



Programa de Doctorado en Bioingeniería

**Funciones morfogénicas de los genes
ANU1, ANU4, ANU9, ANU12, SCA1, SCA5,
*ICU11 y CP2 de Arabidopsis***

Eduardo Mateo Bonmatí
Elche, 2018

**Funciones morfogénicas de los genes
ANU1, ANU4, ANU9, ANU12, SCA1, SCA5,
*ICU11 y CP2 de Arabidopsis***

Trabajo realizado por el Licenciado Eduardo Mateo Bonmatí, en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche, para optar al grado de Doctor.

Elche, 25 de junio de 2018

JOSÉ LUIS MICOL MOLINA, Catedrático de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche

HAGO CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y recoge fielmente la labor desarrollada por el Licenciado Eduardo Mateo Bonmatí para optar al grado de Doctor. Las investigaciones reflejadas en esta Tesis se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

José Luis Micol Molina

Elche, 25 de junio de 2018

JOSÉ MANUEL PÉREZ PÉREZ, Coordinador del Programa de Doctorado en Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche por Resolución Rectoral 0169/17, de 1 de febrero de 2017:

HACE CONSTAR:

Que da su conformidad a la presentación de la Tesis Doctoral de D. Eduardo Mateo Bonmatí, titulada “Funciones morfogenéticas de los genes *ANU1*, *ANU4*, *ANU9*, *ANU12*, *SCA1*, *SCA5*, *ICU11* y *CP2* de *Arabidopsis*”, que se ha desarrollado dentro del Programa de Doctorado en Bioingeniería bajo la dirección del profesor José Luis Micol Molina.

Lo que firmo en Elche, a instancias del interesado y a los efectos oportunos, a veinticinco de junio de dos mil dieciocho.



Profesor JOSÉ MANUEL PÉREZ PÉREZ
Coordinador del Programa de Doctorado en Bioingeniería

A mis padres

A Aida

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE TABLAS	II
I.- PREFACIO	1
II.- RESUMEN	3
III.- SUMMARY	5
IV.- INTRODUCCIÓN	7
IV.1.- Plan corporal y morfología foliar de la planta modelo Arabidopsis	7
IV.2.- Inducción e identificación de mutaciones en Arabidopsis.....	9
IV.3.- Relación entre la morfogénesis foliar y la traducción.....	10
IV.3.1.- Fenotipos mutantes asociados a la disfunción del ribosoma.....	10
IV.3.2.- Funciones morfogenéticas de los ribosomas	11
IV.4.- Epigenética vegetal	13
IV.4.1.- La maquinaria epigenética de las plantas	13
IV.4.2.- Los complejos represores Polycomb.....	15
IV.4.3.- Los genes <i>EMBRYONIC FLOWER</i>	18
IV.5.- Las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe ²⁺	18
IV.6.- Antecedentes y objetivos	21
IV.6.1.- Los mutantes <i>angulata</i>	21
IV.6.2.- Los mutantes <i>scabra</i>	22
IV.6.3.- Los mutantes <i>incurvata</i>	23
IV.6.4.- Objetivos de esta Tesis	26
V.- BIBLIOGRAFÍA DE LA INTRODUCCIÓN	27
VI.- MATERIALES Y MÉTODOS	41
VII.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	43
VII.1.- La combinación de la secuenciación masiva y el análisis de ligamiento facilita la identificación de las mutaciones que causan un fenotipo de interés en Arabidopsis	43
VII.2.- El ribosoma del cloroplasto contribuye a la polaridad dorsoventral de las hojas de Arabidopsis	44
VII.3.- Al menos dos de los genes de la familia CUPULIFORMIS codifican nuevos componentes de la maquinaria epigenética	44
VIII.- PUBLICACIONES	45
IX.- AGRADECIMIENTOS	155

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Arquitectura corporal, ciclo de vida y morfología e histología de las hojas de la roseta de <i>Arabidopsis</i>	8
Figura 2.- Fenotipo foliar de los mutantes <i>angulata</i>	22
Figura 3.- Fenotipo foliar de los mutantes <i>scabra</i>	23
Figura 4.- Fenotipo foliar de los mutantes <i>incurvata</i>	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Proteínas de la superfamilia de las 2OGD caracterizadas en <i>Arabidopsis</i>	20
--	----

I.- PREFACIO

I.- PREFACIO

Este documento se ha elaborado siguiendo la normativa de la Universidad Miguel Hernández de Elche para la “Presentación de Tesis Doctorales por compendio de publicaciones”. Se ha dividido en las partes siguientes:

- 1.- Un *Resumen* en español.
- 2.- Un *Summary* en inglés.
- 3.- Una *Introducción*, en la que se presenta el tema de la Tesis y los antecedentes y objetivos del trabajo realizado.
- 4.- Una *Bibliografía de la introducción*. Algunas de las referencias que incluye se repiten en las bibliografías de los artículos incluidos en esta memoria.
- 5.- Un resumen de los *Materiales y métodos* de las publicaciones de la Tesis.
- 6.- Un resumen de las *Conclusiones y perspectivas* del trabajo realizado.
- 7.- Un apartado de *Publicaciones*, que incluye las tres siguientes, en las que se indica el factor de impacto [FI] del año correspondiente, o el más reciente disponible.

Mateo-Bonmatí, E., Casanova-Sáez, R., Candela, H., y Micol, J.L. (2014). Rapid identification of *angulata* leaf mutations using next generation sequencing. *Planta* **240**, 1113-1122 (FI: 3,263).

Mateo-Bonmatí, E., Casanova-Sáez, R., Quesada, V., Hricová, A., Candela, H., y Micol, J.L. (2015). Plastid control of abaxial-adaxial patterning. *Scientific Reports* **5**, 15975 (FI: 5,228).

Mateo-Bonmatí, E., Esteve-Bruna, D., Juan-Vicente, L., Nadi, R., Candela, H., Ponce, M.R., Pérez-Pérez, J.M., y Micol, J.L. (2018). *INCURVATA11* and *CUPULIFORMIS2* are redundant genes that encode epigenetic machinery components in Arabidopsis. *Plant Cell*, doi:10.1105/tpc.18.00300 (FI: 8,726).

Los “Supplemental Data Sets” de este último artículo no se han incluido en esta memoria por su gran longitud. Las correspondientes hojas de cálculo se remitirán a los miembros del tribunal en formato electrónico.

II.- RESUMEN

II.- RESUMEN

En esta Tesis hemos sometido a análisis genético y molecular a varios mutantes foliares previamente aislados en el laboratorio de José Luis Micol, en el que habían sido asignados a las clases fenotípicas Angulata (Anu), Scabra (Sca) e Incurvata (Icu). Los mutantes *anu* presentan hojas de tamaño inferior al silvestre, parcialmente despigmentadas e indentadas. Las hojas de los mutantes *sca* son variegadas e indentadas y su haz y envés son irregulares. El limbo foliar de los mutantes *icu* se recurva hacia al haz.

Hemos contribuido a la caracterización de los mutantes *anu1-1*, *anu4*, *anu9-1*, *anu12*, *sca1*, *sca5* e *icu11-1*. La despigmentación parcial y la indentación de las hojas de los mutantes *anu* y *sca* nos condujo a considerarlos candidatos a padecer alguna disfunción del cloroplasto y potencialmente informativos sobre la relación entre la biogénesis de este orgánulo y el desarrollo foliar. La curvatura de las hojas de los mutantes *icu* indicó una alteración de la dorsoventralidad y sugirió su utilidad para el estudio del crecimiento de los tejidos dorsales (adaxiales) y ventrales (abaxiales) y/o su coordinación.

Todos los mutantes mencionados habían sido sometidos previamente a análisis del ligamiento a marcadores moleculares, que delimitó intervalos de 30-750 kb, candidatos a contener los genes causantes del fenotipo a estudio. Hemos caracterizado las mutaciones de dichos intervalos mediante secuenciación masiva, estrategia que nos ha permitido identificar los genes *ANU1*, *ANU4*, *ANU9*, *ANU12*, *SCA1* y *SCA5*. Hemos confirmado la identidad de estos genes mediante ensayos de alelismo y de complementación fenotípica mediada por transgenes portadores de los correspondientes alelos silvestres.

ANU1 es At1g21650, al que autores anteriores denominaron *SECRETIONA2* (*SECA2*), que codifica una proteína con actividad ATPasa localizada en el estroma de los cloroplastos; participa en el sistema Sec de importación de proteínas a los tilacoides. *ANU4* es At1g02280, que codifica TRANSLOCON AT THE OUTER ENVELOPE MEMBRANE OF CHLOROPLASTS 33 (TOC33), uno de los componentes del sistema TOC de la envoltura de los cloroplastos, que importa proteínas del citoplasma. *ANU9* es At5g14100, que codifica NON-INTRINSIC ABC PROTEIN 14 (NAP14), otro transportador de la envoltura del cloroplasto. *ANU12* es At1g49970, que codifica la subunidad CASEINOLYTIC PROTEASE RING 1 (ClpR1) del complejo Clp de degradación de proteínas del cloroplasto. Hemos empleado los mutantes *anu1*, *anu4*, *anu9* y *anu12* para contrastar la validez de la secuenciación masiva para identificar genes causantes de fenotipos de interés. No hemos considerado conveniente continuar su estudio, dado que los correspondientes cuatro genes habían sido caracterizados en mayor o menor medida por autores anteriores.

El ribosoma citoplásmico contribuye a la polaridad dorsoventral de las hojas de *Arabidopsis*. Son prueba de ello los alelos hipomorfos y nulos de varios genes que codifican proteínas ribosómicas, que incrementan la severidad de la ventralización causada por la insuficiencia de función de *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) y *AS2*; el complejo represor *AS1-AS2* es esencial para la especificación de la identidad de los tejidos dorsales de la hoja. Los dobles mutantes *sca1 as2* manifiestan un fenotipo sinérgico. Hemos establecido que *SCA1* es At2g33800, cuyo producto es RPS5, un componente de la subunidad menor del ribosoma del cloroplasto. Se demuestra así que el ribosoma del cloroplasto participa, como el citoplásmico, en la formación del patrón adaxial-abaxial. Por su parte, *SCA5* es At5g20040, que codifica la TRNA ISOPENTENYL TRANSFERASE 9 (*IPT9*), que participa en la síntesis de la cis-zeatina, una citoquinina.

Los mutantes foliares no solo son útiles para identificar genes específicamente implicados en la organogénesis de la hoja: también sirven para desentrañar los mecanismos de desarrollo que la hoja comparte con otros órganos de las plantas. Este ha sido el caso de *icu11-1*. En el laboratorio de J.L. Micol se concluyó antes del comienzo de esta Tesis que *icu11-1* (a) interacciona con alelos mutantes de genes que codifican componentes de la maquinaria epigenética, como *ICU1* (más conocido como *CURLY LEAF*; *CLF*) e *ICU2*, (b) causa la desrepresión ectópica y heterocrónica de genes de identidad floral en sus hojas, y (c) es un alelo de At1g22950, que codifica una presunta dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato y Fe^{2+} (*2OGD*).

Hemos establecido que *ICU11* pertenece a una familia de cinco genes de la superfamilia de las *2OGD*, a la que hemos llamado CUPULIFORMIS (*CP*). *ICU11* y *CP2*, su parálogo más próximo, son funcionalmente redundantes: los dobles mutantes *icu11 cp2* carecen de desarrollo vegetativo y florecen inmediatamente después de la germinación. Este fenotipo letal es muy similar al de los alelos de insuficiencia de función de *EMBRYONIC FLOWER 1* (*EMF1*) y *EMF2*, que codifican proteínas del grupo Polycomb con funciones epigenéticas conocidas. La secuenciación masiva del ARN de *icu11-1* ha revelado la desregulación de cientos de genes, algunos de los cuales modulan el desarrollo floral, como los de la familia MADS-box. La desrepresión de uno de estos últimos, *SEPALLATA3* (*SEP3*), causa la curvatura foliar de *icu11-1*. Hemos demostrado mediante secuenciación masiva del genoma de *icu11-1* tras su tratamiento con bisulfito e inmunoprecipitación de su cromatina que *ICU11* y *CP2* participan en la modificación química de las histonas, pero no en la metilación del ADN. El resultado más importante de esta Tesis es la identificación de una familia de componentes de la maquinaria epigenética cuya actividad parece distinta de las previamente descritas.

III.- SUMMARY

III.- SUMMARY

We studied *Arabidopsis* leaf mutants previously isolated in the laboratory of José Luis Micol, where these mutants had already been assigned to the *Angulata* (*Anu*), *Scabra* (*Sca*) and *Incurvata* (*Icu*) phenotypic classes. The *anu* mutants are smaller than the wild type, with pale-green leaves of prominent marginal teeth. Leaves from the *sca* mutants show variegation, dentate margins and irregular lamina surfaces. The *icu* mutants exhibit curly leaves.

Here, we contribute to the characterization of the *anu1-1*, *anu4*, *anu9-1*, *anu12*, *sca1*, *sca5* and *icu11-1* mutants. The marginal teeth and depigmentation shared by *anu* and *sca* leaves indicate defective photosynthesis and suggest that these mutants might be useful for the study of the relationship between chloroplast biogenesis and whole leaf organogenesis. Leaf hyponasty in the *icu* mutants indicates altered dorsoventrality and suggests their usefulness for the study of dorsal (adaxial) and ventral (abaxial) tissue growth, and/or their coordination.

All the mutations studied in this work had already been mapped by linkage analysis to molecular markers, which delimited candidate intervals ranging from 30 to 750 kb. We studied the mutations within these intervals by massive sequencing. This strategy allowed us to identify the *ANU1*, *ANU4*, *ANU9*, *ANU12*, *SCA1* and *SCA5* genes. We confirmed the correct identification of these genes through allelism tests and complementation mediated by transgenes carrying the corresponding wild-type alleles.

ANU1 was found to be At1g21650, already named *SECRETIONA2* (*SECA2*) by previous authors, which encodes a protein with ATPase activity, localized at the stroma of the chloroplasts, and involved in the Sec system, which imports proteins to the thylakoids. *ANU4* is At1g02280, which encodes the TRANSLOCON AT THE OUTER ENVELOPE MEMBRANE OF CHLOROPLASTS 33 (*TOC33*), one of the components of the TOC complex, which imports proteins from the cytoplasm. *ANU9* is At5g14100, which encodes NON-INTRINSIC ABC PROTEIN 14 (*NAP14*), another transporter in the chloroplast envelope. *ANU12* is At1g49970, which encodes CASEINOLYTIC PROTEASE RING1 (*ClpR1*), a component of the Clp complex for chloroplast protein degradation. We used the *anu1*, *anu4*, *anu9* and *anu12* mutants to test the validity of massive sequencing to identify causal genes for phenotypes of interest. Since these four genes have been characterized to different extents by previous authors, we decided not to continue their study.

The cytoplasmic ribosome participates in the dorsoventral patterning of *Arabidopsis* leaves, as shown by the hypomorphic or null alleles of several genes encoding ribosomal

proteins, which increase the severity of the ventralization caused by loss of function of *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) and *AS2*; the *AS1-AS2* repressor complex is essential for dorsal identity specification in leaf tissues. The *sca1 as2* double mutants exhibited a synergistic phenotype. We demonstrated that *SCA1* is At2g33800, whose product is RPS5, a component of the small subunit of the chloroplast ribosome. This is an unexpected discovery, since it indicates that not only the cytoplasmic ribosome, but also the chloroplast ribosome, is involved in dorsoventral pattern formation. On the other hand, *SCA5* is At5g20040, which encodes TRNA ISOPENTENYL TRANSFERASE 9 (*IPT9*), involved in the biosynthesis of cis-zeatin, a cytokinin.

Leaf mutants are not only useful for identifying genes specifically involved in leaf organogenesis but may also provide information on the developmental mechanisms that leaves share with other plant organs. This has been the case for *icu11-1*. Previous analyses performed in the laboratory of J.L. Micol concluded that *icu11-1* (a) genetically interacts with alleles of genes encoding components of the epigenetic machinery, such as *ICU1* (also known as *CURLY LEAF*; *CLF*) and *ICU2*, (b) causes the ectopic and heterochronic derepression of flower organ identity genes in leaves, and (c) is an allele of At1g22950, which encodes a putative 2-oxoglutarate and Fe²⁺-dependent dioxygenase (*2OGD*).

Here, we established that *ICU11* belongs to a five-member gene family of the *2OGD* superfamily, which we named *CUPULIFORMIS* (*CP*). *ICU11* and its closest paralog *CP2* are functionally redundant: the *icu11 cp2* double mutants skip vegetative development and flower immediately after germination. This lethal phenotype is reminiscent to that caused by loss-of-function alleles of *EMBRYONIC FLOWER 1* (*EMF1*) and *EMF2*, which encode Polycomb group proteins with known epigenetic functions. Massive sequencing of *icu11-1* RNA revealed the deregulation of hundreds of genes, some of which regulate flower development, such as those of the *MADS*-box family. Derepression of one of these genes, *SEPALLATA3* (*SEP3*), causes leaf hyponasty in *icu11-1* plants. Massive bisulfite sequencing and chromatin immunoprecipitation of *icu11-1* demonstrated that *ICU11* and *CP2* participate in histone chemical modification but not in DNA methylation. The most important result of this Thesis is the identification of a family of epigenetic machinery components whose activity seems different to those previously described.

IV.- INTRODUCCIÓN

IV.- INTRODUCCIÓN

IV.1.- Plan corporal y morfología foliar de la planta modelo *Arabidopsis*

La brassicácea *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (en adelante, *Arabidopsis*) carece de interés agronómico, a diferencia de otros miembros de su familia, como el rábano, la coliflor o la colza (Pang y Meyerowitz, 1987). Sin embargo, *Arabidopsis* es la planta a la que más atención ha dedicado la comunidad científica internacional (Provart *et al.* 2016); de hecho, según la base de datos Web of Science de Clarivate Analytics, son más de 133.000 los artículos que la mencionan (búsqueda realizada en 4 de mayo de 2018). A la aceptación generalizada de *Arabidopsis* como sistema modelo para el estudio de la biología de las plantas han contribuido su pequeño tamaño, ciclo de vida corto, autogamia y numerosa descendencia, así como la facilidad con que pueden realizarse cruzamientos y transgénesis por infección con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Meyerowitz, 1987; Pang y Meyerowitz, 1987; Koornneef y Meinke, 2010). Además, su genoma es sustancialmente más pequeño y presenta menos ADN repetitivo que los de las especies de uso preferente en la agricultura moderna (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

Los órganos aéreos de una planta adulta de *Arabidopsis* incluyen una roseta de hojas vegetativas de la que emergen un tallo principal y varios secundarios. Cada tallo genera una inflorescencia principal y varias secundarias o axilares, todas ellas con varias flores arracimadas en su región apical (Figura 1A, en la página 8). Las generaciones haploide (gametofítica) y diploide (esporofítica) se alternan dando lugar a tres fases en el ciclo de vida de esta planta: la gametogénesis, la embriogénesis y el desarrollo postembrionario (Figura 1B).

Arabidopsis presenta dos tipos de hojas: las de la roseta y las caulinares, que surgen de los nudos basales de cada rama de la inflorescencia. Las hojas de *Arabidopsis* son aplanadas y manifiestan tres ejes de polaridad: el proximodistal (de la base al ápice), que define el peciolo y el limbo, el mediolateral (de la vena primaria al margen), a lo largo del cual pueden distinguirse dos mitades relativamente simétricas, y el dorsoventral, ortogonal a los dos anteriores, que se manifiesta en la existencia de tejidos internos con características diferentes, y dos superficies externas, el haz y el envés (Figura 1C).

La epidermis de las hojas de *Arabidopsis* (Figura 1D) las aísla de su entorno a la vez que regula el intercambio de gases con el exterior (Becraft, 1999). Está compuesta mayoritariamente por células pavimentosas, de forma irregular y sin capacidad fotosintética. También son epidérmicos algunos histotipos especializados como los tricomas y los estomas (Johnson, 1975; Zhao y Sack, 1999).

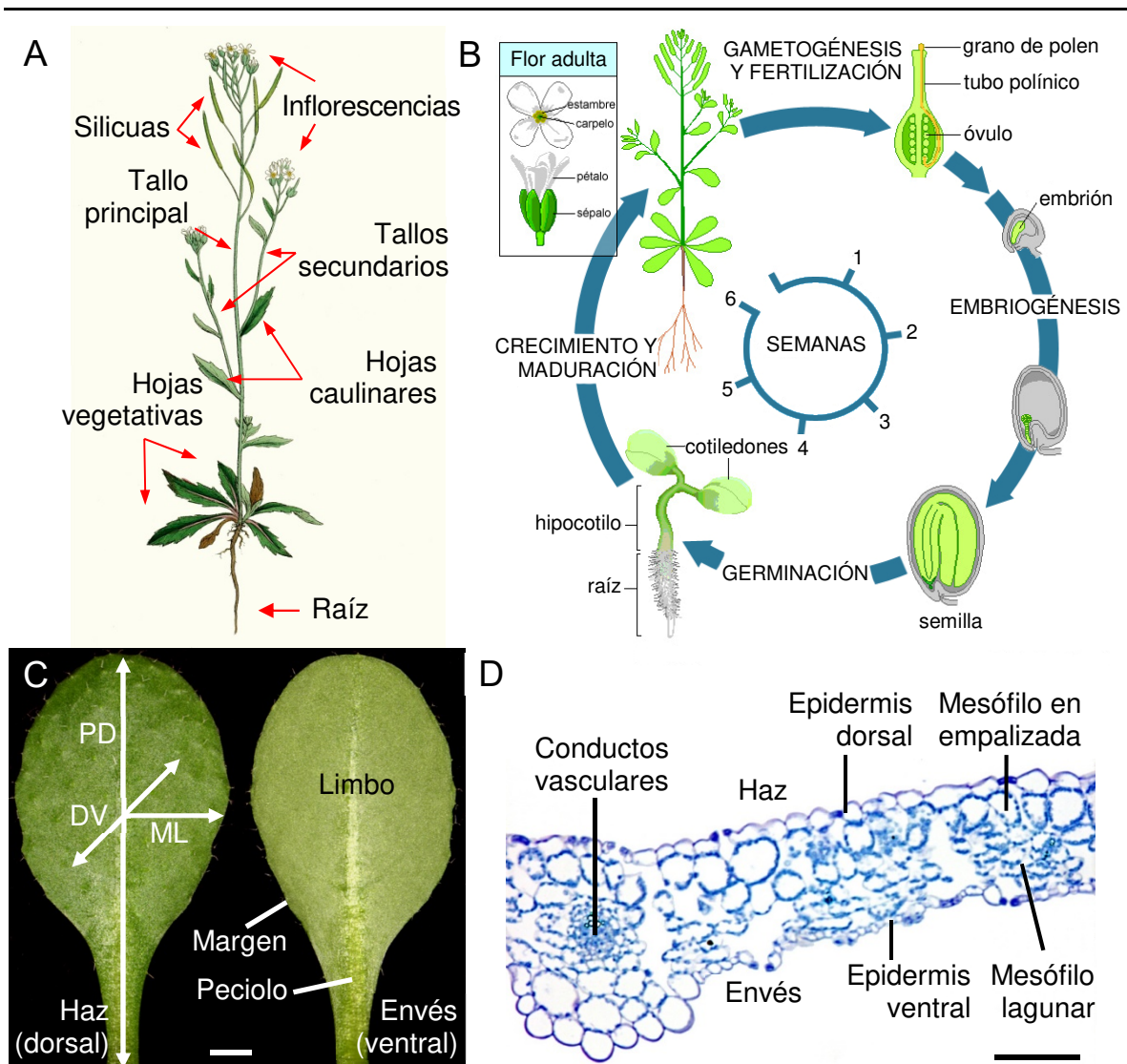


Figura 1.- Arquitectura corporal, ciclo de vida y morfología e histología de las hojas de la roseta de *Arabidopsis*. (A) Planta adulta. (B) Etapas del ciclo de vida. (C) Morfología foliar externa. Se muestran el haz (izquierda) y el envés (derecha) de una hoja del tercer nudo del acceso Landsberg *erecta*. PD: eje proximodistal. ML: eje mediolateral. DV: eje dorsoventral. (D) Corte transversal de una hoja vegetativa del primer nudo. Las barras de escala indican (C) 1 mm y (D) 100 μ m. Tomado de (A, B) Mollá Morales (2011), que a su vez lo modificó de (A) Sowerby y Smith (1813) y (B) http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB_Ch02/fig2_39.jpg, y (C, D) Jover Gil (2005).

El mesófilo en empalizada se yuxtapone a la epidermis dorsal e incluye una o dos capas de células fotosintéticas densamente empaquetadas. Completan los tejidos internos unas cuatro capas de mesófilo lagunar o esponjoso, cuyas células son más pequeñas e irregulares y están separadas por amplios espacios intercelulares, que facilitan la difusión de los gases. En la venación foliar de *Arabidopsis*, que atraviesa el mesófilo lagunar paralelamente a la epidermis, el xilema ocupa la parte dorsal, y el floema, la ventral. La

venación proporciona soporte mecánico a la hoja (Braybrook y Kuhlemeier, 2010) y transporta agua, hidratos de carbono y otros solutos (Turner y Sieburth, 2002).

IV.2.- Inducción e identificación de mutaciones en *Arabidopsis*

La disección genética clásica de la función de un gen se basa en el estudio del fenotipo causado por sus mutaciones (Parinov y Sundaresan, 2000; Page y Grossniklaus, 2002). Suele llamarse genética directa a los abordajes experimentales que se inician con una mutagénesis en la que el mutágeno empleado daña genes aleatoriamente, para a continuación aislar mutantes que manifiesten alteraciones en el proceso a estudio. En cada uno de dichos mutantes se debe identificar el gen causante del fenotipo de interés (Østergaard y Yanofsky, 2004). Esta aproximación permite identificar nuevos genes implicados en el proceso a estudio. Por el contrario, se habla de genética inversa cuando se altera de manera relativamente controlada la secuencia de un gen a estudio para estudiar sus efectos fenotípicos. Una de las variantes más recientes de este abordaje es la mutagénesis mediante el sistema CRISPR/Cas9 (Sander y Joung, 2014). La disponibilidad de las secuencias completas de numerosos genomas ha posibilitado la obtención de colecciones indexadas de mutantes, cuyas mutaciones radican en posiciones conocidas (Alonso y Ecker, 2006).

Se han empleado con éxito en *Arabidopsis* mutágenos físicos, como los rayos γ , X y ultravioleta, y los neutrones rápidos (Koornneef *et al.*, 1982), y químicos como la metil nitroso urea (MNU) (Relichová, 1976), y el metanosulfato de etilo (EMS; Kim *et al.*, 2006). El EMS es el mutágeno de elección preferente y alquila la guanina, transformándola en O-6-etilguanina, que es complementaria de la adenina en lugar de la citosina; de ahí que las mutaciones más frecuentemente causadas por este mutágeno sean las transiciones G/C \rightarrow A/T (Greene *et al.*, 2003).

La identificación del gen causante del fenotipo de un mutante de interés aislado tras una mutagénesis química se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante su análisis del ligamiento a marcadores moleculares, de posición previamente conocida en el genoma (Jander *et al.*, 2002). En la cartografía génica clásica los mutantes a estudio eran cruzados por un tipo silvestre distinto del sometido a los efectos del mutágeno. En la segunda generación filial (F₂) de dicho exocruzamiento se seleccionaba una población cartográfica integrada por individuos que manifestasen inequívocamente el fenotipo recesivo de interés, a fin de estudiar en cada uno de ellos el eventual ligamiento a marcadores moleculares.

Los últimos secuenciadores basados en la tecnología de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), en su versión semiautomatizada y fluorescente (Smith *et al.*, 1986), rendían 96

lecturas simultáneas, cada una de ellas de unos 1000 nucleótidos. Los secuenciadores masivos, por el contrario, están basados en diferentes tecnologías, que en la mayoría de los casos producen lecturas más cortas, 50-200 nucleótidos, pero en un número mucho mayor: decenas de millones. La secuenciación masiva se ha abaratado mucho a lo largo de la última década, propiciando avances en genómica comparada y evolutiva que eran inimaginables en el siglo XX (Metzker, 2010; Goodwin *et al.*, 2016).

La secuenciación masiva es la herramienta de elección preferente para la identificación de mutaciones, mediante abordajes que se han dado en llamar de cartografía mediante secuenciación (*mapping-by-sequencing*; Schneeberger *et al.*, 2009; James *et al.*, 2013; Candela *et al.*, 2015). La secuenciación masiva del ADN de una población cartográfica reduce considerablemente el gasto y el tiempo necesarios para identificar las mutaciones que causan un fenotipo mutante de interés.

La cartografía génica tradicional se basa en el análisis del ligamiento entre la mutación a estudio y algunas decenas de marcadores moleculares. Sin embargo, en algunas variantes de la cartografía mediante secuenciación se usan como marcadores las decenas de miles de polimorfismos de un solo nucleótido existentes entre estirpes silvestres, o los centenares de mutaciones puntuales que han sido inducidas por el mutágeno empleado pero no contribuyen de manera perceptible al fenotipo a estudio (Hartwig *et al.*, 2012; Minevich *et al.*, 2012; Allen *et al.*, 2013). También se denomina cartografía mediante secuenciación al uso de la secuenciación masiva para la identificación de mutaciones cuyo análisis de ligamiento ha delimitado previamente una región candidata (Marti *et al.*, 2010; Tabata *et al.*, 2013).

IV.3.- Relación entre la morfogénesis foliar y la traducción

IV.3.1.- Fenotipos mutantes asociados a la disfunción del ribosoma

Los ribosomas son complejos macromoleculares compuestos por ARN ribosómico (ARNr) y proteínas ribosómicas, que catalizan la síntesis de polipéptidos. El ribosoma citoplásmico eucariótico (80S, por su coeficiente de sedimentación), está formado por una subunidad mayor (60S), que incluye hasta 47 proteínas ribosómicas (RPL, Ribosomal Protein of Large subunit) y 3 ARN ribosómicos (ARNr 5S, 5,8S y 25S en las plantas o 28S en los animales) y otra menor (40S), con hasta 33 proteínas ribosómicas (RPS, Ribosomal Protein of Small subunit) y un ARNr (18S) (Wilson y Doudna Cate, 2012). Las plantas cuentan además con dos tipos de ribosomas organulares (70S): el mitocondrial y el cloroplástico, que traducen los ARN mensajeros (ARNm) de los genes de estos orgánulos. Estos ribosomas 70S están formados por una subunidad mayor (50S), que incluye 3 ARNr

(4,5S, 5S y 23S) y 33 proteínas, y una menor (30S), con 24 proteínas y un ARNr (16S) (Tiller y Bock, 2014; Greber y Ban, 2016). El análisis cristalográfico de los ribosomas ha permitido conocer en detalle su estructura (Ban *et al.*, 2000; Ben-Shem *et al.*, 2011).

Se han identificado decenas de mutaciones en genes de *Arabidopsis* que codifican proteínas del ribosoma citoplásmico. Aunque algunas son letales, la mayoría causa un fenotipo pleiotrópico similar: los mutantes presentan hojas apuntadas (Van Lijsebettens *et al.*, 1994; Byrne, 2009; Creff *et al.*, 2010; Van Minnebruggen *et al.*, 2010; Horiguchi *et al.*, 2011; Szakonyi y Byrne, 2011; Stirnberg *et al.*, 2012; Casanova-Sáez *et al.*, 2014) y una disminución del tamaño final y/o la velocidad de crecimiento de la planta (Creff *et al.*, 2010), como consecuencia de una proliferación celular reducida (Horiguchi *et al.*, 2011).

Se han estudiado alelos insercionales de 26 de los 36 genes nucleares que codifican proteínas del ribosoma del cloroplasto (Tiller y Bock, 2014), 17 de las cuales resultaron ser esenciales para el desarrollo embrionario (Ma y Dooner, 2004; Bryant *et al.*, 2011; Romani *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2013; Tiller y Bock, 2014). La insuficiencia de función de los 9 genes restantes causa palidez en los mutantes, reducción de su tamaño y pérdida de la capacidad fotosintética (Pesaresi *et al.*, 2001; Morita-Yamamuro *et al.*, 2004; Romani *et al.*, 2012; Tiller y Bock, 2014; Robles *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). El ribosoma mitocondrial es el menos estudiado en las plantas, habiéndose caracterizado alelos de los genes nucleares que codifican tres de sus proteínas, que han resultado ser esenciales para la gametogénesis y la fertilización (Portereiko *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2017; Robles y Quesada, 2017).

