant Growth, Development, and Stress Response Signaling. *Non-coding RNA*, *10*(1), 13. <https://doi.org/10.3390/ncrna10010013>
- Yalamanchili, K., Vermeer, J. E. M., Scheres, B., & Willemsen, V. (2024). Shaping root architecture: towards understanding the mechanisms involved in lateral root development. *Biology direct*, *19*(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s13062-024-00535-5>
- Yang, J., He, R., Qu, Z., Gu, J., Jiang, L., Zhan, X., Gao, Y., Adelson, D. L., Li, S., Wang, Z. Y., Zhu, Y., & Wang, D. (2023). Long noncoding RNA ARTA controls ABA response through MYB7 nuclear trafficking in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, *58*(13), 1206–1217.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2023.05.003>
- Yu, Y., Wang, H., You, C., & Chen, X. (2026). Plant microRNA maturation and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *27*(1), 55–70. <https://doi.org/10.1038/s41580-025-00871-y>
- Yu, Y., Zhang, Y., Chen, X., & Chen, Y. (2019). Plant Noncoding RNAs: Hidden Players in Development and Stress Responses. *Annual review of cell and developmental biology*, *35*, 407–431. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100818-125218>
- Zhang, J., Wei, B., Yuan, R., Wang, J., Ding, M., Chen, Z., Yu, H., & Qin, G. (2017). The *Arabidopsis* RING-Type E3 Ligase TEAR1 Controls Leaf Development by Targeting the TIE1 Transcriptional Repressor for Degradation. *The Plant cell*, *29*(2), 243–259. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00771>

- Zhang, X., Du, M., Yang, Z., Wang, Z., & Lim, K. J. (2023). Biogenesis, Mode of Action and the Interactions of Plant Non-Coding RNAs. *International journal of molecular sciences*, 24(13), 10664. <https://doi.org/10.3390/ijms241310664>
- Zhang, X., Garreton, V., & Chua, N. H. (2005). The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes & development*, 19(13), 1532–1543. <https://doi.org/10.1101/gad.1318705>
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature protocols*, 1(2), 641–646. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>
- Zhang, Y., Ma, Y., Zhao, D., Tang, Z., Zhang, T., Zhang, K., Dong, J., & Zhang, H. (2023). Genetic regulation of lateral root development. *Plant signaling & behavior*, 18(1), 2081397. <https://doi.org/10.1080/15592324.2022.2081397>
- Zhang, Z., Ma, X., Liu, Y., Yang, L., Shi, X., Wang, H., Diao, R., & Zhong, B. (2022). Origin and evolution of green plants in the light of key evolutionary events. *Journal of integrative plant biology*, 64(2), 516–535. <https://doi.org/10.1111/jipb.13224>
- Zhou, D., Zhao, S., Zhou, H., Chen, J., & Huang, L. (2023). A lncRNA bra-miR156HG regulates flowering time and leaf morphology as a precursor of miR156 in *Brassica campestris* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*. 337, 111889. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111889>
- Zhou, Y., Yan, A., Han, H., Li, T., Geng, Y., Liu, X., & Meyerowitz, E. M. (2018). HAIRY MERISTEM with WUSCHEL confines CLAVATA3 expression to the outer apical meristem layers. *Science (New York, N.Y.)*, 361(6401), 502–506. <https://doi.org/10.1126/science.aar8638>
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53, 247–273. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329>

10 CARTA DE ACEPTACIÓN DEL ARTÍCULO

JOURNAL ARTICLE ACCEPTED MANUSCRIPT

A Synteny Conserved TATA Binding Protein 2-associated Long Intergenic Non-coding RNA Influences Leaf Development and ABA Response in *Arabidopsis thaliana* [Get access >](#)

Byanka Sthefany Espinoza-López, Jesús Nieto-Hernández, Ángel Eduardo Quezada Eguía, Susana Isabel Vargas Camacho, Jaime Aportela Cortez, José Luis Reyes, Catalina Arenas-Huertero ✉

Plant and Cell Physiology, pcag040, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcag040>

Published: 26 March 2026 **Article history** ▼