



**Universidad Miguel Hernández de Elche**

**Análisis de la localización subcelular  
de la proteína VCC de Arabidopsis  
y del efecto de las condiciones de cultivo  
sobre el fenotipo del mutante vcc-2**

**Estefanía Vidaurre Pinto**

Tutores:

José Luis Micol Molina

Carla Navarro Quiles

Máster en Biotecnología y Bioingeniería

Instituto de Bioingeniería

Curso académico 2022-2023

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

CARLA NAVARRO QUILES, Doctora por la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por Estefanía Vidaurre Pinto como Trabajo de Fin del Máster en Biotecnología y Bioingeniería. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Carla Navarro Quiles

José Luis Micol Molina

Elche, 20 de junio de 2023

# ÍNDICE DE MATERIAS

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	II
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	II
<b>I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE</b> .....	1
<b>II.- INTRODUCCIÓN</b> .....	2
II.1.- Desarrollo embrionario de los cotiledones de Arabidopsis.....	2
II.2.- Establecimiento del patrón de venación de los cotiledones de Arabidopsis .....	3
II.3.- Morfogénesis del margen de las hojas de la roseta de Arabidopsis .....	5
II.4.- Participación de las citoquininas en la morfogénesis del margen de las hojas simples ....	7
<b>III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b> .....	8
III.1.- Las hojas de los mutantes <i>vcc</i> manifiestan asimetría bilateral.....	8
III.2.- Observaciones discordantes sobre la localización subcelular de la proteína VCC.....	8
III.3.- Interacciones genéticas entre alelos de los genes <i>VCC</i> , <i>CUC2</i> e <i>IPT</i> .....	10
III.4.- El agente gelificante Gelrite extrema el fenotipo mutante de las plantas <i>vcc-2</i> .....	11
III.5.- Objetivos de este trabajo .....	11
<b>IV.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	13
IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria .....	13
IV.2.- Abreviaturas, acrónimos y fórmulas químicas .....	13
IV.3.- Gramática y terminología .....	13
IV.4.- Nomenclatura genética .....	14
IV.5.- Estirpes empleadas en este trabajo .....	15
IV.5.1.- Estirpes de Arabidopsis.....	15
IV.5.2.- Estirpes bacterianas.....	15
IV.6.- Cultivos.....	15
IV.6.1.- Parámetros de crecimiento de Arabidopsis .....	15
IV.6.1.1.- Cultivo en placa de Petri .....	16
IV.6.1.2.- Cultivo en maceta.....	16
IV.6.1.3.- Recolección de semillas .....	17
IV.6.2.- Condiciones de los cultivos microbianos.....	17
IV.7.- Disoluciones .....	18
IV.7.1.- Medios de cultivo para Arabidopsis.....	18
IV.7.1.1.- Medios de cultivo líquidos .....	18
IV.7.1.2.- Medios de cultivo sólidos.....	19
IV.7.2.- Medios de cultivo para microorganismos .....	19
IV.7.2.1.- Medios de cultivo líquidos .....	19
IV.7.2.2.- Medios de cultivo sólidos.....	19
IV.7.2.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos.....	20
IV.7.3.- Tampones y otras disoluciones de uso general .....	20
IV.7.3.1.- Disoluciones para extracción de ADN .....	20