IV.3.2.- Funciones morfogenéticas de los ribosomas

Se ha asumido durante décadas que la función del ribosoma es meramente doméstica: la traducción de proteínas. Dado que la traducción parece en principio igualmente necesaria para casi todas las células, no cabe esperar fenotipos específicos de órgano o tejido asociados a las mutaciones en genes que codifican componentes estructurales del ribosoma (Chakraborty y Kenmochi, 2012). La primera evidencia de que el ribosoma participa en el control de procesos de desarrollo en *Arabidopsis* la aportó el estudio del mutante *pointed first leaves* (*pfl*; Van Lijsebettens *et al.*, 1994). Las plantas *pfl* mostraban alteraciones morfológicas en un órgano concreto, la hoja, cuyos márgenes eran indentados, además de un crecimiento lento. La expresión de *PFL* no parecía generalizada, sino restringida a regiones de alta proliferación celular como los meristemos apical, radicular y florales, así como a los primordios foliares.

Los genes *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* y *AS2* codifican proteínas reguladoras que pertenecen a las familias MYELOBLASTOSIS (MYB) y LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB), respectivamente (Byrne *et al.*, 2000; Iwakawa *et al.*, 2002) y participan en el establecimiento del eje dorsoventral (adaxial-abaxial) de la hoja (Pinon *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2008; Husbands *et al.*, 2015). Las combinaciones dobles de alelos de *AS1* o *AS2* con los de algunos de los genes que codifican proteínas ribosómicas rinden fenotipos sinérgicos. Las hojas de estos dobles mutantes están ventralizadas, lo que sugiere que las proteínas ribosómicas son necesarias para determinar la identidad dorsal durante el desarrollo foliar.

El proteoma del cloroplasto incluye unas 3.000 proteínas, casi todas ellas codificadas por genes nucleares (Timmis *et al.*, 2004). La señalización entre el núcleo y el cloroplasto es anterógrada (del núcleo al cloroplasto; Taylor, 1989) y retrógrada (del cloroplasto al núcleo; Goldschmidt-Clermont, 1998). Un ejemplo de señalización anterógrada es el control de la transcripción de los genes del cloroplasto, que es llevada a cabo por dos tipos de ARN polimerasas distintas, una de las cuales es el producto de un gen nuclear: la Nuclear Encoded RNA Polymerase (NEP). La segunda polimerasa es el producto de un gen del cloroplasto: la Plastid Encoded RNA Polymerase (PEP). La NEP transcribe los genes que codifican las subunidades de la PEP, y esta, a su vez, transcribe los genes del cloroplasto relacionados con la fotosíntesis. En consecuencia, la actividad de la PEP requiere la actuación previa de la NEP (Pfannschmidt *et al.*, 2015).

La señalización retrógrada regula la expresión de genes nucleares en respuesta al estado metabólico de la célula o el desarrollo del cloroplasto (Koussevitzky *et al.*, 2007). Uno de los contribuyentes principales a la señalización retrógrada es *GUN1 (GENOMES UNCOUPLED 1; Koussevitzky et al., 2007; Tadini et al., 2016)*, que codifica una proteína con repeticiones del motivo pentatricopéptido (PPR), localizada en los nucleoides de los cloroplastos y de función desconocida. Se han realizado búsquedas de interactores de GUN1 mediante coimmunoprecipitación de proteínas (Colombo *et al.*, 2016; Tadini *et al.*, 2016). Los resultados así obtenidos sugieren que GUN1 es un regulador maestro de la homeostasis de las proteínas de los cloroplastos. En efecto, GUN1 interacciona (1) con proteínas de la maquinaria transcripcional del cloroplasto, como pTAC6, que a su vez se une a la PEP, (2) con proteínas del ribosoma del cloroplasto, como RPS3, RPS4 y RPL2, o con reguladores de la iniciación de la traducción del cloroplasto, como PRPS1, y (3) con chaperonas de la maquinaria de importación desde el citoplasma, plegado y degradación de proteínas, como Hsp93 o Hsp70 (Colombo *et al.*, 2016; Tadini *et al.*, 2016).

Se han descrito alelos mutantes de genes nucleares que codifican proteínas del cloroplasto que no solo alteran la biogénesis del cloroplasto sino también el desarrollo del mesófilo, tanto en *Arabidopsis* como en otras plantas. Son ejemplos de ello los mutantes *pale cress* de *Arabidopsis* (*pac*; Reiter *et al.*, 1994) o *defective chloroplasts and leaves-mutable* de *Solanum lycopersicum* (*dcl-m*; Keddie *et al.*, 1996), en cuyos cloroplastos la traducción está reducida; *rugosa2* (*rug2*; Quesada *et al.*, 2011) y *angulata7* (*anu7*; Muñoz-Nortes *et al.*, 2017) de *Arabidopsis*, cuyos fenotipos se deben a la insuficiencia de función de un factor de terminación de la transcripción (mTERF) de los genes del genoma del cloroplasto y una proteína de la familia de las DnaJ que se requiere para la correcta expresión de algunos genes *pTAC*, respectivamente; y *dag* (Chatterjee *et al.*, 1996) de *Antirrhinum majus*, que carece de una proteína de función desconocida necesaria para la expresión del gen de la subunidad beta de la ARN polimerasa del cloroplasto. El tratamiento del tipo silvestre Col-0 con antibióticos como la lincomicina o la eritromicina, que inhiben específicamente la maquinaria traduccional del cloroplasto, rinde fenocopias de los mutantes *anu7* y *pac* (Mulo *et al.*, 2003; Tameshige *et al.*, 2013). Se asume que la formación del patrón dorsoventral de las hojas de *Arabidopsis* también depende del buen funcionamiento del cloroplasto y de su comunicación con el núcleo, mediada por *GUN1* (Tameshige *et al.*, 2013).

IV.4.- Epigenética vegetal

IV.4.1.- La maquinaria epigenética de las plantas

El desarrollo de los mamíferos es fundamentalmente embrionario. Por el contrario, las plantas generan nuevos órganos a lo largo de todo su ciclo de vida, a partir de poblaciones de células troncales conocidas como meristemas. Dado que las plantas son sésiles, deben adaptarse a los cambios de su entorno. Necesitan para ello integrar durante todo su ciclo de vida diferentes señales externas como las de los estreses bióticos y abióticos o los cambios en el fotoperiodo y la temperatura (Pikaard y Mittelsten Scheid, 2014; Annacondia *et al.*, 2018).

Se ha demostrado en algunos casos que la modulación de la expresión de grupos de genes en respuesta a estímulos ambientales obedece a controles epigenéticos. Se han descrito en las plantas todos los mecanismos epigenéticos conocidos en otros eucariotas, como la modificación química del ADN y las histonas y la remodelación de la cromatina. La metilación de las citosinas, por ejemplo, está asociada a la represión estable y heredable de la expresión de los genes eucarióticos. Es esencial, por ejemplo, para la inactivación del cromosoma X o la impronta génica en los mamíferos terios (Li y Zhang, 2014), en los

que se da casi exclusivamente en los dinucleótidos CG. Este tipo de metilación es también el mayoritario en las plantas, en las que también se observa en otras citosinas (Law y Jacobsen, 2010). Se ha demostrado la relación entre la metilación del ADN de las plantas y el silenciamiento de algunos elementos transponibles (Vongs *et al.*, 1993; Gendrel *et al.*, 2002), el control del momento de la floración (Finnegan *et al.*, 2000) y las respuestas hormonales y al estrés biótico (Downen *et al.*, 2012).

Existen mecanismos de control de la expresión génica y la estructura de la cromatina mediados por pequeños ARN, como los microARN (miARN) o los ARN pequeños interferentes (ARNpi) (Holoch y Moazed, 2015). Estas moléculas no solo inhiben la expresión de sus ARNm diana obstaculizando su traducción o induciendo su degradación, sino que también son importantes para el ensamblaje de la cromatina y el mantenimiento de su estructura. Constituye un ejemplo de ello la metilación del ADN dirigida por ARN (RNA-directed DNA Methylation; RdDM). Este fenómeno se observó por primera vez en plantas de tabaco infectadas con viroides y está asociado al silenciamiento de la transcripción de los transposones, de los retrovirus y de las regiones altamente repetitivas del genoma (Wassenegger *et al.*, 1994; Pikaard y Mittelsten Scheid, 2014; Martínez *et al.*, 2016).

Las modificaciones químicas reversibles que sufren algunos residuos de lisina o arginina en las colas aminoterminales de las histonas modulan la expresión génica. Estas modificaciones epigenéticas incluyen la sumoilación (Cubeñas-Potts y Matunis, 2013), la fosforilación (Houben *et al.*, 2007) y la ubiquitinación (Berr *et al.*, 2011), aunque las más estudiadas son la acetilación y la metilación. La actividad de las acetiltransferasas de histonas (Histone Acetyltransferases; HAT) está generalmente asociada a la activación de la expresión génica y puede ser revertida por las desacetilasas de histonas (Histone Deacetylases; HDAC) (Marmorstein y Zhou, 2014). Algunas lisinas de las histonas pueden ser metiladas reversiblemente. Estas marcas epigenéticas pueden ser represoras o activadoras en función de la posición del residuo metilado y su número de metilos.

Las enzimas que metilan a las lisinas de las histonas (Histone lysine methyltransferase; HKMT) presentan un dominio Su(var)/E(z)/trx (SET; Cheng, 2014). Algunas de las proteínas de los grupos Polycomb (Polycomb group; PcG) o trithorax (trithorax group; trxG) presentan el dominio SET (Grossniklaus y Paro, 2014) y participan en el control de la expresión de miles de genes en las plantas y los animales (apartado IV.5, en la página 18). La primera desmetilasa de histonas, lysine-specific demethylase 1 (LSD1; Shi *et al.*, 2004) fue descrita en *Schizosaccharomyces pombe*. Se conocen dos tipos de desmetilasas de histonas de *Arabidopsis*: las homólogas de LSD1 y las que

contienen el dominio carboxiterminal Jumonji (JmjC; apartado IV.5, en la página 18; Lu *et al.*, 2008). Aunque se considera homólogas de LSD1 a las proteínas FLOWERING LOCUS D (FLD), LSD1-LIKE1 (LDL1), LDL2 y LDL3 de Arabidopsis, solo se ha demostrado la actividad desmetilasa de LDL1 (Jiang *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Spedaletti *et al.*, 2008). Sin embargo, la actividad desmetilasa de 9 de las 21 proteínas JmjC de Arabidopsis está ampliamente probada.

La fertilización, la formación de la semilla y las respuestas a diferentes tipos de estrés son ejemplos de procesos regulados epigenéticamente en Arabidopsis. Tras la fertilización, DEMETER (DME) lleva a cabo una desmetilación generalizada del ADN del endospermo (Wang y Köhler, 2017). La respuesta de la planta contra patógenos como *Pseudomonas syringae* conlleva la metilación del ADN y la actuación de componentes de la maquinaria de la RdDM, como ARGONAUTE4 (AGO4) y la RNA polimerasa V (Annacondia *et al.*, 2018).

IV.4.2.- Los complejos represores Polycomb

Los genes del grupo Polycomb (Polycomb group; PcG) fueron descritos por primera vez en *Drosophila melanogaster* por su papel represor de la expresión de algunos genes homeóticos, como *Ultrabithorax* (Lewis, 1978). Las proteínas del PcG forman parte de dos complejos represores, denominados Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) y PRC2 (Lanzuolo y Orlando, 2012).

El PRC2 de *Drosophila melanogaster* incluye cuatro proteínas: Extra sex combs (Esc), Enhancer of zeste [E(z)], Suppressor of zeste 12 [S(z)12] y p55 (también conocida como Nucleosome-remodeling factor 55; Nuf55). Las proteínas del PRC2 de *Drosophila melanogaster* están muy conservadas, habiéndose descrito sus ortólogas en los mamíferos y las plantas. Arabidopsis cuenta con tres homólogas de E(z), tres de Su(z)12, una de Esc y cinco de p55: CURLY LEAF (CLF; Goodrich *et al.*, 1997), MEDEA (MEA; Grossniklaus *et al.*, 1998) y SWINGER (SWN; Chanvivattana *et al.*, 2004); FERTILIZATION INDEPENDENT SEED2 (FIS2; Luo *et al.*, 1999), VERNALIZATION2 (VRN2; Gendall *et al.*, 2001) y EMBRYONIC FLOWER2 (EMF2; Yoshida *et al.*, 2001); FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE; Ohad *et al.*, 1999); y MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1), MSI2, MSI3, MSI4 y MSI5 (Hennig *et al.*, 2005). Solo de una de las proteínas MSI, MSI1, se ha demostrado que forma parte del PRC2 (Derkacheva *et al.*, 2013).

El PRC1 está menos conservado entre las plantas y los animales que el PRC2. Forman parte del PRC1 de *Drosophila melanogaster* las proteínas Polycomb (Pc),

Polyhomeotic (Ph), Sex combs extra (Sce; también conocida como dRing1) y las parálogas Posterior sex combs (Psc) y Su(z)2 (Shao *et al.*, 1999; Francis *et al.*, 2001; Saurin *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2004). Se han identificado en *Arabidopsis* tres ortólogas de Psc y Su(z)2 y dos de Sce: BMI1A, BMI1B y BMI1C (Bratzel *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Bratzel *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; Calonje, 2014), y RING1A y RING1B (Sanchez-Pulido *et al.*, 2008; Xu y Shen, 2008; Chen *et al.*, 2010; Calonje, 2014). EMF1 y LIKE-HETEROCHROMATIN1 (LHP1, también denominada TERMINAL FLOWER2; TFL2) de *Arabidopsis* fueron inicialmente consideradas componentes del PRC1 (Gaudin *et al.*, 2001; Calonje *et al.*, 2008; Beh *et al.*, 2012). Al igual que la proteína Pc de *Drosophila melanogaster*, LHP1 tiene un cromodominio que media su unión a la variante de la histona H3 cuya lisina 27 está trimetilada (H3K27me3; Turck *et al.*, 2007). Además, tanto EMF1 como LHP1 interaccionan físicamente con las subunidades RING1 y BMI1 del PRC1 (Bratzel *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010). Sin embargo, también se ha demostrado la interacción de EMF1 y LHP1 con componentes del PRC2 (Derkacheva *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2015).

El PRC2 presenta actividad metiltransferasa: cataliza la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3, creando la marca represora H3K27me3 (Schubert *et al.*, 2006). Existen diferentes PRC2, específicos de determinadas etapas del desarrollo, que son resultado de las combinaciones alternativas de sus subunidades parálogas (Derkacheva y Hennig, 2014). Por su parte, el PRC1 tiene actividad ligasa E3 de ubiquitina; cataliza la ubiquitinación de la lisina 121 de la histona H2A, creando la marca represora H2AK121ub. La actuación conjunta de los dos PRC sobre sus genes diana fue inicialmente descrita en *Drosophila melanogaster* y *Mus musculus* (Picó *et al.*, 2015; Colombo *et al.*, 2016). Se supuso que la represión de la transcripción por los PRC era un proceso de dos etapas, en el que actuaba en primer lugar el PRC2, generando la marca H3K27me3, que era a continuación reconocida por el PRC1, que a su vez creaba la marca H2AK121ub (Wang *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha establecido recientemente que el reclutamiento del PRC1 ocurre en algunos casos en ausencia de la marca H3K27me3 (Blackledge *et al.*, 2015), así como que la ubiquitinación de H2AK121 no es en todos los casos posterior a la trimetilación de H3K27 (Zhou *et al.*, 2017), e incluso que el PRC2 puede ser reclutado por el PRC1 (Yang *et al.*, 2013; Blackledge *et al.*, 2014; Cooper *et al.*, 2014; Kalb *et al.*, 2014).

Las proteínas del PcG están implicadas en varios procesos esenciales para el desarrollo vegetal, como el mantenimiento de la pluripotencia de las células de los meristemas. Durante la etapa vegetativa del ciclo de vida de *Arabidopsis*, la identidad meristemática de las células del meristemo apical del tallo depende de la expresión de

WUSCHEL (*WUS*), que codifica un factor de transcripción con Homeobox. La formación de los órganos florales requiere la represión de *WUS*, que es llevada a cabo por proteínas del PcG como CLF, EMF2 y TFL2 (Liu *et al.*, 2011). La identidad meristemática de las células del meristemo radicular depende de la actividad de *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5* (*WOX5*) y los genes de la familia MADS-box *AGAMOUS-LIKE21* (*AGL21*) y *AGL42*. La represión de estos genes en los primordios de los órganos que se forman a partir de los meristemas es consecuencia de la deposición de marcas H3K27me3 llevada a cabo por CLF (Aichinger *et al.*, 2011).

Las proteínas del PcG no solo participan en la organogénesis, sino también en las respuestas a estímulos ambientales como la vernalización o la dormancia de la semilla (de la Paz Sanchez *et al.*, 2015). Se denomina vernalización a la inducción de la floración por exposición prolongada a bajas temperaturas (Lang, 1965), proceso que facilita que la planta inicie su etapa reproductiva en condiciones favorables, una vez finalizado el invierno. La inducción de la floración de *Arabidopsis* depende de *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) y *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*) (Blázquez y Weigel, 2000; Simpson y Dean, 2002), genes que son reprimidos durante la fase vegetativa del ciclo de vida de la planta por *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), que codifica un factor de transcripción de la familia MADS-box. La vernalización depende de la represión de *FLC* por el PRC2, que a su vez causa la expresión de *FT* y *SOC1*, que inducen la floración (Samach *et al.*, 2000; Gendall *et al.*, 2001).

Se denomina dormancia a la inhibición temporal de la germinación de la semilla. La dormancia se induce durante las primeras etapas de la maduración de la semilla, a fin de que la germinación ocurra en condiciones óptimas de temperatura, luz y humedad (Nonogaki, 2014). Uno de los reguladores más importantes de la dormancia es *DELAY OF GERMINATION 1* (*DOG1*), que codifica un factor de transcripción específico de las plantas (Alonso-Blanco *et al.*, 2003; Bentsink *et al.*, 2006). La germinación requiere la represión de *DOG1*, que es llevada a cabo por proteínas del PcG como FIE, BMI1A, BMI1B y CLF (Bouyer *et al.*, 2011; Molitor *et al.*, 2014).

Dado el papel de los PRC en la organogénesis y que inicialmente no se encontraron ortólogos de sus componentes en eucariotas unicelulares como *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*, se propuso que estos complejos eran exclusivos de los eucariotas pluricelulares (Lachner *et al.*, 2004; Veerappan *et al.*, 2008). Sin embargo, se han hallado posteriormente complejos homólogos a los PRC en algunos eucariotas unicelulares como *Chlamydomonas reinhardtii* o *Cryptococcus neoformans* (Shaver *et al.*, 2010; Dumesic *et al.*, 2015).

IV.4.3.- Los genes *EMBRYONIC FLOWER*

Se han obtenido alelos mutantes de los genes que codifican todas las subunidades conocidas de los PRC de Arabidopsis. Los que codifican algunas subunidades del PRC2, como MSI1, FIS2, FIE y MEA, son esenciales para el desarrollo embrionario. La letalidad de sus alelos no ha propiciado el estudio los efectos de su insuficiencia de función en etapas postembrionarias del desarrollo (Grossniklaus *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1999; Ohad *et al.*, 1999; Hennig *et al.*, 2003). Por el contrario, algunas subunidades de los PRC son redundantes, como CLF y SWN (Chanvivattana *et al.*, 2004), BMI1A, BMI1B y BMI1C (Yang *et al.*, 2013) o RING1A y RING1B (Chen *et al.*, 2010). Como consecuencia de dicha redundancia, muchos alelos mutantes de genes del PcG de Arabidopsis carecen de manifestación fenotípica, a excepción de los de *CLF* y *LHP1*, que causan fenotipos pleiotrópicos relativamente débiles cuyos rasgos más patentes son la floración temprana y la hiponastia foliar (Goodrich *et al.*, 1997; Larsson *et al.*, 1998).

Casi todos los alelos de los genes del PcG *EMBRYONIC FLOWER1 (EMF1)* y *EMF2* causan letalidad postembrionaria. Las plántulas homocigóticas para sus alelos nulos carecen de hojas vegetativas, presentando cotiledones aberrantes y estructuras florales que se forman inmediatamente después de la germinación (Sung *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1995). El fenotipo de los mutantes *emf1* y *emf2* demuestra la importancia de las proteínas EMF1 y EMF2, y de los complejos a los que pertenecen, en la represión de los programas de desarrollo floral durante la fase vegetativa. Aunque se han descrito muchas mutaciones en genes de la maquinaria epigenética de Arabidopsis, ninguna de ellas causa un fenotipo similar a los de los mutantes *emf1* y *emf2*, que solo se ha observado en algunos mutantes múltiples y líneas transgénicas: los dobles mutantes *clf swn* y *ring1a ring1b*, los triples *bmi1a bmi1b bmi1c* (Chanvivattana *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2010; Picó *et al.*, 2015) y las líneas en las que se sobreexpresa el gen *RELATIVE EARLY FLOWERING 6 (REF6)* (Lu *et al.*, 2011), que codifica una desmetilasa de H3K27me2/me3 de tipo JmjC.

IV.5.- Las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe²⁺

La segunda superfamilia más numerosa de enzimas del proteoma vegetal es la de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe²⁺ (2-oxoglutarate and iron dependent dioxygenases; 2OGD) (Kawai *et al.*, 2014). Las 2OGD catalizan reacciones oxidativas de diferentes tipos: hidroxilación, desmetilación, desaturación, epimerización, halogenación y apertura y cierre de anillos (Farrow y Facchini, 2014). Un análisis *in silico* de la secuencia de 479 2OGD de seis especies vegetales distintas concluyó que pueden ser agrupadas en tres clases, a las que se denominó DOXA, DOXB y DOXC (Kawai *et al.*, 2014).

Las 2OGD de la clase DOXA son homólogas de la Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase B (AlkB) de *Escherichia coli*. Las enzimas AlkB se inducen en respuesta a los daños causados al ADN por agentes alquilantes y catalizan la desalquilación oxidativa de ácidos nucleicos (Kataoka y Sekiguchi, 1985; Falnes *et al.*, 2002; Trewick *et al.*, 2002; Mielecki *et al.*, 2012) e histonas (se ha descrito solo un caso, en *Schizosaccharomyces pombe*; Korvald *et al.*, 2011). Se han identificado en Arabidopsis 14 proteínas homólogas de las AlkB bacterianas (Kawai *et al.*, 2014), solo tres de las cuales han sido caracterizadas en detalle (Tabla 1, en la página 20). La metilación en la posición N⁶ de las adenosinas del ARN es un mecanismo de regulación postranscripcional en los eucariotas y sus virus (Wang *et al.*, 2014). Estas modificaciones químicas son abundantes en el ARNm y también se han encontrado en los ARN transferentes (ARNt), los ARN ribosómicos (ARNr), los ARNpi y los ARN largos no codificantes (Dominissini *et al.*, 2012). La ALKBH9B es una desmetilasa de ARN, cuya actuación sobre el ARN del virus del mosaico de la alfalfa modula la respuesta inmune de Arabidopsis ante la infección viral; no se ha demostrado su actividad desmetilasa sobre algún ARN endógeno de la planta (Martínez-Pérez *et al.*, 2017). La ALKBH10B es una desmetilasa del ARNm de Arabidopsis, que desmetila a centenares de transcritos distintos, entre ellos el de *FT* (Duan *et al.*, 2017). Por su parte, la ALKBH8A participa en la hidroxilación de la 5-metoxicarbonilmetiluridina, una de las modificaciones químicas que la uridina 34 del ARNt^{Gly} experimenta, que son necesarias para la traducción (Leihne *et al.*, 2011).

La clase DOXB incluye 14 proteínas de Arabidopsis, que presentan una variante del dominio 2OGD denominada prolil-4-hidroxilasa (P4H; Kawai *et al.*, 2014). Solo se han estudiado en Arabidopsis tres miembros de la clase DOXB, implicadas en la modificación postraduccional de las extensinas, proteínas de la pared celular ricas en prolina, cuya hidroxilación es esencial para el desarrollo de los pelos radiculares (Velasquez *et al.*, 2015; Tabla 1).

La clase más numerosa de las 2OGD de Arabidopsis es la que incluye unas 100 enzimas DOXC, que intervienen en la biosíntesis y degradación de hormonas y otros metabolitos (Kawai *et al.*, 2014). Al menos 16 proteínas DOXC (revisado en Yamaguchi, 2008; Tabla 1) participan en la síntesis y degradación de las giberelinas, fitohormonas que regulan diversos procesos como la germinación, la elongación del tallo, la expansión foliar o el desarrollo de la flor y la semilla (Phillips, 1998). También están implicadas en la síntesis de las estrigolactonas (Brewer *et al.*, 2016), los flavonoides (Falcone-Ferreira *et al.*, 2015) o la escopoletina (Kai *et al.*, 2008). Algunas DOXC participan en la inactivación por oxidación de la auxina (Porco *et al.*, 2016) y el ácido jasmónico (Caarls *et al.*, 2017).

Tabla 1.- Proteínas de la superfamilia de las 2OGD caracterizadas en *Arabidopsis*

Gen	Proteína	Función
AT1G31600	ALKYLATION REPAIR HOMOLOGS 8A (ALKBH8A) ^a	Desmetilación de nucleósidos del ARNt
AT2G17970	ALKBH9B ^b	Desmetilación de adenosinas del ARN
AT4G02940	ALKBH10B ^c	Desmetilación de adenosinas del ARNm
AT3G06300	PROLYL 4-HYDROXYLASE 2 (P4H2) ^d	Hidroxilasa de prolina en proteínas de la pared celular
AT2G17720	P4H5 ^d	
AT2G23096	P4H13 ^d	
AT1G14130	DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION 1 (DAO1) ^e	Oxidación de auxina
AT1G14120	DAO2 ^e	Oxidación de auxina
AT5G24530	DOWNY MILDEW RESISTANT 6 (DMR6) ^f	Síntesis de flavonoides
AT1G55290	FERULOYL-CoA 6'-HYDROXYLASE (F6H2) ^g	Síntesis de escopoletina
AT1G15550	GIBBERELLIN 3 BETA-HYDROXYLASE 1 (GA3ox1) ^h	Síntesis de giberelinas
AT1G60980	GIBBERELLIN 20-OXIDASE 4 (GA20ox4) ⁱ	Degradación de giberelinas
AT1G50960	GIBBERELLIN 2-OXIDASE 7 (GA2ox7) ^j	Degradación de giberelinas
AT3G21420	LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE (LBO) ^k	Síntesis de estrigolactonas
AT5G04240	JMJ11/EARLY FLOWERING 6 (ELF6) ^l	Desmetilación de H3K27me2/me3
AT3G48430	JMJ12/RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6) ^m	Desmetilación de H3K27me2/me3
AT4G20400	JMJ14 ⁿ	Desmetilación de H3K4me1/me2/me3
AT2G34880	JMJ15/MATERNAL EFFECT EMBRYO ARREST 27 (MEE27) ^o	Desmetilación de H3K4me3
AT1G30810	JMJ18 ^p	Desmetilación de H3K4me2/me3
AT5G63080	JMJ20 ^q	Desmetilación de H3R2me2 y H4R3me1/me2
AT1G09060	JMJ24 ^r	Ubiquitinación de CMT3 para su degradación
AT3G07610	JMJ25/INCREASE IN BONSAI METHYLATION1 (IBM1) ^s	Desmetilación de H3K9me
AT4G00990	JMJ27 ^t	Desmetilación de H3K9me1/me2
AT3G20810	JMJ30 ^u	Desmetilación H3K27me2/me3

^aLeihne *et al.* (2011); ^bMartínez-Pérez *et al.* (2017); ^cDuan *et al.* (2017); ^dVelasquez *et al.* (2015); ^ePorco *et al.* (2016); ^fFalcone-Ferreyra *et al.* (2015); ^gKai *et al.* (2008); ^hWilliams *et al.* (1998); ⁱHedden *et al.* (2001); ^jSchomburg *et al.* (2003); ^kBrewer *et al.* (2016); ^lCrevillén *et al.* (2014); ^mLu *et al.* (2011); ⁿLu *et al.* (2010); ^oYang *et al.* (2012b); ^pYang *et al.* (2012a); ^qCho *et al.* (2012); ^rDeng *et al.* (2016); ^sSaze *et al.* (2008); ^tDutta *et al.* (2017); y ^uGan *et al.* (2014).

Kawai *et al.* (2014) no tuvieron en cuenta las dioxigenasas de tipo JmjC, ello a pesar de que están anotadas en TAIR10 y Araport como miembros de la superfamilia de las 2OGD. Arabidopsis cuenta con 21 proteínas con un dominio JmjC, que participan en la desmetilación de residuos de lisina o arginina de la histona H3. La primera mutación descrita en un gen *JMJ* fue *increase in bonsai methylation 1 (ibm1*, también llamada *jmj25*) que incrementa los niveles de metilación H3K9 que se correlacionan con una metilación excesiva del ADN, generando un fenotipo pleiotrópico (Saze *et al.*, 2008). La caracterización de *JMJ14* demostró que las proteínas JmjC son desmetilasas de histonas en Arabidopsis (Lu *et al.*, 2010). Los mutantes *jmj14* presentan floración temprana, como consecuencia de la acumulación de marcas activadoras, como la H3K4me3, en genes inductores de la floración, como *FT* (Lu *et al.*, 2010). También se ha demostrado en Arabidopsis la actividad desmetilasa de histonas de proteínas JmjC implicadas en el control del momento de la floración (Lu *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012a; 2012b; Crevillén *et al.*, 2014; Gan *et al.*, 2014; Dutta *et al.*, 2017), de la germinación (Cho *et al.*, 2012) y de la respuesta a patógenos (Dutta *et al.*, 2017) (Tabla 1).

El comportamiento de *JMJ24* difiere del de otras proteínas con un dominio JmjC, ya que los mutantes *jmj24*, como los *ibm1*, presentan niveles altos de H3K9me y de metilación del ADN. Esta peculiaridad de *JMJ24* se debe a que contiene un dominio RING con actividad ligasa E3 de ubiquitina, que marca para su degradación a CMT3, una metiltransferasa de ADN (Deng *et al.*, 2016).

IV.6.- Antecedentes y objetivos

IV.6.1.- Los mutantes *angulata*

La clase fenotípica Angulata (Anu) incluye mutantes con hojas despigmentadas e indentadas (Figura 2, en la página 22). La despigmentación foliar sugiere una alteración de las funciones del cloroplasto y los márgenes dentados indican una expansión lateral deficiente. Un análisis previo de todos los mutantes de la colección del laboratorio de J.L. Micol indicó que los mutantes *anu* presentan alteraciones severas en la estructura de los tejidos internos de la hoja (Pérez-Pérez *et al.*, 2011). Los mutantes *anu* podrían resultar útiles para el estudio de la relación entre la morfogénesis foliar, la biogénesis del cloroplasto y la señalización retrógrada (Pyke *et al.*, 2000; Rodermel, 2001; Andriankaja *et al.*, 2012; Tameshige *et al.*, 2013).

En el laboratorio de J.L. Micol se aislaron 18 mutantes *anu* inducidos por EMS, y se determinó, mediante análisis de complementación, que correspondían a lesiones en 12 genes diferentes: *ANU1* a *ANU12* (Berná *et al.*, 1999). Se estableció mediante cartografía

de baja resolución la posición de mapa de estos 12 genes *ANU* (Robles y Micol, 2001). Antes del comienzo de esta Tesis solo se identificó uno de ellos, *ANU7*, que codifica una proteína de los nucleoides de los cloroplastos y ha sido caracterizado recientemente (Muñoz-Nortes *et al.*, 2017).

