

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA
CURSO 2021-22
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Caracterización de líneas de ADN-T en los
genes de la familia *LSD1*, *RABA1c* y *ABF3*
en *Arabidopsis thaliana*

Autor: Adrián Luque Torres

Tutor académico: Prof. Dr. José Manuel Pérez Pérez

D. José Manuel Pérez Pérez, Doctor y Catedrático de Universidad del área de Genética del Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado:

“Caracterización de líneas de ADN-T en los genes de la familia LSD1,
RABA1c Y ABF3 en Arabidopsis thaliana”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

D. ADRIÁN LUQUE TORRES

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Bioingeniería, cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 1 de septiembre de 2022

Fdo.: Prof. José Manuel Pérez Pérez

RESUMEN

En este Trabajo de Fin de Máster se ha continuado la caracterización fenotípica de 15 líneas de ADN-T en los genes *LDL1*, *LDL2* y *LDL3* de la familia LSD1 (LYSINE-SPECIFIC DEMETHYLASE 1), *RABA1c* (*RAB GTPase HOMOLOG A1C*) y *ABF3* (*ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENTS-BINDING FACTOR 3*) de *Arabidopsis thaliana*, con objeto de determinar su eventual contribución a la formación de raíces adventicias en el hipocótilo en respuesta a herida. Hemos confirmado la presencia de la inserción de ADN-T en homocigosis en la posición anotada en la base datos en todas las líneas analizadas. Para tres de las líneas estudiadas hemos demostrado que las inserciones de ADN-T afectan a la expresión del gen aguas abajo de la inserción, lo que presuntamente generaría una proteína truncada en su extremo carboxilo. Los estudios fenotípicos indican que los genes *LDL1*, *LDL3* y *RABA1c* actuarían como reguladores negativos de la formación de raíces adventicias en el hipocótilo en respuesta a herida. Son necesarios estudios adicionales para establecer una relación funcional entre estos tres genes durante la organogénesis *de novo*.

PALABRAS CLAVE: *Arabidopsis thaliana*, raíces adventicias, organogénesis *de novo*, líneas de ADN-T.

ABSTRACT

In this Master Thesis, the phenotypic characterization of 15 T-DNA lines in the *LDL1*, *LDL2* and *LDL3* genes of the LSD1 (LYSINE-SPECIFIC DEMETHYLASE 1) family, *RABA1c* (*RAB GTPase HOMOLOG A1C*) and *ABF3* (*ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENTS-BINDING FACTOR 3*) of *Arabidopsis thaliana* has been continued, to determine their eventual contribution to adventitious root formation in the hypocotyl in response to injury. We have confirmed the presence of the T-DNA insertion in homozygosis at the position annotated in the database in all the lines analyzed. For three of the lines studied we have shown that T-DNA insertions affected gene expression downstream of the insertion, which presumably would generate truncated proteins at its carboxyl terminus. Phenotypic studies indicate that the *LDL1*, *LDL3* and *RABA1c* genes would act as negative regulators of adventitious root formation in the hypocotyl in response to wounding. Further studies are needed to establish a functional relationship between these three genes during *de novo* organogenesis.

KEYWORDS: *Arabidopsis thaliana*, adventitious roots, *de novo* organogenesis, T-DNA lines.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de experimentación.....	1
1.2. Regeneración vegetal <i>in vitro</i>	3
1.2.1. Embriogénesis somática.....	3
1.2.2. Organogénesis <i>de novo</i>	3
1.2.3. Regeneración de tejidos.....	4
1.3. Formación de raíces adventicias a partir de explantos de hipocótilo	5
1.4. Genes estudiados en este trabajo	7
1.4.1. Familia LSD1	7
1.4.1.1. <i>LDL1</i> y <i>LDL2</i>	9
1.4.1.2. <i>LDL3</i>	10
1.4.1.3. <i>RABA1c</i>	10
1.4.1.4. <i>ABF3</i>	11
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	12
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	13
3.1. Material vegetal.....	13
3.2. Cultivo <i>in vitro</i>	13
3.2.1. Preparación de medios de cultivo.....	13
3.2.2. Esterilización de las semillas	14
3.2.3. Siembra en placas de Petri.....	14
3.3. Genotipado de las líneas de ADN-T	15
3.3.1. Extracción de ADN genómico.....	15
3.3.2. Amplificación de ADN mediante PCR.....	16
3.3.3. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	18
3.4. Análisis del enraizamiento adventicio en explantos de hipocótilo.....	19
3.5. Obtención de imágenes de las placas Petri	19
3.6. Análisis de la distribución de raíces adventicias en los explantos de hipocótilo.....	20
3.7. Confirmación de la inactivación de los genes a estudio en las líneas de ADN-T	20
3.7.1. Extracción de ARN	20
3.7.2. Retrotranscripción y amplificación del ADNc.....	21
3.8. Pruebas estadísticas.....	22

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. Identificación de mutantes insercionales de ADN-T.....	23
4.1.1. Gen <i>LDL1</i>	23
4.1.2. Gen <i>LDL2</i>	25
4.1.3. Gen <i>LDL3</i>	26
4.1.4. Gen <i>RABA1c</i>	27
4.1.5. Gen <i>ABF3</i>	28
4.2. Estudio del enraizamiento adventicio en explantos de hipocótilo.....	29
4.2.1. Gen <i>LDL1</i>	29
4.2.2. Gen <i>LDL2</i>	29
4.2.3. Gen <i>LDL3</i>	31
4.2.4. Gen <i>RABA1c</i>	33
4.2.5. Gen <i>ABF3</i>	34
4.3. Confirmación de la pérdida de función en el gel anotado causada por la inserción de ADN-T	35
5. CONCLUSIONES	38
6. BIBLIOGRAFÍA	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-Ciclo vital de una planta de <i>Arabidopsis thaliana</i>	2
Figura 2.-Regeneración vegetal mediante embriogénesis somática y organogénesis <i>de novo</i>	4
Figura 3.- Regeneración de tejidos	5
Figura 4.- Factores hormonales, ambientales y genéticos involucrados en el crecimiento de raíces adventicias a partir de explantos de hipocótilo	6
Figura 5.- Estructura de LSD1 en animales	8
Figura 6.- Representación gráfica de los dominios de los genes LSD1-like en <i>Arabidopsis</i>	9
Figura 7.- Diseño experimental usado en las siembras	15
Figura 8.- Simulación de gel de agarosa con una línea mutante homocigota.....	18
Figura 9.- Plantilla utilizada para la siembra de explantos de hipocótilo	19
Figura 10.- Diseño gel de agarosa para la amplificación por PCR de ADNc.....	21
Figura 11.- Análisis de mutantes insercionales de ADN-T para el gen <i>LDL1</i> de <i>Arabidopsis</i>	24
Figura 12.- Análisis de mutantes insercionales de ADN-T para el gen <i>LDL2</i> de <i>Arabidopsis</i>	25
Figura 13.- Análisis de mutantes insercionales de ADN-T para el gen <i>LDL3</i> de <i>Arabidopsis</i>	26
Figura 14.- Análisis de mutantes insercionales de ADN-T para el gen <i>RABA1c</i> de <i>Arabidopsis</i>	27
Figura 15.- Análisis de mutantes insercionales de ADN-T para el gen <i>ABF3</i> de <i>Arabidopsis</i>	28
Figura 16.- Formación de raíces adventicias en explantos de hipocótilo en los mutantes <i>LDL1</i>	30
Figura 17.- Formación de raíces adventicias en explantos de hipocótilo en los mutantes <i>LDL2</i>	31
Figura 18.- Formación de raíces adventicias en explantos de hipocótilo en los mutantes <i>LDL3</i>	32
Figura 19.- Formación de raíces adventicias en explantos de hipocótilo en los mutantes <i>RABA1c</i>	33
Figura 20.- Formación de raíces adventicias en explantos de hipocótilo en los mutantes <i>ABF3</i>	34
Figura 21.- Visualización en gel de agarosa de la extracción de ARN	35
Figura 22.- Amplificación por PCR del ADNc.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Líneas de ADN–T de <i>Arabidopsis thaliana</i> utilizadas en este trabajo.	13
Tabla 2.- Lista de cebadores utilizados en este trabajo.....	17
Tabla 3.- Cebadores usados para la amplificación por PCR del ADNc.	22
Tabla 4.- Resultados de las extracciones de ARN.	36

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Arabidopsis thaliana* como modelo de experimentación

En este trabajo de fin de Máster se ha utilizado el modelo experimental de *Arabidopsis thaliana* (en adelante *Arabidopsis*), una angiosperma de la familia de las brassicáceas o crucíferas (Koornneef et al., 2004). Es la primera planta y el tercer organismo pluricelular tras *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, cuyo genoma ha sido secuenciado íntegramente (Bevan & Walsh, 2005). Es una planta originaria de Asia central que se ha extendido por todo el mundo (Al-Shehbaz & O’Kane, 2002). Su gran expansión se debe a que crece bien en un rango climático amplio (Hoffmann, 2002), aunque las temperaturas demasiado bajas en otoño y primavera, o temperaturas altas con escasa precipitación limitan su rango de distribución. Las condiciones utilizadas en el laboratorio, con agua suficiente y temperaturas medias-altas, son artificiales para la mayoría de las estirpes utilizadas, pero a pesar de ello crecen bien incluso con iluminación fluorescente (Hoffmann, 2002; Woodward & Bartel, 2018).

Se trata de una planta herbácea anual con uno o varios tallos erectos que emergen desde la roseta basal, y que pueden ser simples o ramificados en su parte superior, en cuya base son pilosos con tricomas simples y son glabros en su ápice (Al-Shehbaz & O’Kane, 2002). La planta forma una roseta de hojas pequeñas de peciolo corto con un tallo principal rematado por una inflorescencia (Meyerowitz, 1987). La inflorescencia es un racimo que contiene una serie de flores, con las más jóvenes en la parte superior y sucesivamente las más viejas. Sus flores están formadas por cuatro sépalos redondeados alternados con cuatro pétalos blancos, seis estambres y un gineceo bicarpelar (Meyerowitz, 1987). Las semillas son elipsoides, de color café claro a rojizo, con un tamaño que oscila entre 0.3 y 0.5 mm de largo (Al-Shehbaz & O’Kane, 2002).

Las principales razones por las que *Arabidopsis* es un buen modelo experimental de la biología vegetal son su pequeño tamaño, de unos 30 cm de altura, y su ciclo de vida corto, ya es capaz de producir miles de semillas en solo siete semanas (Woodward & Bartel, 2018). A los 3 días tras la imbibición de las semillas emerge la radícula. Con solo 7 días son evidentes los cotiledones, los primordios foliares y el hipocótilo o tallo embrionario. A partir de los 13 días las plantas se transfieren a macetas y a los 28 días se produce la floración, madurando las semillas durante unas dos semanas más, cuando las vainas de semillas se secan completamente y las semillas están ya maduras (Woodward & Bartel, 2018) (**Figura 1**).

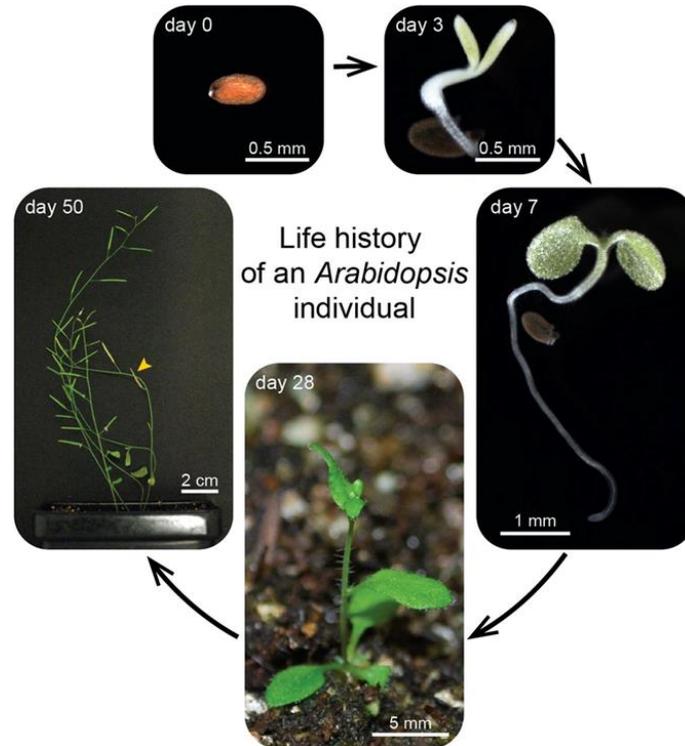


Figura 1.-Ciclo vital de una planta de *Arabidopsis thaliana*. Se describe el ciclo de vida de una planta de *Arabidopsis* desde la siembra de la semilla en placa hasta que es capaz de producir semillas maduras. Imagen obtenida de Woodward & Bartel (2018), con algunas modificaciones.

Se trata de una planta tremendamente versátil, ya que puede tolerar un alto grado de homocigosidad y suele autofecundarse, pudiendo generar miles de descendientes, además no requieren cocultivo con ninguna otra especie y esta planta disuade a otros herbívoros química y enzimáticamente lo cual incurre en un terreno amplio de estudio (Hogge et al., 1988; Woodward & Bartel, 2018). Friedrich Laibach es sin duda el fundador de la investigación experimental de *Arabidopsis* (Koorneff & Meinke, 2010). En los últimos 50 años se han publicado más de 55 000 artículos que contienen *Arabidopsis* en el título, palabras clave o resumen (Provart et al., 2016).

Otra de las características de *Arabidopsis* como sistema modelo es su particular genoma, de unas 146 Mb y organizado en 5 cromosomas (Bevan & Walsh, 2005). A finales del año 2000 se completó la secuenciación de su genoma, aunque posteriormente se han realizado varias rondas de resecuenciación. Su genoma incluye 38 194 locus, 27 655 de los cuáles codifican proteínas, 952 son pseudogenes y el resto son genes no codificantes para diversas formas del ARN (Cheng et al., 2016).

1.2. Regeneración vegetal *in vitro*

Las plantas tienen una gran capacidad regenerativa debido a la plasticidad del desarrollo de sus células (Ikeuchi et al., 2018). La regeneración de plantas *in vitro* es posible realizarla mediante embriogénesis somática, organogénesis *de novo*, o regeneración de tejidos de manera directa (Bidabadi & Jain, 2020; Xu & Huang, 2014).

1.2.1. Embriogénesis somática

En la embriogénesis somática las células somáticas se desdiferencian a células embrionarias y siguiendo las fases del desarrollo embrionario, forman plantas completas (Verdeil et al., 2007). La embriogénesis somática puede ser directa o indirecta, aunque de forma práctica es difícil distinguir entre las dos ya que a menudo ocurren simultáneamente en el mismo explante (Horstmann et al., 2017). En consecuencia, los embriones somáticos se pueden inducir directamente a partir de células somáticas individuales o indirectamente a partir de callos embrionarios (Horstmann et al., 2017).

La embriogénesis indirecta comienza con una masa celular desorganizada denominada callo embrionario, seguida de la formación de masas proembrionarias dentro o en la superficie del callo, a partir de las cuales se desarrollan los embriones somáticos que bajo condiciones apropiadas pueden generar brotes y raíces (Long et al., 2022) (**Figura 2A**). En cuanto a la embriogénesis directa, carece de la fase de formación de callo. En este tipo de embriogénesis, el explante se divide de forma más compacta y es menos prolífico (Horstmann et al., 2017). Una célula somática individual se divide de forma particular y en condiciones adecuadas se convertirá en una planta completa (Long et al., 2022) (**Figura 2A**). Es útil para la regeneración rápida de plantas y para minimizar la variación somaclonales y la formación de quimeras (Bidabadi & Jain, 2020).

1.2.2. Organogénesis *de novo*

La organogénesis *de novo* es el proceso mediante el cual se forman órganos e incluso plantas enteras de otros órganos ya existentes, normalmente en respuesta a heridas (Bidabadi & Jain, 2020). Habitualmente requiere la desdiferenciación de algunas células diferenciadas y la reorganización de la división celular para formar nuevos meristemos y primordios, mediante la conexión vascular entre el explante y el nuevo órgano generado (Sugiyama, 1999). En algunos casos, la organogénesis *de novo* resulta en la formación de raíces adventicias y/o brotes adventicios (Duclercq et al., 2011). En este caso, al igual que en el caso anterior se puede diferenciar entre organogénesis directa e indirecta (**Figura 2B**).

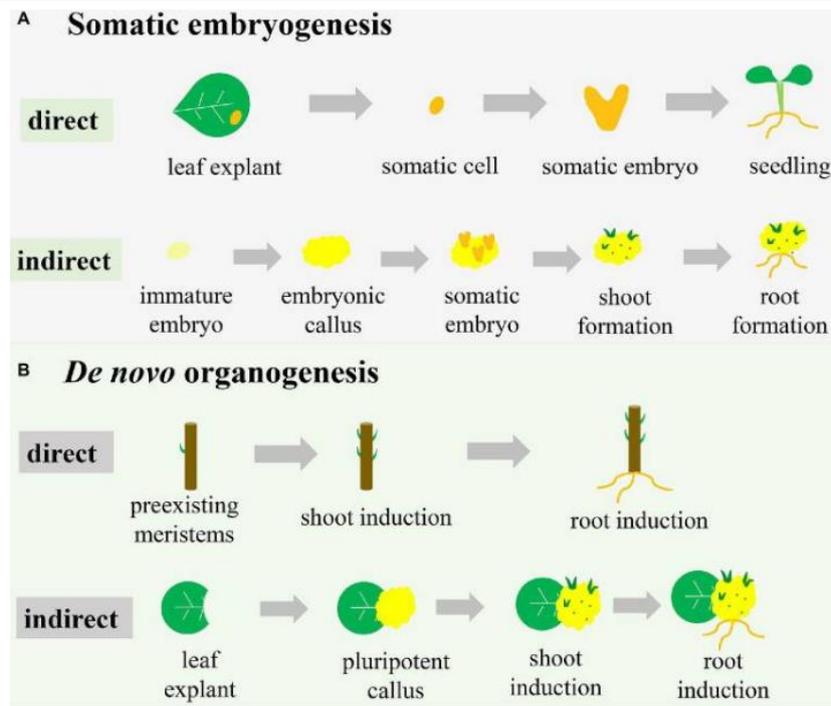


Figura 2.-Regeneración vegetal mediante embriogénesis somática y organogénesis *de novo*. (A) Se describe el proceso de embriogénesis directa e indirecta. (B) Muestra el proceso directo e indirecto de la organogénesis *de novo*. Imagen obtenida de Long et al. (2022), con algunas modificaciones.