IV.7.3.2.- Disoluciones para electroforesis.....	20
IV.7.3.3.- Disoluciones para obtener bacterias competentes.....	20
IV.7.3.4.- Disoluciones para marcaje de las paredes celulares.....	21
IV.8.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos.....	21
IV.8.1.- Síntesis de ADN.....	21
IV.8.1.1.- Síntesis de oligonucleótidos.....	21
IV.8.1.2.- Amplificaciones mediante PCR.....	22
IV.8.2.- Aislamiento de ácidos nucleicos.....	22
IV.8.2.1.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis para su amplificación por PCR.....	22
IV.8.2.2.- Aislamiento de ADN plasmídico.....	23
IV.8.3.- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	23
IV.8.4.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN.....	23
IV.9.- Genotipado de mutantes insercionales mediante PCR.....	24
IV.10.- Obtención de líneas transgénicas mediante la tecnología Gateway.....	24
IV.11.- Transformación de células bacterianas.....	26
IV.11.1.- Obtención de bacterias quimiocompetentes.....	26
IV.11.2.- Transformación por choque térmico.....	27
IV.12.- Caracterización fenotípica de estirpes de Arabidopsis.....	27
IV.12.1.- Observación microscópica y microfotografía.....	27
IV.12.2.- Visualización y análisis morfométrico del patrón de venación.....	27
IV.13.- Microscopía de fluorescencia.....	27
IV.13.1.- Visualización de proteínas de fusión fluorescentes.....	27
IV.13.2.- Tinción con yoduro de propidio de plántulas de Arabidopsis.....	28
<b>V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
V.1.- Análisis comparativo de algunos rasgos del fenotipo morfológico de los mutantes <i>vcc</i> , <i>ipt</i> y <i>cuc2</i> en diferentes condiciones de cultivo.....	29
V.1.1.- Efecto de las condiciones de cultivo sobre el fenotipo de <i>vcc-2</i> .....	29
V.1.2.- Caracterización de la forma del margen foliar.....	29
V.1.3.- Caracterización del patrón de venación de los cotiledones.....	33
V.2.- Localización subcelular de la proteína VCC.....	37
V.2.1.- Análisis de la colocalización de VCC con marcadores del retículo endoplásmico.....	37
V.2.2.- Análisis de la colocalización de VCC con marcadores del aparato de Golgi.....	38
V.2.3.- Construcción de transgenes para determinar la localización subcelular de VCC.....	40
V.2.3.1.- Diseño de fusiones traduccionales de VCC optimizadas.....	40
V.2.3.2.- Amplificación de segmentos de VCC para su inclusión en transgenes.....	40
V.2.3.3.- Clonación de insertos en el vector pGEM-T Easy221.....	42
V.3.- Visualización de la polarización de PIN1 en plantas <i>vcc-1</i> .....	44
<b>VI.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>46</b>

<b>VII.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>48</b>
--------------------------------	-----------

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Polarización de PIN1 durante la embriogénesis de Arabidopsis.....	<b>2</b>
<b>Figura 2.-</b> Clasificación de los patrones de venación de los cotiledones de la estirpe silvestre Col-0 y los mutantes <i>vcc</i> .....	<b>4</b>
<b>Figura 3.-</b> Papel de la auxina en el desarrollo del margen foliar de Arabidopsis .....	<b>6</b>
<b>Figura 4.-</b> Estructura del gen <i>VCC</i> (At2g32280) y fenotipo foliar de su alelo mutante <i>vcc-2</i> .....	<b>8</b>
<b>Figura 5.-</b> Discrepancia en la localización subcelular de <i>VCC</i> publicada previamente en Wilson-Sánchez <i>et al.</i> (2018) y (B) Yanagisawa <i>et al.</i> (2021).....	<b>9</b>
<b>Figura 6.-</b> Interacciones genéticas entre mutaciones que modulan la forma del margen foliar de Arabidopsis .....	<b>10</b>
<b>Figura 7.-</b> Genotipado de inserciones de ADN-T en las líneas de la colección SALK .....	<b>24</b>
<b>Figura 8.-</b> Clonación y subclonación de un inserto en vectores Gateway .....	<b>25</b>
<b>Figura 9.-</b> Mapa del vector de entrada pGEM-T Easy221 empleado en este trabajo .....	<b>26</b>
<b>Figura 10.-</b> Rosetas de los mutantes de Arabidopsis estudiados en este trabajo.....	<b>30</b>
<b>Figura 11.-</b> Efectos de diferentes condiciones de cultivo sobre el fenotipo morfológico de los mutantes estudiados en este trabajo .....	<b>31</b>
<b>Figura 12.-</b> Clasificación de los patrones de venación de los cotiledones de las estirpes de Arabidopsis estudiadas en este trabajo, que se cultivaron bajo luz continua y a 20°C.....	<b>34</b>
<b>Figura 13.-</b> Clasificación de los patrones de venación de los cotiledones de las estirpes de Arabidopsis estudiadas en este trabajo, que se cultivaron bajo fotoperiodo y a 23°C.....	<b>35</b>
<b>Figura 14.-</b> Visualización de la eventual colocalización subcelular de <i>VCC</i> y el retículo endoplásmico.....	<b>38</b>
<b>Figura 15.-</b> Visualización de la eventual colocalización subcelular de <i>VCC</i> y el aparato de Golgi .....	<b>39</b>
<b>Figura 16.-</b> Estructura del gen <i>VCC</i> , con indicación de sus segmentos amplificados mediante PCR en este trabajo para la construcción de transgenes.....	<b>41</b>
<b>Figura 17.-</b> Verificación de la presencia y el tamaño de los insertos $35S_{pro}:GFP:VCC$ , $35S_{pro}:VCC:YFP$ y $VCC_{pro}:VCC:GFP$ en clones Carb <sup>R</sup> de <i>Escherichia coli</i> DH5α.....	<b>43</b>
<b>Figura 18.-</b> Visualización de la polarización de PIN1 en células de la raíz de Col-0 y <i>vcc-1</i> .....	<b>45</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Abreviaturas empleadas en este trabajo .....	<b>13</b>
<b>Tabla 2.-</b> Estirpes de Arabidopsis usadas en este trabajo.....	<b>15</b>
<b>Tabla 3.-</b> Oligonucleótidos usados en este trabajo .....	<b>21</b>
<b>Tabla 4.-</b> Parámetros de visualización de proteínas y tinciones fluorescentes.....	<b>28</b>