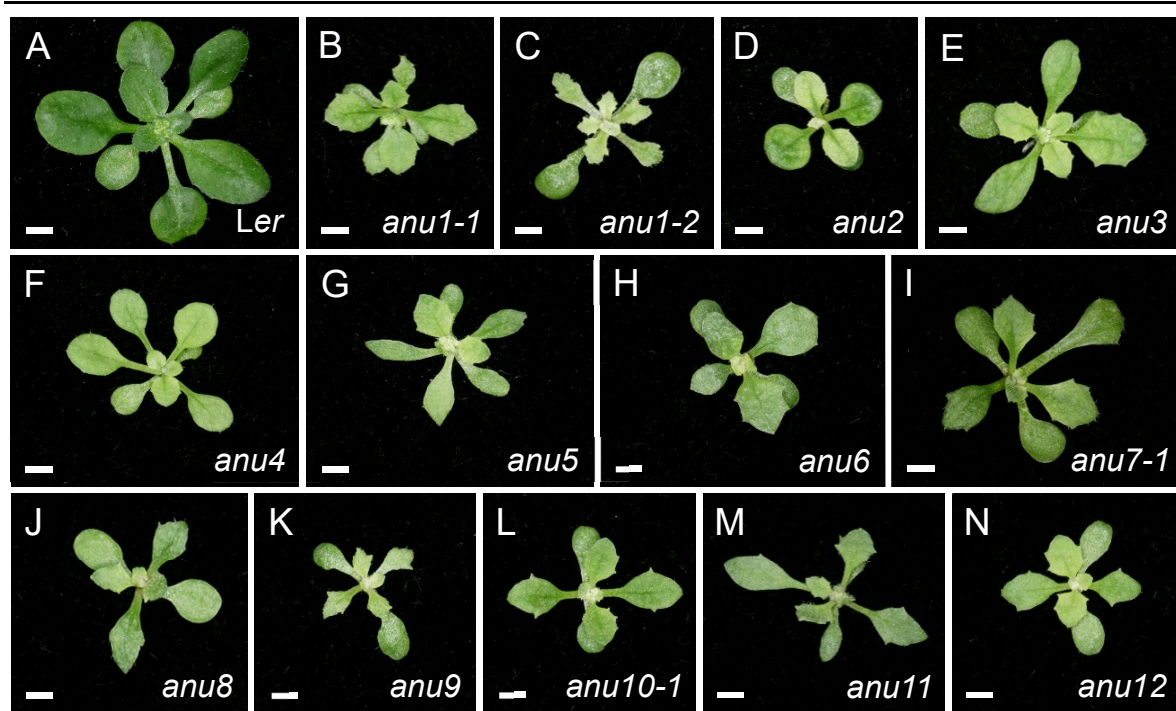


Figura 2.- Fenotipo foliar de los mutantes *angulata*. Rosetas de (A) la estirpe silvestre *Ler*, y de los mutantes (B) *anu1-1*, (C) *anu1-2*, (D) *anu2*, (E) *anu3*, (F) *anu4*, (G) *anu5*, (H) *anu6*, (I) *anu7-1*, (J) *anu8*, (K) *anu9*, (L) *anu10-1*, (M) *anu11* y (N) *anu12*. El fondo genético de todos estos mutantes es *Ler*. Las fotografías se tomaron 19 días después de la estratificación (dde). Las barras de escala representan 2 mm. Modificado a partir de Casanova Sáez (2014).

IV.6.2.- Los mutantes *scabra*

Las hojas de los mutantes de la clase fenotípica *Scabra* (*Sca*) presentan hojas variegadas con márgenes y superficie del limbo irregulares (Figura 3). La alteración de la pigmentación y la forma del margen sugieren respectivamente defectos en las funciones del cloroplasto y en la expansión lateral del limbo foliar.

En el laboratorio de J.L. Micol se aislaron 7 mutantes *sca* tras una mutagénesis mediante EMS (Berná *et al.*, 1999). Su análisis de complementación indicó que correspondían a 5 genes distintos, *SCA1* a *SCA5*, cuyas posiciones de mapa se definieron mediante cartografía de baja resolución (Robles y Micol, 2001). Solo uno de estos mutantes, *sca3*, fue caracterizado antes del comienzo de esta Tesis (Hricová *et al.*, 2006). *SCA3* codifica la RpoTp, una de las dos NEP del cloroplasto (apartado IV.3.2, en la página

11), que transcribe genes domésticos y de la maquinaria transcripcional del genoma de este orgánulo.

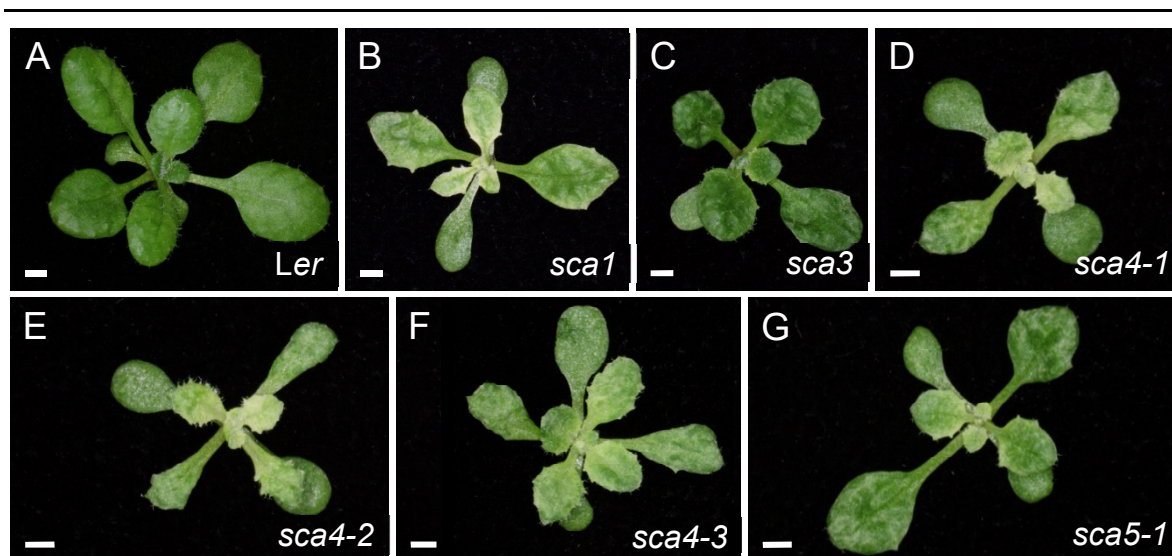


Figura 3.- Fenotipo foliar de los mutantes *scabra*. Rosetas de (A) la estirpe silvestre *Ler*, y de los mutantes (B) *sca1*, (C) *sca3* (D) *sca4-1*, (E) *sca4-2*, (F) *sca4-3* y (G) *sca5-1*. Las fotografías se tomaron 16 dde. Las barras de escala representan 2 mm.

IV.6.3.- Los mutantes *incurvata*

Las hojas de los tipos silvestres de *Arabidopsis* de uso más común en los laboratorios son relativamente planas. Las de los mutantes *incurvata* (*icu*), por el contrario, se recurvan hacia el haz (Figura 4, en la página 24). Este rasgo fenotípico se debe a que el crecimiento de los tejidos ventrales es mayor que el de los dorsales y/o que su coordinación es deficiente, y hace a los mutantes *icu* candidatos a ser portadores de mutaciones en genes implicados en el establecimiento y/o el mantenimiento de la dorsoventralidad foliar.

En el laboratorio de J.L. Micol se han estudiado 42 mutantes *icu*, correspondientes a 14 grupos de complementación. Once de estos mutantes fueron aislados tras una mutagénesis con EMS (Berná *et al.*, 1999) y 9 tras otra, realizada por bombardeo con neutrones rápidos (Robles Ramos, 1999). Los 22 restantes pertenecían a una colección de dominio público, la del *Arabidopsis* Information Service (Serrano-Cartagena *et al.*, 1999).

Los ensayos de alelismo realizados entre 13 mutantes *icu* permitieron asignarlos a cinco grupos de complementación, a los que se denominó *ICU1* a *ICU5*. Del estudio de estos cinco presuntos genes se concluyó que el fenotipo de los mutantes *icu* podía deberse a la perturbación de al menos tres procesos distintos: la regulación epigenética de la

expresión génica, la ruta de los miARN y la homeostasis de la auxina (Serrano-Cartagena *et al.*, 2000).

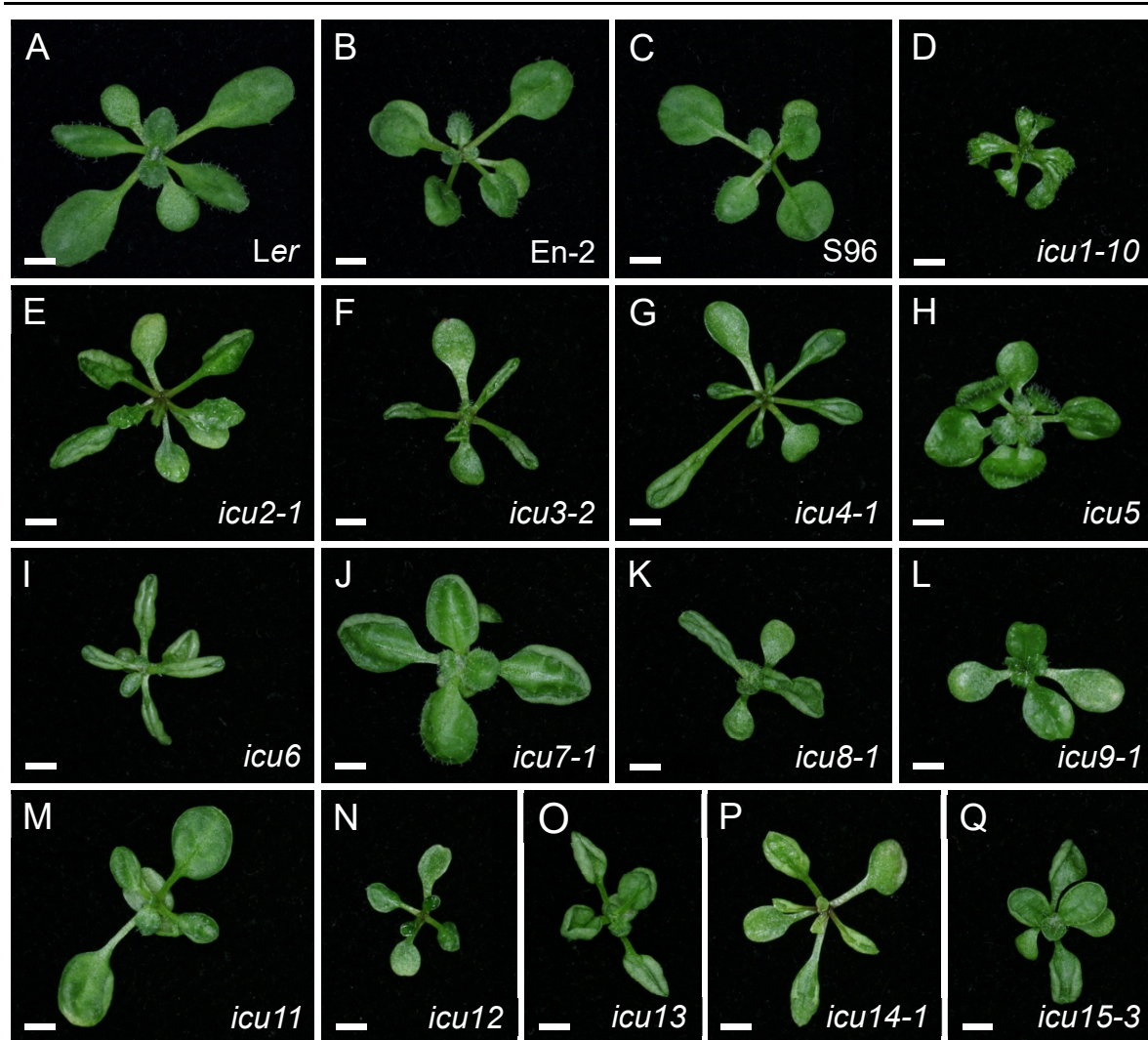


Figura 4.- Fenotipo foliar de los mutantes *incurvata*. Rosetas de las estirpes silvestres (A) *Ler*, (B) *En-2* y (C) *S96*, y de los mutantes (D) *icu1-10*, (E) *icu2-1*, (F) *icu3-2*, (G) *icu4-1*, (H) *icu5*, (I) *icu6*, (J) *icu7-1*, (K) *icu8-1*, (L) *icu9-1*, (M) *icu11*, (N) *icu12*, (O) *icu13*, (P) *icu14-1* y (Q) *icu15-3*. Los fondos genéticos de estos mutantes son (D, I-L, Q) *Ler*, (E-H, N-P) *En-2* y (M) *S96*. Las fotografías se tomaron 16 dde. Las barras de escala representan 2 mm. Tomado de Esteve Bruna (2013).

Los genes que fueron denominados *ICU1* e *ICU2* en el laboratorio de J.L. Micol codifican componentes de la maquinaria epigenética. *ICU1* (más conocido como *CURLY LEAF*; *CLF*) codifica una metiltransferasa responsable de la deposición de la marca represora H3K27me3. La proteína CLF (*ICU1*) forma parte del PRC2 (apartado IV.4.2, en la página 15), que reprime durante la fase vegetativa del ciclo de vida de *Arabidopsis*, entre otros, a algunos de los genes que especifican la identidad de los órganos florales (Goodrich

et al., 1997; Liu *et al.*, 2016). *ICU2* codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa α , que se requiere, al igual que otras subunidades de otras ADN polimerasas, para la represión estable de cientos de genes mediante la deposición de marcas represoras, que ocurre casi simultáneamente al ensamblaje de los nucleosomas que sigue a la replicación del ADN (Serrano-Cartagena *et al.*, 2000; Barrero *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010; Hyun *et al.*, 2013; Micol-Ponce *et al.*, 2015).

Los productos de los genes *ICU3*, *ICU4*, *ICU8*, *ICU9* e *ICU15* están relacionados con la ruta de los miARN. *ICU3* (también denominada HASTY; HST) es un miembro de la familia de las importinas/exportinas nucleares, presuntamente implicado en el transporte de miARN desde el núcleo al citoplasma (Bollman *et al.*, 2003; Peragine *et al.*, 2004; Jover-Gil *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). El ARNm del gen *ICU4* (también denominado *ATHB-15* o *CORONA*; *CNA*) está regulado negativamente por un miARN, y sus alelos *icu4-1* e *icu4-2* son portadores de una mutación puntual que les hace parcialmente resistentes a dicha regulación (Ochando *et al.*, 2006). *ICU8* (también denominado *HYPONASTIC LEAVES 1*; *HYL1*) codifica una proteína de unión a ARN bicatenario, que forma un complejo con la RNasa III DICER-LIKE1 para procesar los transcritos primarios de los genes de miARN (Boutet *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004; Kurihara y Watanabe, 2004; Jover-Gil *et al.*, 2012). *ICU9* (también denominada ARGONAUTE1; AGO1) es una ribonucleasa que juega un papel central en los RNA-Induced Silencing Complexes (RISC; Kidner y Martienssen, 2004; Vaucheret *et al.*, 2004; Jover-Gil *et al.*, 2005; Jover-Gil *et al.*, 2012). Por último, *ICU15* (también denominado *HUA ENHANCER 1*; *HEN1*) codifica una metiltransferasa que metila los precursores de los miARN (Jover-Gil *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005; Jover-Gil *et al.*, 2012).

Por su parte, *ICU5*, *ICU6* e *ICU13* participan en la homeostasis de la auxina o ácido indol acético (indolacetic acid; IAA), un morfógeno vegetal que ejerce sus funciones mediante la formación de gradientes causados por su transporte polar. Tras su acumulación, la auxina se une a su receptor, el complejo ligasa de ubiquitina SCF^{TIR1/AFB1-3} (Skp-Cul1Fbox^{TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN1-3}), lo que a su vez permite que dicho complejo reconozca a las proteínas Aux/IAA y las marque para su degradación, que desreprime a los AUXIN RESPONSE FACTORS (ARF) y les permite actuar sobre sus genes diana (Gray *et al.*, 2001; Dharmasiri *et al.*, 2005a; 2005b). *ICU5* (también denominado *SHORT HYPOCOTYL2*; *SHY2*; Tian y Reed, 1999) e *ICU6* (también denominado *AUXIN RESISTANT3*; *AXR3*; Leyser *et al.*, 1996; Rouse *et al.*, 1998; Pérez-Pérez *et al.*, 2010) codifican dos proteínas Aux/IAA: IAA3 e IAA17, respectivamente. Por último, *ICU13* codifica la proteína CULLIN1 (CUL1; también denominada AXR6), que forma parte del SCF^{TIR1/AFB1-3} (Hobbie *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002; Hellmann *et al.*, 2003; Esteve-

Bruna *et al.*, 2013).

IV.6.4.- Objetivos de esta Tesis

El objetivo general de esta Tesis era la caracterización genética y molecular de los mutantes *anu1-1*, *anu4-1*, *anu9-1*, *anu12-1*, *sca1-1*, *sca5-1* e *icu11-1*. El estudio de algunos de estos mutantes se había iniciado con anterioridad en el laboratorio de J.L. Micol.

El primero de nuestros objetivos concretos fue la identificación de los genes *ANU* y *SCA*, combinando para ello el análisis iterativo del ligamiento a marcadores moleculares con la secuenciación masiva; el segundo de nuestros objetivos era la validación de este método. Nuestro tercer objetivo fue la evaluación del interés de cada uno de los genes *ANU* y *SCA* identificados y la caracterización del fenotipo morfológico e histológico de los alelos hipomorfos o nulos de los genes que tras su clonación nos resultaran más interesantes. El objetivo último del estudio de estas mutaciones era proponer modelos que explicasen la función de los alelos silvestres de sus genes en el desarrollo foliar, y eventualmente, en la configuración de la arquitectura corporal de la planta.

Merece mención aparte el gen *ICU11*, que fue clonado en una Tesis anterior realizada en el laboratorio de J.L. Micol. Nuestros objetivos concretos al respecto de *ICU11* fueron (1) confirmar su identidad mediante la obtención de nuevos alelos mutantes y su rescate fenotípico mediante la transferencia de un transgén portador del alelo silvestre, (2) analizar el fenotipo de los mutantes *icu11* a niveles morfológico, histológico y fisiológico, (3) estudiar su filogenia, (4) caracterizar los fenotipos asociados a la insuficiencia de función de sus parálogos, así como sus interacciones genéticas con estos últimos, (5) determinar sus patrones de expresión espacial y temporal y la localización subcelular de su producto proteico, (6) someter a *icu11-1* a análisis transcriptómico mediante secuenciación masiva de ARN y establecer así la naturaleza de los procesos alterados en este mutante, (7) estudiar la eventual alteración en los mutantes *icu11* de algunas modificaciones químicas de las histonas mediante inmunoprecipitación de la cromatina, (8) establecer el efecto de la insuficiencia de función de *ICU11* sobre la metilación del ADN mediante secuenciación masiva tras tratamiento con bisulfito sódico, (9) explicar el fenotipo de los mutantes *icu11*, y (10) proponer un modelo sobre la función e interacciones de *ICU11*.

V.- BIBLIOGRAFÍA DE LA INTRODUCCIÓN

V.- BIBLIOGRAFÍA DE LA INTRODUCCIÓN

- Aichinger, E., Villar, C.B., Di Mambro, R., Sabatini, S., y Köhler, C. (2011). The CHD3 chromatin remodeler PICKLE and Polycomb group proteins antagonistically regulate meristem activity in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* **23**, 1047-1060.
- Alonso-Blanco, C., Bentsink, L., Hanhart, C.J., Blankestijn-de Vries, H., y Koornneef, M. (2003). Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **164**, 711-729.
- Alonso, J.M., y Ecker, J.R. (2006). Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in *Arabidopsis*. *Nature Reviews Genetics* **7**, 524-536.
- Allen, R.S., Nakasugi, K., Doran, R.L., Millar, A.A., y Waterhouse, P.M. (2013). Facile mutant identification via a single parental backcross method and application of whole genome sequencing based mapping pipelines. *Frontiers in Plant Science* **4**, 362.
- Andriankaja, M., Dhondt, S., De Bodt, S., Vanhaeren, H., Coppens, F., De Milde, L., Mühlenbock, P., Skiryicz, A., Gonzalez, N., Beemster, G.T., e Inzé, D. (2012). Exit from proliferation during leaf development in *Arabidopsis thaliana*: a not-so-gradual process. *Developmental Cell* **22**, 64-78.
- Annacondia, M.L., Magerøy, M.H., y Martínez, G. (2018). Stress response regulation by epigenetic mechanisms: changing of the guards. *Physiologia Plantarum* **162**, 239-250.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., y Steitz, T.A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905-920.
- Barrero, J.M., González-Bayón, R., del Pozo, J.C., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (2007). *INCURVATA2* encodes the catalytic subunit of DNA Polymerase α and interacts with genes involved in chromatin-mediated cellular memory in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**, 2822-2838.
- Becraft, P.W. (1999). Development of the leaf epidermis. *Current Topics in Developmental Biology* **45**, 1-40.
- Beh, L.Y., Colwell, L.J., y Francis, N.J. (2012). A core subunit of Polycomb repressive complex 1 is broadly conserved in function but not primary sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **109**, 1063-1071.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., y Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* **334**, 1524-1529.
- Bentsink, L., Jowett, J., Hanhart, C.J., y Koornneef, M. (2006). Cloning of *DOG1*, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**, 17042-17047.
- Berná, G., Robles, P., y Micol, J.L. (1999). A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **152**, 729-742.
- Berr, A., Shafiq, S., y Shen, W.H. (2011). Histone modifications in transcriptional activation during plant development. *Biochimica et Biophysica Acta* **1809**, 567-576.
- Blackledge, N.P., Farcas, A.M., Kondo, T., King, H.W., McGouran, J.F., Hanssen, L.L., Ito, S., Cooper, S., Kondo, K., Koseki, Y., Ishikura, T., Long, H.K., Sheahan, T.W., Brockdorff, N., Kessler, B.M., Koseki, H., y Klose, R.J. (2014). Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and Polycomb domain formation. *Cell* **157**, 1445-1459.
- Blackledge, N.P., Rose, N.R., y Klose, R.J. (2015). Targeting Polycomb systems to regulate gene expression: modifications to a complex story. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16**, 643-649.
- Blázquez, M.A., y Weigel, D. (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* **404**, 889-892.
- Bollman, K.M., Aukerman, M.J., Park, M.Y., Hunter, C., Berardini, T.Z., y Poethig, R.S. (2003). HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development* **130**, 1493-1504.

- Boutet, S., Vazquez, F., Liu, J., Béclin, C., Fagard, M., Gratiás, A., Morel, J.B., Crété, P., Chen, X., y Vaucheret, H. (2003). *Arabidopsis HEN1*: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Current Biology* **13**, 843-848.
- Bouyer, D., Roudier, F., Heese, M., Andersen, E.D., Gey, D., Nowack, M.K., Goodrich, J., Renou, J.P., Grini, P.E., Colot, V., y Schnittger, A. (2011). Polycomb repressive complex 2 controls the embryo-to-seedling phase transition. *PLOS Genetics* **7**, e1002014.
- Bratzel, F., López-Torrejón, G., Koch, M., del Pozo, J.C., y Calonje, M. (2010). Keeping cell identity in *Arabidopsis* requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination. *Current Biology* **20**, 1853-1859.
- Bratzel, F., Yang, C., Angelova, A., López-Torrejón, G., Koch, M., del Pozo, J.C., y Calonje, M. (2012). Regulation of the new *Arabidopsis* imprinted gene *AtBMIIC* requires the interplay of different epigenetic mechanisms. *Molecular Plant* **5**, 260-269.
- Braybrook, S.A., y Kuhlemeier, C. (2010). How a plant builds leaves. *Plant Cell* **22**, 1006-1018.
- Brewer, P.B., Yoneyama, K., Filardo, F., Meyers, E., Scaffidi, A., Frickey, T., Akiyama, K., Seto, Y., Dun, E.A., Cremer, J.E., Kerr, S.C., Waters, M.T., Flematti, G.R., Mason, M.G., Weiller, G., Yamaguchi, S., Nomura, T., Smith, S.M., Yoneyama, K., y Beveridge, C.A. (2016). *LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE* acts in the final stages of strigolactone biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **113**, 6301-6306.
- Bryant, N., Lloyd, J., Sweeney, C., Myouga, F., y Meinke, D. (2011). Identification of nuclear genes encoding chloroplast-localized proteins required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **155**, 1678-1689.
- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., y Martienssen, R.A. (2000). *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**, 967-971.
- Byrne, M.E. (2009). A role for the ribosome in development. *Trends in Plant Science* **14**, 512-519.
- Caarls, L., Elberse, J., Awwanah, M., Ludwig, N.R., de Vries, M., Zeilmaier, T., Van Wees, S.C.M., Schuurink, R.C., y Van den Ackerveken, G. (2017). *Arabidopsis* JASMONATE-INDUCED OXYGENASES down-regulate plant immunity by hydroxylation and inactivation of the hormone jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **114**, 6388-6393.
- Calonje, M., Sanchez, R., Chen, L., y Sung, Z.R. (2008). EMBRYONIC FLOWER1 participates in Polycomb group-mediated AG gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 277-291.
- Calonje, M. (2014). PRC1 marks the difference in plant PcG repression. *Molecular Plant* **7**, 459-471.
- Candela, H., Casanova-Sáez, R., y Micol, J.L. (2015). Getting started in mapping-by-sequencing. *Journal of Integrative Plant Biology* **57**, 606-612.
- Casanova-Sáez, R., Candela, H., y Micol, J.L. (2014). Combined haploinsufficiency and purifying selection drive retention of *RPL36a* paralogs in *Arabidopsis*. *Scientific Reports* **4**, 4122.
- Casanova Sáez, R. (2014). Contribución de los genes *ANGULATA10* y *APICULATA2* a la morfogénesis foliar en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Colombo, M., Tadini, L., Peracchio, C., Ferrari, R., y Pesaresi, P. (2016). GUN1, a jack-of-all-trades in chloroplast protein homeostasis and signaling. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1427.
- Cooper, S., Dienstbier, M., Hassan, R., Schermelleh, L., Sharif, J., Blackledge, N.P., De Marco, V., Elderkin, S., Koseki, H., Klose, R., Heger, A., y Brockdorff, N. (2014). Targeting Polycomb to pericentric heterochromatin in embryonic stem cells reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. *Cell Reports* **7**, 1456-1470.
- Creff, A., Sormani, R., y Desnos, T. (2010). The two *Arabidopsis* *RPS6* genes, encoding for cytoplasmic ribosomal proteins S6, are functionally equivalent. *Plant Molecular Biology* **73**, 533-546.

- Crevillén, P., Yang, H., Cui, X., Greeff, C., Trick, M., Qiu, Q., Cao, X., y Dean, C. (2014). Epigenetic reprogramming that prevents transgenerational inheritance of the vernalized state. *Nature* **515**, 587-590.
- Cubeñas-Potts, C., y Matunis, M.J. (2013). SUMO: a multifaceted modifier of chromatin structure and function. *Developmental Cell* **24**, 1-12.
- Chakraborty, A., y Kenmochi, N. (2012). Ribosomes and ribosomal proteins: more than just 'Housekeeping'. En *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley and Sons, Ltd.
- Chanvivattana, Y., Bishopp, A., Schubert, D., Stock, C., Moon, Y.H., Sung, Z.R., y Goodrich, J. (2004). Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development* **131**, 5263-5276.
- Chatterjee, M., Sparvoli, S., Edmunds, C., Garosi, P., Findlay, K., y Martin, C. (1996). DAG, a gene required for chloroplast differentiation and palisade development in *Antirrhinum majus*. *EMBO Journal* **15**, 4194-4207.
- Chen, D., Molitor, A., Liu, C., y Shen, W.H. (2010). The *Arabidopsis* PRC1-like ring-finger proteins are necessary for repression of embryonic traits during vegetative growth. *Cell Research* **20**, 1332-1344.
- Cheng, X. (2014). Structural and functional coordination of DNA and histone methylation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6**, a018747.
- Cho, J.N., Ryu, J.Y., Jeong, Y.M., Park, J., Song, J.J., Amasino, R.M., Noh, B., y Noh, Y.S. (2012). Control of seed germination by light-induced histone arginine demethylation activity. *Developmental Cell* **22**, 736-748.
- de la Paz Sanchez, M., Aceves-García, P., Petrone, E., Steckenborn, S., Vega-León, R., Álvarez-Buylla, E.R., Garay-Arroyo, A., y García-Ponce, B. (2015). The impact of Polycomb group (PcG) and Trithorax group (TrxG) epigenetic factors in plant plasticity. *New Phytologist* **208**, 684-694.
- Deng, S., Jang, I.C., Su, L., Xu, J., y Chua, N.H. (2016). JMJ24 targets CHROMOMETHYLASE3 for proteasomal degradation in *Arabidopsis*. *Genes and Development* **30**, 251-256.
- Derkacheva, M., Steinbach, Y., Wildhaber, T., Mozgová, I., Mahrez, W., Nanni, P., Bischof, S., Gruissem, W., y Hennig, L. (2013). *Arabidopsis* MSI1 connects LHP1 to PRC2 complexes. *EMBO Journal* **32**, 2073-2085.
- Derkacheva, M., y Hennig, L. (2014). Variations on a theme: Polycomb group proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* **65**, 2769-2784.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., y Estelle, M. (2005a). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 441-445.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J.S., Jürgens, G., y Estelle, M. (2005b). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Developmental Cell* **9**, 109-119.
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., Sorek, R., y Rechavi, G. (2012). Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature* **485**, 201-206.
- Downen, R.H., Pelizzola, M., Schmitz, R.J., Lister, R., Downen, J.M., Nery, J.R., Dixon, J.E., y Ecker, J.R. (2012). Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **109**, 2183-2191.
- Duan, H.C., Wei, L.H., Zhang, C., Wang, Y., Chen, L., Lu, Z., Chen, P.R., He, C., y Jia, G. (2017). ALKBH10B is an RNA N⁶-methyladenosine demethylase affecting *Arabidopsis* floral transition. *Plant Cell* **29**, 2995-3011.
- Dumesic, P.A., Homer, C.M., Moresco, J.J., Pack, L.R., Shanle, E.K., Coyle, S.M., Strahl, B.D., Fujimori, D.G., Yates, J.R., 3rd, y Madhani, H.D. (2015). Product binding enforces the genomic specificity of a yeast Polycomb repressive complex. *Cell* **160**, 204-218.

- Dutta, A., Choudhary, P., Caruana, J., y Raina, R. (2017). JMJ27, an Arabidopsis H3K9 histone demethylase, modulates defense against *Pseudomonas syringae* and flowering time. *Plant Journal* **91**, 1015-1028.
- Esteve-Bruna, D., Pérez-Pérez, J.M., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (2013). *incurvata13*, a novel allele of *AUXIN RESISTANT6*, reveals a specific role for auxin and the SCF complex in Arabidopsis embryogenesis, vascular specification, and leaf flatness. *Plant Physiology* **161**, 1303-1320.
- Esteve Bruna, D. (2013). Caracterización de mutantes que manifiestan perturbaciones locales en el desarrollo de los tejidos internos de la hoja de Arabidopsis. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Falcone-Ferreira, M.L., Emiliani, J., Rodriguez, E.J., Campos-Bermudez, V.A., Grotewold, E., y Casati, P. (2015). The identification of maize and Arabidopsis type I FLAVONE SYNTHASES links flavones with hormones and biotic interactions. *Plant Physiology* **169**, 1090-1107.
- Falnes, P.O., Johansen, R.F., y Seeberg, E. (2002). AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature* **419**, 178-182.
- Farrow, S.C., y Facchini, P.J. (2014). Functional diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases in plant metabolism. *Frontiers in Plant Science* **5**, 524.
- Finnegan, E.J., Peacock, W.J., y Dennis, E.S. (2000). DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Current Opinion in Genetics and Development* **10**, 217-223.
- Francis, N.J., Saurin, A.J., Shao, Z., y Kingston, R.E. (2001). Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex. *Molecular Cell* **8**, 545-556.
- Gan, E.S., Xu, Y., Wong, J.Y., Goh, J.G., Sun, B., Wee, W.Y., Huang, J., e Ito, T. (2014). Jumonji demethylases moderate precocious flowering at elevated temperature via regulation of *FLC* in *Arabidopsis*. *Nature Communications* **5**, 5098.
- Gaudin, V., Libault, M., Pouteau, S., Juul, T., Zhao, G., Lefebvre, D., y Grandjean, O. (2001). Mutations in *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1* affect flowering time and plant architecture in *Arabidopsis*. *Development* **128**, 4847-4858.
- Gendall, A.R., Levy, Y.Y., Wilson, A., y Dean, C. (2001). The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell* **107**, 525-535.
- Gendrel, A.V., Lippman, Z., Yordan, C., Colot, V., y Martienssen, R.A. (2002). Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the *Arabidopsis* gene *DDM1*. *Science* **297**, 1871-1873.
- Goldschmidt-Clermont, M. (1998). Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. *International Review of Cytology* **177**, 115-180.
- Gong, X., Jiang, Q., Xu, J., Zhang, J., Teng, S., Lin, D., y Dong, Y. (2013). Disruption of the rice plastid ribosomal protein S20 leads to chloroplast developmental defects and seedling lethality. *G3: Genes - Genomes - Genetics* **3**, 1769-1777.
- Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E.M., y Coupland, G. (1997). A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* **386**, 44-51.
- Goodwin, S., McPherson, J.D., y McCombie, W.R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics* **17**, 333-351.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., y Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**, 271-276.
- Greber, B.J., y Ban, N. (2016). Structure and function of the mitochondrial ribosome. *Annual Review of Biochemistry* **85**, 103-132.
- Greene, E.A., Codomo, C.A., Taylor, N.E., Henikoff, J.G., Till, B.J., Reynolds, S.H., Enns, L.C., Burtner, C., Johnson, J.E., Odden, A.R., Comai, L., y Henikoff, S. (2003). Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics* **164**, 731-740.
- Grossniklaus, U., Vielle-Calzada, J.P., Hoepfner, M.A., y Gagliano, W.B. (1998). Maternal control of embryogenesis by *MEDEA*, a *Polycomb* group gene in *Arabidopsis*. *Science* **280**, 446-450.