En la vía directa, los brotes y las raíces se inducen directamente sobre el tallo a partir de meristemos preexistentes en los tejidos del explante (Long et al., 2022) (**Figura 2B**). En la vía indirecta, las células próximas a la herida se desdiferencian y se estimula su división celular a partir de reguladores del crecimiento, como auxinas y citoquininas (Sugimoto & Meyerowitz, 2013). De esta manera se generan callos pluripotentes (Long et al., 2022) y bajo condiciones específicas sufrirán cambios que dan como resultado la alteración de los patrones de división celular y la emergencia de los nuevos primordios (Wang et al., 2011) (**Figura 2B**).

1.2.3. Regeneración de tejidos

La regeneración de tejidos se refiere a la capacidad de las plantas de reparar las heridas y restaurar las partes dañadas o eliminadas por los herbívoros o factores ambientales (Xu & Huang, 2014) (**Figura 3**). En *Arabidopsis*, los estudios de regeneración tisular se han centrado en la regeneración del meristemo de la raíz y la reparación celular de los tejidos del tallo (Xu & Huang, 2014).

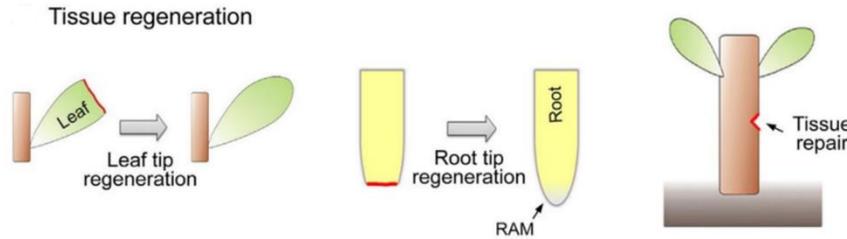


Figura 3.- Regeneración de tejidos. Proceso de regeneración de tejidos tras una herida o corte. Imagen obtenida de Xu & Huang (2014), con algunas modificaciones.

En el caso de la regeneración del meristemo radicular tras su eliminación, el nicho de células madre se encuentra en la punta del meristemo apical de la raíz y se organiza alrededor del centro quiescente (*quiescent center*; QC), que suele tener de cuatro a ocho células que se dividen raramente y que se definen por la expresión del factor de transcripción WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX 5) (Sarkar et al., 2007; Xu & Huang, 2014). Tras la eliminación de las células del QC, se producen cambios en el transporte polar de auxina y en los niveles de algunos factores de transcripción clave, por lo que parece que la alta concentración de auxinas en esta región es un factor clave en la regeneración de la raíz (Xu et al., 2006).

En cuanto a la reparación de tejidos en el tallo tras una herida, la corriente de auxinas se bloquea en la posición de la herida, lo cual lleva a unos niveles bajos de auxinas por debajo de la herida, y a unos niveles altos entorno a ella (Asahina et al., 2011). Estos diferentes niveles de auxinas inducen la expresión de factores de transcripción específicos que son esenciales en la cicatrización de heridas mediante la formación de un callo (Asahina et al., 2011).

1.3. Formación de raíces adventicias a partir de explantos de hipocótilo

Las raíces adventicias son raíces que se desarrollan a partir de tejido no radicular como hipocótilos, hojas y tallos (Verstraeten et al., 2014). En el hipocótilo, las raíces adventicias se originan a partir de una capa celular que se corresponde con el periciclo de la raíz primaria (Falasca et al., 2004). La eliminación del sistema radicular principal activa la formación de primordios de raíces adventicias en el hipocótilo (Verstraeten et al., 2014). La formación de raíces adventicias se puede dividir en varias etapas histológicas: las células fundadoras en el periciclo se dividen anticlinalmente (etapa 1) y periclinalmente (etapa 2) formando dos capas de células; posteriormente se divide periclinalmente la capa externa (etapa 3) y después la capa interna (etapa 4); tras ello se producen varias divisiones anticlinales en las células centrales de las nuevas capas (etapa 5); en la etapa 6 los primordios de raíces adventicias adquieren forma de cúpula; por último en la etapa 7 siguen creciendo estos primordios y se define el QC (Della Rovere et al., 2013).

El desarrollo de raíces adventicias está controlado por procesos dependientes de las auxinas (Della Rovere et al., 2013). IAA14, también llamado SOLITARY ROOT (SLR), actúa en el hipocótilo como un factor que determina la capacidad de formación de raíces adventicias (Fukaki et al., 2002) (**Figura 4**). La inducción de luz para la formación de raíces adventicias está mediada por los genes *ARGONAUTE 1* (*AGO1*) y *LONG HYPOCOTYL 5* (*HY5*) (Sorin et al., 2005). AUXIN RESPONSE FACTOR 17 (ARF17) tiene un papel negativo sobre la formación de raíces adventicias (Sorin et al., 2005) (**Figura 4**). Además, las proteínas GRETCHEN HAGEN 3-3 (*GH3-3*) y *GH3-6* controlan la iniciación del enraizamiento adventicio mediante la modulación de los niveles de jasmonato (Gutierrez et al., 2012) (**Figura 4**).

Algunos factores ambientales tienen efectos sobre el equilibrio hormonal, desencadenando o inhibiendo la formación de raíces adventicias. La escasez de agua retrasa la formación de raíces adventicias a través de interacciones con el ácido abscísico (ABA; Sreenivasulu et al., 2012). Por otro lado, la inmersión de las raíces principales en agua como consecuencia de una inundación induce la formación de raíces adventicias mediada por el etileno (Sauter, 2013), mientras que los niveles reducidos de fosfatos en suelos estimulan la formación de raíces adventicias debido a una redistribución de las auxinas endógenas en la planta (**Figura 4**).

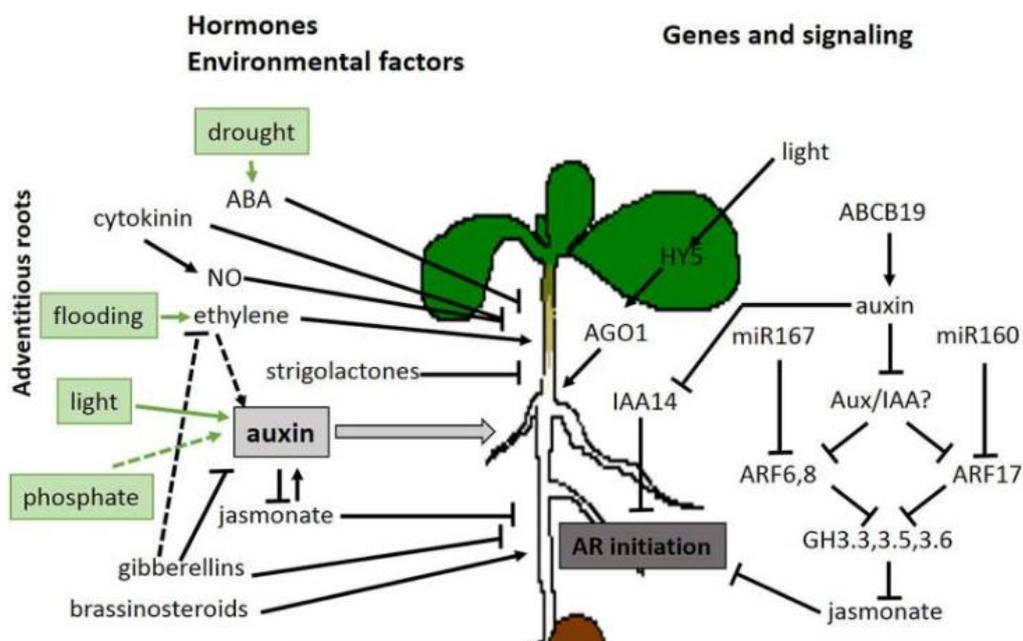


Figura 4.- Factores hormonales, ambientales y genéticos involucrados en el crecimiento de raíces adventicias a partir de explantos de hipocótilo. En esta figura se describen algunos de los factores tanto genéticos como ambientales que influyen en la formación de raíces adventicias. Imagen obtenida de Verstraeten et al. (2014), con algunas modificaciones.

1.4. Genes estudiados en este trabajo

1.4.1. Familia LSD1

Las histonas nucleosómicas están involucradas en el posicionamiento cromosómico dentro del núcleo y en el superenrollamiento del ADN (Kouzarides, 2007). A estas histonas se le pueden añadir o quitar diversos grupos bioquímicos, siendo los más frecuentes la fosforilación, acetilación o metilación, esto ayuda al control de la plasticidad de la cromatina ayudando a las proteínas nucleares, las cuales se encargan de la recombinación del ADN, la expresión génica o la reparación del ADN (Perillo et al., 2020).

El proceso de desacetilación de histonas es un proceso muy estudiado, pero hasta hace un par de décadas se pensaba que no existían proteínas con actividad desmetilasa de histonas. LYSINE-SPECIFIC DEMETHYLASE 1 (LSD1) es una desmetilasa específica de lisina que elimina de las histonas grupos monometilo (me1), dimetilo (me2) y trimetilo (me3). La eliminación de estos grupos metilo se realiza por oxidación del sustrato por FAD (Flavina Adenina Dinucleótido), generando una imina que posteriormente se hidroliza (Forneris et al., 2005).

La proteína LSD1 es capaz de regular la transcripción, ya sea mediante su activación o su represión. Cuando LSD1 se asocia al complejo proteico correpressor transcripcional (CoREST) y desmetila las marcas de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4), provoca la represión transcripcional (Perillo et al., 2020). También se cree que LSD1 colabora con otras desmetilasas de histonas en la regulación de la expresión génica, ya que en un experimento de eliminación selectiva de LSD1 resultó en un aumento de algunas lisinas metiladas de la histona H3 (linsina 36 y 79; Jin et al., 2017). Por otro lado, LSD1 es capaz de estimular la transcripción al unirse a algunos receptores nucleares como los receptores de andrógenos, esto se debe a que en lugar de desmetilar la lisina 4, desmetila la lisina 9 de la histona H3 (H3K9; Metzger et al., 2005). En este caso LSD1 solo puede desmetilar las marcas me1 y me2 por lo que para completar la desmetilación se une a Jumonji C (Jmj C) dependiente de hierro y α -cetoglutarato (Perillo et al., 2020).

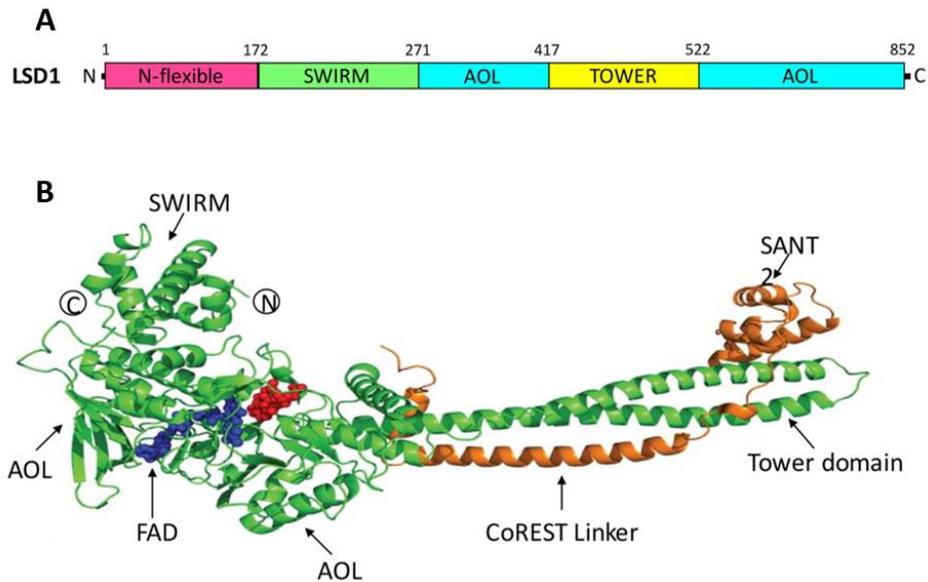


Figura 5.- Estructura de LSD1 en animales. (A) Muestra la proteína LSD1 con sus correspondientes dominios. (B) Representación tridimensional de la proteína LSD1 con sus diferentes dominios y sitios de unión. Imagen obtenida de Perillo et al. (2020) con algunas modificaciones.

LSD1 en animales está formada por 852 aminoácidos con tres dominios diferentes: (1) el dominio Swi3/Rcs8/Moira (SWIRM) aguas abajo de la posición N-terminal, (2) el dominio TOWER y (3) el dominio catalítico AOL (Perillo et al., 2020) (**Figura 5A**). Este dominio catalítico está dividido en dos partes por el dominio Tower, el lado izquierdo se encarga de unir FAD mientras que el lado derecho forma un bolsillo catalítico (Perillo et al., 2020) (**Figura 5B**). El dominio TOWER sobresale de este núcleo proteico formando motivos helicoidales que formará un sitio de unión para el complejo CoREST (Lee et al., 2005).

Arabidopsis tiene cuatro genes homólogos entre sí y ortólogos al gen *LSD1* de animales. Se tratan de *LSD1-like 1* (*LDL1*), *LDL2*, *LDL3* y *FLOWERING LOCUS D* (*FLD*), y en este trabajo vamos a estudiar los tres primeros. A diferencia de la proteína LSD1 de animales, las de Arabidopsis no presentan el dominio TOWER. *LDL1* y *LDL2* tienen un tamaño parecido a su ortólogo en animales, mientras que *LDL3* contiene el doble de aminoácidos. Curiosamente, en *LDL3* se identificó un dominio con similitudes al factor de transcripción IIS, además presenta una inserción en el dominio AOL (Martignago et al., 2019). En cuanto a la cantidad de intrones, *LDL3* presenta dos intrones en la región que codifica el dominio SWIRM, dos en la que codifica el dominio IIS y tres intrones aguas abajo (Martignago et al., 2019). Por otro lado, nos encontramos con *LDL2* que únicamente presenta un intrón y *LDL1* que no presenta ninguno (**Figura 6**) (Martignago et al., 2019).

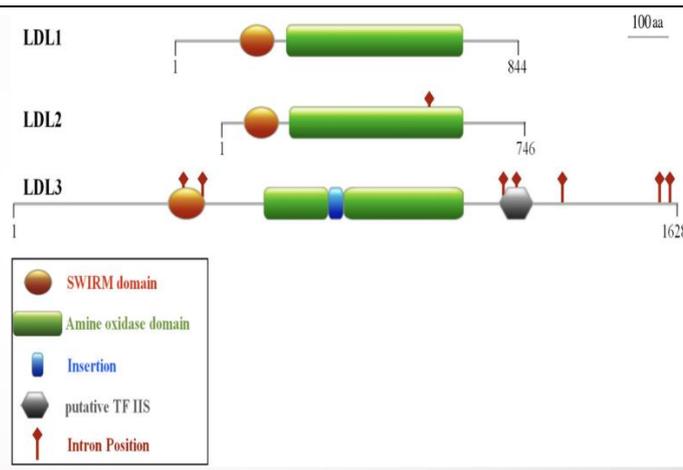


Figura 6.- Representación gráfica de los dominios de los genes *LSD1-like* en *Arabidopsis*. Imagen obtenida de Martignano et al. (2019) con algunas modificaciones.

1.4.1.1. *LDL1* y *LDL2*

Estos dos genes desempeñan su función de forma sinérgica por lo que los revisaremos de manera conjunta. *LDL1* y *LDL2* presentan localización nuclear en estudios con protoplastos (Zhao et al., 2015). *LDL1* se expresa en el meristemo apical del tallo (*shoot apical meristem*, SAM), las hojas recién emergidas y la punta de la raíz, los cotiledones y a lo largo del sistema vascular (Martignano et al., 2019). *LDL2* también se expresa en el SAM, pero se expresa también en las zonas de elongación y diferenciación de la raíz y en la columela de las raíces primarias y secundarias (Martignano et al., 2019).

Ambos genes desempeñan un papel importante en el control de la floración al disminuir los niveles de metilación de H3K4 en la cromatina de los represores florales *FLOWERING LOCUS C (FLC)* y *FLOWERING WAGENINGEN (FWA)* lo cual lleva a una potenciación de la floración (Zhao et al., 2015). La sobreexpresión de los genes *LDL1* o *LDL2* reduce la dormancia de las semillas al mediar en la expresión de *DOG1*, que funciona en la vía de señalización del ABA (Zhao et al., 2015). Los dobles mutantes *ldl1 ldl2* muestran una reducción en los niveles de ABA (López-Molina et al., 2002).

Se ha documentado que las proteínas *LDL1* y *LDL2* también forman complejos con la desacetilasa de histonas HDA6 que funciona como un regulador transcripcional. Se ha visto que los complejos *LDL-HDA6* pueden unirse a factores de transcripción como *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)*, *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* o *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)*, todos ellos funcionan en la regulación del reloj circadiano (Noh et al., 2021). Además, *LDL1* es capaz de afectar a la elongación de las raíces mediante la represión del factor transcripcional *LATERAL ROOT PRIMORDIA 1 (LRP1)* (Krichevsky et al., 2009).

1.4.1.2. *LDL3*

El gen *LDL3* pertenece a un linaje evolutivo diferente a *LDL1* y *LDL2*, de ahí su diferencia en cuanto a estructura génica y funciones con respecto a los demás. Se expresa en hojas recién emergidas, columela y en el sistema vascular de la raíz (Martignago et al., 2019).

El gen *LDL3* también desempeña un papel en el control de la floración, pero al contrario que *LDL1* o *LDL2* tiene un efecto potenciador de la expresión de *FLC* lo cual conlleva un retraso en la floración (Jiang et al., 2007). Recientemente se ha visto que en los mutantes *ldl3* se suprime la regeneración de brotes *de novo* (Isihara et al., 2019), lo que sugiere que *LDL3* estaría implicado en la regeneración tisular. De hecho, la expresión de algunos genes relacionados con la regeneración de brotes, como *CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 23 (CIPK23)*, *NADH-DEPENDENT GLUTAMATE SYNTHASE 1 (GLT1)* y *UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE 4 (UPL4)* disminuyó durante la regeneración de brotes, y esta reducción fue mayor en los mutantes *ldl3* (Isihara et al., 2019). Estos resultados indican que *LDL3* es capaz de eliminar las marcas H3K4me de estos genes mencionados, favoreciendo su expresión (Isihara et al., 2019).

1.4.2. *RABA1c*

El gen *RABA1c* (AT5G45750) también llamado *RAB GTPase HOMOLOG A1C* tiene un tamaño de 1 850 pb y consta de dos exones separados por un intrón. Codifica una pequeña GTPasa monomérica de la superfamilia Ras cuya función está modulada por la unión e hidrólisis del nucleótido de guanina (Qi & Zheng, 2013). En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado 26 proteínas Rab-A que se han dividido en seis categorías, desde A1 a A6 (Qi et al., 2013). Se cree que estas proteínas se encargan de satisfacer la necesidad dinámica del tráfico de membranas alrededor del TGN (Qi et al., 2011). En las células vegetales, las proteínas Rab-A desempeñan importantes funciones en el tráfico de membrana desde la red del trans-Golgi (*trans-Golgi network*, TGN) hasta la membrana plasmática y/o la placa celular recién formada en citocinesis, actuando como un interruptor molecular en la regulación del anclaje y acoplamiento de diferentes vesículas a la membrana mediante el ciclo entre sus formas activa (unida a GTP) e inactiva (unida a GDP) (Qi et al., 2013; Qi & Zheng, 2013).

Un estudio previo ha demostrado que *RABA1C*, colocaliza con otras Rab-A y define una población del TGN que contiene la subunidad de la H⁺ ATPasa vacuolar VHA a1 (Qi et al., 2013). *RABA1c* es sensible a ES1, pero no a Wortmannin. ES1 es un compuesto que inhibe una población específica de la TGN que participa en el transporte de ciertos transportadores de auxina como PIN2 y AUX1 (Robert et al., 2008). Es posible que ES1 inhiba el reciclaje de PIN2 y AUX1 atacando a un componente de la ruta TRAPP/II/Rab-A (transporte de PIN2 en TGN), pero no directamente a Rab-A (Qi et al., 2013). Wortmannin es un inhibidor de PI3K, siendo capaz de inhibir la endocitosis de los cuerpos

multivesiculares (Wang et al., 2009). Las proteínas Rab-A1, además de su participación en la secreción polar y en el reciclaje de las proteínas de la membrana plasmática, también están involucradas en la citocinesis, ya que se requieren para el transporte de otras proteínas desde el TGN hasta la placa celular recién formada (Qi et al., 2013).

1.4.3. ABF3

El gen *ABF3* (AT4G34000), también llamado *ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENTS-BINDING FACTOR 3*, está formado por seis exones y tiene un tamaño de 2 701 pb. Codifica un factor de transcripción del grupo A de la familia basic leucine zipper (bZIP; Choi et al., 2000). Algunas proteínas de este grupo son esenciales para las respuestas mediadas por ABA (Choi et al., 2000; Gao et al., 2016). Entre los eventos que pueden producir la activación de ABF3 se encuentran la salinidad y la sequía, es decir funcionan ante la señalización de estrés osmótico (Yoshida et al., 2015). Según un estudio de Delmas et al. (2013) concluyen que ABF3 entre otros, media en la degradación de la clorofila mediante la activación directa de la expresión de NYE 1. Otro estudio descubre que NYE2 también está involucrado en la senescencia de las hojas (Gao et al., 2016). Además, ABF3 se encarga de regular directamente la expresión de dos CCG como son NYC1 y PAO en la degradación de clorofila (Gao et al., 2016). Otra proteína que provoca senescencia mediada por ABF3 se trata de SAG29 y en menor medida SAG12 (Zhao et al., 2016).

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los estudios dedicados a la identificación de genes implicados en la formación de raíces adventicias no son muy numerosos. En el laboratorio del Dr. José Manuel Pérez Pérez se han llevado cabo varios estudios que implican la formación de raíces adventicias. En un trabajo previo (Fernández López, 2016), se estudió la formación de raíces adventicias a partir de explantos foliares en 23 líneas insercionales de ADN-T y se verificó que siete de ellas portaban las inserciones en homocigosis. Para seis de los mutantes homocigóticos estudiados, el fenotipo observado era causado por la inserción de ADN-T en el gen anotado (Fernández López, 2016). En un trabajo posterior (Ortí Llul, 2019) se sentaron las bases para el análisis funcional de la familia LSD1 en los que se identificaron individuos presuntamente homocigóticos para inserciones de ADN-T en los genes *LDL1*, *LDL3* y *FLD* (Ortí Llul, 2019). En este trabajo se observó que líneas sobreexpresoras de *LDL1* y *LDL2* mostraron un efecto negativo sobre la regeneración y la formación de raíces adventicias en explantos foliares (Ortí Llul, 2019). Por último, en el año 2020 se realizó un estudio en el que se encontró que los explantos foliares con mutantes de pérdida de función en *FLD* y *LDL2*, presentaban un mayor número de raíces adventicias que el genotipo silvestre (Ballester Palomar, 2020). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la formación de raíces adventicias en las líneas mutantes de *LDL1* y *LDL3* (Ballester Palomar, 2020).

Para indagar sobre la función de los genes implicados en la formación de raíces adventicias LSD1, así como de RAB-A1c y ABF3, en el proceso de enraizamiento adventicio, se persiguen los siguientes objetivos:

- Identificar líneas homocigóticas para las inserciones de ADN-T en genes de interés, como *LDL1*, *LDL2*, *LDL3*, *RABA1c* y *ABF3*, identificadas en trabajos previos.
- Estudiar la formación de raíces adventicias en el hipocótilo en respuesta a herida en las líneas mutantes homocigotas para la inserción de ADN-T en los genes de interés.
- Confirmar que los fenotipos mutantes identificados se deben a deficiencias en la expresión de los genes de interés causadas por las inserciones de ADN-T en dichos genes.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. Material vegetal

En este trabajo se han utilizado las 15 líneas mutantes de ADN–T de *Arabidopsis thaliana* (en adelante *Arabidopsis*) que se indican en la **Tabla 1**. Como estirpe de referencia se ha utilizado Columbia–0 (Col–0), que es el fondo genético silvestre en el que se obtuvieron todas las líneas de ADN–T utilizadas en este trabajo. Las semillas se obtuvieron del banco de semillas del laboratorio, que están almacenadas en una cámara fría a 14 °C.

Tabla 1.- Líneas de ADN–T de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo.

Gen	Código AGI	Identificador NASC	Identificador alternativo	Referencia
LDL1	At1g62830	N642477	SALK_142477	Krichevsky et al. (2011)
		N534869	SALK_034869	Jiang et al. (2007)
		N331519	GABI_438B06	María Ortí Lull (2019)
LDL2	At3g13682	N638820	SALK_138820	Hirakawa et al. (2019)
		N635831	SALK_135831	Jiang et al. (2007)
		CS816505	SAIL_355_F07	
LDL3	At4g16310	N684745	SALK_146733C	Ishihara et al. (2019)
		N827606	SAIL_640_B10	Martignago et al. (2019)
		N361813	GABI_092C03	Ishihara et al. (2019)
RABA1C	At5g45750	N628435	SALK_128435	
		N532904	SALK_032904	
		N625441	SALK_125441	
		N645363	SALK_145363	
ABF3	At4g34000	N638872	SALK_138872	
		N631169	SALK_131169	

3.2. Cultivo *in vitro*

3.2.1. Preparación de medios de cultivo

Para la preparación de 1 L de medio de germinación, se añaden 800 mL de agua destilada a un vaso de precipitados y se mantiene en agitación durante todo el proceso. A continuación, se añaden 2.15 g de sales de Murashige y Skoog [M0221, Duchefa Biochemie], 10 g de sacarosa [S0809, Duchefa Biochemie], 0.5 g de MES monohidrato [M1503, Duchefa Biochemie] y 2 mL de un preparado de vitaminas Gamborg a 1× de concentración [G0415, Duchefa Biochemie]. Hay que asegurarse que los compuestos se disuelven completamente en el agua destilada. Posteriormente se ajusta el pH de la disolución a 5.7 con unas gotas de KOH 1M.

A continuación, se enrasa la mezcla con agua destilada hasta 1 L utilizando una probeta graduada y se vierte el contenido en 2 botellas de 500 mL, añadiendo 3.25 g de Plant Agar [P1001, Duchefa Biochemie] en cada botella. Las botellas se autoclavan a 121 °C durante 20 min. Al finalizar, se deja enfriar el medio en un baño termostatzado hasta 50 °C, antes de verterlo en las placas de Petri cuadradas (120×120×10 mm) a razón de 75 mL por placa y en una cabina de flujo laminar horizontal modelo AH100 [Telstar] para que el medio se mantenga en condiciones asépticas. Las placas de Petri se guardan en bolsas estériles en un frigorífico a 4 °C hasta su uso.

3.2.2. Esterilización de las semillas

Durante la esterilización de las semillas es muy importante mantener la asepsia en todo momento, por ello este proceso se realiza en la cabina de flujo laminar horizontal, la cual habrá sido previamente encendida y esterilizada con la lámpara UV (20 min) y desinfectada superficialmente con etanol absoluto. Para la esterilización de las semillas, introducimos las semillas de las diferentes líneas en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL. Una vez en la cabina, se añade 1 mL de la disolución de esterilización [50 mL de lejía comercial Mical (37 g de cloro activo por litro a la salida de fábrica), 300 µL de Tritón X-100 al 1% y 50 mL de agua destilada estéril] a cada tubo Eppendorf y se agitan ocasionalmente durante 10 min. A continuación, se retira la disolución de esterilización con una micropipeta P1000 con cuidado de no arrastrar ninguna semilla, cambiando de punta entre tubo y tubo. Posteriormente se añade 1 mL de agua destilada estéril a cada tubo y se agitan ocasionalmente durante 5 min. Pasado ese tiempo, se retira el agua con una punta de micropipeta con cuidado de no arrastrar ninguna semilla. Este lavado se repite otras tres veces para retirar los residuos que puedan quedar de la disolución de esterilización, y finalmente se dejan las semillas en suspensión acuosa para su siembra.

3.2.3. Siembra en placas de Petri

La siembra de las semillas se realiza en una cabina de flujo laminar horizontal. Para la siembra de semillas para su genotipado en placas de Petri se ha utilizado una plantilla de 49 semillas por placa (**Figura 7**). Para depositar las semillas individualmente en los cuadrantes indicados en la plantilla, se utiliza una pipeta Pasteur previamente esterilizada con el mechero, con cuidado de no depositar varias semillas en un mismo cuadrante. Tras la siembra, las placas se sellaron con una cinta quirúrgica Micropore 3MM de 12.5 mm, teniendo cuidado de que no quedase ningún hueco en las placas de Petri que favorezcan las contaminaciones desde el exterior. Las semillas se mantienen en las placas a 4 °C en un frigorífico y en horizontal durante tres días para sincronizar su germinación. Según el experimento que se esté llevando a cabo, las placas se sembrarán en distintas condiciones: horizontal o vertical, oscuridad o luz continua (véase el apartado siguiente para más detalles).

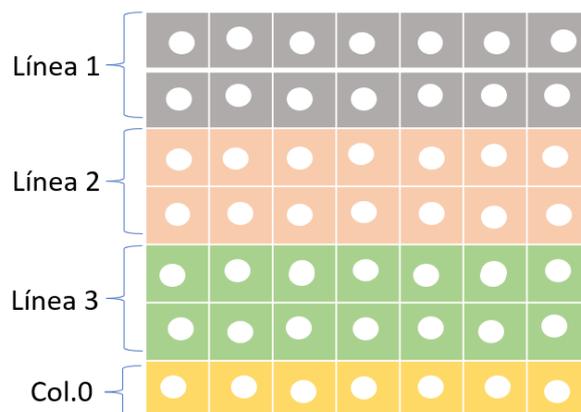


Figura 7.- Diseño experimental usado en las siembras.

3.3. Genotipado de las líneas de ADN–T

3.3.1. Extracción de ADN genómico

Las placas para genotipado se incuban durante siete días en posición horizontal en una cámara de cultivo modelo MLR-352 (Panasonic) con luz continua de unos $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad y a una temperatura de $21.0 \pm 1.0 \text{ }^\circ\text{C}$. Para la extracción de ADN genómico (ADNg) se utilizan siete individuos de cada una de las líneas estudiadas, que fueron almacenados individualmente en tubos Eppendorf de 1.5 mL debidamente rotulados.

A cada tubo le añadimos 500 μL del tampón de extracción [10 mL de Tris-Cl 1M a pH 8.0; 10 mL de EDTA 1M a pH 8.0; 20 mL de NaCl 2.5M; 60 mL de agua destilada]. A continuación, se macera cada muestra con un palillo estéril hasta obtener una mezcla homogénea. Se vuelven a añadir otros 500 μL del tampón de extracción y se termina de homogeneizar con el vórtex. A la mezcla anterior se añaden 35 μL de SDS al 20%, se mezcla por inversión (evitando la formación de espuma), y se incuban en un termobloque durante 5 min a $65 \text{ }^\circ\text{C}$. A continuación, se pasan los tubos a hielo y se añaden 130 μL de KOAc 5M, se mezcla mediante el vórtex, se incuban en hielo 8 min y luego se centrifugan a 12000g durante 15 min a temperatura ambiente en una microfuga Maestrogen [SKU: SML-01]. Posteriormente se transfieren 500 μL del sobrenadante a nuevos tubos Eppendorf, con cuidado de no arrastrar ningún material desde el precipitado. Se añaden 640 μL de isopropanol y 40 μL de acetato de amonio 3M, se mezclan bien y se incuban los tubos en el congelador a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 25 min. Después se centrifugan los tubos a 12000g durante 15 min y se elimina el sobrenadante por decantación. Al precipitado se le adiciona 1 mL de etanol 70% para el lavado, y se centrifuga a 12000g durante 5 min. En este momento llega el momento más crítico ya que hay que eliminar todo el sobrenadante con una micropipeta sin arrastrar el precipitado. Una vez completado este paso, se deja secar el precipitado en el termobloque

a unos 45 °C durante 20 min y se resuspende a continuación en 50 µL de agua destilada doblemente autoclavada. Los tubos se guardan debidamente rotulados en el frigorífico a 4 °C.

3.3.2. Amplificación de ADN mediante PCR

Para comprobar que la inserción se encuentra en la posición indicada en la página del TAIR [<https://www.arabidopsis.org/>] y que las líneas utilizadas eran homocigóticas para la inserción estudiada (Tabla 1), se ha llevado a cabo la amplificación mediante PCR de fragmentos de ADN_g utilizando dos parejas de cebadores para cada una de las líneas estudiadas. La primera pareja de cebadores está formada por un cebador *forward* y otro *reverse* que son específicos de la región contigua a la inserción estudiada (**Tabla 2**), lo que permite comprobar la presencia del alelo silvestre tras su amplificación. La segunda pareja de cebadores incluye un cebador específico para la inserción del ADN-T (LBb1.3, 08474 o LB⁻, dependiendo del origen de la línea) y otro específico del gen, el *forward* o *reverse* indicado arriba, dependiendo de la orientación en la que se ha insertado el ADN-T en el gen a estudio (**Tabla 2**). Se simuló las hibridaciones de las diferentes parejas de cebadores en los genes correspondientes antes de su amplificación.

Cuando se utilizan las dos parejas anteriores para analizar una línea de ADN-T presuntamente homocigota esperamos que no se obtenga ningún fragmento de amplificación con la primera pareja de cebadores en ninguno de los individuos mutantes analizados, pero sí con el individuo silvestre Col-0 utilizado como control. Por el contrario, con la segunda pareja de cebadores se amplificaría un fragmento de ADN a partir del ADN_g de los individuos mutantes pero no del silvestre (**Figura 8**). Estos resultados confirmarían la homocigosis para la inserción de ADN-T en el gen anotado para la línea analizada en cada caso.

Para la PCR se prepara una mezcla maestra de cada pareja de cebadores, ajustando el número de reacciones de PCR que se llevarán a cabo en cada caso. Cada reacción de PCR (10 µL) en la mezcla maestra contiene 2.0 µL de tampón Buffer Green 5×; 1.6 µL de MgCl₂ 25 mM; 1.6 µL del cebador *forward* 25 µM, 1.6 µL del cebador *reverse* 25 µM, 1.35 µL de agua destilada estéril, 0.8 µL de dNTPs 10 mM y 0.05 µL de la polimerasa GO Taq 5 U/λ, siguiendo el protocolo del kit GoTaq DNA Polymerase [M3001, Promega]. Cuando la mezcla maestra esté homogeneizada, se transfieren 9 µL de esta mezcla a cada tubo de PCR de 0.2 mL, y se añade 1 µL de ADN_g, cambiando de punta entre cada tubo de PCR. Una vez completado este paso, se tapan los tubos y se incuban en un termociclador modelo T100 [1861096, Bio-Rad] con el siguiente programa: 95 °C durante 2 min, 40 ciclos de amplificación (95 °C durante 10 s, 60 °C durante 30 s, y 72 °C durante 1 min por Kb) y 72 °C durante 5 min, y se mantiene a 16 °C al finalizar el programa. Las muestras se almacenan en el congelador a -20 °C hasta su visualización en un gel de agarosa.

Tabla 2.- Lista de cebadores utilizados en este trabajo.