- Grossniklaus, U., y Paro, R. (2014). Transcriptional silencing by *Polycomb*-group proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6**, a019331.
- Han, M.H., Goud, S., Song, L., y Fedoroff, N. (2004). The *Arabidopsis* double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**, 1093-1098.
- Hartwig, B., James, G.V., Konrad, K., Schneeberger, K., y Turck, F. (2012). Fast isogenic mapping-by-sequencing of ethyl methanesulfonate-induced mutant bulks. *Plant Physiology* **160**, 591-600.
- Hedden, P., Phillips, A.L., Rojas, M.C., Carrera, E., y Tudzynski, B. (2001). Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: a case of convergent evolution? *Journal of Plant Growth Regulation* **20**, 319-331.
- Hellmann, H., Hobbie, L., Chapman, A., Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., del Pozo, C., Reinhardt, D., y Estelle, M. (2003). *Arabidopsis* *AXR6* encodes CUL1 implicating SCF E3 ligases in auxin regulation of embryogenesis. *EMBO Journal* **22**, 3314-3325.
- Hennig, L., Taranto, P., Walser, M., Schönrock, N., y Gruissem, W. (2003). *Arabidopsis* MSII is required for epigenetic maintenance of reproductive development. *Development* **130**, 2555-2565.
- Hennig, L., Bouveret, R., y Gruissem, W. (2005). MSII-like proteins: an escort service for chromatin assembly and remodeling complexes. *Trends in Cell Biology* **15**, 295-302.
- Hobbie, L., McGovern, M., Hurwitz, L.R., Pierro, A., Liu, N.Y., Bandyopadhyay, A., y Estelle, M. (2000). The *axr6* mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene involved in auxin response and early development. *Development* **127**, 23-32.
- Holoch, D., y Moazed, D. (2015). RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Reviews Genetics* **16**, 71-84.
- Horiguchi, G., Mollá-Morales, A., Pérez-Pérez, J.M., Kojima, K., Robles, P., Ponce, M.R., Micol, J.L., y Tsukaya, H. (2011). Differential contributions of ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development. *Plant Journal* **65**, 724-736.
- Houben, A., Demidov, D., Caperta, A.D., Karimi, R., Agueci, F., y Vlasenko, L. (2007). Phosphorylation of histone H3 in plants—A dynamic affair. *Biochimica et Biophysica Acta* **1769**, 308-315.
- Hricová, A., Quesada, V., y Micol, J.L. (2006). The *SCABRA3* nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **141**, 942-956.
- Husbands, A.Y., Benkovics, A.H., Nogueira, F.T., Lodha, M., y Timmermans, M.C. (2015). The ASYMMETRIC LEAVES complex employs multiple modes of regulation to affect adaxial-abaxial patterning and leaf complexity. *Plant Cell* **27**, 3321-3335.
- Hyun, Y., Yun, H., Park, K., Ohr, H., Lee, O., Kim, D.H., Sung, S., y Choi, Y. (2013). The catalytic subunit of *Arabidopsis* DNA polymerase α ensures stable maintenance of histone modification. *Development* **140**, 156-166.
- Iwakawa, H., Ueno, Y., Semiarti, E., Onouchi, H., Kojima, S., Tsukaya, H., Hasebe, M., Soma, T., Ikezaki, M., Machida, C., y Machida, Y. (2002). The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant and Cell Physiology* **43**, 467-478.
- James, G.V., Patel, V., Nordström, K.J., Klasen, J.R., Salomé, P.A., Weigel, D., y Schneeberger, K. (2013). User guide for mapping-by-sequencing in *Arabidopsis*. *Genome Biology* **14**, R61.
- Jander, G., Norris, S.R., Rounsley, S.D., Bush, D.F., Levin, I.M., y Last, R.L. (2002). *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiology* **129**, 440-450.
- Jiang, D., Yang, W., He, Y., y Amasino, R.M. (2007). *Arabidopsis* relatives of the human lysine-specific Demethylase1 repress the expression of *FWA* and *FLOWERING LOCUS C* and thus promote the floral transition. *Plant Cell* **19**, 2975-2987.
- Johnson, H.B. (1975). Plant pubescence: An ecological perspective. *Botanical Review* **41**, 233-258.

- Jover-Gil, S., Candela, H., y Ponce, M.R. (2005). Plant microRNAs and development. *International Journal of Developmental Biology* **49**, 733-744.
- Jover-Gil, S., Candela, H., Robles, P., Aguilera, V., Barrero, J.M., Micol, J.L., y Ponce, M.R. (2012). The microRNA pathway genes *AGO1*, *HEN1* and *HYL1* participate in leaf proximal-distal, venation and stomatal patterning in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **53**, 1322-1333.
- Jover Gil, S. (2005). Caracterización de genes implicados en la organogénesis foliar en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Kai, K., Mizutani, M., Kawamura, N., Yamamoto, R., Tamai, M., Yamaguchi, H., Sakata, K., y Shimizu, B. (2008). Scopoletin is biosynthesized via *ortho*-hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **55**, 989-999.
- Kalb, R., Latwiel, S., Baymaz, H.I., Jansen, P.W., Müller, C.W., Vermeulen, M., y Müller, J. (2014). Histone H2A monoubiquitination promotes histone H3 methylation in Polycomb repression. *Nature Structural and Molecular Biology* **21**, 569-571.
- Kataoka, H., y Sekiguchi, M. (1985). Molecular cloning and characterization of the *alkB* gene of *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics* **198**, 263-269.
- Kawai, Y., Ono, E., y Mizutani, M. (2014). Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *Plant Journal* **78**, 328-343.
- Keddie, J.S., Carroll, B., Jones, J.D., y Gruissem, W. (1996). The *DCL* gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves. *EMBO Journal* **15**, 4208-4217.
- Kidner, C.A., y Martienssen, R.A. (2004). Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature* **428**, 81-84.
- Kim, Y., Schumaker, K.S., y Zhu, J.K. (2006). EMS mutagenesis of *Arabidopsis*. *Methods in Molecular Biology* **323**, 101-103.
- Koornneef, M., Dellaert, L.W., y van der Veen, J.H. (1982). EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mutation Research* **93**, 109-123.
- Koornneef, M., y Meinke, D. (2010). The development of *Arabidopsis* as a model plant. *Plant Journal* **61**, 909-921.
- Korvald, H., Mølsted Moe, A.M., Cederkvist, F.H., Thiede, B., Laerdahl, J.K., Bjøras, M., y Alseth, I. (2011). *Schizosaccharomyces pombe* Ofd2 is a nuclear 2-oxoglutarate and iron dependent dioxygenase interacting with histones. *PLOS One* **6**, e25188.
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T.C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R., y Chory, J. (2007). Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* **316**, 715-719.
- Kurihara, Y., y Watanabe, Y. (2004). *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**, 12753-12758.
- Lachner, M., Sengupta, R., Schotta, G., y Jenuwein, T. (2004). Trilogies of histone lysine methylation as epigenetic landmarks of the eukaryotic genome. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **69**, 209-218.
- Lang, A. (1965). Physiology of flower initiation. En *Encyclopedia of Plant Physiology*. Ruhland, W., ed. Springer.
- Lanzuolo, C., y Orlando, V. (2012). Memories from the polycomb group proteins. *Annual Review of Genetics* **46**, 561-589.
- Larsson, A.S., Landberg, K., y Meeks-Wagner, D.R. (1998). The *TERMINAL FLOWER2* (*TFL2*) gene controls the reproductive transition and meristem identity in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**, 597-605.
- Law, J.A., y Jacobsen, S.E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics* **11**, 204-220.

- Leihne, V., Kirpekar, F., Vågbø, C.B., van den Born, E., Krokan, H.E., Grini, P.E., Meza, T.J., y Falnes, P.Ø. (2011). Roles of Trm9- and ALKBH8-like proteins in the formation of modified wobble uridines in *Arabidopsis* tRNA. *Nucleic Acids Research* **39**, 7688-7701.
- Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565-570.
- Leyser, H.M., Pickett, F.B., Dharmasiri, S., y Estelle, M. (1996). Mutations in the *AXR3* gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the *SAUR-AC1* promoter. *Plant Journal* **10**, 403-413.
- Li, E., y Zhang, Y. (2014). DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6**, a019133.
- Liang, S.C., Hartwig, B., Perera, P., Mora-García, S., de Leau, E., Thornton, H., de Lima Alves, F., Rappsilber, J., Yang, S., James, G.V., Schneeberger, K., Finnegan, E.J., Turck, F., y Goodrich, J. (2015). Kicking against the PRCs - a domesticated transposase antagonises silencing mediated by Polycomb group proteins and is an accessory component of Polycomb Repressive Complex 2. *PLOS Genetics* **11**, e1005660.
- Liu, F., Quesada, V., Crevillén, P., Bäurle, I., Swiezewski, S., y Dean, C. (2007). The *Arabidopsis* RNA-binding protein FCA requires a lysine-specific demethylase 1 homolog to downregulate *FLC*. *Molecular Cell* **28**, 398-407.
- Liu, J., Ren, X., Yin, H., Wang, Y., Xia, R., Wang, Y., y Gong, Z. (2010). Mutation in the catalytic subunit of DNA polymerase α influences transcriptional gene silencing and homologous recombination in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **61**, 36-45.
- Liu, J., Deng, S., Wang, H., Ye, J., Wu, H.W., Sun, H.X., y Chua, N.H. (2016). *CURLY LEAF* regulates gene sets coordinating seed size and lipid biosynthesis. *Plant Physiology* **171**, 424-436.
- Liu, X., Kim, Y.J., Müller, R., Yumul, R.E., Liu, C., Pan, Y., Cao, X., Goodrich, J., y Chen, X. (2011). *AGAMOUS* terminates floral stem cell maintenance in *Arabidopsis* by directly repressing *WUSCHEL* through recruitment of Polycomb Group proteins. *Plant Cell* **23**, 3654-3670.
- Lu, C., Yu, F., Tian, L., Huang, X., Tan, H., Xie, Z., Hao, X., Li, D., Luan, S., y Chen, L. (2017). RPS9M, a mitochondrial ribosomal protein, is essential for central cell maturation and endosperm development in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **8**, 2171.
- Lu, F., Li, G., Cui, X., Liu, C., Wang, X.J., y Cao, X. (2008). Comparative analysis of JmjC domain-containing proteins reveals the potential histone demethylases in *Arabidopsis* and rice. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 886-896.
- Lu, F., Cui, X., Zhang, S., Liu, C., y Cao, X. (2010). JMJ14 is an H3K4 demethylase regulating flowering time in *Arabidopsis*. *Cell Research* **20**, 387-390.
- Lu, F., Cui, X., Zhang, S., Jenuwein, T., y Cao, X. (2011). *Arabidopsis* REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase. *Nature Genetics* **43**, 715-719.
- Luo, M., Bilodeau, P., Koltunow, A., Dennis, E.S., Peacock, W.J., y Chaudhury, A.M. (1999). Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**, 296-301.
- Ma, Z., y Dooner, H.K. (2004). A mutation in the nuclear-encoded plastid ribosomal protein S9 leads to early embryo lethality in maize. *Plant Journal* **37**, 92-103.
- Marmorstein, R., y Zhou, M.M. (2014). Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6**, a018762.
- Marti, L., Stefano, G., Tamura, K., Hawes, C., Renna, L., Held, M.A., y Brandizzi, F. (2010). A missense mutation in the vacuolar protein GOLD36 causes organizational defects in the ER and aberrant protein trafficking in the plant secretory pathway. *Plant Journal* **63**, 901-913.
- Martínez-Pérez, M., Aparicio, F., López-Gresa, M.P., Bellés, J.M., Sánchez-Navarro, J.A., y Pallás, V. (2017). *Arabidopsis* m⁶A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m⁶A abundance in its genomic RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **114**, 10755-10760.

- Martínez, G., Panda, K., Köhler, C., y Slotkin, R.K. (2016). Silencing in sperm cells is directed by RNA movement from the surrounding nurse cell. *Nature Plants* **2**, 16030.
- Meinke, D., y Koornneef, M. (1997). Community standards for *Arabidopsis* genetics. *Plant Journal* **12**, 247-253.
- Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics* **11**, 31-46.
- Meyerowitz, E.M. (1987). *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Genetics* **21**, 93-111.
- Micol-Ponce, R., Sánchez-García, A.B., Xu, Q., Barrero, J.M., Micol, J.L., y Ponce, M.R. (2015). *Arabidopsis INCURVATA2* regulates salicylic acid and abscisic acid signaling, and oxidative stress responses. *Plant and Cell Physiology* **56**, 2207-2219.
- Mielecki, D., Zugaj, D.L., Muszewska, A., Piwowarski, J., Chojnacka, A., Mielecki, M., Nieminuszcz, J., Grynberg, M., y Grzesiuk, E. (2012). Novel AlkB dioxygenases—alternative models for *in silico* and *in vivo* studies. *PLOS One* **7**, e30588.
- Minevich, G., Park, D.S., Blankenberg, D., Poole, R.J., y Hobert, O. (2012). CloudMap: a cloud-based pipeline for analysis of mutant genome sequences. *Genetics* **192**, 1249-1269.
- Molitor, A.M., Bu, Z., Yu, Y., y Shen, W.H. (2014). *Arabidopsis* AL PHD-PRC1 complexes promote seed germination through H3K4me3-to-H3K27me3 chromatin state switch in repression of seed developmental genes. *PLOS Genetics* **10**, e1004091.
- Mollá Morales, A. (2011). Caracterización genética y molecular de los mutantes *venosa* y *denticulata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Morita-Yamamuro, C., Tsutsui, T., Tanaka, A., y Yamaguchi, J. (2004). Knock-out of the plastid ribosomal protein S21 causes impaired photosynthesis and sugar-response during germination and seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **45**, 781-788.
- Mulo, P., Pursiheimo, S., Hou, C., Tyystjärvi, R., y Aro, E. (2003). Multiple effects of antibiotics on chloroplast and nuclear gene expression. *Functional Plant Biology* **30**, 1097-1103.
- Muñoz-Nortes, T., Pérez-Pérez, J.M., Ponce, M.R., Candela, H., y Micol, J.L. (2017). The *ANGULATA7* gene encodes a DnaJ-like zinc finger-domain protein involved in chloroplast function and leaf development in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **89**, 870-884.
- Nonogaki, H. (2014). Seed dormancy and germination — emerging mechanisms and new hypotheses. *Frontiers in Plant Science* **5**, 233.
- Ochando, I., Jover-Gil, S., Ripoll, J.J., Candela, H., Vera, A., Ponce, M.R., Martínez-Laborda, A., y Micol, J.L. (2006). Mutations in the microRNA complementarity site of the *INCURVATA4* gene perturb meristem function and adaxialize lateral organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **141**, 607-619.
- Ohad, N., Yadegari, R., Margossian, L., Hannon, M., Michaeli, D., Harada, J.J., Goldberg, R.B., y Fischer, R.L. (1999). Mutations in *FIE*, a WD Polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *Plant Cell* **11**, 407-416.
- Østergaard, L., y Yanofsky, M.F. (2004). Establishing gene function by mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **39**, 682-696.
- Page, D.R., y Grossniklaus, U. (2002). The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* **3**, 124-136.
- Pang, P.P., y Meyerowitz, E.M. (1987). *Arabidopsis thaliana*: a model system for plant molecular biology. *Nature Biotechnology* **5**, 1177-1181.
- Parinov, S., y Sundaresan, V. (2000). Functional genomics in *Arabidopsis*: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Current Opinion in Biotechnology* **11**, 157-161.
- Park, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., y Poethig, R.S. (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**, 3691-3696.

- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H.L., y Poethig, R.S. (2004). *SGS3* and *SGS2/SDE1/RDR6* are required for juvenile development and the production of *trans*-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes and Development* **18**, 2368-2379.
- Pérez-Pérez, J.M., Candela, H., Robles, P., López-Torrejón, G., del Pozo, J.C., y Micol, J.L. (2010). A role for *AUXIN RESISTANT3* in the coordination of leaf growth. *Plant and Cell Physiology* **51**, 1661-1673.
- Pérez-Pérez, J.M., Rubio-Díaz, S., Dhondt, S., Hernández-Romero, D., Sánchez-Soriano, J., Beemster, G.T., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (2011). Whole organ, venation and epidermal cell morphological variations are correlated in the leaves of *Arabidopsis* mutants. *Plant, Cell and Environment* **34**, 2200-2211.
- Pesaresi, P., Varotto, C., Meurer, J., Jahns, P., Salamini, F., y Leister, D. (2001). Knock-out of the plastid ribosomal protein L11 in *Arabidopsis*: effects on mRNA translation and photosynthesis. *Plant Journal* **27**, 179-189.
- Peterson, A.J., Mallin, D.R., Francis, N.J., Ketel, C.S., Stamm, J., Voeller, R.K., Kingston, R.E., y Simon, J.A. (2004). Requirement for sex comb on midleg protein interactions in *Drosophila* polycomb group repression. *Genetics* **167**, 1225-1239.
- Pfanschmidt, T., Blanvillain, R., Merendino, L., Courtois, F., Chevalier, F., Liebers, M., Grübler, B., Hommel, E., y Lerbs-Mache, S. (2015). Plastid RNA polymerases: orchestration of enzymes with different evolutionary origins controls chloroplast biogenesis during the plant life cycle. *Journal of Experimental Botany* **66**, 6957-6973.
- Phillips, A.L. (1998). Gibberellins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**, 115-124.
- Picó, S., Ortiz-Marchena, M.I., Merini, W., y Calonje, M. (2015). Deciphering the role of POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX1 variants in regulating the acquisition of flowering competence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **168**, 1286-1297.
- Pikaard, C.S., y Mittelsten Scheid, O. (2014). Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6**, a019315.
- Pinon, V., Etchells, J.P., Rossignol, P., Collier, S.A., Arroyo, J.M., Martienssen, R.A., y Byrne, M.E. (2008). Three *PIGGYBACK* genes that specifically influence leaf patterning encode ribosomal proteins. *Development* **135**, 1315-1324.
- Porco, S., Pěňčík, A., Rashed, A., Voß, U., Casanova-Sáez, R., Bishopp, A., Golebiowska, A., Bhosale, R., Swarup, R., Swarup, K., Peňáková, P., Novák, O., Staswick, P., Hedden, P., Phillips, A.L., Vissenberg, K., Bennett, M.J., y Ljung, K. (2016). Dioxygenase-encoding *AtDAO1* gene controls IAA oxidation and homeostasis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **113**, 11016-11021.
- Portereiko, M.F., Sandaklie-Nikolova, L., Lloyd, A., Dever, C.A., Otsuga, D., y Drews, G.N. (2006). *NUCLEAR FUSION DEFECTIVE1* encodes the *Arabidopsis* RPL21M protein and is required for karyogamy during female gametophyte development and fertilization. *Plant Physiology* **141**, 957-965.
- Provart, N.J., Alonso, J., Assmann, S.M., Bergmann, D., Brady, S.M., Brkljacic, J., Browse, J., Chapple, C., Colot, V., Cutler, S., Dangel, J., Ehrhardt, D., Friesner, J.D., Frommer, W.B., Grotewold, E., Meyerowitz, E., Nemhauser, J., Nordborg, M., Pikaard, C., Shanklin, J., Somerville, C., Stitt, M., Torii, K.U., Waese, J., Wagner, D., y McCourt, P. (2016). 50 years of *Arabidopsis* research: highlights and future directions. *New Phytologist* **209**, 921-944.
- Pyke, K., Zubko, M.K., y Day, A. (2000). Marking cell layers with spectinomycin provides a new tool for monitoring cell fate during leaf development. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1713-1720.
- Quesada, V., Sarmiento-Mañús, R., González-Bayón, R., Hricová, A., Pérez-Marcos, R., Graciá-Martínez, E., Medina-Ruiz, L., Leyva-Díaz, E., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (2011). *Arabidopsis* *RUGOSA2* encodes an mTERF family member required for mitochondrion, chloroplast and leaf development. *Plant Journal* **68**, 738-753.

- Reiter, R.S., Coomber, S.A., Bourett, T.M., Bartley, G.E., y Scolnik, P.A. (1994). Control of leaf and chloroplast development by the *Arabidopsis* gene *pale cress*. *Plant Cell* **6**, 1253-1264.
- Relichová, J. (1976). Some new mutants. *Arabidopsis Information Service* **13**, 25-28.
- Robles, P., y Micol, J.L. (2001). Genome-wide linkage analysis of *Arabidopsis* genes required for leaf development. *Molecular Genetics and Genomics* **266**, 12-19.
- Robles, P., Micol, J.L., y Quesada, V. (2015). Mutations in the plant-conserved MTERF9 alter chloroplast gene expression, development and tolerance to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **154**, 297-313.
- Robles, P., y Quesada, V. (2017). Emerging roles of mitochondrial ribosomal proteins in plant development. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 2595.
- Robles Ramos, P. (1999). Análisis genético de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología de la hoja. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Rodermel, S. (2001). Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends in Plant Science* **6**, 471-478.
- Romani, I., Tadini, L., Rossi, F., Masiero, S., Pribil, M., Jahns, P., Kater, M., Leister, D., y Pesaresi, P. (2012). Versatile roles of *Arabidopsis* plastid ribosomal proteins in plant growth and development. *Plant Journal* **72**, 922-934.
- Rouse, D., Mackay, P., Stirnberg, P., Estelle, M., y Leysner, O. (1998). Changes in auxin response from mutations in an *AUX/IAA* gene. *Science* **279**, 1371-1373.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F., y Coupland, G. (2000). Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* **288**, 1613-1616.
- Sanchez-Pulido, L., Devos, D., Sung, Z.R., y Calonje, M. (2008). RAWUL: a new ubiquitin-like domain in PRC1 ring finger proteins that unveils putative plant and worm PRC1 orthologs. *BMC Genomics* **9**, 308.
- Sander, J.D., y Joung, J.K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology* **32**, 347-355.
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **74**, 5463-5467.
- Saurin, A.J., Shao, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., y Kingston, R.E. (2001). A *Drosophila* Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature* **412**, 655-660.
- Saze, H., Shiraishi, A., Miura, A., y Kakutani, T. (2008). Control of genic DNA methylation by a *jmjC* domain-containing protein in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **319**, 462-465.
- Schneeberger, K., Ossowski, S., Lanz, C., Juul, T., Petersen, A.H., Nielsen, K.L., Jørgensen, J.E., Weigel, D., y Andersen, S.U. (2009). SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nature Methods* **6**, 550-551.
- Schomburg, F.M., Bizzell, C.M., Lee, D.J., Zeevaart, J.A., y Amasino, R.M. (2003). Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell* **15**, 151-163.
- Schubert, D., Primavesi, L., Bishopp, A., Roberts, G., Doonan, J., Jenuwein, T., y Goodrich, J. (2006). Silencing by plant Polycomb-group genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27. *EMBO Journal* **25**, 4638-4649.
- Serrano-Cartagena, J., Robles, P., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (1999). Genetic analysis of leaf form mutants from the *Arabidopsis* Information Service collection. *Molecular and General Genetics* **261**, 725-739.
- Serrano-Cartagena, J., Candela, H., Robles, P., Ponce, M.R., Pérez-Pérez, J.M., Piqueras, P., y Micol, J.L. (2000). Genetic analysis of *incurvata* mutants reveals three independent genetic operations at work in *Arabidopsis* leaf morphogenesis. *Genetics* **156**, 1363-1377.
- Shao, Z., Raible, F., Mollaaghbabaa, R., Guyon, J.R., Wu, C.T., Bender, W., y Kingston, R.E. (1999). Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* **98**, 37-46.

- Shaver, S., Casas-Mollano, J.A., Cerny, R.L., y Cerutti, H. (2010). Origin of the Polycomb repressive complex 2 and gene silencing by an E(z) homolog in the unicellular alga *Chlamydomonas*. *Epigenetics* **5**, 301-312.
- Shen, W.H., Parmentier, Y., Hellmann, H., Lechner, E., Dong, A., Masson, J., Granier, F., Lepiniec, L., Estelle, M., y Genschik, P. (2002). Null mutation of *AtCUL1* causes arrest in early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 1916-1928.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., y Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941-953.
- Simpson, G.G., y Dean, C. (2002). *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science* **296**, 285-289.
- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B., y Hood, L.E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**, 674-679.
- Sowerby, J., y Smith, J.E. (1813). *English Botany*.
- Spedaletti, V., Polticelli, F., Capodaglio, V., Schininà, M.E., Stano, P., Federico, R., y Tavladoraki, P. (2008). Characterization of a lysine-specific histone demethylase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* **47**, 4936-4947.
- Stirnberg, P., Liu, J.P., Ward, S., Kendall, S.L., y Leyser, O. (2012). Mutation of the cytosolic ribosomal protein-encoding *RPS10B* gene affects shoot meristematic function in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* **12**, 160.
- Sung, Z.R., Belachew, A., Shunong, B., y Bertrand-Garcia, R. (1992). *EMF*, an *Arabidopsis* gene required for vegetative shoot development. *Science* **258**, 1645-1647.
- Szakonyi, D., y Byrne, M.E. (2011). Ribosomal protein L27a is required for growth and patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **65**, 269-281.
- Tabata, R., Kamiya, T., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Yamada, M., Hasebe, M., Fujiwara, T., y Sawa, S. (2013). Identification of an EMS-induced causal mutation in a gene required for boron-mediated root development by low-coverage genome re-sequencing in *Arabidopsis*. *Plant Signaling and Behaviour* **8**, e22534.
- Tadini, L., Pesaresi, P., Kleine, T., Rossi, F., Guljamow, A., Sommer, F., Mühlhaus, T., Schroda, M., Masiero, S., Pribil, M., Rothbart, M., Hedtke, B., Grimm, B., y Leister, D. (2016). GUN1 controls accumulation of the plastid ribosomal protein S1 at the protein level and interacts with proteins involved in plastid protein homeostasis. *Plant Physiology* **170**, 1817-1830.
- Tameshige, T., Fujita, H., Watanabe, K., Toyokura, K., Kondo, M., Tatematsu, K., Matsumoto, N., Tsugeki, R., Kawaguchi, M., Nishimura, M., y Okada, K. (2013). Pattern dynamics in adaxial-abaxial specific gene expression are modulated by a plastid retrograde signal during *Arabidopsis thaliana* leaf development. *PLOS Genetics* **9**, e1003655.
- Taylor, W.C. (1989). Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 211-233.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Tian, Q., y Reed, J.W. (1999). Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* *SHY2/IAA3* gene. *Development* **126**, 711-721.
- Tiller, N., y Bock, R. (2014). The translational apparatus of plastids and its role in plant development. *Molecular Plant* **7**, 1105-1120.
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y., y Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Reviews Genetics* **5**, 123-135.
- Trewick, S.C., Henshaw, T.F., Hausinger, R.P., Lindahl, T., y Sedgwick, B. (2002). Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature* **419**, 174-178.

- Turck, F., Roudier, F., Farrona, S., Martin-Magniette, M.L., Guillaume, E., Buisine, N., Gagnot, S., Martienssen, R.A., Coupland, G., y Colot, V. (2007). Arabidopsis TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genetics* **3**, e86.
- Turner, S., y Sieburth, L.E. (2002). Vascular patterning. En *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists.
- Van Lijsebettens, M., Vanderhaeghen, R., De Block, M., Bauw, G., Villarroel, R., y Van Montagu, M. (1994). An S18 ribosomal protein gene copy at the *Arabidopsis PFL* locus affects plant development by its specific expression in meristems. *EMBO Journal* **13**, 3378-3388.
- Van Minnebruggen, A., Neyt, P., De Groeve, S., Coussens, G., Ponce, M.R., Micol, J.L., y Van Lijsebettens, M. (2010). The *ang3* mutation identified the ribosomal protein gene *RPL5B* with a role in cell expansion during organ growth. *Physiologia Plantarum* **138**, 91-101.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P., y Bartel, D.P. (2004). The action of *ARGONAUTE1* in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes and Development* **18**, 1187-1197.
- Veerappan, C.S., Avramova, Z., y Moriyama, E.N. (2008). Evolution of SET-domain protein families in the unicellular and multicellular Ascomycota fungi. *BMC Evolutionary Biology* **8**, 190.
- Velasquez, S.M., Ricardi, M.M., Poulsen, C.P., Oikawa, A., Dilokpimol, A., Halim, A., Mangano, S., Denita Juarez, S.P., Marzol, E., Salgado Salter, J.D., Dorosz, J.G., Borassi, C., Möller, S.R., Buono, R., Ohsawa, Y., Matsuoka, K., Otegui, M.S., Scheller, H.V., Geshi, N., Petersen, B.L., Iusem, N.D., y Estevez, J.M. (2015). Complex regulation of prolyl-4-hydroxylases impacts root hair expansion. *Molecular Plant* **8**, 734-746.
- Vongs, A., Kakutani, T., Martienssen, R.A., y Richards, E.J. (1993). *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science* **260**, 1926-1928.
- Wang, G., y Köhler, C. (2017). Epigenetic processes in flowering plant reproduction. *Journal of Experimental Botany* **68**, 797-807.
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., y Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**, 873-878.
- Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G.C., Yue, Y., Han, D., Fu, Y., Parisien, M., Dai, Q., Jia, G., Ren, B., Pan, T., y He, C. (2014). *N*⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature* **505**, 117-120.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L., y Sängler, H.L. (1994). RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **76**, 567-576.
- Wilson-Sánchez, D., Lup, S.D., Andreu-Andreu, S., y Micol, J.L. (2018a). EasyMap: a program to map point and insertional mutations accessible to any user. Pendiente de aceptación.
- Wilson-Sánchez, D., Sarmiento-Mañús, R., Lup, S.D., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (2018b). Next-generation forward genetic screens: using simulated data to improve the design of mapping-by-sequencing experiments in Arabidopsis. Pendiente de aceptación.
- Wilson, D.N., y Doudna Cate, J.H. (2012). The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**, a011536.
- Williams, J., Phillips, A.L., Gaskin, P., y Hedden, P. (1998). Function and substrate specificity of the gibberellin 3 β -hydroxylase encoded by the Arabidopsis *GA4* gene. *Plant Physiology* **117**, 559-563.
- Xu, L., y Shen, W.H. (2008). Polycomb silencing of *KNOX* genes confines shoot stem cell niches in *Arabidopsis*. *Current Biology* **18**, 1966-1971.
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 225-251.
- Yang, C., Bratzel, F., Hohmann, N., Koch, M., Turck, F., y Calonje, M. (2013). VAL- and AtBMI1-mediated H2Aub initiate the switch from embryonic to postgerminative growth in *Arabidopsis*. *Current Biology* **23**, 1324-1329.