Gen	Línea	Cebador <i>forward</i>		Cebador <i>reverse</i>		Tamaño del fragmento (pb)
		Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia	
<i>LDL1</i>	SALK_142477 [18]	<i>LDL1-intern-2F</i>	TGGTTTATGGGGTTGCTGAGGAT	<i>gLDL1-R</i>	CTCGAATAACTGATCCAAAC	962
	GABI_438B06 [7.3.15]	<i>LDL1-intern-F</i>	TGCTCTGTGGCGATCTAATGT	<i>LDL1-intern-R</i>	ACGATGCCTCAATCTTAGAATCAA	468
	SALK_034869 [5.5.8]	<i>gLDL1-F</i>	AAGAAAGAAGCGATTGAGAG	<i>LDL1-R_2</i>	AGTATTCAATTTCTCAACTCATC	791
<i>LDL2</i>	SALK_138820 [#1A]	<i>LDL2-LP</i>	AGTTTGGTTGGTTTCGGTTG	<i>LDL2-RP</i>	ACCCAATACAGACGGTTTGC	962
	SAIL_355F07 [5.2]					
	SALK_135831 [#1A]					
<i>LDL3</i>	SALK_146733C [B]	<i>LDL3-Salk-Sail-F</i>	TTCGAATTTGAGAGTTTTGATAGAC	<i>LDL3-Salk-Sail-R</i>	TTGCTCATTCTCCCATTTCACG	1074
	SAIL_640_B10 [#C]	<i>GK-LDL3-F</i>	AGGATGGTCTAGAATATGGCCTTC	<i>GK-LDL3-R</i>	TATCAATTATACGCACAGCTTCCC	997
	GABI_092C03 [2.2B]					
<i>RAB-A1c</i>	SALK_032904 [11]	<i>FWSalk_032904C_2</i>	CCACGTATATTATTCTGGATTAG	<i>RVSalk_032904C</i>	TGACCAGCAGTATCCCAAATC	697
	SALK_145363 [10]	<i>FWSalk_145363C</i>	ATTGCCGTAGCCATAACTGTG	<i>RVSalk_145363C</i>	CGATTTCTTCTGTTGTTTTGC	1178
	SALK_128435 [2.2 y 21]	<i>FWSalk_128435C</i>	AATCAAACCAGCAAATGCAAC			1399
<i>ABF3</i>	SALK_131169 [B]	<i>FWSalk_138872C</i>	CGCAAATGTATCGATAATG	<i>RVSalk_131169C</i>	CGGTTGAGGTTCTTCCCTAAC	1370
	SALK_138872 [24]					
Colección de ADN-T		Cebador para el ADN-T				
		Nombre	Secuencia			
SALK		<i>LBb1.3</i>	ATTTTGCCGATTCGGAAC			
GABI		<i>08474</i>	ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT			
SAIL		<i>LB3</i>	TAGCATCTGAATTTCATAACCAATCTCGATACAC			

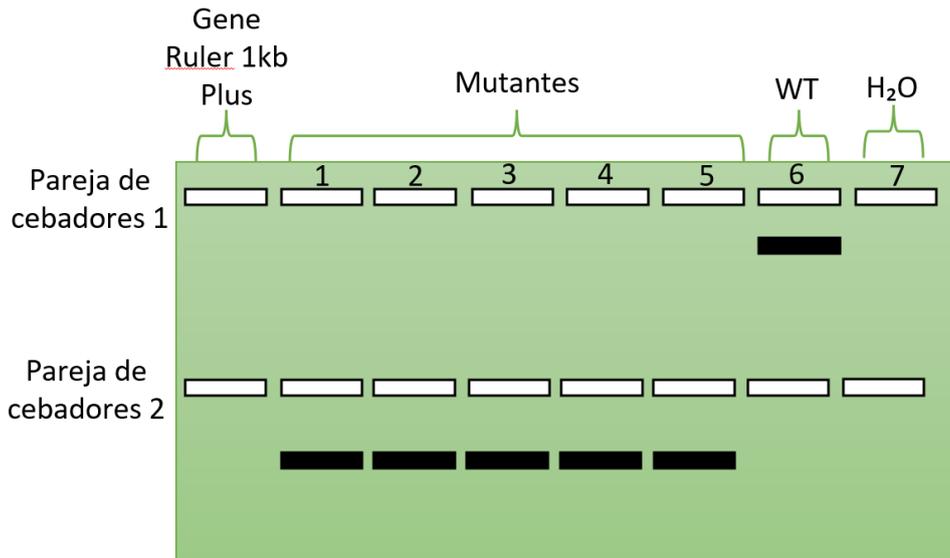


Figura 8.- Simulación de gel de agarosa con una línea mutante homocigota. Las barras blancas indican el pocillo en el gel de agarosa y las negras el fragmento de ADN que se observa tras la amplificación por PCR con la pareja de cebadores indicada en cada caso.

3.3.3. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Para visualizar los productos de amplificación por PCR se prepara un gel de agarosa al 1%. Para ello añadimos 1 g de agarosa en un matraz adecuado y 100 mL de tampón TAE 1× (Tris 40 mM; ácido acético 0,12% y EDTA 1 mM). Calentamos la mezcla en el microondas, agitando ocasionalmente, hasta obtener una mezcla homogénea y transparente. Dejamos atemperar la mezcla un poco y se le añaden 4 µL del agente intercalante GreenSafe [MB13201, NZYTech] al matraz con la disolución de agarosa y agitamos suavemente sin crear burbujas. A continuación, se vierte la mezcla en el portageles, que previamente habremos montado con las gomas en la campana de extracción de gases, y la dejamos solidificar durante unos 25 min. Cuando el gel haya solidificado completamente, retiramos con cuidado los peines y las gomas del portageles y lo introducimos en la cubeta de electroforesis. En el primer pocillo cargamos 5 µL del marcador de peso molecular Gene Ruler DNA ladder 1 kb [SM0313, Thermofisher], y en el resto de los pocillos cargamos 10 µL de cada muestra de PCR. A continuación, se conecta la fuente de alimentación a un voltaje de 90 V durante 25 min. Tras esto, se visualiza el ADN mediante luz UV utilizando un documentador de geles [SML-01, Maestrogen] y se obtiene una fotografía del gel utilizando la cámara que incorpora el equipo.

3.4. Análisis del enraizamiento adventicio en explantos de hipocótilo

Para el estudio de la formación de raíces adventicias en explantos de hipocótilo sembraremos semillas de las líneas de ADN-T homocigóticas con la ayuda de una plantilla de 43 posiciones (**Figura 9A**). Se han realizado dos réplicas de cada una de las líneas estudiadas y confirmadas mediante PCR y tres réplicas de la línea silvestre Col-0. Para inducir la elongación del hipocótilo, las placas se envolvieron con varias capas de papel de aluminio y se mantuvieron en vertical en la cámara de cultivo durante cuatro días. A continuación, se les retiró el papel de aluminio y se incubaron las placas en vertical durante siete días más en la cámara de cultivo para favorecer la expansión de los cotiledones y el desarrollo foliar. En este momento [11 días tras la siembra (dts)], se induce la formación de raíces adventicias en el hipocótilo mediante un corte limpio realizado con un bisturí a 2 mm por encima de la unión del sistema radicular con el hipocótilo. Los explantos de hipocótilo se transfieren seguidamente a nuevas placas de Petri. Cada placa contiene 10 explantos de la línea silvestre y 15 explantos de dos líneas diferentes, según la distribución que se muestra en la **Figura 9B**.

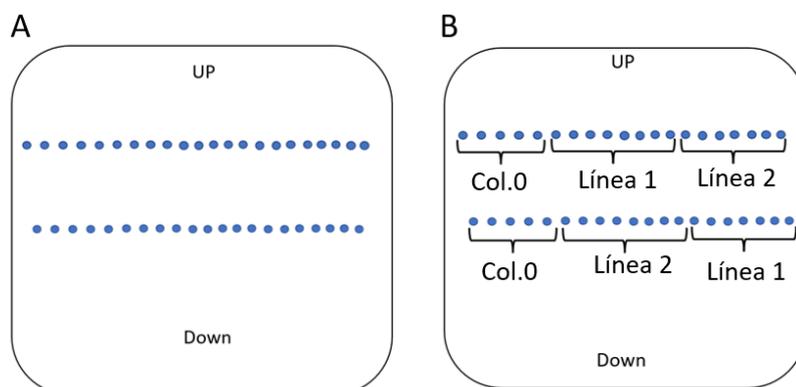


Figura 9.- Plantilla utilizada para la siembra de explantos de hipocótilo. (A) Se indica la disposición en la que se siembra cada línea. (B) Se representa el diseño tomado para el análisis de los explantos de hipocótilo.

Los explantos de hipocótilo se analizan a los 0, 3 y 7 días tras la excisión del sistema radicular (dte) para documentar la presencia de raíces adventicias, utilizando para ello una lupa modelo Motic SMZ-168 (Motic). Los explantos de hipocótilo a los 7 dte se fijaron en una disolución de hidrato de cloral (80 g hidrato de cloral y 30 mL de H₂O) tras la eliminación de los órganos aéreos con un bisturí.

3.5. Obtención de imágenes de las placas de Petri

El recuento de raíces adventicias en cada explanto se documentó mediante la obtención de imágenes de las placas de Petri a los 0, 3 y 7 dte con un escáner Epson Perfection V330 Photo a través del cual se tomaron imágenes a color (24 bits) con una resolución de 600 ppp y en formato de archivoJPG.

3.6. Análisis de la distribución de raíces adventicias en los explantos de hipocótilo

Para observar la distribución de las raíces adventicias en el hipocótilo, se escogieron algunas líneas que mostraron diferencias significativas en el número de raíces adventicias con respecto a la estirpe silvestre Col-0 (véase el apartado 4.3 de Resultados). Las muestras que habían sido previamente fijadas y decoloradas en el apartado 3.4. se colocaron en un portaobjetos sobre una fina capa de una solución preparada a partir de 80g de hidrato de cloral, 20 mL de glicerol y 10 mL de H₂O para dar estabilidad a la muestra y que no se deslice por el portaobjetos. Las muestras se observaron en un microscopio Motic SMZ-168 equipado con una cámara Canon EOS 1100D.

3.7. Confirmación de la inactivación de los genes a estudio en las líneas de ADN-T

Para determinar que los fenotipos observados en las líneas de ADN-T estudiadas son causados por la inactivación del gen a estudio, se han realizado experimentos para visualizar sus niveles de expresión como son la extracción de ARN, su retrotranscripción a ADN complementario (ADNc) y la amplificación del ADNc mediante PCR.

3.7.1. Extracción de ARN

Para la extracción del ARN se utilizarán plántulas de 12 días que han crecido en placas de Petri en las condiciones indicadas en el apartado 3.3.1. Las plántulas de cada línea se guardan en tubos Eppendorf debidamente rotulados a -80 °C en el arcón congelador. A continuación, las muestras se pasan a nitrógeno líquido y se disgregan con un mortero hasta quedar un polvo liofilizado que se volverá a introducir en los Eppendorf. Se transfieren 200 mg del liofilizado a nuevos tubos Eppendorf y se añade a cada tubo 1 mL de TRI Reagent (T9424, Sigma-Aldrich). Las muestras se homogeneizan, manteniéndolas en hielo y en la campana de extracción de gases, con un palillo estéril y se añaden 200 µL de cloroformo. Tras ello, se mezclan bien con el vórtex durante unos 20 s y se incuban a temperatura ambiente durante 5 min. Los tubos se centrifugan a 12000g durante 15 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada Digicen 21R (Ortoalresa). El sobrenadante se pasa a nuevos tubos Eppendorf con 500 µL de isopropanol y se mezclan bien con el vórtex. Se incuban estos durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugan después durante 20 min a la misma temperatura y velocidad que en el paso anterior. Tras la centrifugación se elimina el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el precipitado de ARN y se añaden 45 µL de agua libre de nucleasas, que se incuban durante 5 min a 40 °C en un termobloque para facilitar la solubilización del ARN. En ese momento, 40 µL de las muestras de ARN se congelarán en nitrógeno líquido y se guardarán a -80 °C en el arcón congelador. De los 5 µL restantes, 3 µL se cargarán en un gel de agarosa al 1% junto con 7 µL de tampón de carga 1× para comprobar la integridad del ARN y la ausencia de ADNg, mientras que los otros 2 µL se utilizarán para

la cuantificación de la concentración y calidad del ARN en el Nanodrop [NanoPhotometer Spectrophotometer IMPLN Pearl, Bio Nova Scientific].

3.7.2. Retrotranscripción y amplificación del ADNc

Previo a la retrotranscripción, a las muestras de ARN se les realiza un tratamiento para eliminar el ADNg utilizando DNasa I (EN0521, Thermofisher). Cada reacción incluye 1.5 μL del tampón de reacción con MgCl_2 , 1.5 μL de DNasa I, 2.0 μg de ARN y se completará con agua libre de nucleasas hasta 15 μL . Las reacciones se incuban en tubos de PCR de 0.2 mL en el termociclador a 37 °C durante 30 min y, a continuación, se añade 1 μL de EDTA 50 μM a cada tubo para parar la digestión del ADNg y se incuban las muestras a 65 °C durante 10 min para inactivar la DNasa I.

Con el producto de la digestión con DNasa I se realiza la retrotranscripción utilizando el *iScript cDNA Synthesis Kit* (1708891, Bio-Rad). Cada reacción incluye 4.0 μL de *iScript Reaction Mix*; 1.0 μL de *iScript Reverse Transcriptase*; 1.0 μg de ARN (7.5 μL de la reacción obtenida anteriormente, ya que el tubo completo contiene 2.0 μg de ARN en 15 μL) y se completa hasta 20 μL con agua libre de nucleasas (7.5 μL). Las reacciones se preparan en tubos de PCR de pared fina de 0.2 mL y se incuban en el termociclador con el siguiente programa: 5 min a 25 °C, 20 min a 46 °C, 1 min a 95 °C y *hold* a 16 °C. Al finalizar, el ADNc se guarda en el congelador a -20 °C hasta su amplificación por PCR.

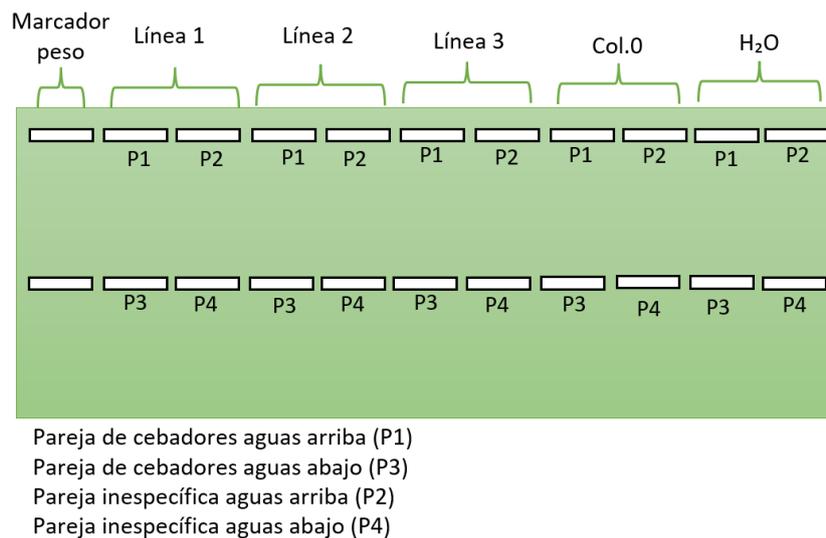


Figura 10.- Diseño gel de agarosa para la amplificación por PCR de ADNc.

Para detectar la amplificación del gen a estudio en el ADNc de una línea dada, se amplificará este (1) con una primera pareja de cebadores localizada aguas arriba de la posición del ADN-T de esa línea, y (2) con una segunda pareja de cebadores localizada aguas abajo de la posición del ADN-T de esa línea. Además, se utilizarán otras dos parejas de cebadores (3 y 4) en otro gen distinto al que está afectado en esa línea. La amplificación por PCR del ADNc se ha llevado a cabo según el procedimiento

indicado en el apartado 3.3.2. El diseño específico se muestra en la **Figura 10** y las parejas de cebadores utilizadas en cada caso se indican en la **Tabla 3**. Según este diseño, si se amplifica un fragmento de ADN con la pareja de cebadores específicos aguas arriba del inserto (1), pero no con la pareja de cebadores específicos aguas abajo del mismo (2), indicar que el transcrito incorpora parte de la secuencia del ADN-T y, en consecuencia, la proteína que se obtiene a partir de este gen en caso de que se traduzca estaría truncada en la región carboxilo respecto a la de la estirpe silvestre Col-0.

Tabla 3.- Cebadores usados para la amplificación por PCR del ADNc.

Línea	Cebadores	Secuencia	Tamaño del fragmento (pb)
SALK_142477 [18]	<i>qPCR-LDL1-upst-F</i>	CCGAAGACCTGGGAACTCAT	213
	<i>qPCR-LDL1-upst-R</i>	GAAGAGGCTGAAGCTCCGTT	
SALK_034869 [5.5.8]	<i>qPCR-LDL1-downst-F</i>	AGCTTGGTGAAATGGATGGAGA	204
	<i>qPCR-LDL1-downst-R</i>	ACAACGTAGACGCAGCTGAA	
GABI_092C03 [2.2B]	<i>LDL3-Salk-Sail-F</i>	TTCGAATTTGAGAGTTTTGATAGAC	118
	<i>qPCR-LDL3-upst-R</i>	AGATCCTCTCTTGGAAACCAGA	201
	<i>qPCR-LDL3-downst-F</i>	GGTGCTCCTGTCCTGATAGC	
	<i>qPCR-LDL3-downst-R</i>	AGCAACATACGAGTAGGCACC	

3.8. Pruebas estadísticas

Los análisis estadísticos han sido calculados mediante el programa Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies Inc., USA). Este programa se usa para establecer el grado de ajuste de los datos obtenidos a una distribución normal y para la representación de los histogramas. En primer lugar, se ha procedido con la detección y descarte de valores atípicos para ajustar nuestros datos a una distribución normal y poder realizar posteriormente los análisis de varianza (ANOVA), con el objetivo de identificar diferencias significativas en la formación de raíces adventicias para los distintos genotipos y tiempos. Para la evaluación de diferencias significativas en la respuesta al enraizamiento a 0 y 3 dae se emplearon tablas de contingencia con el análisis de Chi-Cuadrado. En ambos casos, con un valor crítico de 0,01.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación de mutantes insercionales de ADN-T

En este apartado se comprobará si las 15 líneas seleccionadas poseen el inserto de ADN-T en el gen correspondiente de manera homocigótica o heterocigótica. Solo las líneas que presenten el inserto en homocigosis se utilizarán para llevar a cabo estudios fenotípicos.