- Yang, C.H., Chen, L.J., y Sung, Z.R. (1995). Genetic regulation of shoot development in *Arabidopsis*: role of the *EMF* genes. *Developmental Biology* **169**, 421-435.
- Yang, H., Han, Z., Cao, Y., Fan, D., Li, H., Mo, H., Feng, Y., Liu, L., Wang, Z., Yue, Y., Cui, S., Chen, S., Chai, J., y Ma, L. (2012a). A companion cell-dominant and developmentally regulated H3K4 demethylase controls flowering time in *Arabidopsis* via the repression of *FLC* expression. *PLOS Genetics* **8**, e1002664.
- Yang, H., Mo, H., Fan, D., Cao, Y., Cui, S., y Ma, L. (2012b). Overexpression of a histone H3K4 demethylase, JMJ15, accelerates flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* **31**, 1297-1308.
- Yao, Y., Ling, Q., Wang, H., y Huang, H. (2008). Ribosomal proteins promote leaf adaxial identity. *Development* **135**, 1325-1334.
- Yin, T., Pan, G., Liu, H., Wu, J., Li, Y., Zhao, Z., Fu, T., y Zhou, Y. (2012). The chloroplast ribosomal protein L21 gene is essential for plastid development and embryogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* **235**, 907-921.
- Yoshida, N., Yanai, Y., Chen, L., Kato, Y., Hiratsuka, J., Miwa, T., Sung, Z.R., y Takahashi, S. (2001). EMBRYONIC FLOWER2, a novel Polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 2471-2481.
- Yu, L., Yu, X., Shen, R., y He, Y. (2005). *HYL1* gene maintains venation and polarity of leaves. *Planta* **221**, 231-242.
- Zhang, H., Luo, M., Day, R.C., Talbot, M.J., Ivanova, A., Ashton, A.R., Chaudhury, A.M., Macknight, R.C., Hrmova, M., y Koltunow, A.M. (2015). Developmentally regulated *HEART STOPPER*, a mitochondrially targeted L18 ribosomal protein gene, is required for cell division, differentiation, and seed development in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **66**, 5867-5880.
- Zhang, J., Yuan, H., Yang, Y., Fish, T., Lyi, S.M., Thannhauser, T.W., Zhang, L., y Li, L. (2016). Plastid ribosomal protein S5 is involved in photosynthesis, plant development, and cold stress tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **67**, 2731-2744.
- Zhao, L., y Sack, F.D. (1999). Ultrastructure of stomatal development in *Arabidopsis* (Brassicaceae) leaves. *American Journal of Botany* **86**, 929-939.
- Zhou, Y., Romero-Campero, F.J., Gómez-Zambrano, A., Turck, F., y Calonje, M. (2017). H2A monoubiquitination in *Arabidopsis thaliana* is generally independent of LHP1 and PRC2 activity. *Genome Biology* **18**, 69.

VI.- MATERIALES Y MÉTODOS

VI.- MATERIALES Y MÉTODOS

Para la redacción de la introducción de esta memoria se han seguido las mismas pautas que en Tesis anteriores de los laboratorios de M.R. Ponce y J.L. Micol. Se ha preferido usar los acrónimos castellanizados ADN y ARN —de uso común en los medios de comunicación españoles—, en lugar de los recomendados por la International Union of Pure and Applied Chemistry, DNA y RNA, para los ácidos desoxirribonucleico y ribonucleico, respectivamente. Esta elección no está basada en ningún argumento que se considere incontestable; ambas opciones son aceptadas por el Diccionario de la Lengua Española (vigésimotercera edición, 2015) de la Real Academia Española (RAE). Tal como recomienda la RAE en su Ortografía de la lengua española (2010), en esta memoria no se realiza el plural de las siglas añadiendo al final una s minúscula: se escribe “el ARN” y también “los ARN”.

La nomenclatura que se aplica en esta memoria a genes, mutaciones y fenotipos nuevos se atiene a las pautas propuestas para *Arabidopsis* por Meinke y Koornneef (1997). No hemos traducido al español muchos de los nombres de genes y proteínas que se mencionan en esta memoria; en estos casos solo hemos usado la cursiva para los genes. Los transgenes se denotan según lo establecido en las instrucciones a los autores de la revista *Plant Cell*. Los genotipos completos, como *icu11-1/icu11-1*, en los que los alelos en cromosomas homólogos se separan con una barra, se han utilizado únicamente cuando fue imprescindible. Salvo que se indique lo contrario, los individuos que se describen en este trabajo son homocigóticos para la mutación que se menciona en cada caso. Hemos utilizado en algunos casos un punto y coma como separador entre cromosomas no homólogos. Por ejemplo, el genotipo *ICU11/icu11-1;cp2-3/cp2-3* es el de una planta sesquimutante, heterocigótica para un alelo silvestre (*ICU11*) y otro mutante (*icu11-1*) del gen *ICU11* (en el cromosoma 1) y homocigótica para el alelo mutante *cp2-3* del gen *CP2* (en el cromosoma 3).

Las estirpes de *Arabidopsis* y las condiciones de cultivo empleadas en esta Tesis se describen en las páginas 46, 62 y 93. Para la identificación de genes causantes de fenotipos de interés hemos empleando la secuenciación masiva (páginas 46, 62 y 96); también hemos secuenciado masivamente ARN (página 97) y ADN previamente tratado con bisulfito sódico (página 97). Hemos realizado análisis histológicos y morfométricos (páginas 64 y 95), histoquímicos y de microscopía confocal (página 95) de los mutantes a estudio y determinado su momento de floración (página 93). Hemos aislado ARN para su retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa (páginas 63 y 96). Hemos generado

construcciones para el rescate fenotípico de mutantes (páginas 48, 63 y 94), fusiones transcripcionales con el gen de la β -glucuronidasa (página 94), fusiones traduccionales con el de la proteína fluorescente verde (página 94) y de intercambio de promotores (página 94). También hemos realizado experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (página 98) y alineamientos múltiples de secuencias de ADN y proteicas, así como otros análisis bioinformáticos y búsquedas *in silico* (página 96).

VII.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

VII.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

VII.1.- La combinación de la secuenciación masiva y el análisis de ligamiento facilita la identificación de las mutaciones que causan un fenotipo de interés en *Arabidopsis*

La secuenciación masiva ha reducido sustancialmente el tiempo y el esfuerzo necesarios para la identificación de genes de interés en especies modelo. Hemos combinado con éxito en esta Tesis el análisis iterativo del ligamiento a marcadores moleculares con la secuenciación de genomas completos. Hemos identificado así las mutaciones causantes del fenotipo de los mutantes *anu1-1*, *anu4-1*, *anu9-1*, *anu12-1*, *sca1-1* y *sca5*. Las lecturas derivadas de la secuenciación masiva de estos genomas, cuyo fondo genético es *Ler*, fueron alineadas con el genoma de referencia de Col-0. Todos los polimorfismos de un solo nucleótido compartidos por dos o más de los mutantes a estudio fueron descartados, ya que se entendió que correspondían a diferencias entre el genoma de *Ler* y el de referencia. El análisis de los intervalos candidatos previamente definidos y la aplicación de varios filtros sucesivos condujo a la identificación de un número moderado de mutaciones candidatas. Dichos filtros incluyeron la exclusión de los polimorfismos que (a) no fueran transiciones como las que casi siempre induce el EMS (G/C→A/T) y (b) radicasen en intrones o regiones intergénicas. Hemos demostrado que este abordaje es viable y relativamente rápido y económico.

Los continuos avances que experimentan las tecnologías de secuenciación masiva y sus herramientas bioinformáticas asociadas han determinado que el método comentado en el apartado anterior y descrito en la página 45 y siguientes de esta memoria haya sido superado en efectividad por otros más recientes. En efecto, el propio laboratorio de J.L. Micol, entre otros, ha desarrollado herramientas bioinformáticas para la identificación de mutaciones a partir de la secuenciación masiva de poblaciones cartográficas derivadas de exocruzamientos, retrocruzamientos o pseudoretrocruzamientos de uno o varios mutantes de interés (Wilson-Sánchez *et al.*, 2018a; 2018b). Estos abordajes recientes no requieren análisis de ligamiento previo.

No obstante lo anterior, nuestro estudio de los mutantes *anu1-1*, *anu4-1*, *anu9-1*, *anu12-1*, *sca1-1* y *sca5* no solo resultó útil en su momento en el ámbito metodológico. Uno de sus resultados es la identificación de los primeros alelos mutantes viables de los genes *SECA2* y *NAP14*, que facilitarán la ulterior disección —por quienes estén interesados en hacerlo— de sus contribuciones a la biogénesis del cloroplasto y la organogénesis foliar.

VII.2.- El ribosoma del cloroplasto contribuye a la polaridad dorsoventral de las hojas de Arabidopsis

Otro de los genes que hemos identificado en esta Tesis empleando la metodología descrita en el apartado anterior es *SCA1*, que codifica un componente estructural de la subunidad menor del ribosoma del cloroplasto (PRPS5). El trabajo que se presenta en la página 59 y siguientes de esta memoria demuestra que no solo el ribosoma citoplásmico, tiene actividad morfogenética: también la presenta el ribosoma del cloroplasto, que participa en la especificación de la dorsoventralidad foliar. Se requerirán estudios adicionales para establecer (a) el motivo de que las mutaciones *sca1* interaccionen genéticamente con los alelos de *AS2* pero no lo hagan con los de *AS1* y (b) si el papel morfogenético del ribosoma del cloroplasto depende de la traducción de moléculas de ARNm que presenten alguna característica estructural común.

VII.3.- Al menos dos de los genes de la familia CUPULIFORMIS codifican nuevos componentes de la maquinaria epigenética

El trabajo que se presenta en la página 73 y siguientes describe la identificación y caracterización de una nueva familia génica, a la que hemos llamado CP, cuyos miembros codifican proteínas con el dominio que caracteriza a las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe^{2+} (2OGD). *ICU11* y *CP2*, dos de los miembros de la familia CP, son componentes de la maquinaria epigenética que actúan directa o indirectamente como reguladores negativos de centenares de genes, mediante un mecanismo desconocido, que conlleva la modificación química de la histona H3 pero no la metilación del ADN.

Nuestro descubrimiento de la familia CP amplía el espectro de las proteínas que integran la maquinaria epigenética. La comprensión de sus funciones requerirá el estudio de los efectos individuales y combinados de la insuficiencia o el exceso de función de los genes *CP3*, *CP4* y *CP5*. También será necesario realizar experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina seguida de secuenciación masiva, empleando para ello anticuerpos contra marcas epigenéticas distintas de las aquí estudiadas. La disección funcional de los promotores de los genes *ICU11* y *CP2* y la identificación de los interactores físicos de las proteínas *ICU11* y *CP2* también contribuirán a desentrañar el papel que la familia CP juega en la epigenética de *Arabidopsis*, de otras plantas y de los eucariotas en conjunto.

VIII.- PUBLICACIONES

Rapid identification of *angulata* leaf mutations using next-generation sequencing

Eduardo Mateo-Bonmatí · Rubén Casanova-Sáez · Héctor Candela · José Luis Micol

Received: 15 May 2014 / Accepted: 28 July 2014 / Published online: 8 August 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Map-based (positional) cloning has traditionally been the preferred strategy for identifying the causal genes underlying the phenotypes of mutants isolated in forward genetic screens. Massively parallel sequencing technologies are enabling the rapid cloning of genes identified in such screens. We have used a combination of linkage mapping and whole-genome re-sequencing to identify the causal mutations in four loss-of-function *angulata* (*anu*) mutants. These mutants were isolated in a screen for mutants with defects in leaf shape and leaf pigmentation. Our results show that the *anu1-1*, *anu4-1*, *anu9-1* and *anu12-1* mutants carry new alleles of the previously characterized *SECA2*, *TRANSLOCON AT THE OUTER MEMBRANE OF CHLOROPLASTS 33 (TOC33)*, *NON-INTRINSIC ABC PROTEIN 14 (NAPI4)* and *CLP PROTEASE PROTEOLYTIC SUBUNIT 1 (CLPR1)* genes. Re-sequencing the genomes of fine mapped mutants is a feasible approach that has allowed us to identify a

moderate number of candidate mutations, including the one that causes the mutant phenotype, in a nonstandard genetic background. Our results indicate that *anu* mutations specifically affect plastid-localized proteins involved in diverse processes, such as the movement of peptides through chloroplast membranes (*ANU1* and *ANU4*), metal homeostasis (*ANU9*) and protein degradation (*ANU12*).

Keywords Arabidopsis · Chloroplast mutants · Cloning-by-sequencing · NGS · SHOREmap · Whole-genome sequencing

Abbreviations

ANU ANGULATA
das Days after stratification
EMS Ethylmethane sulfonate
NGS Next-generation sequencing

E. Mateo-Bonmatí and R. Casanova-Sáez have contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00425-014-2137-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

E. Mateo-Bonmatí · R. Casanova-Sáez · H. Candela · J. L. Micol (✉)
Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández,
Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante, Spain
e-mail: jlmicol@umh.es

Present Address:

R. Casanova-Sáez
Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Umeå
Plant Science Centre, Swedish University of Agricultural
Sciences, SE-901 83 Umea, Sweden

Introduction

Over the past 25 years, genetic and genomic approaches have led to unprecedented advances in the study of plant physiology, pathology and development using *Arabidopsis thaliana* (hereafter, Arabidopsis) as a model organism (Meinke et al. 1998; Lukowitz et al. 2000). For many years, map-based cloning (i.e. the identification of a mutated gene based on linkage analysis), also known as positional cloning, has been the gold standard for cloning the causal genes of the phenotypes of mutants isolated in forward genetic screens (Peters et al. 2003). This strategy starts with the isolation of mutants exhibiting a given phenotype, and continues with the generation of mapping populations

and the identification of linked molecular markers flanking the mutated gene. The candidate interval defined in this way typically contains a few genes, of which only one is expected to carry a lesion, allowing its identification by conventional Sanger sequencing. In *Arabidopsis*, the time required to complete these steps has dropped from an average of 4 years to less than a year (Jander et al. 2002; Ponce et al. 2006). Factors that have propitiated this acceleration are the availability of a high-quality annotated genome sequence for the Columbia-0 (Col-0) accession (The Arabidopsis Genome Initiative 2000), the identification of thousands of polymorphisms between the Col-0 and Landsberg *erecta* (*Ler*) accessions (Jander et al. 2002), and the availability of gene-indexed collections of T-DNA insertional mutants (Alonso et al. 2003), which very often have helped to confirm the identity of the mutated genes. However, despite the above-mentioned advances, map-based cloning remains a time-consuming and labor-intensive task.

Next-generation sequencing (NGS) technologies produce vast amounts of sequence data and have opened new avenues for plant research (Lister et al. 2009). Different strategies have been developed to rapidly identify the mutations that underlie an interesting phenotype by combining NGS and bulked segregant analysis. Mapping-by-sequencing or SHOREmapping, as this technique is also known, allows one to map and clone a gene in a single experiment by sequencing pooled genomic DNA from selected individuals of an appropriate mapping population (Schneeberger et al. 2009).

In our laboratory, a large-scale screen for leaf mutants has allowed the identification of 269 mutants; complementation analyses indicated that their mutations damage 131 different genes. All these mutants exhibit various defects in leaf shape or leaf size, often accompanied by altered pigmentation (Berná et al. 1999; Serrano-Cartagena et al. 1999). So far, 58 of these genes required for leaf organogenesis have been cloned using map-based cloning, 31 of which are shown in Table 1.

There are, however, numerous mutants for which map positions have been defined but the affected genes still await to be identified. These mutants represent a significant investment of effort and resources that has not yet reached fruition. In this work, we report the use of massively parallel Illumina sequencing to identify the causal mutations in four loss-of-function *angulata* (*anu*) mutants. These non-allelic mutants are recessive and belong to one of the most abundant phenotypic classes established in our screen, defining four different genes (*ANU1*, *ANU4*, *ANU9* and *ANU12*). We show that sequencing the genomes of fine mapped mutants is a feasible approach that leads to the identification of a moderate number of candidate mutations, including the one that causes the *anu* phenotype.

Interestingly, in all four cases, the genes identified were found to encode plastid-localized proteins, which are involved in processes such as plastid protein localization, metal homeostasis and protein degradation.

Materials and methods

Plant material and growth conditions

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. wild-type accessions Col-0 and *Ler*, as well as the T-DNA insertion lines *seca2-1* [SALK_014008 (N514008)], *anu4-2* [SALK_122849 (N622849)], *nap14* [SALK_116866 (N616866)] and *clpr1-2* [SALK_088407 (N588407)], were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC). The *anu1-1*, *anu4-1*, *anu9-1* and *anu12-1* mutants were isolated after EMS mutagenesis of *Ler* as previously described (Berná et al. 1999). All plants were grown on half-strength Murashige and Skoog (MS) agar medium [2.15 g l⁻¹ (Duchefa), pH 5.7, and 1 % sucrose], at 20 ± 1 °C and 60–70 % relative humidity under continuous fluorescent light (~75 μmol m⁻² s⁻¹) as previously described (Ponce et al. 1998). Crosses and allelism tests were performed as previously described (Berná et al. 1999).

Re-sequencing of mutant genomes

Plant DNA was isolated using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). DNA samples were sequenced by Fasteris (Geneva, Switzerland) using the Illumina HiSeq2000 platform by combining three different libraries (each corresponding to a different mutant genome) per lane. Paired-end reads were 100-bp long. The raw data have been deposited at the Short Read Archive database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) with accession number SRP043639. The TAIR10 genome sequence and annotation data were downloaded from the TAIR database (<http://www.arabidopsis.org>). Reads were aligned to reference genome using the mapflowcell command of SHORE (Schneeberger et al. 2009), selecting BWA (Li and Durbin 2009) as the read aligner and allowing a maximum edit distance of 3 (-n 3). The edit distance is the minimum number of changes (substitutions, insertions or deletions of individual bases) required to align the read to the reference genome sequence. We allowed one insertion/deletion of length up to three nucleotides per read (-g 1 -e 3). The alignments of the forward and reverse reads were then combined using the merge command of SHORE, and the resulting file was used as the input for SHORE's correct4pe option, which removes incorrect alignments inferred from the relative locations of paired-end reads. After filtering out incorrectly mapped reads, we used the consensus command of SHORE

Table 1 Genes identified by map-based cloning in leaf mutants isolated in the laboratory of J.L. Micol

Mutation (alternative name)	Gene name(s)	Origin	AGI code(s)	F ₂ mapping population
<i>angulata10-1</i>	<i>ANU10</i> ¹	EMS	At1g28530	332
<i>angusta1-1</i>	<i>PGY1</i> ² , <i>ANG1</i> ^U , <i>DEN12</i> ³	EMS	At2g27530	82
<i>angusta3-1</i>	<i>ANG3</i> ⁴	EMS	At5g39740	100
<i>apiculata2-1</i>	<i>API2</i> ⁵	EMS	At4g14320	138
<i>denticulata5-1</i>	<i>DEN5</i> ³	EMS	At2g01250	20
<i>denticulata12-1</i>	<i>PGY1</i> ² , <i>ANG1</i> ^U , <i>DEN12</i> ³	EMS	At2g27530	19
<i>denticulata29-1</i>	<i>DEN29</i> ³	FN	At1t2g19720–30	299
<i>denticulata30-1</i>	<i>DEN30</i> ³	EMS	At4g31985	264
<i>exigua1-1</i>	<i>EXI1</i> ⁶	EMS	At4g18780	217
<i>exigua2-1</i>	<i>EXI2</i> ⁶	EMS	At5g44030	417
<i>exigua5-1</i>	<i>EXI5</i> ⁶	EMS	At5g17420	278
<i>hemivenata-1</i>	<i>HVE</i> ⁷	S	At2g02560	1,545
<i>incurvata2-1</i>	<i>ICU2</i> ⁸	AIS	At5g67100	1,061
<i>incurvata4-1</i>	<i>ATHB15</i> ⁹ , <i>ICU4</i> ¹⁰ , <i>CNA</i> ¹¹	AIS	At1g52150	130
<i>incurvata6</i>	<i>AXR3</i> ¹² , <i>ICU6</i> ¹³	EMS	At1g04250	62
<i>incurvata8-2 (hyll1-12)</i>	<i>HYL1</i> ¹⁴ , <i>ICU8</i> ¹⁵	FN	At1g09700	462
<i>incurvata9-2 (ago1-52)</i>	<i>AGO1</i> ¹⁶ , <i>ICU9</i> ¹⁵	EMS	At1g48410	311
<i>incurvata13-1</i>	<i>AXR6</i> ¹⁷ , <i>CUL1</i> ¹⁸ , <i>ICU13</i> ¹⁹	AIS	At4g02570	481
<i>incurvata15-3 (hen1-13)</i>	<i>HEN1</i> ²⁰ , <i>ICU15</i> ¹⁵	FN	At4g20910	60
<i>rotunda2-1</i>	<i>RON2</i> ²¹ , <i>LUG</i> ²²	EMS	At4g32551	1,424
<i>rugosa1-1</i>	<i>RUG1</i> ²³	EMS	At5g08280	438
<i>rugosa2-1</i>	<i>RUG2</i> ²⁴	EMS	At4g02990	244
<i>scabra3-1</i>	<i>SCA3</i> ²⁵	EMS	At2g24120	441
<i>transcurvata1-1</i>	<i>TCU1</i> ²⁶	EMS	At4g37130	740
<i>transcurvata2-1</i>	<i>TCU2</i> ²⁷	EMS	At1g03150	1,137
<i>ultracurvata1-1</i>	<i>DWF12</i> ²⁸ , <i>BIN2</i> ²⁹ , <i>UCU1</i> ³⁰	EMS	At4g18710	164
<i>ultracurvata2-1</i>	<i>FKBP42</i> ³¹ , <i>TWD1</i> ³² , <i>UCU2</i> ³³	FN	At3g21640	172
<i>venosa2-1 (re-3)</i>	<i>RE</i> ^{34, 35}	EMS	At2g37860	54
<i>venosa3-1</i>	<i>VEN3</i> ³⁶	EMS	At1g29900	312
<i>venosa5-1 (rer3-1)</i>	<i>VEN5</i> ³⁷ , <i>RER3</i> ³⁷	EMS	At3g08640	170
<i>venosa6-1</i>	<i>VEN6</i> ³⁶	EMS	At3g26900	125

AIS Arabidopsis information service (unknown mutagen), FN fast neutrons, S spontaneous

^U Unpublished; ¹ Casanova-Sáez et al. (2014b); ² Pinon et al. (2008); ³ Horiguchi et al. (2011); ⁴ Van Minnebruggen et al. (2010); ⁵ Casanova-Sáez et al. (2014a); ⁶ Rubio-Díaz et al. (2012); ⁷ Alonso-Peral et al. (2006); ⁸ Barrero et al. (2007); ⁹ Ohashi-Ito and Fukuda (2003); ¹⁰ Ochando et al. (2006); ¹¹ Green et al. (2005); ¹² Leyser et al. (1996); ¹³ Pérez-Pérez et al. (2010); ¹⁴ Lu and Fedoroff (2000); ¹⁵ Jover-Gil et al. (2012); ¹⁶ Bohmert et al. (1998); ¹⁷ Hobbie et al. (2000); ¹⁸ Hellmann et al. (2003); ¹⁹ Esteve-Bruna et al. (2013); ²⁰ Chen et al. (2002); ²¹ Cnops et al. (2004); ²² Liu and Meyerowitz (1995); ²³ Quesada et al. (2013); ²⁴ Quesada et al. (2011); ²⁵ Hricová et al. (2006); ²⁶ Ferrández-Ayela et al. (2013a); ²⁷ Ferrández-Ayela et al. (2013b); ²⁸ Choe et al. (2002); ²⁹ Li et al. (2001); ³⁰ Pérez-Pérez et al. (2002); ³¹ Kamphausen et al. (2002); ³² Geisler et al. (2003); ³³ Pérez-Pérez et al. (2004); ³⁴ Rédei and Hirono (1964); ³⁵ González-Bayón et al. (2006); ³⁶ Mollá-Morales et al. (2011); ³⁷ Pérez-Pérez et al. (2013)

to detect differences between the aligned reads and the reference genome. This option produces a file containing homozygous substitutions (homozygous_snp.txt). For a given candidate interval, we kept those changes that were detected only in the genome of the mutant. We discarded all changes that were common to two or more of the sequenced genomes, as these were considered to be *Ler/Col-0* polymorphisms. The changes selected were then subjected to additional filters to select for the most likely

candidate mutations (e.g. selection of G/C-to-A/C transition mutations and non-synonymous substitutions). SHOREmap was used to assess the impact of homozygous substitutions on the protein sequence (Schneeberger et al. 2009). The effects on transcript splicing were determined manually, by checking if candidate mutations located near intron–exon boundaries damaged the consensus sequences of donor or acceptor splice sites. The complete bioinformatic analysis took 2–3 days using desktop computers

(with Intel i7 CPUs and 24–64 gigabytes of RAM) running the Ubuntu Linux operating system.

Gene constructs and plant transformation

To make the overexpression transgenes, we amplified the full-length coding sequence of each gene from Col-0 cDNA using Phusion polymerase (Thermo Scientific) and primers containing attB1 and attB2 sites (Suppl. Table S1). The amplification products were cloned into the pGEM-T Easy 221 donor vector (kindly provided by Prof. B. Scheres, Utrecht University) using BP Clonase II (Life Technologies). The inserts were sequenced using an ABI PRISM 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems), and then transferred to the pMDC32 destination vector (Curtis and Grossniklaus 2003) using LR Clonase II (Life Technologies). All constructs were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (C58C1 Rif^R) electrocompetent cells, which were used to transform Arabidopsis plants by the floral dip method (Clough and Bent 1998). T₁ transformants were selected on plates supplemented with 15 µg ml⁻¹ hygromycin B (Invitrogen).

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA from Col-0 rosettes collected 21 days after stratification (das) was extracted using TRIzol Reagent (Sigma Aldrich). First-strand cDNA was synthesized using a poly-T primer (Suppl. Table S1) and the Maxima Reverse Transcriptase system (Fermentas) following the manufacturer's instructions.

Results

Fine mapping of *angulata* mutants

To identify genes required for leaf morphogenesis, we screened in advance for ethylmethane sulfonate (EMS)-induced mutants with abnormal shape or size of vegetative leaves, and assigned them to phenotypic classes (Berná et al. 1999). The Angulata (Anu) phenotypic class comprises 18 recessive mutants in the *Ler* background, which define 12 different loci, *ANU1* to *ANU12*. All the *anu* mutations are fully penetrant, with only minor variations in expressivity, and determine leaves with a pale-yellow lamina and irregular leaf margins with prominent teeth. To further our understanding of the molecular processes that underlie the Anu phenotype, we focused on the cloning of the *anu1-1*, *anu4-1*, *anu9-1* and *anu12-1* mutations (Fig. 1) using a strategy combining linkage mapping and whole-genome re-sequencing. Rough map positions had previously been obtained for these mutations at chromosomes 1

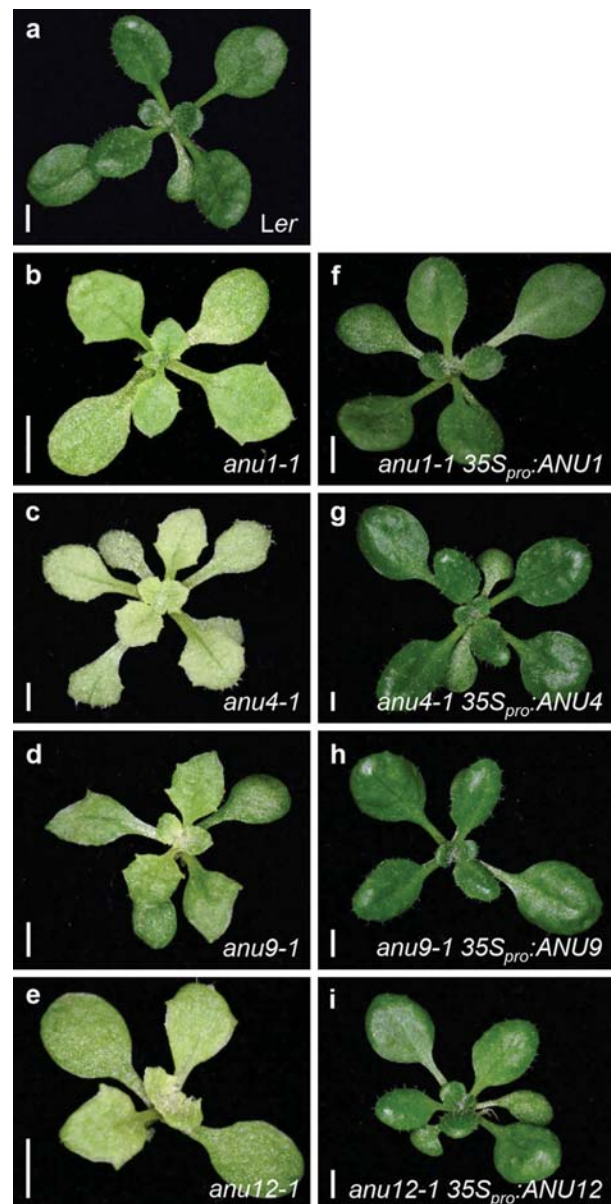


Fig. 1 Phenotypic rescue of the mutants studied in this work. **a–e** Rosettes of the wild-type *Ler* (**a**), and the *anu1-1* (**b**), *anu4-1* (**c**), *anu9-1* (**d**) and *anu12-1* (**e**) mutants. **f–i** Rosettes of the *anu1-1 35S_{pro}:ANU1* (**f**), *anu4-1 35S_{pro}:ANU4* (**g**), *anu9-1 35S_{pro}:ANU9* (**h**) and *anu12-1 35S_{pro}:ANU12* (**i**) mutant and transgenic plants. Pictures were taken 16 days after stratification (das). Scale bars 2 mm

(*anu1-1*, *anu4-1* and *anu12-1*) and 5 (*anu9-1*) (Robles and Micol 2001). We first refined the known map positions of these mutants using a number of phenotypically mutant F₂ plants ranging from 209 to 1,270, derived from outcrosses of each mutant (in the *Ler* background) to the Columbia-0 (Col-0) wild type. Using molecular markers, we defined relatively narrow candidate intervals for *anu1-1* (216 kb), *anu4-1* (160 kb), *anu9-1* (35 kb) and *anu12-1* (754 kb) (Table 2; Suppl. Fig. S1).

Table 2 Fine mapping by linkage analysis of the mutations studied in this work

Mutation	Candidate interval			F ₂ mapping population analyzed (number of plants)
	Size (kb)	Number of genes	Flanking markers	
<i>anu1-1</i>	216	53	cer473079, T26F17	503
<i>anu4-1</i>	160	52	cer469132, T6A9	326
<i>anu9-1</i>	35	13	cer440496, cer457250	1,270
<i>anu12-1</i>	754	199	cer469629, cer480200	209

Whole-genome re-sequencing of *angulata* mutant genomes

To speed up the identification of the causal mutations, we isolated total DNA from these mutants and used the Illumina HiSeq 2000 platform to re-sequence their genomes using paired-end 100-bp reads. We obtained between 65 and 115 million reads for each mutant genome, and aligned them to the TAIR10 version of the Col-0 reference sequence using the BWA read aligner (Li and Durbin 2009), as implemented in the SHORE pipeline (Schneberger et al. 2009). The SHORE pipeline allowed us to identify numerous nucleotide substitutions, as well as small insertions and deletions, between the mutant and reference genomes. We used custom scripts to parse the lists of changes produced by SHORE, and kept only those changes that were specific to individual mutant genomes. Changes that were present in two or more genomes were discarded and considered likely to represent polymorphisms between the *Ler* and Col-0 genomes. Because EMS typically induces G/C-to-A/T transition mutations (Kim et al. 2006), we focused on these substitutions as the most likely candidate mutations. After whole-genome sequencing and bioinformatic analysis, we focused on the following candidate mutations in the intervals defined for *anu1-1*, *anu4-1* and *anu9-1* (Table 3). The *anu1-1* mutant was found to carry a C-to-T transition mutation in the 8th exon of the At1g21650 gene, also known as *SECA2*, which encodes a homolog of SecA, the ATPase of the Sec protein translocation system (Skalitzky et al. 2011). This mutation is predicted to create an R-to-K substitution in the SECA2 protein, which is known to be chloroplast localized (Skalitzky et al. 2011) (Fig. 2a). The *anu4-1* mutation was found to carry a C-to-T transition mutation in the acceptor site of the 3rd intron of the At1g02280 gene, thus altering its mRNA splicing (Fig. 2b). At1g02280 encodes a homolog of the chloroplast import receptor Toc33 (Jarvis et al. 1998). The *anu9-1* mutation creates a premature stop

Table 3 Candidate mutations found in each interval

	Mutation	Region affected ^a	Predicted effect ^b
<i>anu1-1</i>	C → T ^c	At1g21650, 8th exon	Arg → Lys
	C → T	At1g21945–50	–
	C → T	At1g21970, 1st intron	–
<i>anu4-1</i>	C → T ^c	At1g02280, 3rd intron	Splicing acceptor site damaged
<i>anu9-1</i>	C → T ^c	At5g14100, 10th exon	Trp → Stop
	G → A ^c	At1g49890, 1st exon	Trp → Stop
<i>anu12-1</i>	C → T	At1g49938, 1st intron	–
	G → A ^c	At1g49970, 6th exon	Arg → Cys
	C → T	At1g49980, 12th exon	Arg → Trp
	G → A	At1g50020–At1g50030	–
	G → A	At1g50240, 15th exon	Gly → Arg
	C → T	At1g50510, 11th intron	–
	G → A	At1g50590, 2nd exon	Phe → Phe
	C → T	At1g50610–20	–
	G → A	At1g50650–59	–
	G → A	At1g50780, 3rd exon	Lys → Lys
G → A	At1g50850–At1g50860	–	
G → A	At1g51035–At1g51040	–	
G → A	At1g51260, 8th exon	Thr → Thr	
G → A	At1g51350, 2nd exon	Glu → Glu	

^a For mutations mapping at intergenic regions, both flanking genes are indicated

^b The effects of each mutation were inferred using SHOREmap and confirmed by in silico translation and splicing event simulation using tools available at <http://bio.lundberg.gu.se> and <http://www.cbs.dtu.dk>

^c Mutations selected for further study

codon (UGG → UGA) in the last exon of the At5g14100 gene, also known as *NON-INTRINSIC ABC PROTEIN 14* (Shimoni-Shor et al. 2010), which is predicted to truncate the last 16 amino acids of the chloroplast-localized protein NAP14 (Fig. 2c).