4.1.1. Gen *LDL1*

Hemos estudiado tres líneas insercionales que afectan al gen *LDL1* (AT1G62830): SALK_142477 [18], SALK_034869 [5.5.8] y GABI_438B06 [7.3.15] (Tabla 1). Estas tres líneas presentan el inserto de ADN-T en la región codificante de su único exón (**Figura 11A**). Para SALK_142477 [18] se ha utilizado una pareja específica de cebadores, *LDL1-intern-2F* y *gLDL1-R*, que flanquea a la inserción del ADN-T (**Figura 11A**). La segunda pareja de cebadores incluye a *gLDL1-R* y al cebador específico de la inserción de ADN-T (*LBb1.3* para las líneas de la colección del SALK). No se obtuvo amplificación por PCR con el ADN genómico de ninguno de los cinco individuos ensayados de esta línea con la pareja de cebadores específica del gen, pero sí con la pareja formada por *gLDL1-R* y *LBb1.3* (**Figura 11B**). La pareja específica de cebadores de *LDL1* para la línea SALK_034869 [5.5.8] es *gLDL1-F* y *LDL1-R_2* y la pareja de cebadores para amplificar el inserto es *gLDL1-F* y *LBb1.3* (**Figura 11C**). Al igual que en el caso anterior, en los cinco individuos de esta línea únicamente se amplificaron los fragmentos correspondientes a la pareja de cebadores del inserto y no a los cebadores específicos del gen. Para la tercera línea analizada, GABI_438B06 [7.3.15], solo se observó amplificación de un fragmento del tamaño esperado en el silvestre Col-0 con la pareja de cebadores *LDL1-intern-F* y *LDL1-intern-R*, mientras que la pareja de cebadores *LDL1-intern-R* y *08474* (cebador específico de la inserción de ADN-T en las líneas de la colección del GABI) rindió un fragmento de amplificación del tamaño esperado en todos los individuos de esta línea, pero no en Col-0 (**Figura 11D**). Estos resultados indican claramente que las tres líneas insercionales del gen *LDL1* seleccionadas son homocigotas para la inserción del ADN-T en las posiciones indicadas.

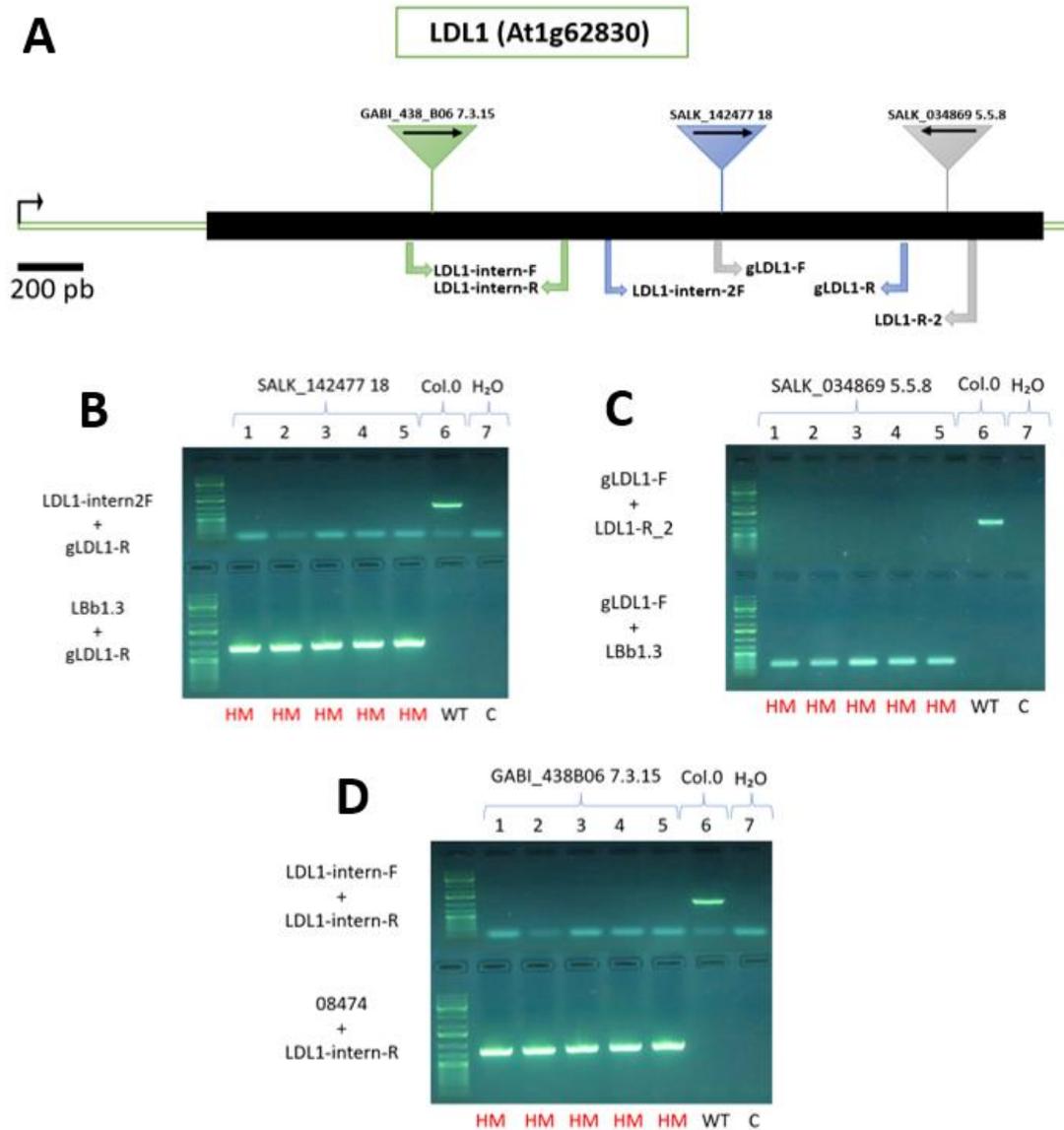


Figura 11.- Análisis de mutantes insercionales de ADN-T para el gen *LDL1* de *Arabidopsis*. (A) Esquema del gen *LDL1* donde se indica la localización de las inserciones de ADN-T (con una flecha se indica la dirección en la que se han insertado). En la parte inferior se indican los cebadores que se han utilizado para amplificar las líneas estudiadas y su dirección. En diferentes colores se encuentran las inserciones de ADN-T junto con los cebadores utilizados en cada caso. (B-D) Identificación mediante PCR de los individuos homocigotos para las inserciones de ADN-T estudiadas. En el lado izquierdo de la imagen encontramos las parejas de cebadores que se han utilizado en la amplificación. Las columnas marcadas con 1-5 contienen ADNg extraído de plántulas individuales. La columna 6 contiene el ADNg de un individuo silvestre Col-0 utilizado como control positivo de la amplificación. La columna 7 contiene el control negativo de la amplificación.; HM: Homocigoto para la inserción (ADN-T); WT: control silvestre; C: Control negativo.

4.1.2. Gen *LDL2*

El gen *LDL2* (AT3G13682) contiene dos intrones y las tres líneas que se han estudiado, SALK_135831 #1A, SALK_138820 #1A y SAIL_355_F07 [5.2] (**Tabla 1**), presentan la inserción del ADN-T en el segundo exón (Figura 11A). Se ha utilizado la pareja *LDL2-LP* y *LDL2-RP* para amplificar el alelo silvestre del gen *LDL2* en el silvestre Col-0, pero no se ha observado amplificación en ninguno de los individuos ensayados de las líneas SALK_135831 #1A, SALK_138820 #1A y SAIL_355_F07 [5.2] (**Figura 12B-D**). Por el contrario, sí que se amplificó un fragmento del tamaño esperado en estas líneas utilizando la pareja de cebadores para amplificar la inserción, *LDL2-RP* y *LBb1.3* (**Figura 12B-C**). Estos resultados confirman que las dos líneas del SALK presentan el inserto en homocigosis. Para el análisis de la línea SAIL_355_F07 [5.2] se utilizó la combinación de *LDL2-LP* y *LB3* (cebador específico de la inserción de ADN-T en las líneas de la colección del SAIL) para confirmar la inserción del ADN-T (Figura 11D). En esta última línea se observó también la amplificación de la inserción del ADN-T con la pareja *LDL2-RP* y *LB3*, que sugiere una duplicación invertida del inserto en la posición anotada para esta línea (**Figura 12D**).

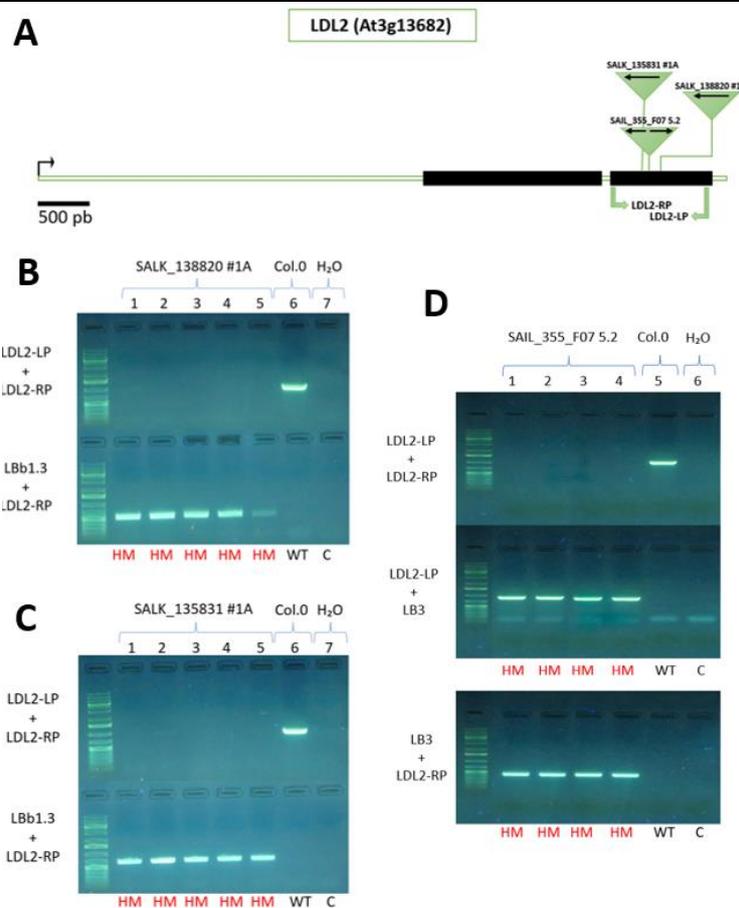


Figura 12.- Análisis de mutantes insercionales de ADN-T para el gen *LDL2* de *Arabidopsis*. (A) Esquema del gen *LDL2* donde se indica la localización de las inserciones de ADN-T. (B-D) Identificación mediante PCR de los individuos homocigotos para las inserciones de ADN-T estudiadas. Véase el pie de la Figura 10 para más detalles.

4.1.3. Gen *LDL3*

El gen *LDL3* (AT4G16310) contiene nueve exones. Dos de las líneas estudiadas SAIL_640_B10 #C y SALK_146733C B, presentan las inserciones del ADN-T en el segundo exón, mientras que la tercera línea, GABI_092C03 [2.2B] presenta la inserción en el cuarto exón (**Figura 13A**). En las líneas SALK_146733C B y SAIL_640_B10 #C se ha utilizado la pareja de cebadores específicos del gen *LDL3-Salk-Sail-F* y *LDL3-Salk-Sail-R*, no encontrándose amplificación en ninguno de los individuos ensayados salvo en Col-0 (**Figura 13B-C**). Para amplificar la inserción del ADN-T se ha utilizado la combinación de cebadores *LDL3-Salk-Sail-R* y *LB3* para SAIL_640_B10 #C o *LDL3-Salk-Sail-F* y *LBb1.3* para SALK_146733C B (**Figura 13B-C**). En todos los individuos estudiados de estas líneas se observaron fragmentos de los tamaños esperados, confirmándose la homocigosis para las inserciones del ADN-T. En cuanto a la línea GABI_092C03 [2.2B], la pareja *GK-LDL3-F* y *GK-LDL3-R* solo rindió un producto de amplificación con el ADNg de la estirpe silvestre mientras que sí que se amplificó un fragmento del tamaño esperado a partir del ADNg de esta línea con la pareja *GK-LDL3-R* y *08474* (**Figura 13D**), confirmando la presencia del inserto en homocigosis en la posición anotada.

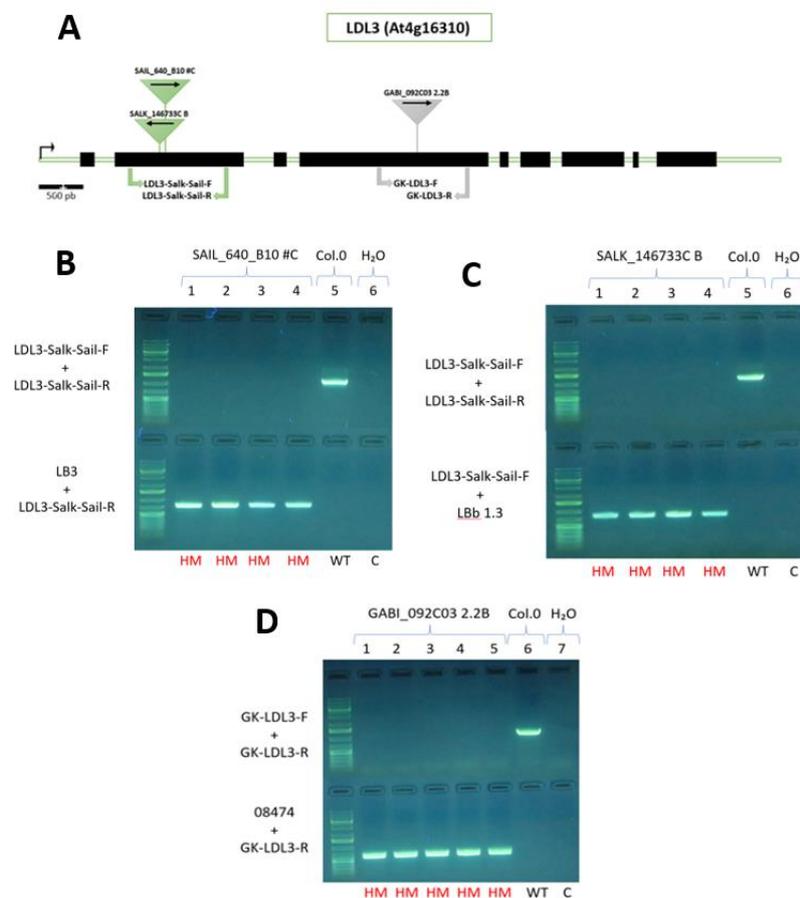


Figura 13.- Análisis de mutantes insercionales de ADN-T para el gen *LDL3* de *Arabidopsis*. (A) Esquema del gen *LDL3* donde se indica la localización de las inserciones de ADN-T. (B-D) Identificación mediante PCR de los individuos homocigotos para las inserciones de ADN-T estudiadas. Véase el pie de la Figura 10 para más detalles.

4.1.4. Gen *RABA1c*

Para el gen *RABA1c* (AT5G45750) estudiaremos tres líneas diferentes: SALK_032904 [11], con el inserto de ADN-T en el primer exón, y SALK_145363 [10] y SALK_128435 [2.1] y [2.2] cuyos insertos se localizan en el segundo exón (Figura 13A). Para confirmar la homocigosis de la línea SALK_032904 [11] utilizamos las parejas de cebadores (1) *FWSalk_032904C_2* y *RVSalk_032904C* y (2) *RVSalk_032904C* y *LBb1.3* (Figura 14B). De manera similar se ha determinado que las líneas SALK_145363 [10] y SALK_128435 [2.1] y [2.2] son homocigotas para las inserciones de ADN-T anotadas (Figura 14C-E).

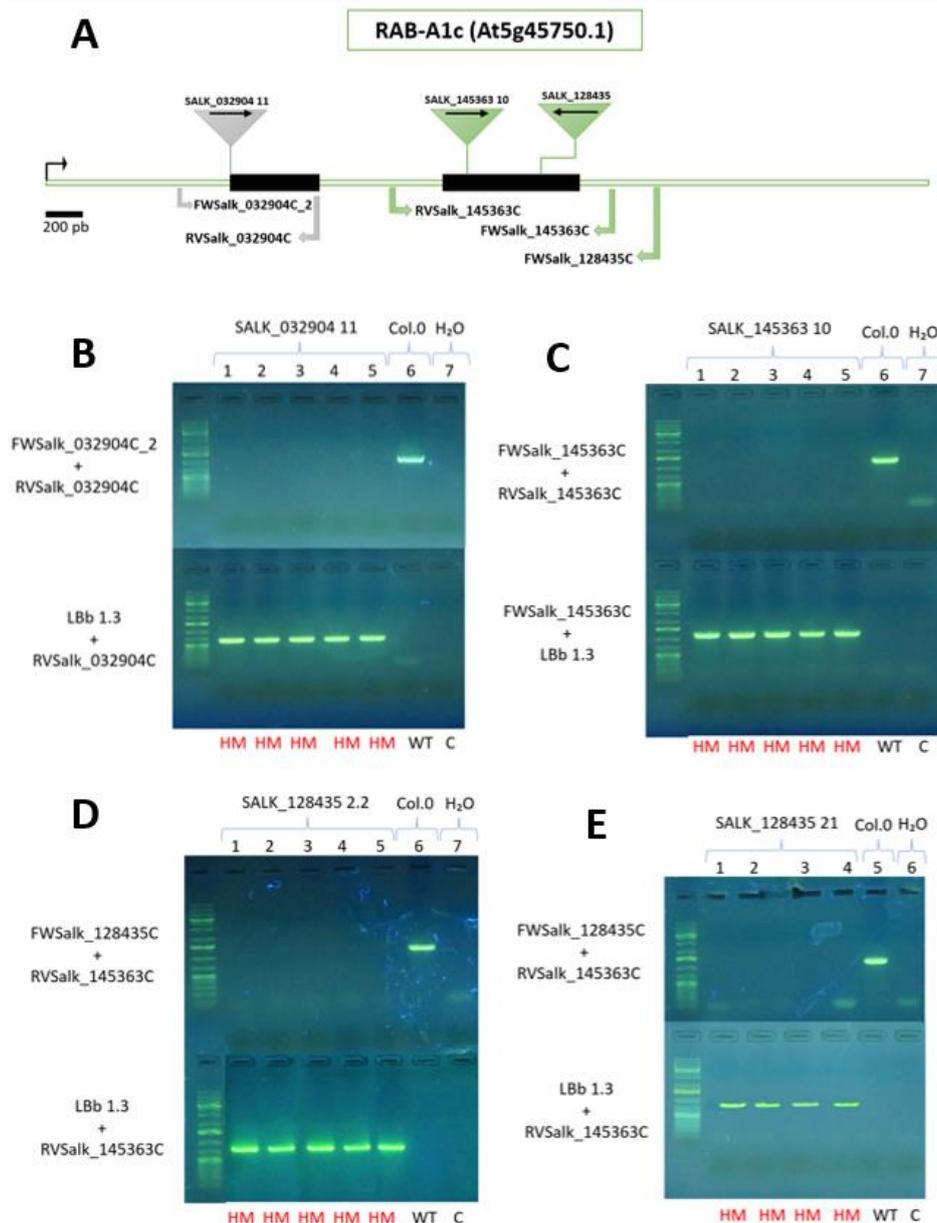


Figura 14.- Análisis de mutantes insercionales de ADN-T para el gen *RABA1c* de Arabidopsis. (A) Esquema del gen *RABA1c* donde se indica la localización de las inserciones de ADN-T. (B-D) Identificación mediante PCR de los individuos homocigotos para las inserciones de ADN-T estudiadas. Véase el pie de la Figura 10 para más detalles.

4.1.5. Gen *ABF3*

De las dos inserciones estudiadas para el gen *ABF3* (AT4G34000), el ADN-T de SALK_138872 [24] se encuentra en el segundo intrón y el de SALK_131169 [B] en el segundo exón (**Figura 15A**). Se ha confirmado la presencia de la inserción de ADN-T de forma homocigótica en todos los individuos de ambas líneas estudiadas para lo cual se han ensayado dos parejas de cebadores distintas (**Figura 15B-C**).

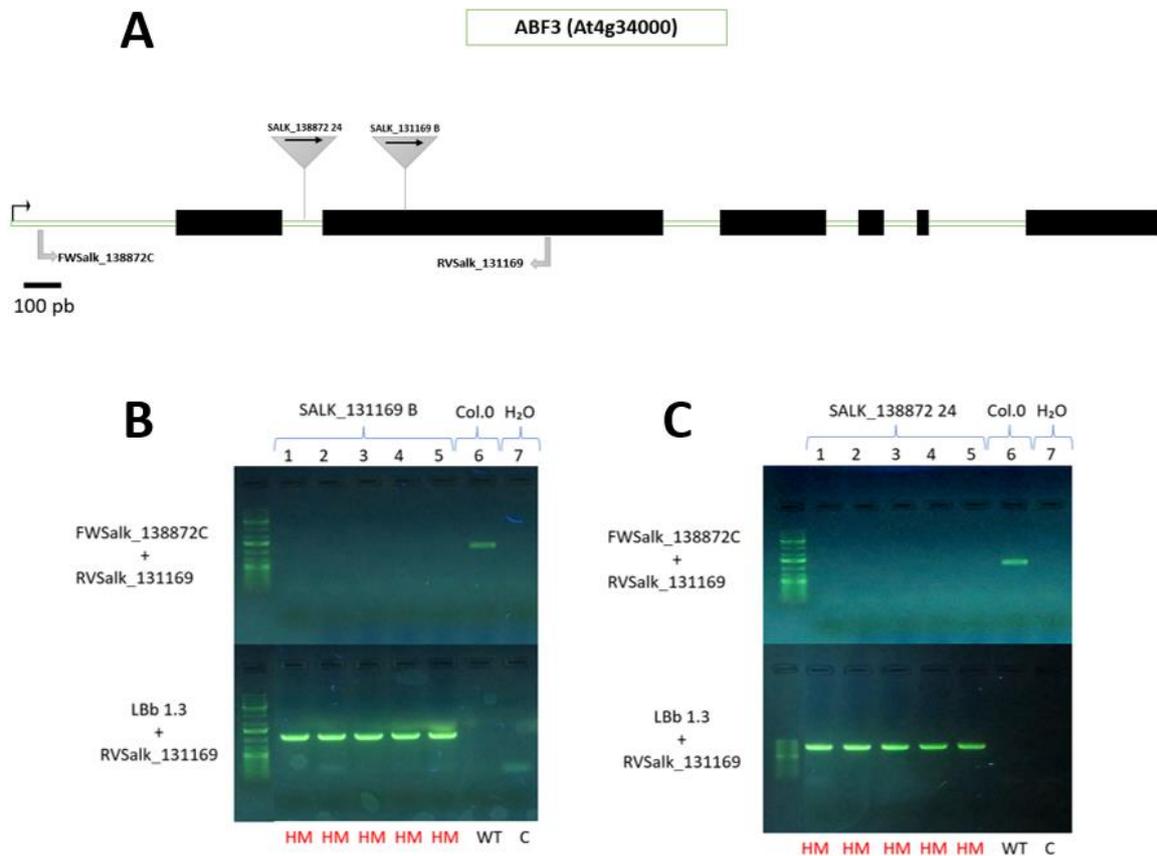


Figura 15.- Análisis de mutantes insercionales de ADN-T para el gen *ABF3* de *Arabidopsis*. (A) Esquema del gen *ABF3* donde se indica la localización de las inserciones de ADN-T. (B-D) Identificación mediante PCR de los individuos homocigotos para las inserciones de ADN-T estudiadas. Véase el pie de la Figura 10 para más detalles.

4.2. Estudio del enraizamiento adventicio en explantos de hipocótilo

Tras confirmar que todas las líneas seleccionadas eran homocigóticas para las inserciones de ADN-T anotadas, se ha estudiado la formación de raíces adventicias en el hipocótilo tras la escisión del sistema radicular tal como se indica en el apartado 3.4.

4.2.1. Gen *LDL1*

En el diseño experimental utilizado, los hipocótilos etiolados se transfieren a condiciones de fotoperiodo 16/8 durante 7 días antes de la escisión completa del sistema radicular. Un 37% de las plántulas de la estirpe silvestre Col-0 presentaron en el momento de la escisión (0 dae, *days after excision*), una o dos raíces adventicias (**Figura 16A-B**). En las líneas mutantes de *LDL1*, entre el 65 y el 80% de las plántulas presentaron de una a tres raíces adventicias a 0 dae (**Figura 16A-B**). A 3 dae se observó que el porcentaje de plántulas que presentaron alguna raíz adventicia fue significativamente mayor en las líneas de ADN-T de *LDL1* que en el silvestre (**Figura 16A**), y que las líneas mutantes presentaron un número significativamente mayor de raíces adventicias que el silvestre (**Figura 16B**). La línea SALK_034869 [5.5.8] presentó las mayores diferencias respecto al silvestre en el número de raíces adventicias a 3 dae, con un 25% de los explantos con cinco o más raíces adventicias (**Figura 16C**). Las mayores diferencias de las líneas mutantes de *LDL1* con respecto al genotipo silvestre se observaron en el recuento a 7 dae (**Figura 16D**). Mientras que en Col-0 un 30% presentó más de 10 raíces por explanto, en las líneas SALK_142477 [18] y GABI_438B06 [7.3.15] el 60% de los explantos presentaron más de 10 raíces adventicias, con algún individuo con hasta 18 raíces adventicias (Figura 15D-E). Estos resultados indican que las tres líneas insercionales estudiadas de *LDL1* presentaron un incremento en la formación de raíces adventicias en explantos de hipocótilo respecto a la estirpe silvestre Col-0, lo que sugiere que el gen *LDL1* actuaría como un regulador negativo de la formación de raíces adventicias en el hipocótilo en respuesta a herida.

4.2.2. Gen *LDL2*

En los mutantes insercionales de *LDL2*, el porcentaje de hipocótilos que presentaron alguna raíz adventicia a 0 dae fue ligeramente superior al del silvestre, aunque solo fue significativo en la línea SAIL_355F07 [5.2] (**Figura 17A-B**). A 3 dae, sin embargo, el porcentaje de respuesta de formación de raíces adventicias en las líneas de *LDL2* fue similar a la de la estirpe silvestre (**Figura 17A**), lo que contrasta con los resultados obtenidos con *LDL1*. A 3 dae no se observaron diferencias significativas entre las líneas insercionales de ADN-T y la estirpe silvestre, aunque la línea SALK_135831 #1A presentó algunos individuos con más de seis raíces adventicias en el hipocótilo (**Figura 17C**). A 7 dae se observó una mayor variación en el número de raíces adventicias entre las distintas líneas, con los valores extremos de SALK_138820 #1A y SAIL_355F07 [5.2] (**Figura 17D**). La estirpe silvestre mostró un comportamiento intermedio, lo que sugiere que la alteración de *LDL2* causada por las inserciones de ADN-T en este gen, a diferencia de lo observado para *LDL1*, no modifica la formación de raíces adventicias en el hipocótilo en respuesta a herida.

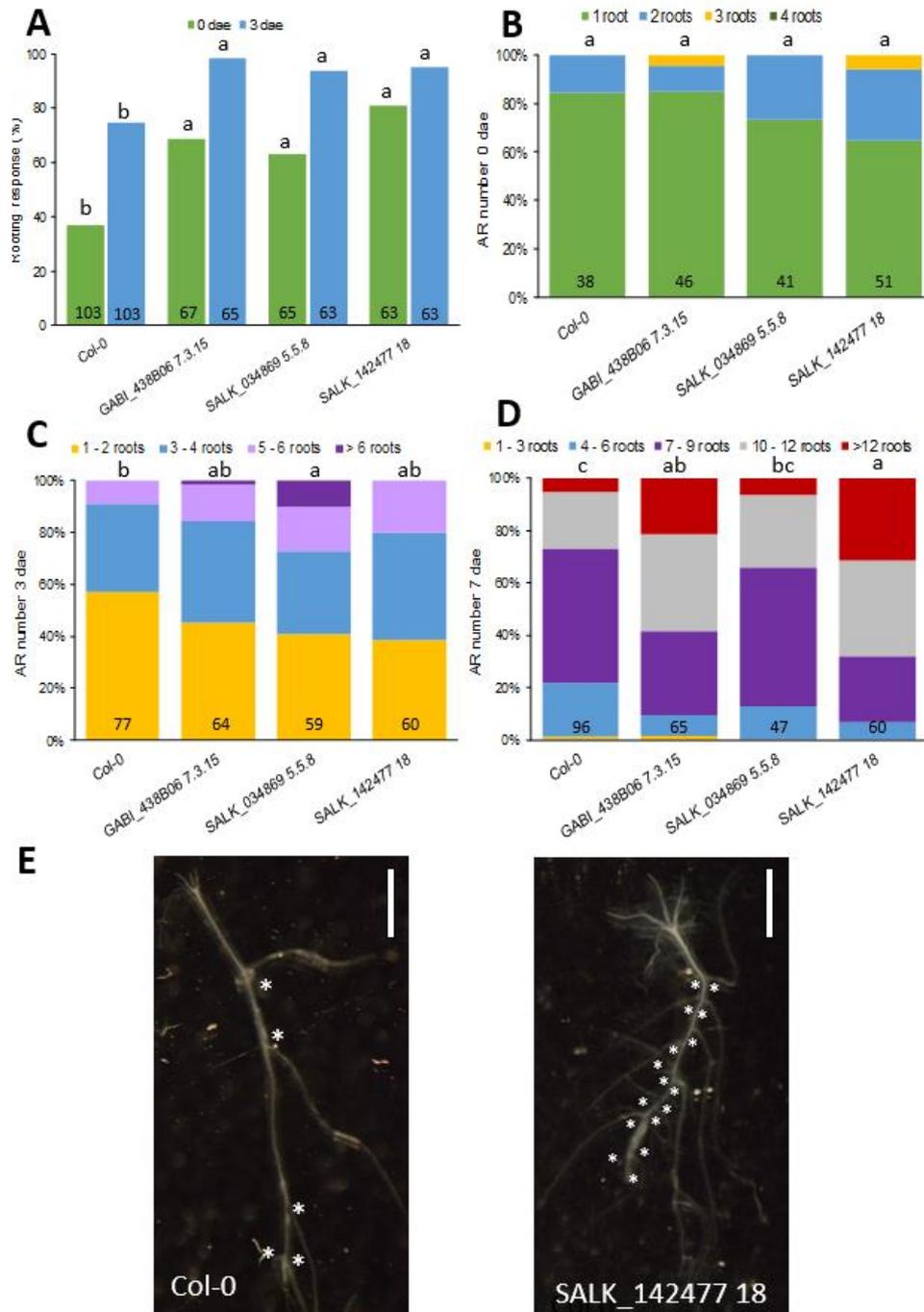


Figura 16.- Formación de raíces adventicias en explantos de hipocótilo en los mutantes *LDL1*. (A) Respuesta de enraizamiento a 0 y 3 dae. (B) Proporción de hipocótilos con una a cuatro raíces adventicias a 0 dae. (C) Proporción de hipocótilos con una a 8 raíces adventicias a 3 dae. (D) Proporción de hipocótilos con una a 18 raíces adventicias a 7 dae. (E) Detalle del hipocótilo a 7 dae en la estirpe silvestre Col-0 y la línea mutante indicada. La barra de escala indica 2 mm. Las letras minúsculas en A-D indican las diferencias estadísticamente significativas (valor de $p < 0.01$; A: Chi-cuadrado; B-D: ANOVA) entre los distintos genotipos para el tiempo indicado.

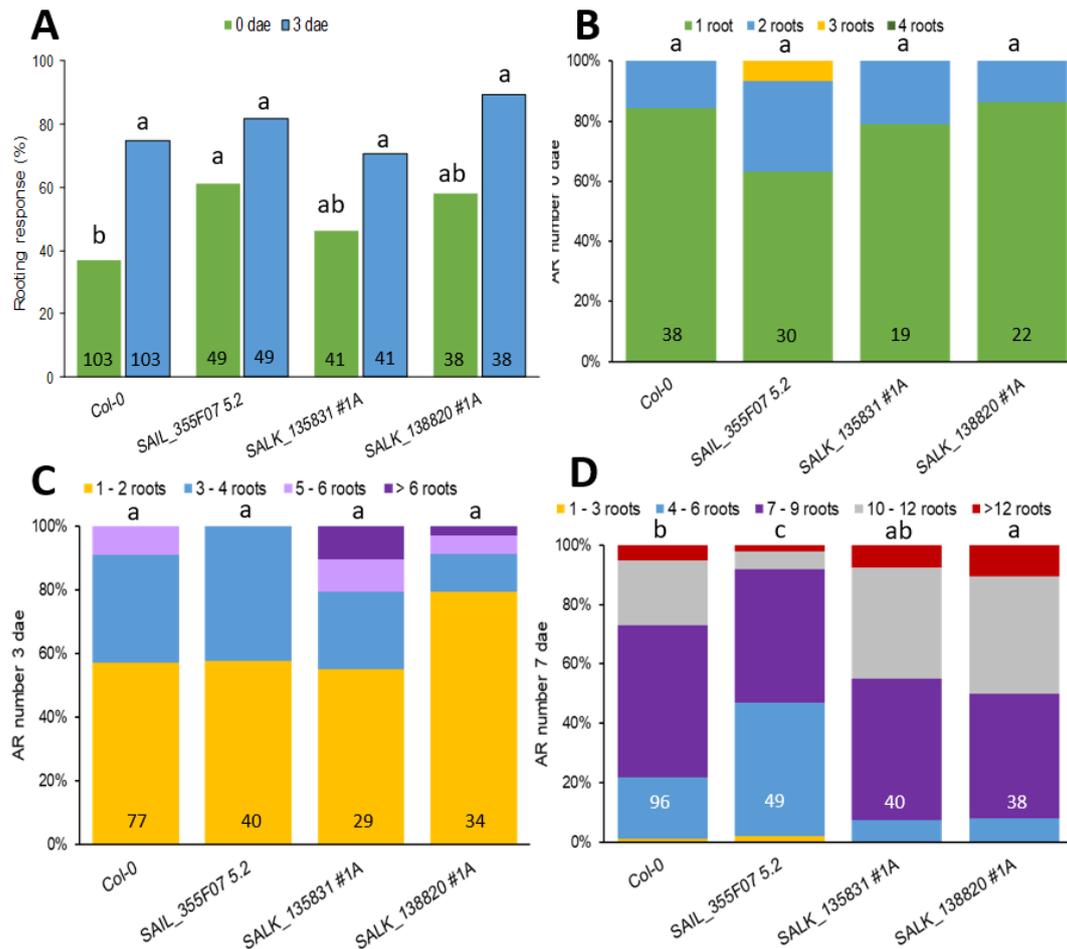


Figura 17.- Formación de raíces adventicias en explantos de hipocótilo en los mutantes *LDL2*. (A) Respuesta de enraizamiento a 0 y 3 dae. (B) Proporción de hipocótilos con una a cuatro raíces adventicias a 0 dae. (C) Proporción de hipocótilos con una a 10 raíces adventicias a 3 dae. (D) Proporción de hipocótilos con una a 15 raíces adventicias a 7 dae. Las letras minúsculas indican las diferencias estadísticamente significativas (valor de $p < 0.01$; A: Chi-cuadrado; B-D: ANOVA) entre los distintos genotipos para el tiempo indicado.

4.2.3. Gen *LDL3*

A 0 dae, más del 70% de los hipocótilos de las tres líneas insercionales de *LDL3* presentaron alguna raíz adventicia, en comparación con el 37% observado en la estirpe silvestre (**Figura 18A**). En la línea SAIL_640B10 #C, más del 40% de los explantos presentaron tres o cuatro raíces, mientras que ninguno de los hipocótilos de Col-0 mostró más de dos raíces adventicias a 0 dae (**Figura 18B**). De manera similar a lo ocurrido con *LDL1*, más del 90% de los explantos de las líneas de *LDL3* presentaron alguna raíz a los 3 dae, mientras que en el silvestre este valor se quedó en el 75% (**Figura 18A**). Las tres líneas insercionales de *LDL3* presentaron un mayor número de raíces adventicias a 3 dae que la estirpe silvestre (**Figura 18C**), y estas diferencias se incrementaron más para las líneas GABI_092C03 [2.2B] y SALK_146733C [B] a 7 dae (**Figura 18D**). Cabe destacar que en la línea GABI_092C03 [2.2B], un 60% de los hipocótilos produjeron más de 12 raíces, con algún individuo con hasta 18 raíces (**Figura 18E**). Estos

resultados sugieren que el gen *LDL3* también actuaría como un regulador negativo de la formación de raíces adventicias en el hipocótilo en respuesta a herida.