As the candidate region defined for *anu12-1* was larger (Table 2; Suppl. Fig. S1), a higher number of candidate mutations were identified within this interval (Table 3). Four transition mutations were predicted to cause amino acid substitutions in proteins encoded in the *anu12-1* candidate interval (Table 3). The four candidate mutations identified in the candidate interval defined for *anu12-1* damaged four different genes: At1g49890, At1g49970, At1g49980 and At1g50240. According to the TAIR10 annotation, two of these genes (At1g49890 and At1g49970) encode plastid-localized proteins, At1g49980 encodes a putative DNA/RNA polymerase and At1g50240 encodes a protein kinase family member related to the hedgehog signaling pathway. Because the *anu12-1* mutant exhibits a pale-yellow leaf phenotype (Fig. 1e), At1g49890 and At1g49970 were considered the most likely candidate genes for the *ANU12* gene.

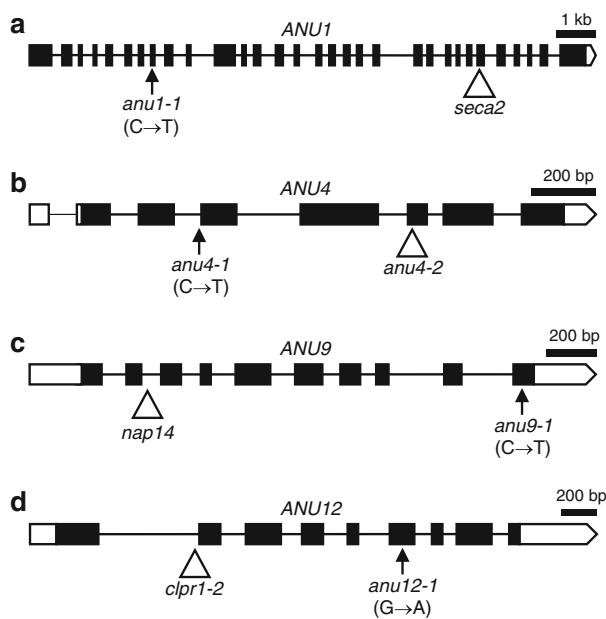


Fig. 2 Structure of the genes studied in this work, with indication of the position and nature of their mutations. *Arrows and triangles* indicate point mutations and T-DNA insertions, respectively. *Boxes and lines between boxes* represent exons and introns, respectively. *Open boxes* correspond to the 5' and 3' untranslated regions

Identification of the causal mutations in *anu1-1*, *anu4-1*, *anu9-1* and *anu12-1* mutants

To confirm the identity of the *ANU1*, *ANU4*, *ANU9* and *ANU12* genes, we followed a transgenic approach and made constructs to constitutively express the coding regions of the candidate genes in the relevant mutant backgrounds ($35S_{pro}::At1g21650$ in *anu1-1*, $35S_{pro}::At1g02280$ in *anu4-1*, $35S_{pro}::At5g14100$ in *anu9-1*, and $35S_{pro}::At1g49890$ and $35S_{pro}::At1g49970$ in *anu12-1*). With the only exception of the $35S_{pro}::At1g49890$ transgene, which failed to complement the *anu12-1* mutant phenotype, the remaining transgenes fully complemented the effects of the *anu1-1*, *anu4-1*, *anu9-1* and *anu12-1* mutations (Fig. 1). We conclude that *ANU12* is the same gene as At49970, also known as *CLP PROTEASE PROTEOLYTIC SUBUNIT 1* (*CLPR1*; Koussevitzky et al. 2007).

To identify additional mutant alleles of our candidate genes, we searched for publicly available T-DNA insertional mutants (Table 4). The SALK_014008 and SALK_116866 lines carry insertions in the 26th exon of the At1g21650 (*ANU1*) gene and the 2nd intron of the At5g14100 (*ANU9*) gene, respectively (Fig. 2). These insertions are recessive lethal (Shimoni-Shor et al. 2010; Skalitzky et al. 2011). We observed a mutant phenotype in one half of the F_1 plants from crosses involving *anu1-1* and plants heterozygous for the SALK_014008 insertion, as

Table 4 Leaf mutations studied in this work

Gene	Alleles	Mutagen and molecular damage
Name	AGI code	
<i>SECA2</i>	At1g21650 <i>anu1-1</i> ^a	EMS, C → T
	<i>seca2-1</i> (SALK_014008)	T-DNA insertion
<i>TOC33</i>	At1g02280 <i>anu4-1</i> ^a	EMS, G → A
	<i>anu4-2</i> (SALK_122849)	T-DNA insertion
<i>NAP14</i>	At5g14100 <i>anu9-1</i> ^a	EMS, C → T
	<i>nap14</i> (SALK_116866)	T-DNA insertion
<i>CLPR1</i>	At1g49970 <i>anu12-1</i> ^a	EMS, G → A
	<i>clpr1-2</i> (SALK_088407)	T-DNA insertion

AGI Arabidopsis genome initiative, EMS ethylmethane sulfonate

^a Mutant screen described in Berná et al. (1999)

well as in one half of the F_1 plants from crosses involving *anu9-1* and plants heterozygous for the SALK_116866 insertion. The SALK_122849 and SALK_088407 lines carry T-DNA insertions in the 6th exon of At1g02280 (*ANU4*) and the 1st intron of At1g49970 (*ANU12*), respectively (Fig. 2). When homozygous, the SALK_122849 and SALK_088407 lines displayed similar, although less severe, phenotypes than those of *anu4-1* and *anu12-1*, including leaves with prominent marginal teeth and paler rosettes compared to the wild type, Col-0 (Fig. 3). All the F_1 plants derived from crosses of *anu4-1* to SALK_122849, and *anu12-1* to SALK_088407 exhibited a mutant phenotype (Fig. 3), indicating that these T-DNA lines carry loss-of-function *anu4* and *anu12* alleles, respectively. Therefore, the correct identification of *ANU1* as At1g21650, *ANU4* as At1g02280, *ANU9* as At5g14100, and *ANU12* as At1g49970 is granted both by our transgenic complementation studies and by the independent isolation of two mutant alleles carrying lesions in the transcription unit of each of these four genes.

Discussion

The effort required for positional cloning has dramatically dropped in recent years (Laitinen et al. 2010; Uchida et al. 2011; Liu et al. 2012; Tabata et al. 2012). In this work, we have tested a strategy that combines Illumina whole-genome sequencing and conventional linkage mapping to successfully identify the causal mutations in four non-allelic *angulata* (*anu*) mutants that had previously been identified in a screen for leaf shape mutants (Berná et al. 1999). The genomes of these mutants (in the *Ler* background) were sequenced in parallel, allowing us to comprehensively catalog their differences to the Col-0 genome sequence, which we used as the reference to align the reads derived from each mutant genome. To establish a list of

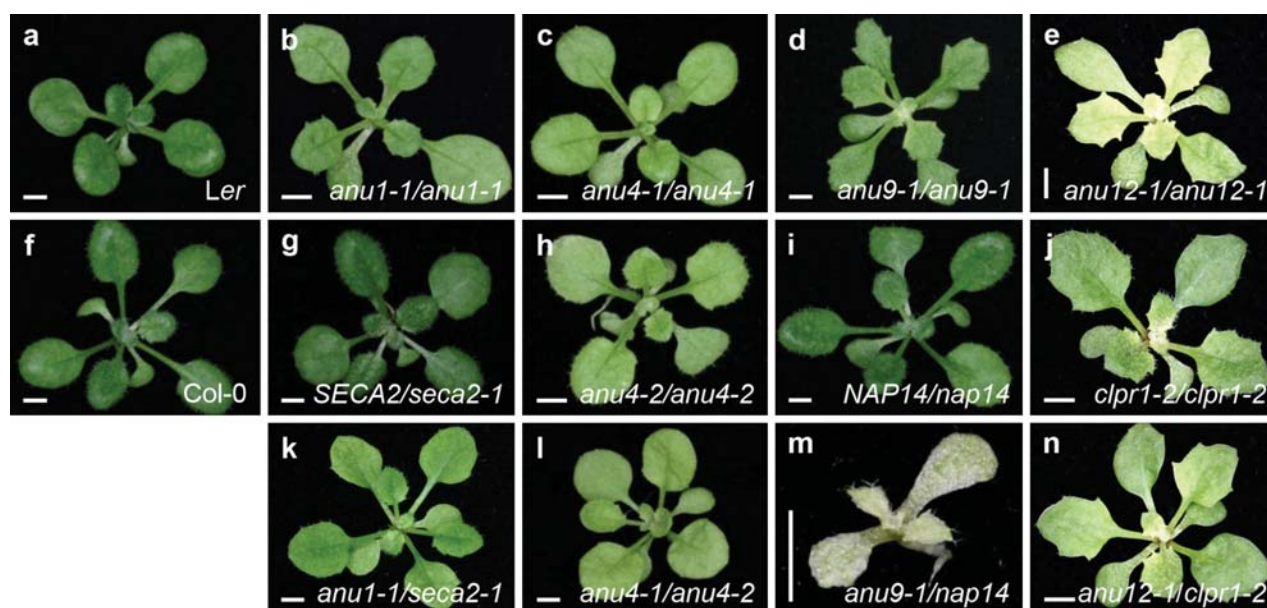


Fig. 3 Rosette phenotypes of the homozygous and heterozygous mutants studied in this work. **a, f** Rosettes of the *Ler* (**a**) and *Col-0* (**f**) wild types. **b–e, h, j** Plants homozygous for EMS-induced mutations (**b–e**) and T-DNA insertions (**h, j**) in a *Col-0* background.

g, i Plants heterozygous for the wild type and a recessive lethal T-DNA alleles of the genes indicated. **k–n** Plants heterozygous for an EMS-induced and a T-DNA insertional allele of the genes indicated. Pictures were taken 19 das. Scale bars 2 mm

EMS-induced candidate mutations, we excluded every sequence difference that was present in two or more sequenced genomes, as these differences were considered likely to represent polymorphisms between *Ler* and *Col-0*. We then focused on the subset of transition mutations (G/C-to-A/T nucleotide substitutions) present in the candidate intervals that we had previously defined by linkage mapping, as EMS has been shown to almost exclusively induce this type of nucleotide substitutions in plant genomes (Kim et al. 2006), and ranked them based on their expected impact on splicing or transcript translation. In all four mutants, this approach led to the identification of only a moderate number of mutations within the boundaries of the candidate intervals. For each interval, we found evidence that a single candidate mutation causes the observed mutant phenotype, either by identifying additional mutant alleles or by complementing the effects of the mutation with transgenes. Our experience indicates that this approach requires significantly less effort than the traditional combination of positional cloning and conventional Sanger sequencing, a strategy that we have used over the past 20 years (Table 1). However, because EMS-mutagenized genomes typically carry hundreds of induced mutations, massively parallel sequencing technologies still rely on classical genetic methods (e.g. bulked segregant analysis or linkage mapping) to succeed. In its initial formulation (Schneeberger et al. 2009), mapping-by-sequencing works best with mutations that have been induced in a sequenced reference genome (e.g. *Col-0*): when mutations

are induced in a nonstandard genetic background (e.g. *Ler*), identifying the one that causes a given phenotype requires sorting it out from other EMS-induced mutations and from the abundant sequence polymorphisms that distinguish any two ecotypes. When mutations are induced in a sequenced background, by contrast, the only nucleotide substitutions tightly linked to the mutant phenotype are expected to be the EMS-induced substitutions. Our results indicate that directly sequencing the genome of fine mapped mutants is a feasible strategy to identify mutations that have been induced in a nonstandard genetic background, as previous authors have also shown (Laitinen et al. 2010; Krothapalli et al. 2013; Nordstrom et al. 2013). A drawback of our approach is that the reads consistently covered only 89 % of the reference genome (Table 5), leaving the remaining 11 % unsequenced. This percentage was the same for sequencing depths ranging from 24× to 64×, reflecting that many *Ler*-derived reads cannot be aligned due to the numerous sequence differences between the two genomes. At least in part, this problem might be overcome by aligning the reads tolerating edit distances higher than 3, or by combining the alignment of reads with the de novo assembly of unsequenced gaps (Ossowski et al. 2008).

The *anu* mutants belong to the second largest phenotypic class identified in our screen for leaf shape mutants (Berná et al. 1999; Pérez-Pérez et al. 2009). Interestingly, the four loci identified in this work encode proteins that function in the chloroplast, in line with the pigmentation defects observed in the corresponding mutants, suggesting

Table 5 Statistics of genome re-sequencing

Mutant	Number of reads	Number of unique aligned bases	Genome coverage (%)	Sequencing depth
<i>anu1-1</i>	106,167,074	7,570,820,035	88.44	63.54
<i>anu4-1</i>	115,216,930	6,402,105,840	89.37	53.37
<i>anu9-1</i>	89,797,616	6,002,416,556	89.27	50.38
<i>anu12-1</i>	65,789,848	2,939,428,319	89.27	24.67

that this might also be the case for other *ANU* genes that remain to be cloned. Indeed, this idea is validated by the recent cloning of *ANU10*, which was cloned using a conventional map-based approach and encodes a chloroplast-localized protein that is required for normal grana stacking and leaf organogenesis (Casanova-Sáez et al. 2014b). The *anu1-1*, *anu4-1*, *anu9-1* and *anu12-1* mutants described in this work turned out to be new alleles of the previously characterized *SECA2*, *TOC33*, *NAP14* and *CLPR1* genes (Jarvis et al. 1998; Koussevitzky et al. 2007; Shimoni-Shor et al. 2010; Skalitzy et al. 2011), all of which encode chloroplast-localized proteins. *SECA2* is a member of the thylakoid Sec translocation system, involved in the transport of stromal proteins into thylakoid membranes or the thylakoid lumen (Skalitzy et al. 2011), and *NAP14* has recently been associated with plastid transition metal homeostasis (Shimoni-Shor et al. 2010). *TOC33* is a GTPase of the chloroplast protein import machinery at the outer envelope of chloroplasts (Jarvis et al. 1998; Jarvis and López-Juez 2013). Similar to *anu4-1*, other mutant alleles damaging components of the TOC complex, such as *TOC75-III* (Stanga et al. 2009), *TOC159* (Bauer et al. 2000) and *TOC132* (Kubis et al. 2004), have been shown to exhibit a pale leaf phenotype. *CLPR1* is a subunit of a chloroplast proteolytic complex (Koussevitzky et al. 2007). Mutations in other members of the Clp complex have also been reported to render a pale leaf phenotype, as exemplified by the *clpp3-1* mutant of *Arabidopsis* (Kim et al. 2013) and the *vgl* mutant of rice (Dong et al. 2013). Remarkably, other phenotypic classes established in our screen have consistently identified functionally related loci, as illustrated by the *exigua*, *denticulata* and *elongata* mutations, which were respectively found to damage genes encoding subunits of the cellulose synthase complex (Rubio-Díaz et al. 2012); the cytosolic ribosome (Horiguchi et al. 2011); and the Elongator complex (Nelissen et al. 2005). Important efforts have been made to identify nuclear genes that encode chloroplast proteins (Ajjawi et al. 2010; Lu et al. 2011; Savage et al. 2013), and have shown that many T-DNA mutants lacking chloroplast functions are embryonic-lethal. EMS is well known for its ability to induce

leaky and conditional mutant alleles. In this work, we have identified the first viable alleles of the *SECA2* and *NAP14* genes, which should help us to advance our understanding of the functions played by *SECA2* and *NAP14* proteins on chloroplast function and leaf development. Such alleles should be particularly helpful to characterize the effects of these embryonic-lethal genes in adult (post-embryonic) tissues.

Author contribution JLM and HC conceived and designed the research. EMB, RCS and HC performed the research. EMB, RCS, HC and JLM wrote the article.

Acknowledgments We thank J.M. Serrano, F.M. Lozano, T. Trujillo, R. Sarmiento-Mañús, D. Navarro, L. Serna, J.M. Sánchez-Larrosa and A. Torregrosa for their excellent technical assistance. Research in the laboratory of J.L.M. is supported by Grants from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain [BFU2011-22825 and CSD2007-00057 (TRANSPLANTA)], the Generalitat Valenciana (PROMETEO/2009/112) and the European Commission [LSHG-CT-2006-037704 (AGRON-OMICS)]. HC is a recipient of a Marie Curie International Reintegration Grant (PIRG03-GA-2008-231073). RCS holds a fellowship from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (BES-2009-014106). EMB holds a predoctoral fellowship from the Universidad Miguel Hernández.

References

- Ajjawi I, Lu Y, Savage LJ, Bell SM, Last RL (2010) Large-scale reverse genetics in *Arabidopsis*: case studies from the chloroplast 2010 project. *Plant Physiol* 152:529–540
- Alonso-Peral MM, Candela H, del Pozo C, Martínez-Laborda A, Ponce MR, Micol JL (2006) The *HVE/CAND1* gene is required for the early patterning of leaf venation in *Arabidopsis*. *Development* 133:3755–3766
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK et al (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653–657
- Barrero JM, González-Bayón R, del Pozo JC, Ponce MR, Micol JL (2007) *INCURVATA2* encodes the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and interacts with genes involved in chromatin-mediated cellular memory in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19:2822–2838
- Bauer J, Chen K, Hiltbunner A, Wehrli E, Eugster M, Schnell D, Kessler F (2000) The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* 403:203–207
- Berná G, Robles P, Micol JL (1999) A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 152:729–742
- Bohmer K, Camus I, Bellini C, Bouchez D, Caboche M, Benning C (1998) *AGO1* defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J* 17:170–180
- Casanova-Sáez R, Candela H, Micol JL (2014a) Combined haploinsufficiency and purifying selection drive retention of *RPL36a* paralogs in *Arabidopsis*. *Sci Rep* 4:4122
- Casanova-Sáez R, Mateo-Bonmatí E, Kangasjärvi S, Candela H, Micol JL (2014b) *Arabidopsis* ANGULATA10 is required for thylakoid biogenesis and mesophyll development. *J Exp Bot* 65:2391–2404
- Chen X, Liu J, Cheng Y, Jia D (2002) *HEN1* functions pleiotropically in *Arabidopsis* development and acts in C function in the flower. *Development* 129:1085–1094

- Choe S, Schmitz RJ, Fujioka S, Takatsuto S, Lee MO, Yoshida S, Feldmann KA, Tax FE (2002) *Arabidopsis* brassinosteroid-insensitive *dwarf12* mutants are semidominant and defective in a glycogen synthase kinase 3beta-like kinase. *Plant Physiol* 130:1506–1515
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735–743
- Cnops G, Jover-Gil S, Peters JL, Neyt P, De Block S, Robles P, Ponce MR, Gerats T, Micol JL, Van Lijsebettens M (2004) The *rotunda2* mutants identify a role for the *LEUNIG* gene in vegetative leaf morphogenesis. *J Exp Bot* 55:1529–1539
- Curtis MD, Grossniklaus U (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133:462–469
- Dong H, Fei GL, Wu CY, Wu FQ, Sun YY, Chen MJ, Ren YL, Zhou KN, Cheng ZJ, Wang JL, Jiang L, Zhang X, Guo XP, Lei CL, Su N, Wang H, Wan JM (2013) A rice virescent-yellow leaf mutant reveals new insights into the role and assembly of plastid caseinolytic protease in higher plants. *Plant Physiol* 162:1867–1880
- Esteve-Bruna D, Pérez-Pérez JM, Ponce MR, Micol JL (2013) *incurvata13*, a novel allele of *AUXIN RESISTANT6*, reveals a specific role for auxin and the SCF complex in *Arabidopsis* embryogenesis, vascular specification, and leaf flatness. *Plant Physiol* 161:1303–1320
- Ferrández-Ayela A, Alonso-Peral MM, Sánchez-García AB, Micol-Ponce R, Pérez-Pérez JM, Micol JL, Ponce MR (2013a) *Arabidopsis TRANSCURVATA1* encodes NUP58, a component of the nucleopore central channel. *PLoS One* 8:e67661
- Ferrández-Ayela A, Micol-Ponce R, Sánchez-García AB, Alonso-Peral MM, Micol JL, Ponce MR (2013b) Mutation of an *Arabidopsis* NatB N-alpha-terminal acetylation complex component causes pleiotropic developmental defects. *PLoS One* 8:e80697
- Geisler M, Kolkusioğlu HU, Bouchard R, Billion K, Berger J, Saal B, Frangne N, Koncz-Kalman Z, Koncz C, Dudler R, Blakeslee JJ, Murphy AS, Martinoia E, Schulz B (2003) TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with *Arabidopsis* multidrug resistance-like transporters AtPGP1 and AtPGP19. *Mol Biol Cell* 14:4238–4249
- González-Bayón R, Kinsman EA, Quesada V, Vera A, Robles P, Ponce MR, Pyke KA, Micol JL (2006) Mutations in the *RETICULATA* gene dramatically alter internal architecture but have little effect on overall organ shape in *Arabidopsis* leaves. *J Exp Bot* 57:3019–3031
- Green KA, Prigge MJ, Katzman RB, Clark SE (2005) *CORONA*, a member of the class III homeodomain leucine zipper gene family in *Arabidopsis*, regulates stem cell specification and organogenesis. *Plant Cell* 17:691–704
- Hellmann H, Hobbie L, Chapman A, Dharmasiri S, Dharmasiri N, del Pozo C, Reinhardt D, Estelle M (2003) *Arabidopsis AXR6* encodes CUL1 implicating SCF E3 ligases in auxin regulation of embryogenesis. *EMBO J* 22:3314–3325
- Hobbie L, McGovern M, Hurwitz LR, Pierro A, Liu NY, Bandyopadhyay A, Estelle M (2000) The *axr6* mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene involved in auxin response and early development. *Development* 127:23–32
- Horiguchi G, Mollá-Morales A, Pérez-Pérez JM, Kojima K, Robles P, Ponce MR, Micol JL, Tsukaya H (2011) Differential contributions of ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development. *Plant J* 65:724–736
- Hricová A, Quesada V, Micol JL (2006) The *SCABRA3* nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141:942–956
- Jander G, Norris SR, Rounsley SD, Bush DF, Levin IM, Last RL (2002) *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiol* 129:440–450
- Jarvis P, López-Juez E (2013) Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:787–802
- Jarvis P, Chen LJ, Li H, Peto CA, Fankhauser C, Chory J (1998) An *Arabidopsis* mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science* 282:100–103
- Jover-Gil S, Candela H, Robles P, Aguilera V, Barrero JM, Micol JL, Ponce MR (2012) The microRNA pathway genes *AGO1*, *HEN1* and *HYL1* participate in leaf proximal–distal, venation and stomatal patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 53:1322–1333
- Kamphausen T, Fanghanel J, Neumann D, Schulz B, Rahfeld JU (2002) Characterization of *Arabidopsis thaliana* AtFKBP42 that is membrane-bound and interacts with Hsp90. *Plant J* 32:263–276
- Kim Y, Schumaker KS, Zhu JK (2006) EMS mutagenesis of *Arabidopsis*. *Methods Mol Biol* 323:101–103
- Kim J, Olinares PD, Oh SH, Ghisaura S, Poliakov A, Ponnala L, van Wijk KJ (2013) Modified Clp protease complex in the ClpP3 null mutant and consequences for chloroplast development and function in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 162:157–179
- Koussevitzky S, Stanne TM, Peto CA, Giap T, Sjogren LL, Zhao Y, Clarke AK, Chory J (2007) An *Arabidopsis thaliana* virescent mutant reveals a role for ClpR1 in plastid development. *Plant Mol Biol* 63:85–96
- Krothapalli K, Buescher EM, Li X, Brown E, Chapple C, Dilkes BP, Tuinstra MR (2013) Forward genetics by genome sequencing reveals that rapid cyanide release deters insect herbivory of *Sorghum bicolor*. *Genetics* 195:309–318
- Kubis S, Patel R, Bedard J, Kovacheva S, Lilley K, Biehl A, Leister D, Rios G, Koncz C, Jarvis P (2004) Functional specialization amongst the *Arabidopsis* Toc159 family of chloroplast protein import receptors. *Plant Cell* 16:2059–2077
- Laitinen RA, Schneeberger K, Jelly NS, Ossowski S, Weigel D (2010) Identification of a spontaneous frame shift mutation in a nonreference *Arabidopsis* accession using whole genome sequencing. *Plant Physiol* 153:652–654
- Leyser HM, Pickett FB, Dharmasiri S, Estelle M (1996) Mutations in the *AXR3* gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the *SAUR-AC1* promoter. *Plant J* 10:403–413
- Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760
- Li J, Nam KH, Vafeados D, Chory J (2001) *BIN2*, a new brassinosteroid-insensitive locus in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127:14–22
- Lister R, Gregory BD, Ecker JR (2009) Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. *Curr Opin Plant Biol* 12:107–118
- Liu Z, Meyerowitz EM (1995) *LEUNIG* regulates *AGAMOUS* expression in *Arabidopsis* flowers. *Development* 121:975–991
- Liu KH, McCormack M, Sheen J (2012) Targeted parallel sequencing of large genetically-defined genomic regions for identifying mutations in *Arabidopsis*. *Plant Methods* 8:12
- Lu C, Fedoroff N (2000) A mutation in the *Arabidopsis HYL1* gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *Plant Cell* 12:2351–2366
- Lu Y, Savage LJ, Larson MD, Wilkerson CG, Last RL (2011) Chloroplast 2010: a database for large-scale phenotypic screening of *Arabidopsis* mutants. *Plant Physiol* 155:1589–1600
- Lukowitz W, Gillmor CS, Scheible WR (2000) Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol* 123:795–805

- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282:679–682
- Mollá-Morales A, Sarmiento-Manús R, Robles P, Quesada V, Pérez-Pérez JM, González-Bayón R, Hannah MA, Willmitzer L, Ponce MR, Micol JL (2011) Analysis of *ven3* and *ven6* reticulate mutants reveals the importance of arginine biosynthesis in *Arabidopsis* leaf development. *Plant J* 65:335–345
- Nelissen H, Fleury D, Bruno L, Robles P, De Veylder L, Traas J, Micol JL, Van Montagu M, Inze D, Van Lijsebettens M (2005) The *elongata* mutants identify a functional elongator complex in plants with a role in cell proliferation during organ growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7754–7759
- Nordstrom KJ, Albani MC, James GV, Gutjahr C, Hartwig B, Turck F, Paszkowski U, Coupland G, Schneeberger K (2013) Mutation identification by direct comparison of whole-genome sequencing data from mutant and wild-type individuals using k-mers. *Nat Biotechnol* 31:325–330
- Ochando I, Jover-Gil S, Ripoll JJ, Candela H, Vera A, Ponce MR, Martínez-Laborda A, Micol JL (2006) Mutations in the microRNA complementarity site of the *INCURVATA4* gene perturb meristem function and adaxialize lateral organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141:607–619
- Ohashi-Ito K, Fukuda H (2003) HD-zip III homeobox genes that include a novel member, *ZeHB-13* (*Zinnia*)/*ATHB-15* (*Arabidopsis*), are involved in procambium and xylem cell differentiation. *Plant Cell Physiol* 44:1350–1358
- Ossowski S, Schneeberger K, Clark RM, Lanz C, Warthmann N, Weigel D (2008) Sequencing of natural strains of *Arabidopsis thaliana* with short reads. *Genome Res* 18:2024–2033
- Pérez-Pérez JM, Ponce MR, Micol JL (2002) The *UCU1 Arabidopsis* gene encodes a SHAGGY/GSK3-like kinase required for cell expansion along the proximodistal axis. *Dev Biol* 242:161–173
- Pérez-Pérez JM, Ponce MR, Micol JL (2004) The *ULTRACURVATA2* gene of *Arabidopsis* encodes an FK506-binding protein involved in auxin and brassinosteroid signaling. *Plant Physiol* 134:101–117
- Pérez-Pérez JM, Candela H, Robles P, Quesada V, Ponce MR, Micol JL (2009) Lessons from a search for leaf mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Dev Biol* 53:1623–1634
- Pérez-Pérez JM, Candela H, Robles P, López-Torrejón G, del Pozo JC, Micol JL (2010) A role for *AUXIN RESISTANT3* in the coordination of leaf growth. *Plant Cell Physiol* 51:1661–1673
- Pérez-Pérez JM, Esteve-Bruna D, González-Bayón R, Kangasjarvi S, Caldana C, Hannah MA, Willmitzer L, Ponce MR, Micol JL (2013) Functional redundancy and divergence within the *Arabidopsis* RETICULATA-RELATED gene family. *Plant Physiol* 162:589–603
- Peters JL, Cnudde F, Gerats T (2003) Forward genetics and map-based cloning approaches. *Trends Plant Sci* 8:484–491
- Pinon V, Etchells JP, Rossignol P, Collier SA, Arroyo JM, Martienssen RA, Byrne ME (2008) Three *PIGGYBACK* genes that specifically influence leaf patterning encode ribosomal proteins. *Development* 135:1315–1324
- Ponce MR, Quesada V, Micol JL (1998) Rapid discrimination of sequences flanking and within T-DNA insertions in the *Arabidopsis* genome. *Plant J* 14:497–501
- Ponce MR, Robles P, Lozano FM, Brotons MA, Micol JL (2006) Low-resolution mapping of untagged mutations. *Methods Mol Biol* 323:105–113
- Quesada V, Sarmiento-Manús R, González-Bayón R, Hricová A, Pérez-Marcos R, Gracia-Martínez E, Medina-Ruiz L, Leyva-Díaz E, Ponce MR, Micol JL (2011) *Arabidopsis RUGOSA2* encodes an mTERF family member required for mitochondrion, chloroplast and leaf development. *Plant J* 68:738–753
- Quesada V, Sarmiento-Manús R, González-Bayón R, Hricová A, Ponce MR, Micol JL (2013) *PORPHOBILINOGEN DEAMINASE* deficiency alters vegetative and reproductive development and causes lesions in *Arabidopsis*. *PLoS One* 8:e53378
- Rédei GP, Hirono Y (1964) Linkage studies. *Arabidopsis Inf Serv* 1:9–10
- Robles P, Micol JL (2001) Genome-wide linkage analysis of *Arabidopsis* genes required for leaf development. *Mol Genet Genomics* 266:12–19
- Rubio-Díaz S, Pérez-Pérez JM, González-Bayón R, Muñoz-Viana R, Borrega N, Mouille G, Hernández-Romero D, Robles P, Hofte H, Ponce MR, Micol JL (2012) Cell expansion-mediated organ growth is affected by mutations in three *EXIGUA* genes. *PLoS One* 7:e36500
- Savage LJ, Imre KM, Hall DA, Last RL (2013) Analysis of essential *Arabidopsis* nuclear genes encoding plastid-targeted proteins. *PLoS One* 8:e73291
- Schneeberger K, Ossowski S, Lanz C, Juul T, Petersen AH, Nielsen KL, Jorgensen JE, Weigel D, Andersen SU (2009) SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nat Methods* 6:550–551
- Serrano-Cartagena J, Robles P, Ponce MR, Micol JL (1999) Genetic analysis of leaf form mutants from the *Arabidopsis* information service collection. *Mol Gen Genet* 261:725–739
- Shimoni-Shor E, Hassidim M, Yuval-Naeh N, Keren N (2010) Disruption of Nap14, a plastid-localized non-intrinsic ABC protein in *Arabidopsis thaliana* results in the over-accumulation of transition metals and in aberrant chloroplast structures. *Plant Cell Environ* 33:1029–1038
- Skalitzky CA, Martin JR, Harwood JH, Beirne JJ, Adamczyk BJ, Heck GR, Cline K, Fernandez DE (2011) Plastids contain a second sec translocase system with essential functions. *Plant Physiol* 155:354–369
- Stanga JP, Boonsirichai K, Sedbrook JC, Otegui MS, Masson PH (2009) A role for the TOC complex in *Arabidopsis* root gravitropism. *Plant Physiol* 149:1896–1905
- Tabata R, Kamiya T, Shigenobu S, Yamaguchi K, Yamada M, Hasebe M, Fujiwara T, Sawa S (2012) Identification of an EMS-induced causal mutation in a gene required for boron-mediated root development by low-coverage genome re-sequencing in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 8:18–24
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815
- Uchida N, Sakamoto T, Kurata T, Tasaka M (2011) Identification of EMS-induced causal mutations in a non-reference *Arabidopsis thaliana* accession by whole genome sequencing. *Plant Cell Physiol* 52:716–722
- Van Minnebruggen A, Neyt P, De Groeve S, Coussens G, Ponce MR, Micol JL, Van Lijsebettens M (2010) The *ang3* mutation identified the ribosomal protein gene *RPL5B* with a role in cell expansion during organ growth. *Physiol Plant* 138:91–101