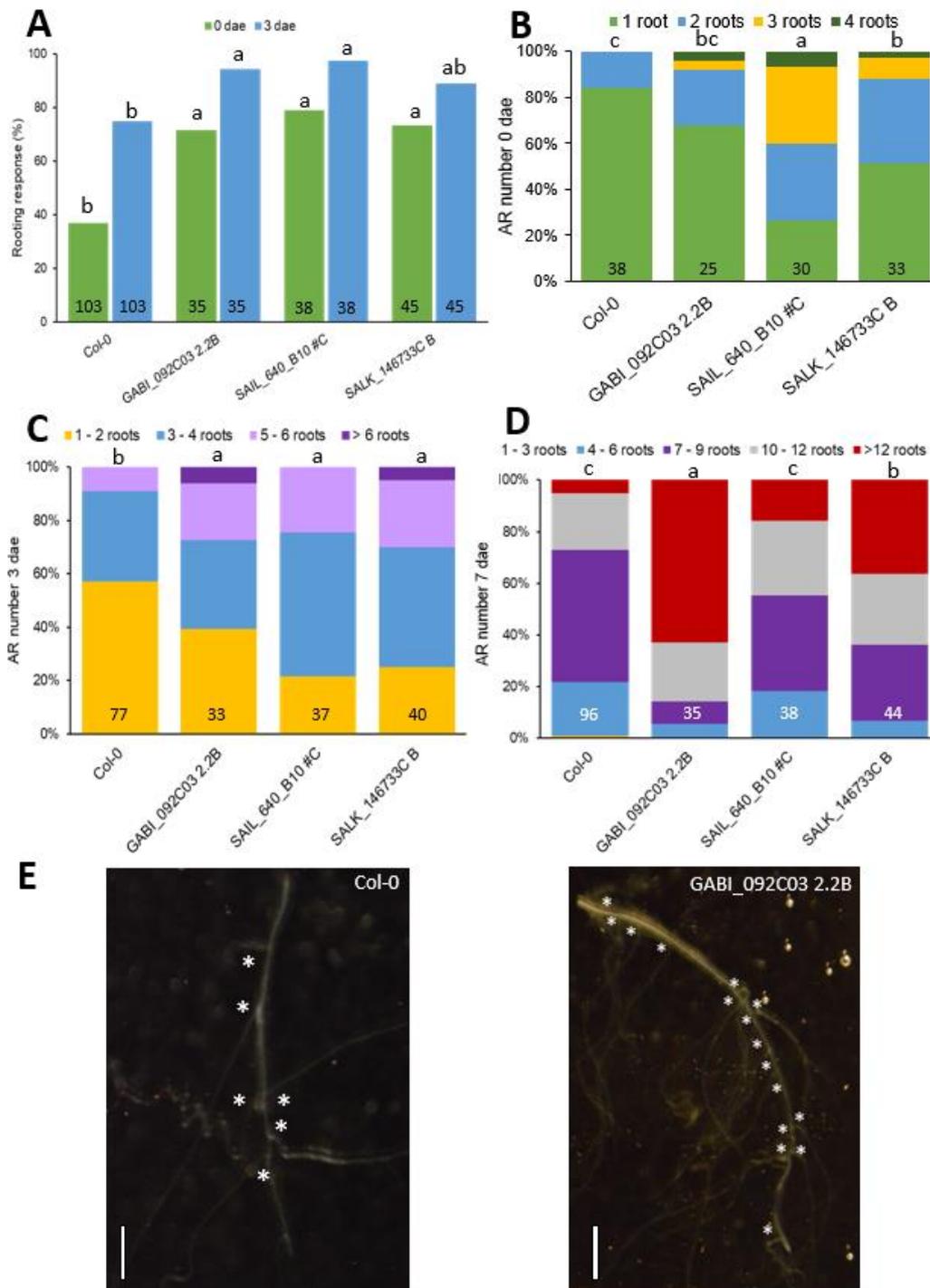


Figura 18.- Formación de raíces adventicias en explantos de hipocótilo en los mutantes *LDL3*. (A) Respuesta de enraizamiento a 0 y 3 dae. (B) Proporción de hipocótilos con una a cuatro raíces adventicias a 0 dae. (C) Proporción de hipocótilos con una a 7 raíces adventicias a 3 dae. (D) Proporción de hipocótilos con una a 19 raíces adventicias a 7 dae. (E) Detalle del hipocótilo a 7 dae en la estirpe silvestre Col-0 y la línea mutante indicada. La barra de escala indica 2 mm. Las letras minúsculas en A-D indican las diferencias estadísticamente significativas (valor de $p < 0.01$; A: Chi-cuadrado; B-D: ANOVA) entre los distintos genotipos para el tiempo indicado.

4.2.4. Gen *RABA1c*

Las tres líneas insercionales en el gen *RABA1c* analizadas presentaron un mayor porcentaje de respuesta a 0 dae, en torno al 65%, respecto a la de su ancestro silvestre Col-0, un 35% (**Figura 19A**). También se observó un incremento significativo en el porcentaje de explantos con dos o más raíces a 0 dae en las líneas insercionales de este gen (**Figura 19B**). Estas diferencias con respecto a la estirpe silvestre se mantuvieron a 3 y 7 dae, aunque de manera variable en función de la línea estudiada (**Figura 19C-D**). La línea que presentó el fenotipo más extremo en comparación con la estirpe silvestre fue SALK_032904 [1.1], con el 50% de los hipocótilos con 10 o más raíces a 7 dae (**Figura 19E**). De esta manera, el gen *RABA1c* actuaría como un regulador negativo de la formación de raíces adventicias en el hipocótilo en respuesta a herida.

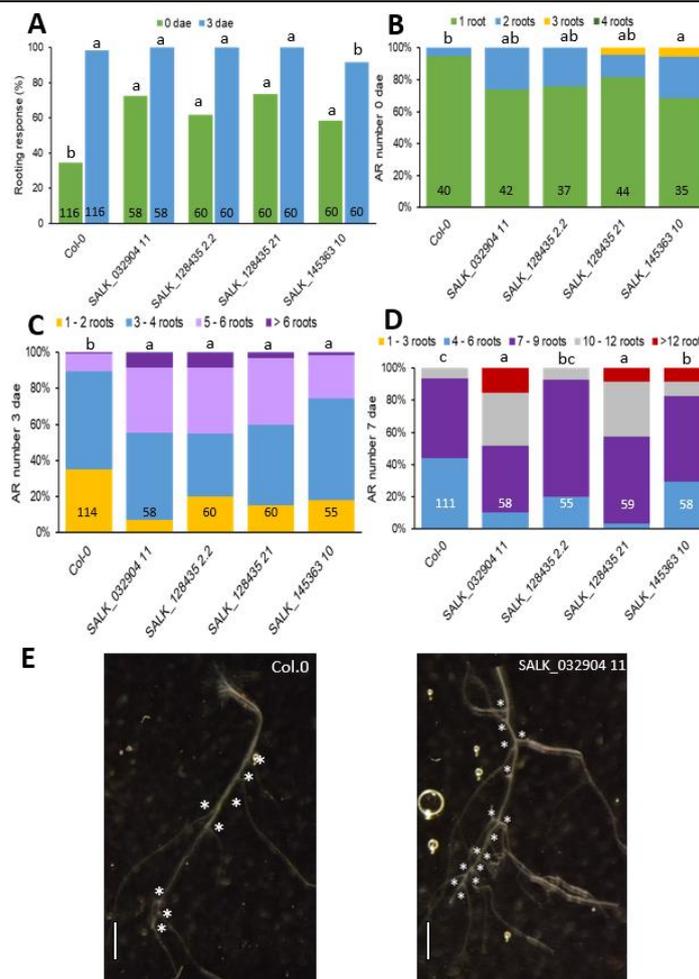


Figura 19.- Formación de raíces adventicias en explantos de hipocótilo en los mutantes *RABA1c*. (A) Respuesta de enraizamiento a 0 y 3 dae. (B) Proporción de hipocótilos con una a cuatro raíces adventicias a 0 dae. (C) Proporción de hipocótilos con una a 8 raíces adventicias a 3 dae. (D) Proporción de hipocótilos con una a 16 raíces adventicias a 7 dae. (E) Detalle del hipocótilo a 7 dae en la estirpe silvestre Col-0 y la línea mutante indicada. La barra de escala indica 2 mm. Las letras minúsculas en A-D indican las diferencias estadísticamente significativas (valor de $p < 0.01$; A: Chi-cuadrado; B-D: ANOVA) entre los distintos genotipos para el tiempo indicado.

4.2.5. Gen *ABF3*

Las dos líneas insercionales en el gen *ABF3* analizadas presentaron un mayor porcentaje de respuesta a 0 dae, pero no a 3 dae, que la de su ancestro silvestre Col-0 (**Figura 20A**). También se observó un incremento significativo en el porcentaje de explantos con dos o más raíces a 0 dae en las dos líneas insercionales de este gen (**Figura 20B**). A 3 y 7 dae, solo la línea SALK_131169 [B] mostró diferencias estadísticamente significativas en el número de raíces adventicias en el hipocótilo con respecto al silvestre (**Figura 20C-D**). A 7 dae, el 80% de los explantos de esta línea presentaron siete o más raíces, con algún individuo con hasta XX raíces (**Figura 20E**). Las evidencias de las que se dispone hasta el momento no nos permiten concluir acerca de la implicación del gen *ABF3* en la formación de raíces adventicias en el hipocótilo en respuesta a herida.

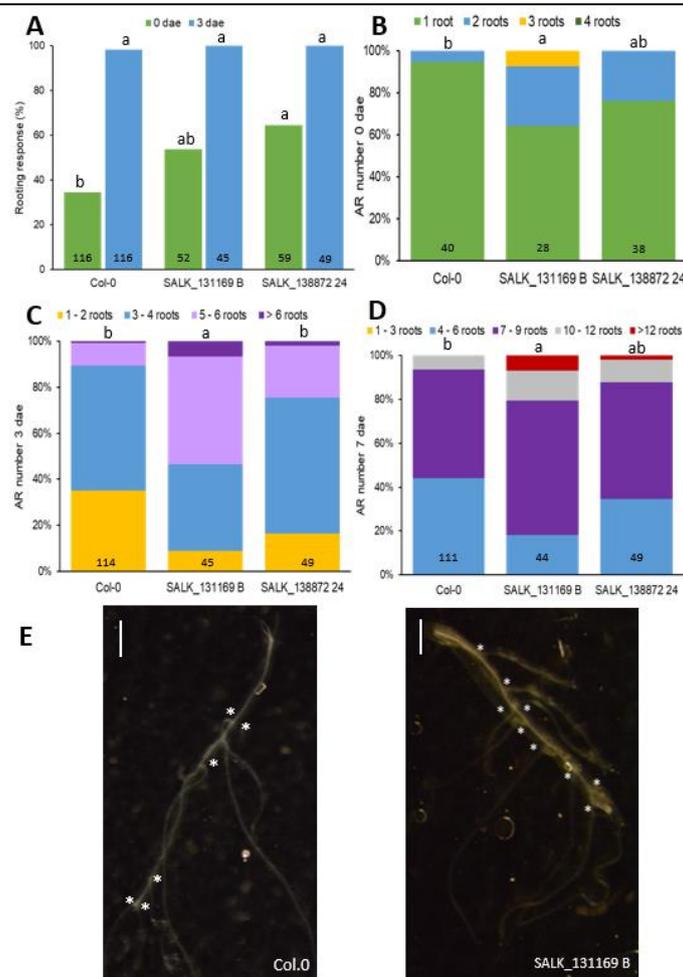


Figura 20.- Formación de raíces adventicias en explantos de hipocótilo en los mutantes *ABF3*. (A) Respuesta de enraizamiento a 0 y 3 dae. (B) Proporción de hipocótilos con una a cuatro raíces adventicias a 0 dae. (C) Proporción de hipocótilos con una a 7 raíces adventicias a 3 dae. (D) Proporción de hipocótilos con una a 15 raíces adventicias a 7 dae. (E) Detalle del hipocótilo a 7 dae en la estirpe silvestre Col-0 y la línea mutante indicada. La barra de escala indica 2 mm. Las letras minúsculas en A-D indican las diferencias estadísticamente significativas (valor de $p < 0.01$; A: Chi-cuadrado; B-D: ANOVA) entre los distintos genotipos para el tiempo indicado.

4.3. Confirmación de la pérdida de función en el gen anotado causada por la inserción de ADN-T

Para confirmar que las inserciones de ADN-T interrumpen la expresión de los genes que las contienen, hemos llevado a cabo un experimento de retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR), tal como se indica en el apartado 3.7.2. En la Tabla 4 se muestran los parámetros de las dos extracciones de ARN realizadas para nueve de las 15 líneas estudiadas y la estirpe silvestre Col-0. Para confirmar la pureza y la integridad del ARN se cargaron las muestras en un gel de agarosa según se describe en el apartado 3.7.1. Las imágenes obtenidas (**Figura 21**) indican que el ARN obtenido no está degradado y, aparentemente, no presenta contaminación con ADNg.

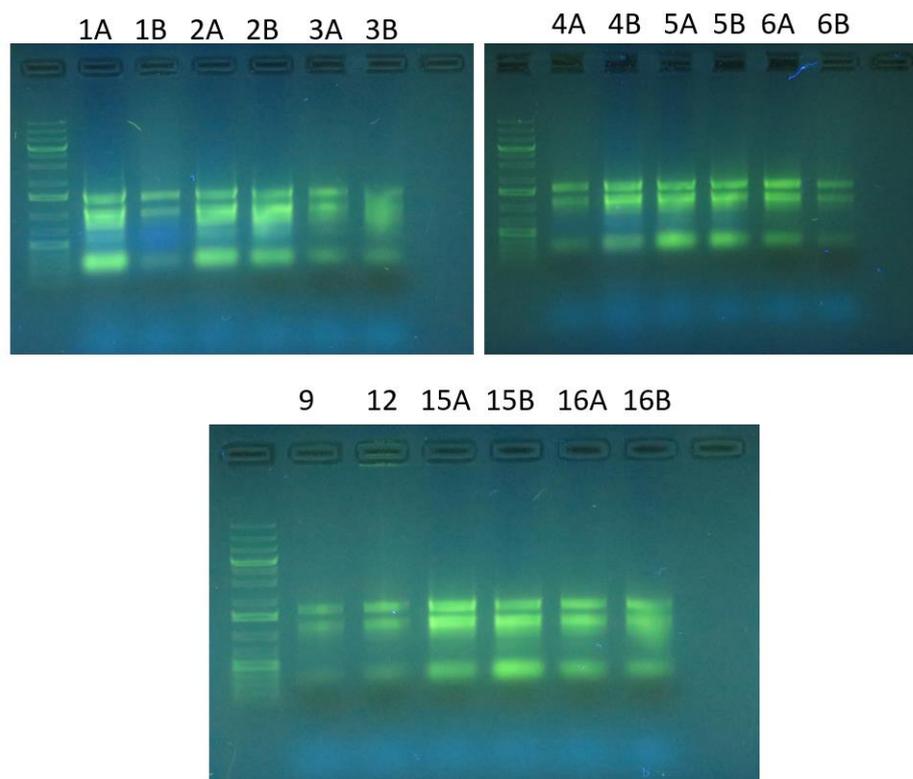


Figura 21.- Visualización en gel de agarosa de la extracción de ARN. Los números encima de cada uno de los pocillos indican la muestra, tal como se recoge en la Tabla 4.

A continuación, se seleccionaron las líneas SALK_142477 [18] y SALK_034869 [5.5.8] de *LDL1*, GABI_092C03 [2.2B] de *LDL3*, y la estirpe Col-0. Para eliminar la eventual contaminación con ADNg, se trataron las muestras con DNasa I de manera previa a la síntesis de ADNc, según se explica en el apartado 3.7.2. En la **Figura 22A-B** se indica la posición de los cebadores que se han utilizado para la amplificación de fragmentos del ADNc localizados aguas arriba (P1 y P2) y aguas abajo (P3 y P4) de las inserciones de ADN-T en los genes *LDL1* (P1, P3) y *LDL3* (P2, P4). El ADNc obtenido de la línea GABI_092C03 [2.2B] se ha amplificado con las parejas de cebadores P1 a P4 obteniéndose productos

de amplificación del tamaño esperado con P1 y P3 (*LDL1*), y con P2 (*LDL3*) pero no con P4 (**Figura 22C**). Estos resultados indican que la inserción de ADN-T de esta línea interrumpe el gen *LDL3*, pero no el *LDL1*, lo que afecta a la integridad del ARNm del gen *LDL3*, perdiéndose presumiblemente el dominio carboxilo de la proteína. Para las dos líneas estudiadas del gen *LDL1* (SALK_142477 [18] y SALK_034869 [5.5.8]) se obtuvieron productos de amplificación de los tamaños esperados con las parejas de cebadores P2 y P4 (*LDL3*), y P1 (*LDL1*) pero no P3 y P2 (**Figura 22C**). Esto indica que, al igual que en el caso anterior, el transcrito incorpora la secuencia de ADN-T lo cual genera que la proteína LDL1 que se obtiene a partir de estas dos líneas esté truncada en la región carboxilo, lo cual produciría, presumiblemente, su pérdida de función.

Tabla 4.- Resultados de las extracciones de ARN.