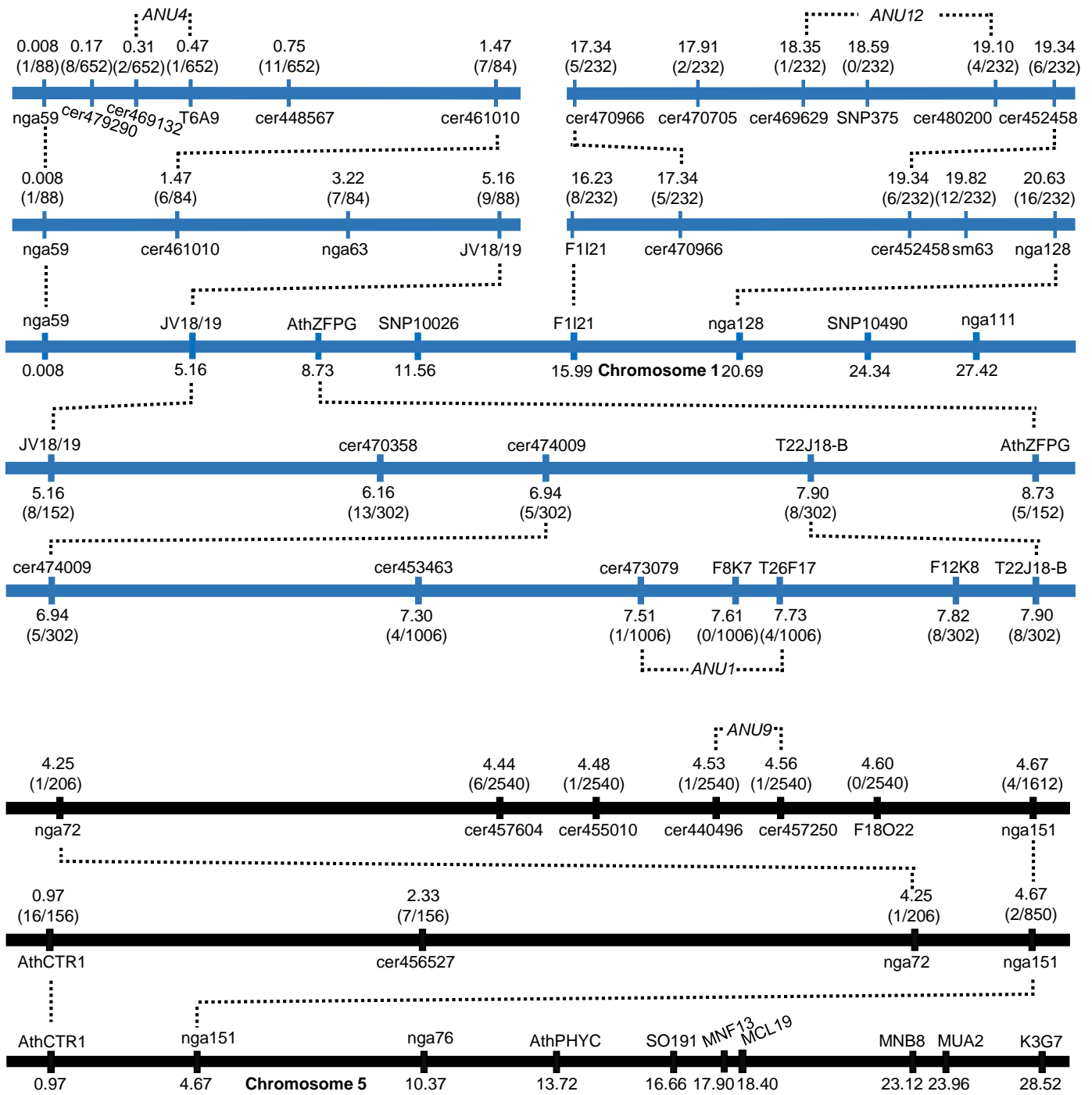
Suppl. Table S1. Primer sets used in this work

Purpose	Oligonucleotide name(s)	Oligonucleotide sequences (5'→3')	
		Forward primer (F)	Reverse primer (R)
Linkage analysis	cer470358_F/R	CGTCCCTCTTATTAGCATTAGT	GCCAAACACTTGATCATACTCC
	cer474009_F/R	CTGGTGCTGCATTTCTGTCA	TGCTTACCAGAAGCATCCTCA
	T22J18-B_F/R	CATAAGCAACGACTTGATCC	CTTGCTGGCGAATGTTAACAC
	cer453463_F/R	TTCAAAACCTGGAGCGTCGTC	GGCCCATCTTGTGTGTTTTG
	cer473079_F/R	TGTCTTTTGACACAAAGGGAAGTC	TCACCTCTCGAGGACGTAAAAA
	F8K7_F/R	CTTCAAGATTATAGAAATGCACC	GTACGTTGTTTTGATAGTCTATG
	T26F17_F/R	GAATCACATGAACCGTAGATGTT	CATACATGCAAGAGTTTGATATG
	F12K8_F/R	CATGGGTTTACGTTTTGGGCG	CCGCCAAAAACGTAAACCCG
	cer461010_F/R	GCCTTTGCTTCCACACAAAATC	CATGAAGATCTGGTCTCGGTGT
	nga63_F/R	AACCAAGGCACAGAAGCG	ACCCAAGTGATCGCCACC
	cer469132_F/R	ATGACACCTTCACGGTCCTC	AAGCAGCAGCAGGTCAAAGT
	T6A9_F/R	AAAGCACACCCGTTATCAG	TGCGAAGGAGGATTTATTGG
	cer448567_F/R	AGGTGCGAAGAACCCTAAACC	AACCAACCCAAGATTAGTAAAAAGC
	cer456527	GGACCTCATGCGATTGTATATT	GGCCCATTTTTACAGCATGAAA
	nga72_F/R	AATCCCAGTAACCAAACACACA	CCCAGTCTAACCACGACCAC
	cer457604_F/R	TGCTGCTTTTCTCCCTGGTAA	CAAGTGCCAAAACCACATTCA
	cer455010_F/R	CTTGACACAGCGTTCCTCTCT	GTCGAATAGACCTGTCCAGCA
	cer440496_F/R	TGCCTGTTCTGTTTGCTTTG	CATCCCAACAGCTCTTTCAATTT
	cer457250_F/R	TGGACCAAGGAACCTCAGGA	AGGGGCTGCAGAGGTAGATG
	F18O22_F/R	CGAAAGTCGAGAAGCACCAA	GGCGACGATTCTGAGGATTT
	cer470966_F/R	GGTGACACGTGTGATGTTTAC	CCACACACGCAACTTCATGGC
	cer452458_F/R	GAACTTCTTCCATCTCGGTGT	AATCCCATCTGGTATGTCGTC
	sm63_F/R	ATGCTGGACCGAAGGCTACC	CAGTCACAGAGCTCATAAACAG
	cer470705_F/R	CTCTTTCTACAACCTCACCCAT	GAATTACCCGAAAACCGAACC
	cer469629_F/R	GAGGAGTAGGTTGGTTTGAAAT	AGACGACCGCAAATTTGGGGC
	SNP375_F/R	GCACATTCACAGAAAAGTTTCTG	TACTTCATTCTGCGAAGTTAGG
	cer480200_F/R	CTTAATCTCCCCAAAATCACC	AGAATTGGGACTGTTTTGGAT
Sequencing of candidate mutations	At1g21650_F/R	TCACCCGTCTCAAGAGCCATT	ACGAGATAACCTTACTTCAAACC
	At1g02280_F/R	GATATGAACCTCAATGACAGTTCTT	AAGACATCTATTGTTCTGTTTACA
	At5g14100_F/R	GAACTTACATAGAAAATCCACCAT	ACTTGTTGTAAGTCATGATCTAAG
	At1g49890_F/R	TGGCTTCTGCTAGGTTCTGG	ATACCCATGCATTCCACAGG
	At1g49970_F/R	GTCAATGGCTGCTTGAGCTT	GGGACCCAGGTCAGTAGAAG
Gateway cloning	ANU1cds_F/R	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT ATGGGTTCTGTTTCTAATCTTGTG	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GATATGAATAGTTCTTGGGATTC
	ANU4cds_F/R	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT ATGGGGTCTCTCGTTCGTGAA	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTAAGTGGCTTTCCACTTGTCTTG
	ANU9cds_F/R	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT ATGGCAGTGTGCGACGTTTTCG	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTAAGTGGTGGACGTTCTGCAAC
	At1g49890cds_F/R	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT ATGGTTGCTGCAGCGATTTCAA	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG CAATTGCGGAGTCAAGCTGCT
	At1g49970cds_F/R	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTA ATGGCAGGCTATGGCGACTGCTCTGGTTT	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG TCTTAGTCCGGCTGGAGCTG
	Poly-T Primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTCATTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN	

Suppl. Table S1. Primer sets used in this work


Purpose	Oligonucleotide name(s)	Oligonucleotide sequences (5'→3')	
		Forward primer (F)	Reverse primer (R)
Genotyping of T-DNA lines	Salk_014008_LP/RP	TCTAGCTCTCCAGATCAACGC	TGGTCTCTTCTGTGATCCCAG
	Salk_122849_LP/RP	TTGGTTATGCCGAGTTTTCTG	TAGCAATCACCCAAACCTTTG
	Salk_116866_LP/RP	AAACTACCTTTTTGCCTTGGC	CCCAATTAAGGCCATTCTAC
	Salk_088407_LP/RP	AAGTAGATGGGCTTTGTTGGG	TGGAGACAATCTCAAAGACGG

This list of oligonucleotides does not include those used for low-resolution mapping, which are described in Ponce et al. (2006).



Suppl. Fig. S1. Fine mapping by linkage analysis of the mutations studied in this work. The names and physical map positions of the molecular markers used for linkage analysis are shown. All values not in parentheses indicate Mb. The number of recombinant chromosomes found and the total of chromosomes analyzed are indicated in parentheses.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN Plastid control of abaxial-adaxial patterning

Eduardo Mateo-Bonmatí, Rubén Casanova-Sáez[†], Víctor Quesada, Andrea Hricová[‡], Héctor Candela & José Luis Micol

Received: 13 August 2015

Accepted: 07 October 2015

Published: 02 November 2015

Translational regulation, exerted by the cytosolic ribosome, has been shown to participate in the establishment of abaxial-adaxial polarity in *Arabidopsis thaliana*: many hypomorphic and null alleles of genes encoding proteins of the cytosolic ribosome enhance the leaf polarity defects of *asymmetric leaves1* (*as1*) and *as2* mutants. Here, we report the identification of the *SCABRA1* (*SCA1*) nuclear gene, whose loss-of-function mutations also enhance the polarity defects of the *as2* mutants. In striking contrast to other previously known enhancers of the phenotypes caused by the *as1* and *as2* mutations, we found that *SCA1* encodes a plastid-type ribosomal protein that functions as a structural component of the 70S plastid ribosome and, therefore, its role in abaxial-adaxial patterning was not expected.

The abaxial-adaxial patterning of plant lateral organs, such as the leaves, is known to depend on a complex regulatory network that involves microRNAs, trans-acting siRNAs and several families of transcription factors¹. Translational regulation, exerted by the cytosolic ribosome, has also been shown to participate in the establishment of abaxial-adaxial polarity, although its role is much less well understood. In the model plant *Arabidopsis thaliana* (hereafter, *Arabidopsis*), loss-of-function mutations in many different subunits of the cytosolic ribosome specifically cause a dose-dependent syndrome, with phenotypes ranging from embryonic and gametophytic lethality to mild defects in organ growth and polarity. Many such mutations also enhance the leaf polarity defects of *asymmetric leaves1* (*as1*) and *as2* mutants^{2–5}. One mechanism explaining how the cytosolic ribosome influences leaf polarity depends on the presence of uORFs (upstream open reading frames) in the transcripts of several ARF (auxin response factors) involved in abaxial-adaxial patterning⁶.

Considerable efforts have been devoted to the elucidation of the function of nucleus-encoded Plastid Ribosomal Proteins (PRPs) in *Arabidopsis*, most often using publicly available T-DNA insertion mutants. However, 16 out of 36 of the *Arabidopsis* nucleus-encoded PRPs are essential proteins, precluding ascertaining their role in post-embryonic tissues⁷.

Here we describe the identification of the *Arabidopsis SCABRA1* (*SCA1*) gene, whose partial loss-of-function enhances the polarity defects caused by *as2* alleles. However, contrary to other previously known *as1* and *as2* enhancers, we found that *SCA1* encodes a plastid-type ribosomal protein that functions as a structural component of the 70S plastid ribosome and, therefore, its role in abaxial-adaxial patterning was unexpected. *SCA1* was already annotated as *EMBRYO DEFECTIVE 3113* (*EMB3113*), an embryonic lethal gene; the *sca1-1* viable allele that we isolated has allowed us studying the role of *SCA1* on leaf morphogenesis.

Results and Discussion

The *scabra1-1* (*sca1-1*) mutant was isolated in a large-scale screen for ethyl methanesulfonate (EMS)-induced mutants with abnormal leaf morphology⁸. The *sca1-1* mutant was assigned to the Scabra phenotypic class, which comprises six additional recessive mutants, all with pale green leaves, uneven

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Spain. [†]Present address: Umeå Plant Science Centre, Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Sciences, SE-901 83, Umeå, Sweden. [‡]Present address: Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, Akademická 2, Nitra, Slovak Republic. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.L.M. (email: jlmicol@umh.es)

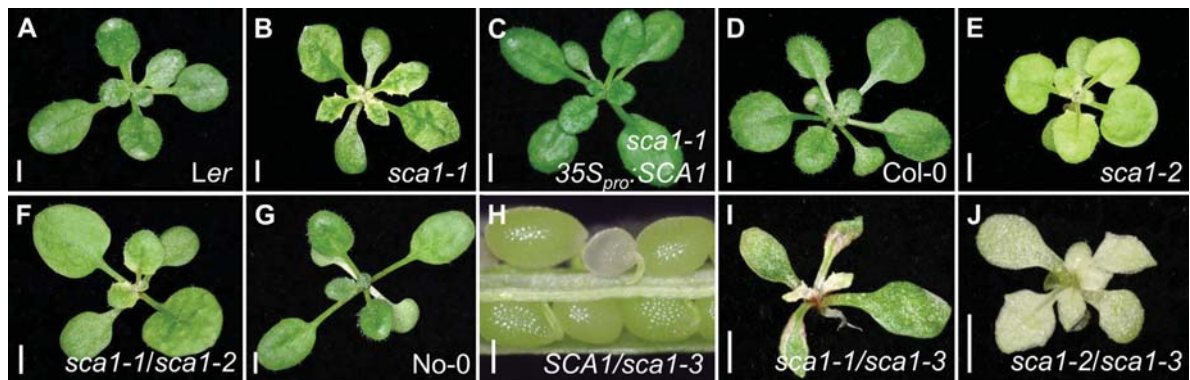


Figure 1. Mutations in the *SCA1* gene alter leaf morphology and pigmentation. (A–G,I,J) Rosettes from the (A) *Ler*, (D) *Col-0*, and (G) *No-0* wild types, the (B) *sca1-1*, (E) *sca1-2*, (F) *sca1-1/sca1-2*, (I) *sca1-1/sca1-3*, and (J) *sca1-2/sca1-3* mutants, and (C) the *sca1-1* 35S_{pro}::*SCA1* transgenic line. (H) Dissected silique from a *SCA1/sca1-3* plant showing a *sca1-3/sca1-3* aborted seed. Unless otherwise stated, all plants are homozygous for the mutations shown. Pictures were taken (A–G,I,J) 16 and (H) 40 days after stratification (das). Scale bars indicate (A–G, I, J) 2 mm, and (H) 0.2 mm.

leaf surface and prominent marginal teeth. The *sca1-1* mutant exhibits a general reduction in size, which translates into rosettes with significantly reduced projected area when compared with its wild type, *Landsberg erecta* (*Ler*) (Fig. 1A,B; Supplementary Figure S1A).

To identify the *SCA1* gene, we followed a strategy combining map-based cloning and next-generation sequencing. We first mapped the *sca1-1* mutation to a 760-kb candidate interval on chromosome 2 using 910 chromosomes (Fig. 2A). We next sequenced the *sca1-1* genome using the Illumina HiSeq2000 platform. After discarding all the putative *Ler/Col-0* polymorphisms, we identified five nucleotide substitutions of the type induced by EMS (three G→A and two C→T transition mutations) within the candidate interval (Supplementary Table 1; see Methods). The C→T mutation in the At2g33800 gene was predicted to cause a Leu→Phe amino acid substitution at residue 233 of the protein. This substitution was confirmed using conventional Sanger sequencing in *sca1-1* and *Ler* plants. Additional evidence that At2g33800 is the same gene as *SCA1* was obtained using a construct carrying the coding sequence of At2g33800 placed downstream of the 35S_{pro}::*SCA1*. This construct fully complemented the mutant phenotype of *sca1-1* plants, demonstrating that their phenotype is a consequence of reduced At2g33800 function (Fig. 1A–C; Supplementary Figure S1A).

At2g33800 encodes Plastid Ribosomal Protein S5 (PRPS5), a structural component of the plastid ribosome⁷. We studied two additional lines, which carry insertions in At2g33800: SALK_095863, with a T-DNA insertion in the 5' untranslated region, and pst11131, with a *Ds* element inserted in the second exon (Fig. 2B). Plants homozygous for the SALK_095863 insertion showed a compact and small rosette with pale-green, roundish leaves and a general size reduction (Fig. 1D,E; Supplementary Figure S1B). The F₁ progeny of *sca1-1* x SALK_095863 crosses displayed a mutant phenotype, showing that both mutations are allelic (Fig. 1F). Using real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR), we showed that the levels of At2g33800 transcripts were reduced in SALK_095863 to ~40% of the wild-type levels (Fig. 2B,C), suggesting that the insertion behaves as a hypomorphic allele. No homozygotes were found for the pst11131 allele, but we observed 25% aborted seeds in the siliques of hemizygous plants, showing that this allele is embryo-lethal (Fig. 1G,H). Indeed, At2g33800 is also known as *EMBRYO DEFECTIVE 3113* (*EMB3113*)⁹. The F₁ progeny of crosses involving *sca1-1* and hemizygous pst11131 plants also displayed defects more severe than those of *sca1-1* (Fig. 1B,I). We named *sca1-2* and *sca1-3* the alleles present in the SALK_095863 and pst11131 lines, respectively. The *sca1-2/sca1-3* heterozygotes were viable and exhibited stronger defects than the *sca1-2* homozygotes (Fig. 1E,J).

The viability of *sca1-1* and *sca1-2* mutants offers an opportunity to study the function of PRPS5 in post-embryonic tissues. Because *sca1* leaves are pale green, we determined their levels of chlorophyll and carotenoids: both mutants had significantly lower levels of chlorophyll *a* and chlorophyll *b*. This reduction was more pronounced in *sca1-2* than in *sca1-1*. The *sca1-2* mutant also had reduced carotenoid levels (Supplementary Figure S2A). Consistent with these results, the maximum efficiencies of photosystem II, measured as F_v/F_m , were significantly reduced in *sca1* mutants compared with their wild types (Supplementary Figure S2B). In addition to the defects in chloroplast function, mesophyll development was severely perturbed. In paradermal sections, *sca1-2* exhibited significantly smaller palisade mesophyll cells (Fig. 3A,B; Supplementary Figure S3A). A more severe defect was observed in the mesophyll of *sca1-1* (Fig. 3D,E), which had large intercellular spaces and a distribution of cell sizes wider than in

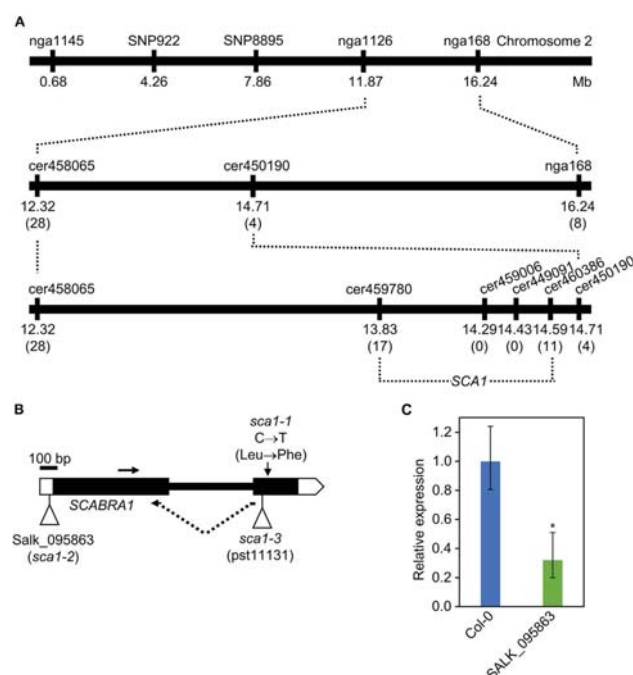


Figure 2. Fine-mapping of the *sca1-1* mutation, structure of the *SCA1* gene, and molecular characterization of the *sca1-2* allele. (A) Linkage analysis of the *sca1-1* mutation. The names and physical map positions of the molecular markers used for linkage analysis are shown. All values not in parentheses indicate Mb. The number of recombinant chromosomes found are indicated in parentheses. (B) Structure of the *SCA1* gene with indication of the position and nature of *sca1* mutations. Horizontal arrows indicate the oligonucleotides (not drawn to scale) used as primers for determining the relative expression of *SCA1*. The vertical arrow marks the position of the point mutation in *sca1-1*. Triangles represent a T-DNA insertion in *sca1-2* and a *Ds* transposon insertion in *sca1-3*. (C) qRT-PCR relative expression analysis of *SCA1* in the SALK_095863 (*sca1-2*) line background. Bars indicate relative expression levels, determined by the comparative C_T method, and normalized with the expression of the 18S rRNA housekeeping gene. Error bars indicate the interval delimited by $2^{-(\Delta\Delta C_T \pm SD)}$. Asterisks indicate ΔC_T values significantly different from those of Col-0 in a Mann-Whitney U-test ($p < 0.01$; $n = 9$).

the wild type (Supplementary Figure S3B). The mesophyll phenotype was fully complemented by the $35S_{pro}::SCA1$ transgene (Fig. 3C,F; Supplementary Figure S3A).

Previous authors have reported an enhancement of the phenotype of *as1* mutants in some chloroplast-defective backgrounds, including the *sca1* mutant found in our screen¹⁰. *SCA3* encodes the plastid-targeted RpoTp RNA polymerase, which is required for the expression of plastid-encoded transcripts¹¹. To investigate whether defects in plastid ribosomal proteins can also enhance the abaxial-adaxial polarity defects of *as1* and *as2* mutants (Fig. 4A–C), we isolated *sca1 as1* and *sca1 as2* double mutants. Both *sca1-1* and *sca1-2* enhanced the phenotype of *as2-1* though to a different extent (Fig. 4E,H). A strong abaxialization was observed in *sca1-1 as2-1* plants, which displayed *as2*-like cotyledons, radial leaves (Fig. 4E,F) and some trumpet-shaped leaves (Fig. 4G), an enhancement that occurred with full penetrance and similar expressivity in all double mutant plants. A milder enhancement was seen in *sca1-2 as2-1* plants, which only occasionally had trumpet-shaped leaves (Fig. 4H,I), as expected if the *sca1-2* allele is weaker than *sca1-1*, as suggested by our morphologic analysis. The same enhancement was not apparent in the *sca1-1 as1-1* double mutant (Fig. 4J). To investigate the molecular basis of this interaction, we examined the expression of abaxial-adaxial polarity markers in *sca1-1 as2-1* plants, including members of the *KANADI* (*KAN*), *AUXIN RESPONSE FACTOR* (*ARF*), *YABBY* (*YAB*) and HD-ZIPIII families of transcription factors, using qRT-PCR (Fig. 5A). Compared with Col-0, all the studied genes were upregulated in *sca1-1* and *as2-1*, except for *KAN1*, which was upregulated only in *sca1-1*, specially the HD-ZIPIII gene *REVOLUTA* (*REV*) in *sca1-1* and *YAB5* in both mutants. On the contrary, in *sca1-1 as2-1* plants, the *KAN1*, *KAN2*, *ARF3* and *REV* genes exhibited transcript levels similar to those of the wild type, except for *YAB5*, which was upregulated.

We hypothesized that a dual role of *SCA1* as a component of both the cytosolic and plastid ribosomes might explain the observed enhancement. However, this possibility is precluded by the predicted plastid localization signal in the *SCA1* protein, the absence of *SCA1* from the 80S ribosome in proteomic studies, and the very low similarity between the amino acid sequences of *SCA1* and its counterpart in

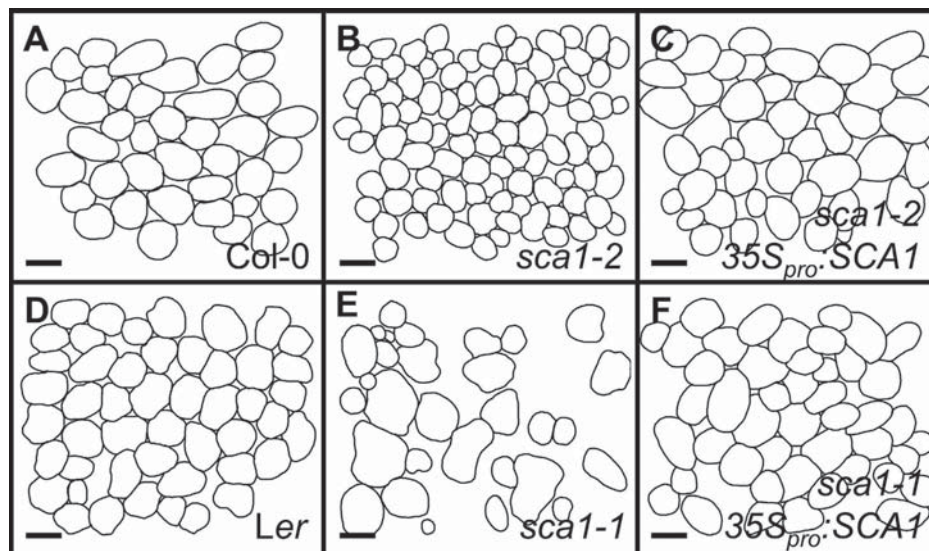


Figure 3. Representative diagrams of the sub-epidermal layer of palisade mesophyll cells from a first leaf of the (A) Col-0 and (D) *Ler* wild types, the (B) *sca1-2*, and (E) *sca1-1* mutants, and the $35S_{pro}:SCA1$ transgenic line in the (C) *sca1-2* and (F) *sca1-1* genetic backgrounds, respectively. Diagrams were drawn from differential interference contrast images taken from cleared leaves. Scale bars indicate 50 μm .

the cytosolic ribosome. In line with a role of SCA1 acting specifically in the plastids, we instead found that the *sca1-1* mutation causes a general change in the expression of the plastid-encoded *rbcl*, *psbA*, *rrn16*, *rrn23* and *atpB* genes, all of which were found to be downregulated in the mutant using qRT-PCR (Fig. 5B). Remarkably, mutations in components of the plastid transcriptional machinery [e.g. *EMBRYO DEFECTIVE DEVELOPMENT1* (*EDD1*)] have been reported to cause similar defects in leaf abaxial-adaxial polarity, uncovering a role of plastids in the establishment of adaxial fate beyond other known roles in leaf morphogenesis¹⁰. The inhibition of plastid translation by lincomycin also altered abaxial-adaxial patterning, a defect that was dependent on the *GENOME UNCOUPLED1* gene, which is involved in chloroplast retrograde signaling¹².

The leaves are lateral organs highly specialized in light capture and photosynthesis, as reflected by their planar shape and the functional differentiation that is apparent along the abaxial-adaxial axis: the tight packing of the adaxial palisade mesophyll provides a solution to maximize light capture, while the abundant stomata and the spongy mesophyll on the abaxial side facilitate gas exchange. Considering that abaxial-adaxial polarity might have evolved as an innovation of land plants to optimize photosynthesis, a functional relationship between plastids and pattern formation is not fully unexpected. On the one hand, chloroplast biogenesis can be seen as a step towards the differentiation of the photosynthetically active palisade mesophyll. On the other, normal chloroplast activity might represent a checkpoint that controls the progression towards the acquisition of adaxial fate. Further study of mutants impairing chloroplast function, such as the ones described in this report, should help to understand how defective chloroplast development feeds back on the establishment of adaxial fate in plant leaves.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. wild-type accessions No-0, Col-0 and *Ler*, and the T-DNA insertional line *sca1-2* [SALK_095863 (N595863)] were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC). The transposon tag line *sca1-3* (pst11131) was obtained from the RIKEN collection. The *sca1-1* mutant was isolated after EMS mutagenesis of *Ler* seeds as previously described by Berná *et al.*⁸. All plants were grown on half-strength Murashige and Skoog (MS) agar medium (2.15 g l⁻¹ [Duchefa], pH 5.7, and 1% sucrose), at 20 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ and 60–70% relative humidity under continuous fluorescent light ($\sim 75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) as previously described by Ponce *et al.*¹³. Crosses and allelism tests were performed as described by Berná *et al.*⁸. To analyze the genetic interactions of *sca1-1* with *as1-1* and *as2-1*, we standardized the genetic backgrounds, outcrossing *sca1-1* three times to Col-0.

Cloning-by-sequencing. In order to clone the *SCA1* gene, we used the approach described in Mateo-Bonmatí *et al.*¹⁴. In brief, we first defined a broad candidate interval of 760 kb (Fig. 2A) by linkage analysis as described in Ponce *et al.*¹⁵, using the primers listed on Supplementary Table 2, and then we re-sequenced the *sca1-1* genome. After filtering all the putative *Ler/Col-0* polymorphisms, a short list of EMS-type substitutions was obtained (Supplementary Table 1). A total of 3 G \rightarrow A and 2 C \rightarrow T substitutions were found within the candidate interval, of which only the C \rightarrow T substitution in At2g33800

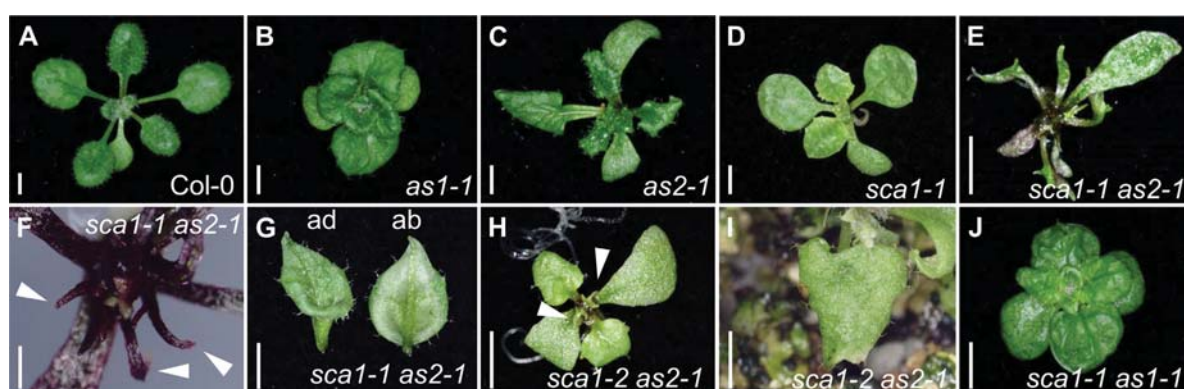


Figure 4. Genetic interaction between the *SCA1* and *AS* genes. Rosettes from (A) Col-0, (B) *as1-1*, (C) *as2-1*, (D) *sca1-1* introgressed in Col-0 mutants, and (E) *sca1-1 as2-1*, (H) *sca1-2 as2-1* and (J) *sca1-1 as1-1* double mutants. (G,I) Peltate leaves from the (G) *sca1-1 as2-1* double mutant, showing the adaxial (ad) and abaxial (ab) sides of the leaf, and (I) *sca1-2 as2-1*. (F) Detail of the radialized leaves of the *sca1-1 as2-1* double mutant. Pictures were taken (A–E,H,J) 16, (G) 30 and (I) 24 das. Scale bars indicate (A–E,G,J) 2 mm and (F) 0.5 mm.

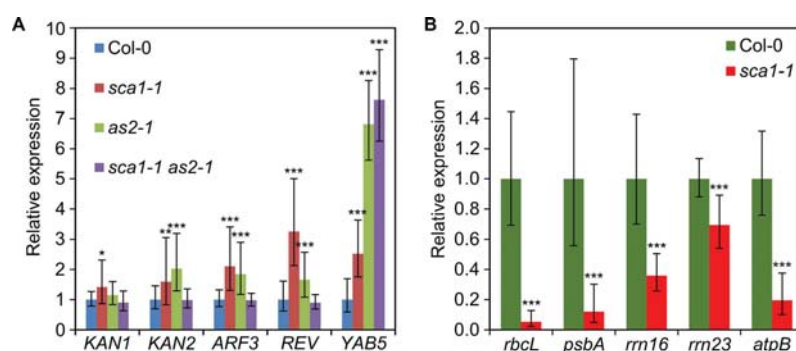


Figure 5. Relative expression analysis of (A) the abaxial-adaxial polarity genes *KANADII* (*KAN1*), *KAN2*, *AUXIN RESISTANT FACTOR3* (*ARF3*), *REVOLUTA* (*REV*) and *YABBY5* (*YAB5*) in Col-0, *sca1-1*, *as2-1* and *sca1-1 as2-1* plants collected 10 das, and of (B) the plastid-encoded genes *rbcL*, *psbA*, *rrn16*, *rrn23* and *atpB*, in Col-0 and *sca1-1* plants collected 10 das. Bars indicate relative expression levels. Error bars indicate the interval delimited by $2^{-(\Delta\Delta C_T \pm SD)}$. Asterisks indicate ΔC_T values significantly different from those of Col-0 in a Mann–Whitney U-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 9$).

changed the protein sequence. DNA samples were sequenced by Fasteris (Geneva, Switzerland) using the Illumina HiSeq2000 platform. Paired-end reads were 100-bp long. A total of 89,797,616 reads were obtained, which correspond to a 50.38x sequencing depth. The raw data have been deposited at the Short Read Archive database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) with accession number SRP050297.

Gene constructs and plant transformation. The $35S_{pro}::SCA1$ transgene was made amplifying the full-length coding sequence of At2g33800 from Col-0 cDNA using Phusion polymerase (Thermo Scientific) and primers containing *attB1* and *attB2* sites (Supplementary Table 2). The amplification product was cloned into the pGEM-T Easy221 donor vector (kindly provided by Prof. B. Scheres) using BP Clonase II (Life Technologies). The insert was sequenced using an ABI PRISM 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems), and then transferred into the pMDC32 destination vector¹⁶ using LR Clonase II (Life technologies). The construct was then mobilized into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (C58C1 Rif^R) electrocompetent cells, which were used to transform *Arabidopsis* plants by the floral dip method¹⁷. T₁ transformants were selected on agar medium supplemented with 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ hygromycin B (Invitrogen).

RNA isolation, cDNA synthesis and qRT-PCR. Total RNA was extracted using TRI Reagent (Sigma) from a single Col-0 seedling collected 21 days after stratification (das) to synthesize the cDNA used for preparing the $35S_{pro}::SCA1$ transgene and a pool of 10 seedlings (collected 10 das) for quantitative RT-PCR

analysis, respectively. DNA was removed using the TURBO DNA-free Kit (Invitrogen). First-strand cDNA was synthesized using random hexamers and the Maxima Reverse Transcriptase system (Fermentas). The 18S rRNA¹⁸ and *ACTIN2*¹⁰ genes were used as internal controls in the relative expression analyses of plastid-encoded and dorsoventrality genes, respectively. Three different biological replicates and triplicate reactions were used. PCR mixes were prepared in a volume of 20 μ l by adding 7.5 μ l of Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas), 5 μ l of the corresponding primer pair (1.5 μ M each), and 1 μ l of cDNA template. Relative quantification of gene expression data was performed using the comparative C_T method¹⁹ on a Step One Plus System (Applied Biosystems). The primer sets used are listed on Supplemental Table 2.

Morphometry. Rosette area measurements and the morphometric analysis of palisade cells of leaves were performed as described previously^{20,21}. In brief, ten first-node leaves were manually excised and immediately kept in 70% ethanol. Samples were then incubated in a clearing solution (80 g chloral hydrate in 30 ml water) until photosynthetic tissues became transparent and veins were visible. Whole leaves were mounted on glass slides in solutions of 80 g chloral hydrate, 20 ml glycerol and 10 ml water. Pictures from palisade mesophyll were taken halfway along the primary vein and the leaf margin.

Pigment determination and photosynthesis analysis. For determination of chlorophylls and carotenoids, five independent samples of 100 mg each of fresh first-node and second-node leaves from rosettes collected 14 das were pooled, frozen in liquid N₂, and homogenized with 4 ml of 80% acetone at 4°C. The samples were centrifuged for 5 min at 2350 g and the pigment concentration in the supernatant was spectrophotometrically determined as previously described²². Photosynthetic maximum quantum yield was measured 20 das on plants dark-adapted for 30 min and after applying a 0.8-sec saturating light pulse (4000 μ mol m⁻² sec⁻¹). Measurements were made with a DUAL-PAM/F fluorometer and a DUAL-BA leaf-positioning device (WALZ).

References

- Byrne, M. E. Making leaves. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**, 24–30 (2012).
- Casanova-Sáez, R., Candela, H. & Micol, J. L. Combined haploinsufficiency and purifying selection drive retention of *RPL36a* paralogs in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* **4**, 4122 (2014).
- Pinon, V. et al. Three *PIGGYBACK* genes that specifically influence leaf patterning encode ribosomal proteins. *Development* **135**, 1315–1324 (2008).
- Yao, Y., Ling, Q., Wang, H. & Huang, H. Ribosomal proteins promote leaf adaxial identity. *Development* **135**, 1325–1334 (2008).
- Horiguchi, G. et al. Differential contributions of ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development. *Plant J.* **65**, 724–736 (2011).
- Rosado, A., Li, R., van de Ven, W., Hsu, E. & Raikhel, N. V. *Arabidopsis* ribosomal proteins control developmental programs through translational regulation of auxin response factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 19537–19544 (2012).
- Tiller, N. & Bock, R. The translational apparatus of plastids and its role in plant development. *Mol. Plant* **7**, 1105–1120 (2014).
- Berná, G., Robles, P. & Micol, J. L. A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **152**, 729–742 (1999).
- Meinke, D., Muralla, R., Sweeney, C. & Dickerman, A. Identifying essential genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci.* **13**, 483–491 (2008).
- Moschopoulos, A., Derbyshire, P. & Byrne, M. E. The *Arabidopsis* organelle-localized glycyl-tRNA synthetase encoded by *EMBRYO DEFECTIVE DEVELOPMENT1* is required for organ patterning. *J. Exp. Bot.* **63**, 5233–5243 (2012).
- Hricová, A., Quesada, V. & Micol, J. L. The *SCABRA3* nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **141**, 942–956 (2006).
- Tameshige, T. et al. Pattern dynamics in adaxial-abaxial specific gene expression are modulated by a plastid retrograde signal during *Arabidopsis thaliana* leaf development. *PLoS Genet.* **9**, e1003655 (2013).
- Ponce, M. R., Quesada, V. & Micol, J. L. Rapid discrimination of sequences flanking and within T-DNA insertions in the *Arabidopsis* genome. *Plant J.* **14**, 497–501 (1998).
- Mateo-Bonmatí, E., Casanova-Sáez, R., Candela, H. & Micol, J. L. Rapid identification of *angulata* leaf mutations using next-generation sequencing. *Planta* **240**, 1113–1122 (2014).
- Ponce, M. R., Robles, P., Lozano, F. M., Brotons, M. A. & Micol, J. L. Low-resolution mapping of untagged mutations. *Methods Mol. Biol.* **323**, 105–113 (2006).
- Curtis, M. D. & Grossniklaus, U. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* **133**, 462–469 (2003).
- Clough, S. J. & Bent, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743 (1998).
- Yamauchi, Y. et al. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* **16**, 367–378 (2004).
- Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101–1108 (2008).
- Ferrández-Ayela, A. et al. *Arabidopsis* *TRANSCURVATA1* encodes NUP58, a component of the nucleopore central channel. *PLoS One* **8**, e67661 (2013).
- Pérez-Pérez, J. M. et al. Whole organ, venation and epidermal cell morphological variations are correlated in the leaves of *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell Environ.* **34**, 2200–2211 (2011).
- Wellburn, A. The spectral determination of chlorophyll *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* **144**, 307–3013 (1994).

Acknowledgements

We thank J.M. Serrano, F.M. Lozano, T. Trujillo, R. Sarmiento-Mañús, D. Navarro, L. Serna, J.M. Sánchez-Larrosa and A. Torregrosa for their excellent technical assistance. Research in the laboratory of J.L.M. was supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (BFU2011-22825

and BIO2014-53063-P) and the Generalitat Valenciana (PROMETEOII/2014/006). H.C. was a recipient of a Marie Curie International Reintegration Grant (PIRG03-GA-2008-231073). E.M.-B. held predoctoral fellowships from the Generalitat Valenciana (ACIF/2014/049) and the Ministerio de Educación of Spain (FPU13/00371).

Author Contributions

J.L.M., V.Q. and H.C. conceived and designed the research. E.M.-B., R.C.-S., V.Q., A.H. and H.C. performed the research. E.M.-B., V.Q., H.C. and J.L.M. wrote the article.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Mateo-Bonmatí, E. *et al.* Plastid control of abaxial-adaxial patterning. *Sci. Rep.* 5, 15975; doi: 10.1038/srep15975 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Plastid control of abaxial-adaxial patterning

Eduardo Mateo-Bonmatí, Rubén Casanova-Sáez, Víctor Quesada, Andrea Hricová,
Héctor Candela, and José Luis Micol

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202
Elche, Spain

SUPPLEMENTARY DATA

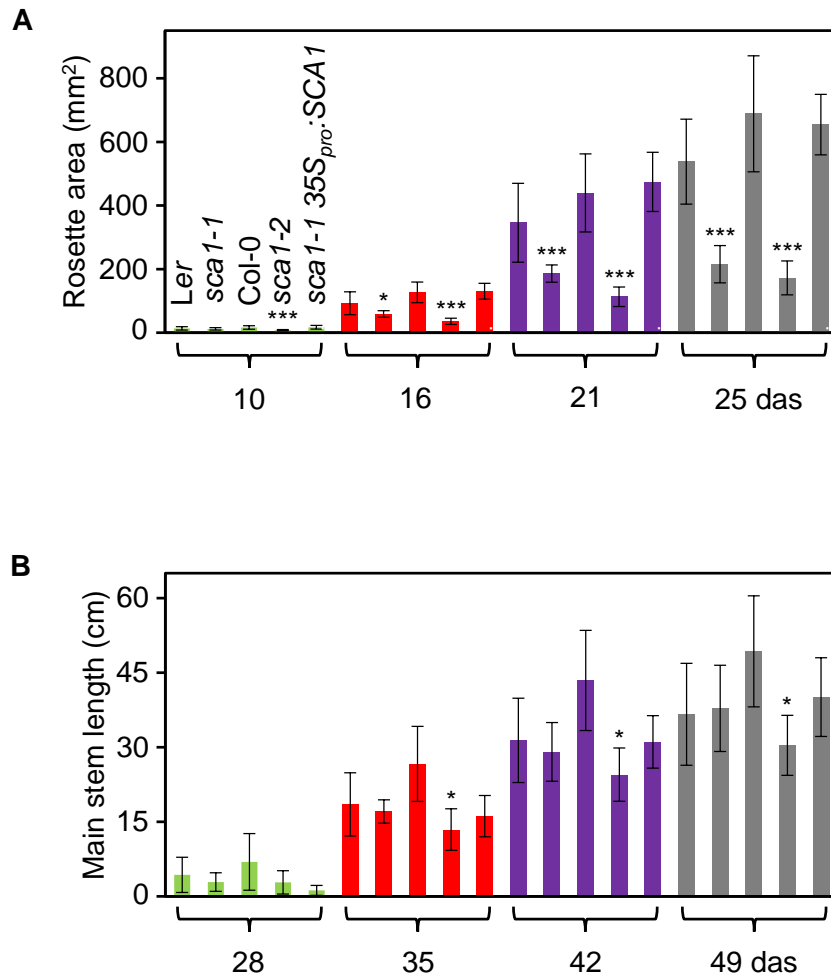
Supplementary Table S1. Mutations found in the *sca1-1* candidate interval.

Mutation	Region affected	Predicted effect
G→A	At2g32990, 3 rd exon	Glu265→Glu (Synonymous)
G→A	At2g33060, 3'UTR	-
C→T	At2g33170, 2 nd exon	Ile1011→Ile (Synonymous)
C→T	At2g33800, 2 nd exon	Leu233→Phe
G→A	At2g34670, 5'UTR	-

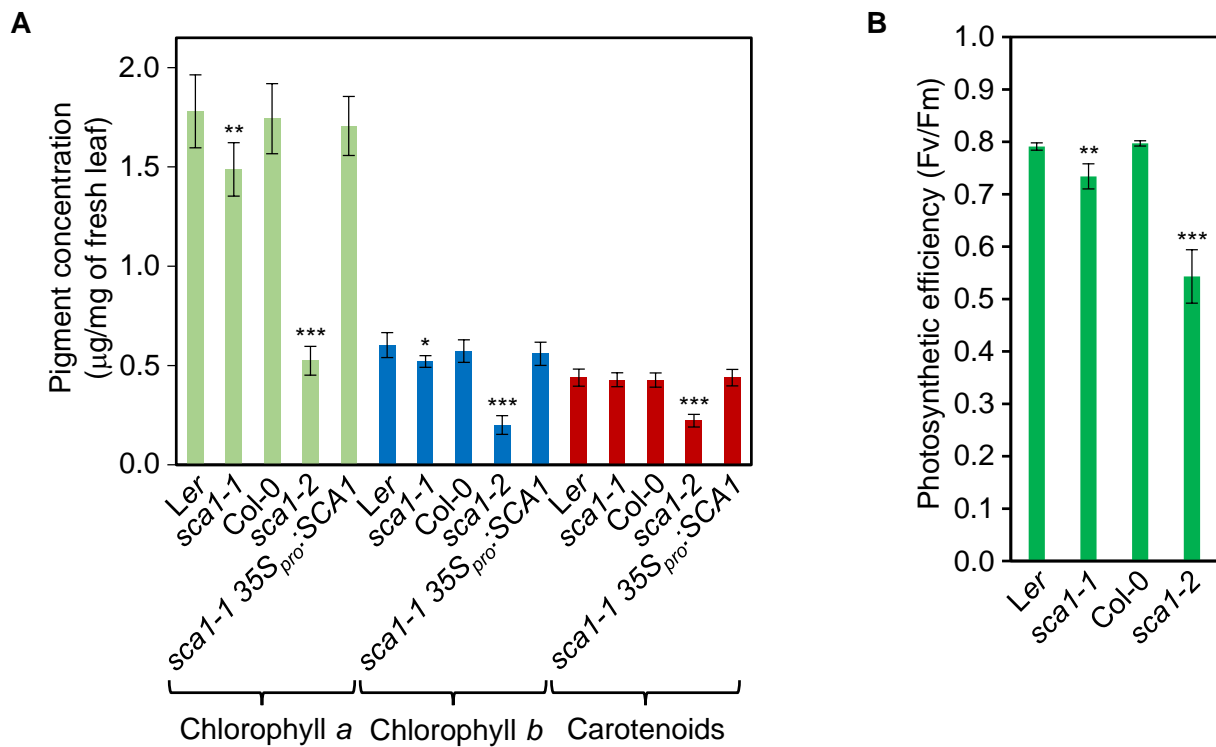
Supplementary Table S2. Primer sets used in this work.

Purpose	Oligonucleotide sequence (5' → 3')	
	Forward primer (F)	Reverse primer (R)
Linkage analysis	cer458065_F/R	GTTATTATTTCCATACTTTTGGC
	cer450190_F/R	GGTCGGTATTGTTAAATTATTG
	cer460386_F/R	TCCATCAACGGTATTATTTCTCAA
	cer449091_F/R	CATTACACTACATAATTCTGAATAG
	cer459006_F/R	AGAGCTGATGAACAAAAGACTGA
cer459780_F/R	CCTTGCCTGAAAGAAAAGTGAA	
SCA1 sequencing	At2g33800_F/R	AAGTATTCTACTTTCCCTCACAG
	At2g33800_R2	CACAATCAATTAGAAATCGGTT
Gateway cloning	SCA1cnds_F/R	GGGACCACCTTTGTACAAAGAAAGCTGG
		GTATCATCCAAGTAGTAGTATGAGC
Genotyping	Salk_095863_LP/RP	AATTAACGTTGCTCGTTGGTG
	LbB1.3_R	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC
	pst_11131_LP/RP	GGCACAAGTCTTCGCATGTA
	Ds5-1a_R	ACGGGATCCCCGGTGAACCGGT
qRT-PCR	18SrRNA_qPCR_F/R	CGACGTTTTTAAC TGCAACAAC T
	qSCA1_F/R	CCCTCTGATCTGTGAGGGAAAG
	qACTIN2_F/R	AACCCCTCGTAGATTGGCACA
	rbcl_F/R	CATCGGTCCACACAGTTGTC
	psbA_F/R	CCTATGGGGTCCGCTTCTGTA
	rrn16_F/R	GATTTGACGGCGGACTTAAA
	rrn23_F/R	TTACCCGACAAGGAATTTTCG
	atpB_F/R	ACCCAATAAGGCGGATACCT
	qKAN1_F/R	TTTCTCGTGCCAAATCTGGTCT
	qKAN2_F/R	TTGTTCCCGAGATGCTTGAT
	qARF3_F/R	ACCATCCGAACAAGTGTGA
	qREV_F/R	ATAACTCACATGCTTCCCATCG

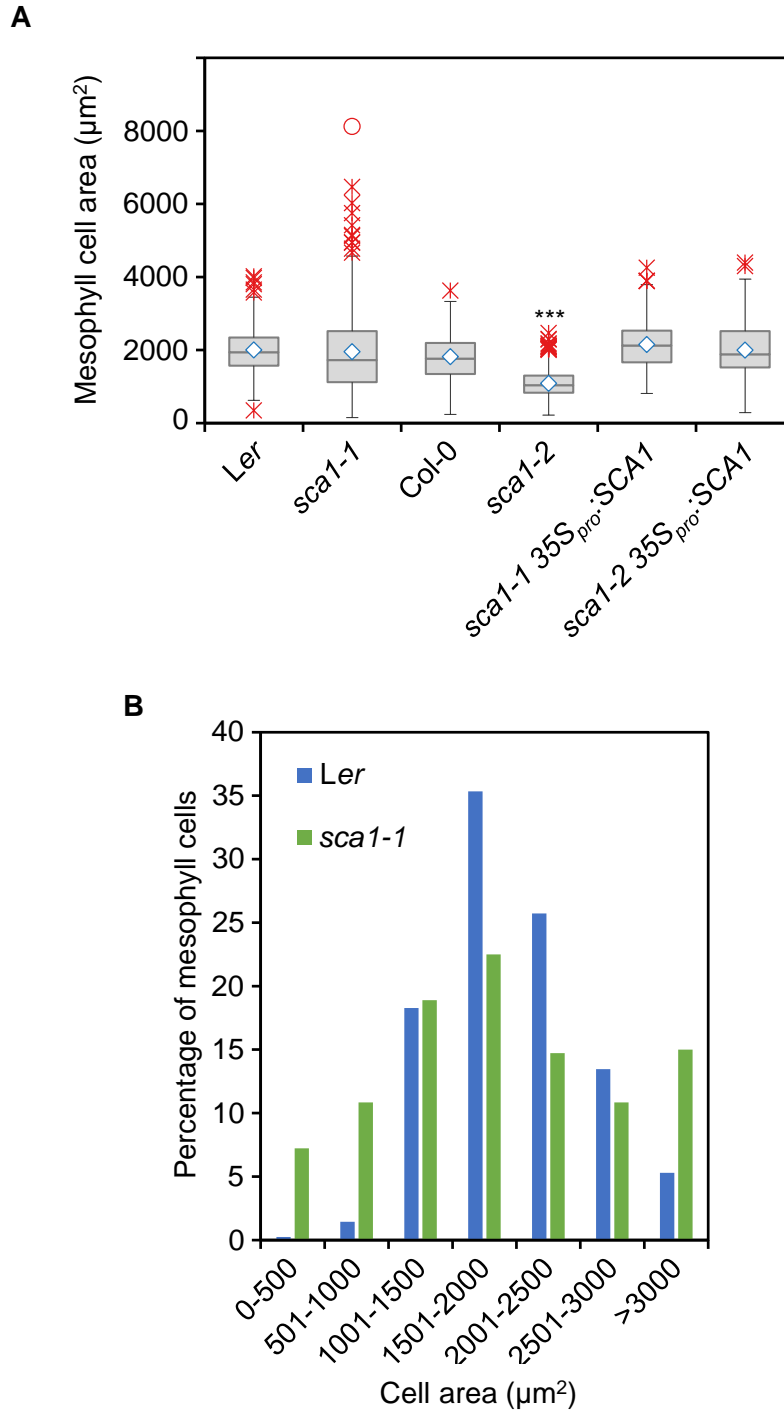
This list of oligonucleotides does not include those used for low-resolution mapping, which are described in Ponce *et al.*¹⁵.



Supplementary Figure S1. Characterization of the growth of the *sca1* mutants. (A) Rosette area progression. (B) Main stem length progression. Asterisks indicate a significant difference with the corresponding wild type in a (A) Student's *t* test (n=16) or (B) Mann-Whitney test (n=8) (**p*<0.05, ****p*<0.001).



Supplementary Figure S2. Chlorophyll and carotenoid content and photosynthetic efficiency in the *sca1* mutants. (A) Chlorophyll and carotenoid concentration in plant leaves collected 14 das. (B) Maximum efficiencies of PSII measured as *Fv/Fm* in plant leaves at 20 das. Asterisks indicate a significant difference with the corresponding wild type in a Mann-Whitney test (n=8) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



Supplementary Figure S3. Morphometric analysis of the palisade mesophyll cells of the *sca1* mutants. (A) Boxplot distribution of the palisade mesophyll cell area in first-node leaves from Ler, *sca1-1*, Col-0, *sca1-2*, *sca1-1 35S_{pro}:SCA1* and *sca1-2 35S_{pro}:SCA1*. Boxes are delimited by the first (Q1, lower hinge) and third (Q3, upper hinge) quartiles. Whiskers represent Q1 - 1.5 IQ (lower) and Q3 + 1.5 IQ (upper), where IQ = Q3 - Q1. \diamond : Mean. —: Median. \circ : Extreme maximum outlier ($> [Q3 + 3 \cdot IQ]$). $*$: Maximum or minimum outlier. (B) Distribution of palisade mesophyll cell area in first-node leaves from Ler and *sca1-1*. More than 350 cells were analyzed from at least 10 different samples. Asterisks indicate a significant difference with the corresponding wild type in a Student's *t* test ($***p < 0.001$).

INCURVATA11 and CUPULIFORMIS2 Are Redundant Genes That Encode Epigenetic Machinery Components in Arabidopsis

Eduardo Mateo-Bonmatí, David Esteve-Bruna, Lucía Juan-Vicente, Riad Nadi, Hector Candela, Francisca María Lozano, Maria Rosa Ponce, Jose Manuel Perez-Perez and Jose Luis Micol
Plant Cell; originally published online June 18, 2018;
 DOI 10.1105/tpc.18.00300

This information is current as of June 18, 2018

Supplemental Data	/content/suppl/2018/06/18/tpc.18.00300.DC1.html
Permissions	https://www.copyright.com/ccc/openurl.do?sid=pd_hw1532298X&issn=1532298X&WT.mc_id=pd_hw1532298X
eTOCs	Sign up for eTOCs at: http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain
CiteTrack Alerts	Sign up for CiteTrack Alerts at: http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain
Subscription Information	Subscription Information for <i>The Plant Cell</i> and <i>Plant Physiology</i> is available at: http://www.aspb.org/publications/subscriptions.cfm

IX.- AGRADECIMIENTOS

IX.- AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la financiación del trabajo que se realiza en el laboratorio de José Luis Micol por la Comisión Europea (AGRON-OMICS, LSHG-CT-2006-037704), la Generalitat Valenciana (PROMETEOII/2014/006) y el Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2011-22825 y BIO2014-53063-P). Durante mi periodo predoctoral he sido beneficiario de contratos predoctorales de los programas VALi+d (ACIF/2014/049) de la Generalitat Valenciana y de Formación de Profesorado Universitario (FPU13/00371) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Gracias en primer lugar a mi director de Tesis, José Luis Micol, por depositar su confianza en mí y asignarme tareas de tanto potencial, por las innumerables charlas y debates de carácter científico con los que ha podido transmitirme una pequeña parte de sus conocimientos, por no cejar en su empeño de intentar convertirme en mejor científico y por acostumbrarme a buscar siempre la excelencia.

A María Rosa Ponce, por su interés en mi trabajo y su eterna predisposición a ayudarme y a aportar un punto de vista diferente y constructivo.

Al Profesor Héctor Candela, por todo lo que me enseñó en mis primeros veranos en el laboratorio, por introducirme en la bioinformática y en la filosofía del “no te asfixies” y por tomarse todo el tiempo que fue necesario para ayudarme en la redacción de algunos de los artículos recogidos en esta Tesis.

Al resto de Profesores del área, Pedro Robles, Víctor Quesada, José Manuel Pérez, Sara Jover y Raquel Sarmiento por todo lo que aprendí con vosotros durante la carrera, el Máster, las sesiones de prácticas, el día a día en el laboratorio y siendo compañeros de *Tupper* en Hélike. Sí Raquel, era yo quien te giraba el imán...

A los técnicos de laboratorio con los que coincidí, aunque fuese brevemente, Paqui, Bea, Leila, Diana, Aurelia, José María, Antonio, María José, y Juan.

A Tania, por ser ese gran terremoto dentro y fuera del laboratorio. ¡Eres una crack!

A José Manuel Serrano, por ser un 10 como técnico y un 10¹⁰⁰ como persona. El placer de conocer gente como tú merece cada minuto que pasas fastidiado durante la Tesis. No te quejarás, en una Tesis... ¡4 Champions!

A mi gran mentor en la bancada y en la vida, Rubén. Gracias por toda la paciencia que demostraste durante mis inicios, cuando solo era un medio químico, por hacerme ver que la vida sin risas no tiene sentido y por todo tu apoyo posterior tanto personal como profesional. ¿Quién sabe? quizás no acabe aquí todo...

A David Wilson, la persona con la que más he disfrutado debatiendo y divagando sobre ciencia, política y la vida en general.

A mi predecesor en el estudio de *ICU11*, David Esteve, por su predisposición a echarme una mano siempre que fue necesario e interés en mis progresos. Espero haber estado a la altura.

A Rosa, por estar siempre ahí para ayudarme en todo lo que necesité, personal o profesional, y por todas las tostadas y confesiones que compartimos a solas antes de que la cafetería se tornara *mainstream*.

A Tamara (Tamarix), por su amistad, por su empatía, por las risas que nos hemos echado, por introducirme en el *jungle* y por sus cartelitos con memes que hacían más amenas mis visitas al “cortapuros”.

A Ana Belén, por todo lo que compartimos y por acudir en mi ayuda siempre que lo necesité.

A las Almudenas y a Rebeca, con las que coincidí poco, pero de las que intenté aprender todo lo que pude.

A los “predocs” del presente y doctores del futuro Sergio, Alejandro, Samuel, Adrián (culiao) y Uri (CTM) y a los estudiantes del presente y “predocs” del futuro Sara, Nerea y Yaiza, porque con todos vosotros el éxito futuro del laboratorio está más que garantizado.

A mi pequeña pandilla del laboratorio Carla, Lucía y Riad. Gracias por vuestra predisposición a ayudarme con cualquier experimento, relacionado o no con vuestras Tesis. Gracias por apoyar mis decisiones y por hacer piña todos juntos. Por vuestra paciencia durante las correcciones de los TFG, TFM o artículos. Vuestra entrega y dedicación ha sido la bocanada de aire fresco que necesitaba.

A Riad, por todo lo que hemos compartido fuera del laboratorio. Por tu actitud como compañero de pádel y por convertirte para mí en un referente a la hora de afrontar la vida en general y los congresos en particular. ¡Eres muy grande!

A mi alumno y alumnas de verano, Mar, Lucía, Miquel y Débora y a mi primera estudiante de TFG, Cristina. Vuestras dudas, preguntas y comentarios me enseñaron cuán difícil es la enseñanza y me ayudaron a iniciarme en ese aspecto de la vida académica.

A Amparo, por su labor al frente de la faceta administrativa del laboratorio y por sus continuas palabras de ánimo y cariño. Y a su relevo, Rosana, a quien le deseo lo mejor.

A todos los trabajadores de mantenimiento, limpieza, conserjería y seguridad de la Universidad por su buen trato, y en especial a Karen, Maribel y Loreto, de la cafetería de Altabix. Gracias también a Daniela y a los monitores del PMC que han permitido que mi cerebro se descomprimiese gracias al deporte.

A Sergio y Josema, mis compis de promoción y los últimos bioquímicos que ha dado esta Universidad.

A la grandísima suerte de mi vida, Aida. Tenerte a mi lado todos estos años ha hecho que cada momento malo lo fuese un poco menos y que cada gran momento fuese cien veces mejor. Gracias por entender lo especial que es esta profesión y por estar dispuesta a acompañarme sea cual sea el destino. Eres un sueño, te quiero.

A mi queridísimo Bobby y a su Boba. Por todas esas cenas en las que nos pusimos al día, despotricábamos de este negocio y nos contabais vuestras aventuras por Europa. Por aquel primer INDOQUIM y todas aquellas risas en el CTQ, por esos partidos de fútbol sala primero y pádel después. Espero que pronto encontremos todos nuestro “sitio”.

A Ana M^a y a Ana Agulló (Las Anas), por todo su cariño y amistad durante estos años en los que, pese a la distancia, en ocasiones sideral, hemos continuado con las reuniones del consejo de sabios que se fundó en Praga.

A mis padres, quienes sin entender del todo a qué me dedico, me mostraron siempre su apoyo sin vacilar. Sin vuestro aliento para que siguiera mi pasión jamás hubiera redactado este documento.

A Darya, por ser esa fuente de sonrisas inagotable desde que naciste y por ayudarme a perfeccionar mis aptitudes de “pachacho”.

A mi familia política, por acogerme como a uno de los suyos desde el primer día y por toda su ayuda desinteresada y comprensión demostrada. A mi cuñadita, por todos los bailes del pollo pasados y venideros.

A todos los docentes que han pasado por mi vida, y en particular a todos aquellos que me sacaron del letargo y me enseñaron a hacerme mil preguntas antes de crearme cualquier afirmación.