Muestra	Línea	mg tejido	A230	A260	A280	A320	260/280	260/230	µg ARN/µL	µg ARN/mg tejido
1A	GABI_092C03 [2.2B]	96	0,86	1,92	0,96	0,01	2,01	2,26	3,81	1,79
1B	GABI_092C03 [2.2B]	95	0,18	0,16	0,09	0,01	1,71	0,86	0,30	0,14
2A	SALK_142477 [18]	89	0,48	1,00	0,50	0,01	2,00	2,12	1,98	1,00
2B	SALK_142477 [18]	99	0,41	0,87	0,43	0,00	2,03	2,10	1,74	0,79
3A	SALK_034869 [5.5.8]	80	0,11	0,17	0,09	0,00	1,84	1,60	0,32	0,18
3C	SALK_034869 [5.5.8]	67	0,19	0,32	0,17	0,00	1,90	1,71	0,64	0,43
4A	GABI_438B06 [7.3.15]	74	0,13	0,13	0,07	0,00	1,71	0,97	0,26	0,16
4B	GABI_438B06 [7.3.15]	72	0,55	0,60	0,35	0,06	1,84	1,10	1,07	0,67
5A	SALK_146733C [B]	111	0,75	1,24	0,64	0,01	1,94	1,67	2,46	1,00
5B	SALK_146733C [B]	99	0,46	0,76	0,39	0,00	1,95	1,67	1,52	0,69
6A	SAIL_640_B10 [#C]	65	0,18	0,24	0,13	0,00	1,76	1,32	0,48	0,33
6B	SAIL_640_B10 [#C]	45	0,08	0,07	0,04	0,00	1,71	0,90	0,15	0,15
9	SAIL_355F07 [5.2]	17	0,07	0,07	0,05	0,00	1,56	1,01	0,15	0,39
12A	SALK_032904 [11]	39	0,38	0,23	0,14	0,00	1,63	0,61	0,46	0,53
15A	Col-0	89	2,14	1,43	0,80	0,04	1,82	0,66	2,78	1,41
15B	Col-0	79	0,32	0,46	0,24	0,00	1,93	1,43	0,92	0,52
16A	SALK_128435 [21]	71	0,16	0,29	0,16	0,00	1,84	1,80	0,58	0,37
16B	SALK_128435 [21]	73	0,19	0,16	0,10	0,00	1,66	0,86	0,33	0,20

Este experimento no se ha podido completar con todas las líneas estudiadas, pero sería interesante realizarlo debido a que como ha ocurrido en el caso de las 3 líneas escogidas, en cuyo caso se ha confirmado que el fenotipo observado se debe a la pérdida de función de este gen. También sería interesante validar los fenotipos de aquellas líneas en las que no se han observado grandes diferencias, ya que este hecho podría ser debido a que la proteína generada de estas líneas mutantes si es funcional, lo que provocaría un fenotipo similar al de la estirpe silvestre.

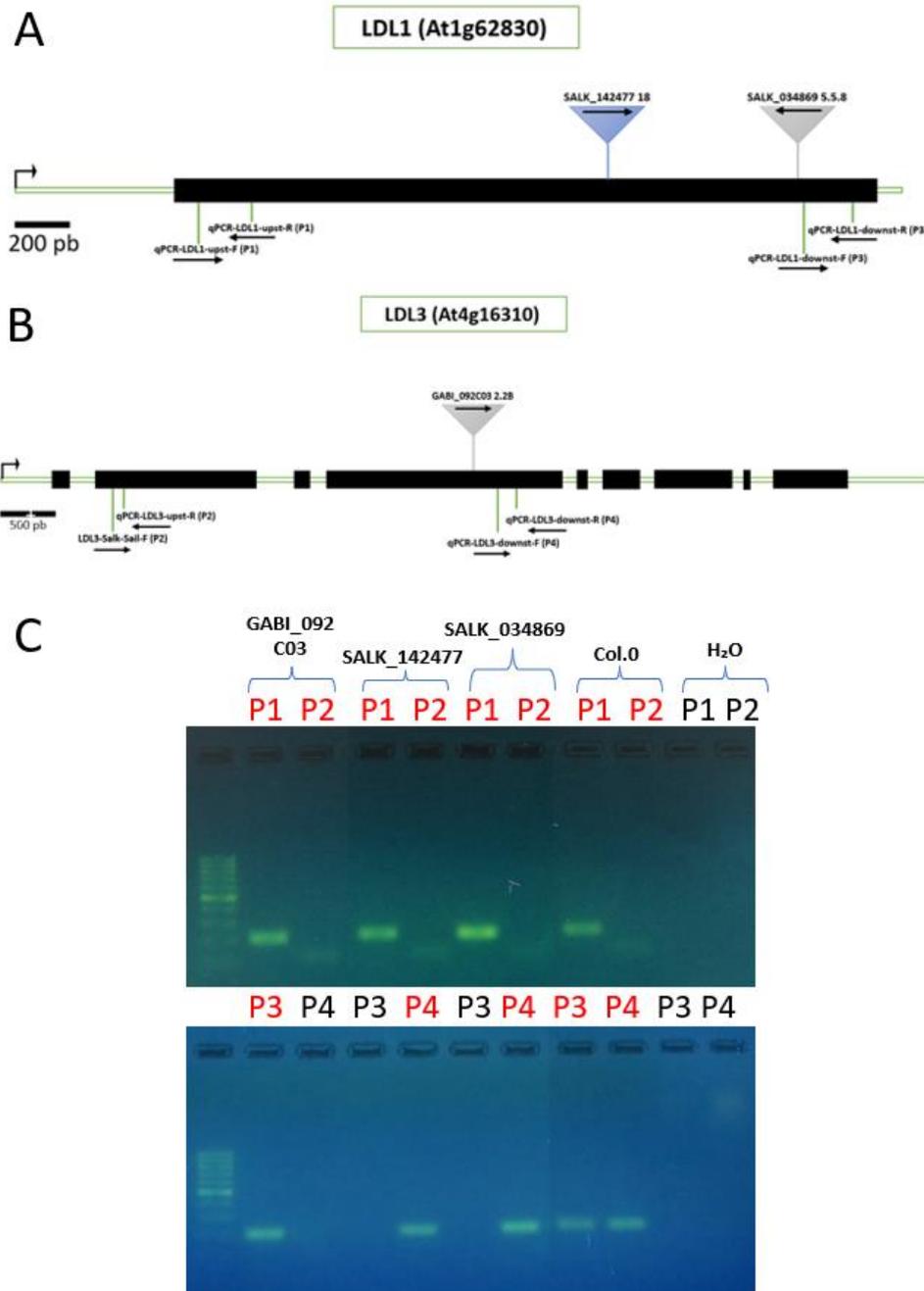


Figura 22.- Amplificación por PCR del ADNc. (A) Representación del gen *LDL1* con las parejas de cebadores específicas del gen aguas arriba (P1) y aguas abajo (P3) de las inserciones de ADN-T. (B) Representación del gen *LDL3* con las parejas de cebadores específicas del gen aguas arriba (P2) y aguas abajo (P4) de las inserciones de ADN-T. (C) Imagen del gel de agarosa con los resultados de la amplificación por PCR de las líneas estudiadas, con las parejas de cebadores antes descritas. En color rojo se representan las parejas que han generado productos de amplificación de los tamaños esperados.

5. CONCLUSIONES

- Hemos confirmado que las 15 líneas de ADN-T en los genes *LDL1*, *LDL2*, *LDL3*, *RABA1c* y *ABF3* que hemos estudiado son homocigotas para las inserciones de ADN-T en las posiciones anotadas en la base de datos.
- Las líneas insercionales estudiadas de *LDL1* y *LDL3* presentaron un incremento en la formación de raíces adventicias en explantos de hipocótilo respecto a la estirpe silvestre Col-0, tanto en el momento de la escisión de la raíz principal como en respuesta a herida.
- Las líneas insercionales de *LDL2* no mostraron diferencias con respecto a la estirpe silvestre en los fenotipos estudiados.
- Nuestros resultados sugieren que *LDL1* y *LDL3*, pero no *LDL2*, actuarían como reguladores negativos de la formación de raíces adventicias en el hipocótilo, tanto en condiciones habituales de cultivo como en respuesta a herida.
- Las tres líneas de ADN-T en el gen *RABA1c* presentaron un mayor número de raíces adventicias en explantos de hipocótilo en comparación con el silvestre, lo que sugiere que este gen actuaría como un regulador negativo de la formación de raíces adventicias en este órgano.
- No disponemos de evidencias suficientes para refutar la implicación del gen *ABF3* en la formación de raíces adventicias en el hipocótilo en respuesta a herida.
- Para tres de las líneas estudiadas hemos demostrado que las inserciones de ADN-T afectan a la expresión del gen aguas abajo de la inserción, lo que presuntamente generaría una proteína truncada en su extremo carboxilo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Shehbaz, I. A., y O'Kane, S. L., Jr** (2002). Taxonomy and phylogeny of *Arabidopsis* (brassicaceae). *The arabidopsis book 1*, e0001.
- Asahina, M., Azuma, K., Pitaksaringkarn, W., Yamazaki, T., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Okada, K., Nishimura, T., Koshiba, T., Yokota, T., Kamada, H., y Satoh, S.** (2011). Spatially selective hormonal control of RAP2.6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 16128–16132.
- Ballester-Palomar, A.** (2020). Estudio de la función de las proteínas LSD1 de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Bartel, B. y Woodward, A.W.** (2018). Biology in Bloom: A Primer on the *Arabidopsis thaliana* Model System. *Genetics* **208**, 1337–1349.
- Bellini, C., Pacurar, D. I., y Perrone, I.** (2014). Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual review of plant biology* **65**, 639–666.
- Bevan, M., y Walsh, S.** (2005). The *Arabidopsis* genome: a foundation for plant research. *Genome research* **15**, 1632–1642.
- Bidabadi, S. S., y Jain, S. M.** (2020). Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration. *Plants (Basel, Switzerland)* **9**, 702.
- Cheng, C. Y., Krishnakumar, V., Chan, A. P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S., y Town, C. D.** (2017). Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **89**, 789–804.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J., y Kim, S. Y.** (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *The Journal of biological chemistry* **275**, 1723–1730.
- Duclercq, J., Sangwan-Norreel, B., Catterou, M., y Sangwan, R. S.** (2011). De novo shoot organogenesis: from art to science. *Trends in plant science* **16**, 597–606.
- Falasca, G., Zaghi, D., Possenti, M., y Altamura, M. M.** (2004). Adventitious root formation in *Arabidopsis thaliana* thin cell layers. *Plant cell reports* **23**, 17–25.
- Fernández-López, M.A.** (2016). Caracterización de mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectados en la formación de raíces adventicias. Trabajo Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández.
- Forneris, F., Binda, C., Vanoni, M. A., Mattevi, A., y Battaglioli, E.** (2005). Histone demethylation catalysed by LSD1 is a flavin-dependent oxidative process. *FEBS letters* **579**, 2203–2207.
- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., y Tasaka, M.** (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **29**, 153–168.
- Gao, S., Gao, J., Zhu, X., Song, Y., Li, Z., Ren, G., Zhou, X., y Kuai, B.** (2016). ABF2, ABF3, and ABF4 Promote ABA-Mediated Chlorophyll Degradation and Leaf Senescence by Transcriptional

- Activation of Chlorophyll Catabolic Genes and Senescence-Associated Genes in Arabidopsis. *Molecular plant* **9**, 1272–1285.
- Gutierrez, L., Mongelard, G., Floková, K., Pacurar, D. I., Novák, O., Staswick, P., Kowalczyk, M., Pacurar, M., Demailly, H., Geiss, G., y Bellini, C.** (2012). Auxin controls Arabidopsis adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. *The Plant cell* **24**, 2515–2527.
- Haughn, G.W. y Somerville, C.** (1986). Sulfonylurea-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Molec Gen Genet* **204**, 430–434.
- Hoffmann, M.H.** (2002). Biogeography of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). *Journal of Biogeography* **29**, 125–134.
- Hogge, L.R., Reed, D.W., Unherhill, E.W., y Haughn, G.W.** (1988). HPLC Separation of Glucosinolates from Leaves and Seeds of *Arabidopsis thaliana* and Their Identification Using Thermospray Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* **26**, 551–556.
- Horstman, A., Bemer, M., y Boutilier, K.** (2017). A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration (Oxford, England)* **4**, 201–216.
- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., y Sugimoto, K.** (2016). Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development (Cambridge, England)* **143**, 1442–1451.
- Ishihara, H., Sugimoto, K., Tarr, P. T., Temman, H., Kadokura, S., Inui, Y., Sakamoto, T., Sasaki, T., Aida, M., Suzuki, T., Inagaki, S., Morohashi, K., Seki, M., Kakutani, T., Meyerowitz, E. M., y Matsunaga, S.** (2019). Primed histone demethylation regulates shoot regenerative competency. *Nature communications* **10**, 1786.
- 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. *The Plant cell* **19**, 2975–2987.
- Jin, Y., Huo, B., Fu, X., Cheng, Z., Zhu, J., Zhang, Y., Hao, T., y Hu, X.** (2017). LSD1 knockdown reveals novel histone lysine methylation in human breast cancer MCF-7 cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **92**, 896–904.
- Koornneef, M. y Meinke, D.** (2010). The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal* **61**, 909–921.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., y Vreugdenhil, D.** (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annual review of plant biology* **55**, 141–172.
- Kouzarides T.** (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693–705.
- Krichevsky, A., Zaltsman, A., Kozlovsky, S. V., Tian, G. W., y Citovsky, V.** (2009). Regulation of root elongation by histone acetylation in Arabidopsis. *Journal of molecular biology* **385**, 45–50.
- Lee, M. G., Wynder, C., Cooch, N., y Shiekhhattar, R.** (2005). An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature* **437**, 432–435.

- Long, Y., Yang, Y., Pan, G., y Shen, Y.** (2022). New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms. *Frontiers in plant science* **13**, 926752.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., McLachlin, D. T., Chait, B. T., y Chua, N. H.** (2002). ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **32**, 317–328.
- Martignago, D., Bernardini, B., Polticelli, F., Salvi, D., Cona, A., Angelini, R., y Tavladoraki, P.** (2019). The Four FAD-Dependent Histone Demethylases of Arabidopsis Are Differently Involved in the Control of Flowering Time. *Frontiers in plant science* **10**, 669.
- Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Müller, J. M., Schneider, R., Peters, A. H., Günther, T., Buettner, R., y Schüle, R.** (2005). LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* **437**, 436–439.
- Meyerowitz E. M.** (1987). Arabidopsis thaliana. *Annual review of genetics* **21**, 93–111.
- Noh, S. W., Seo, R. R., Park, H. J., y Jung, H. W.** (2021). Two Arabidopsis Homologs of Human Lysine-Specific Demethylase Function in Epigenetic Regulation of Plant Defense Responses. *Frontiers in plant science* **12**, 688003.
- Ortí-Llul, M.** (2019). Análisis funcional de la familia LSD1 en *Arabidopsis thaliana* durante la formación de raíces adventicias. Trabajo Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Perillo, B., Tramontano, A., Pezone, A., y Migliaccio, A.** (2020). LSD1: more than demethylation of histone lysine residues. *Experimental & molecular medicine* **52**, 1936–1947.
- Provart, N.J., Alonso, J., Assmann, S.M., Bergmann, D., Brady, S.M., Brkljacic, J., Browse, J., Chapple, C., Colot, V., Cutler, S., Dangl, 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 Phytol* **209**, 921–944.
- Qi, X., Kaneda, M., Chen, J., Geitmann, A., y Zheng, H.** (2011). A specific role for Arabidopsis TRAPP II in post-Golgi trafficking that is crucial for cytokinesis and cell polarity. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **68**, 234–248.
- Qi, X., y Zheng, H.** (2013). Functional analysis of small Rab GTPases in cytokinesis in Arabidopsis thaliana. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1043**, 103–112.
- Qi, X., y Zheng, H.** (2013). Rab-A1c GTPase defines a population of the trans-Golgi network that is sensitive to endosidin I during cytokinesis in Arabidopsis. *Molecular plant* **6**, 847–859.
- Robert, S., Chary, S. N., Drakakaki, G., Li, S., Yang, Z., Raikhel, N. V., y Hicks, G. R.** (2008). Endosidin I defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 8464–8469.

- Sarkar, A. K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., y Laux, T.** (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**, 811–814
- Sauter M.** (2013). Root responses to flooding. *Current opinion in plant biology* **16**, 282–286.
- Sorin, C., Bussell, J. D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., McKhann, H., Garcion, C., Vaucheret, H., Sandberg, G., y Bellini, C.** (2005). Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1. *The Plant cell* **17**, 1343–1359.
- Sreenivasulu, N., Harshavardhan, V. T., Govind, G., Seiler, C., y Kohli, A.** (2012). Contrapuntal role of ABA: does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress?. *Gene* **506**, 265–273.
- Sugimoto, K., y Meyerowitz, E. M.** (2013). Regeneration in *Arabidopsis* tissue culture. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **959**, 265–275
- Sugiyama M.** (1999). Organogenesis in vitro. *Current opinion in plant biology* **2**, 61–64.
- Verstraeten, I., Schotte, S., y Geelen, D.** (2014). Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development. *Frontiers in plant science* **5**, 495.
- Wang, J., Cai, Y., Miao, Y., Lam, S. K., y Jiang, L.** (2009). Wortmannin induces homotypic fusion of plant prevacuolar compartments. *Journal of experimental botany* **60**, 3075–3083.
- Wang, X. D., Nolan, K. E., Irwanto, R. R., Sheahan, M. B., y Rose, R. J.** (2011). Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: the fate of the pluripotent and totipotent stem cells. *Annals of botany* **107**, 599–609.
- Xu, J., Hofhuis, H., Heidstra, R., Sauer, M., Friml, J., y Scheres, B.** (2006). A molecular framework for plant regeneration. *Science (New York, N.Y.)* **311**, 385–388.
- Xu, L., y Huang, H.** (2014). Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. *Current topics in developmental biology* **108**, 1–33.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Maruyama, K., Mogami, J., Todaka, D., Shinozaki, K., y Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2015). Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, cell & environment* **38**, 35–49.
- Zhao, M., Yang, S., Liu, X., y Wu, K.** (2015). *Arabidopsis* histone demethylases LDL1 and LDL2 control primary seed dormancy by regulating DELAY OF GERMINATION 1 and ABA signaling-related genes. *Frontiers in plant science* **6**, 159.
- Zhao, Y., Chan, Z., Gao, J., Xing, L., Cao, M., Yu, C., Hu, Y., You, J., Shi, H., Zhu, Y., Gong, Y., Mu, Z., Wang, H., Deng, X., Wang, P., Bressan, R. A., y Zhu, J. K.** (2016). ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 1949–1954.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Miguel Hernández de Elche y al Instituto de Bioingeniería por prestarme las instalaciones donde realizar este trabajo.

A mi tutor el Dr. José Manuel Pérez Pérez por permitirme realizar el trabajo en su laboratorio y por ayudarme en todo lo que ha estado en su mano.

A mis compañeros de laboratorio Miriam, María Salud, Eduardo y Mariam por hacerme sentir cómodo en el laboratorio y enseñarme cosas nuevas.

A mis compañeros de Máster por permitirme compartir con ellos cada día nuevas experiencias.

A mi familia por ayudarme y creer en mí incondicionalmente y apoyarme en los momentos difíciles de estrés y agobio.