## **I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE**

## I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Se han publicado descripciones discrepantes del fenotipo del mutante *vasculature complexity and connectivity-2* (*vcc-2*) y de la localización subcelular de la proteína VCC de *Arabidopsis*. Roschztardt et al. (2014) y Yanagisawa et al. (2021) afirmaron que el patrón de venación de los cotiledones de *vcc-2* es más simple e inconexo que el silvestre, y que VCC se localiza en la membrana celular. Según Wilson-Sánchez et al. (2018), las hojas de *vcc-2* muestran asimetría bilateral, y VCC radica en el retículo endoplásmico. Hemos intentado establecer si tales discrepancias se deben a diferentes condiciones de cultivo o a diseños erróneos de los transgenes obtenidos para la visualización de proteínas de fusión entre VCC y una proteína fluorescente. Hemos comprobado que la temperatura y el fotoperiodo no modifican el patrón de venación de los cotiledones ni la simetría bilateral de las hojas de los mutantes estudiados, excepto *vcc-2*, cuya asimetría bilateral se incrementó en medios gelificados con Gelrite. Nuestro análisis mediante microscopía confocal de superresolución reveló que la proteína de fusión VCC:CFP es aparentemente citoplásmica. También hemos diseñado e iniciado la construcción de las fusiones traduccionales  $35S_{pro}:GFP:VCC$  (con la GFP unida al extremo amino de VCC en la proteína de fusión resultante) y  $35S_{pro}:VCC:YFP$  (con una proteína fluorescente más fotoestable y adecuada para la nanoscopia que la GFP).

**Palabras clave:** *Arabidopsis*, VCC, patrón de venación, localización subcelular, citoquininas.

Two distinct descriptions have been published of the phenotype of the *vasculature complexity and connectivity-2* (*vcc-2*) *Arabidopsis* mutant, as well as of the subcellular localization of the VCC protein. Roschztardt et al. (2014) and Yanagisawa et al. (2021) claimed that the venation pattern of *vcc-2* cotyledons is simpler and disconnected compared to wild type, and that VCC localizes at the cell membrane. According to Wilson-Sánchez et al. (2018), *vcc-2* leaves exhibit bilateral asymmetry, and VCC localizes at the endoplasmic reticulum. We attempted to establish whether these discrepancies are due to different growth conditions or defective design of the transgenes used for obtaining and visualizing VCC fusion proteins. We confirmed that temperature and photoperiod do not modify the venation pattern of cotyledons or the bilateral symmetry of the studied mutants, except for *vcc-2*, whose leaf bilateral asymmetry increased in media gelified with Gelrite. Our super-resolution confocal microscopy analysis revealed that VCC:CFP is apparently cytoplasmic. We also designed and initiated the construction of the translational fusions  $35S_{pro}:GFP:VCC$  (with GFP attached to the N-terminus of VCC in the resulting fusion protein) and  $35S_{pro}:VCC:YFP$  (with a fluorescent protein more photostable and suitable for nanoscopy than GFP).

**Keywords:** *Arabidopsis*, VCC, venation pattern, subcellular localization, cytokinins.

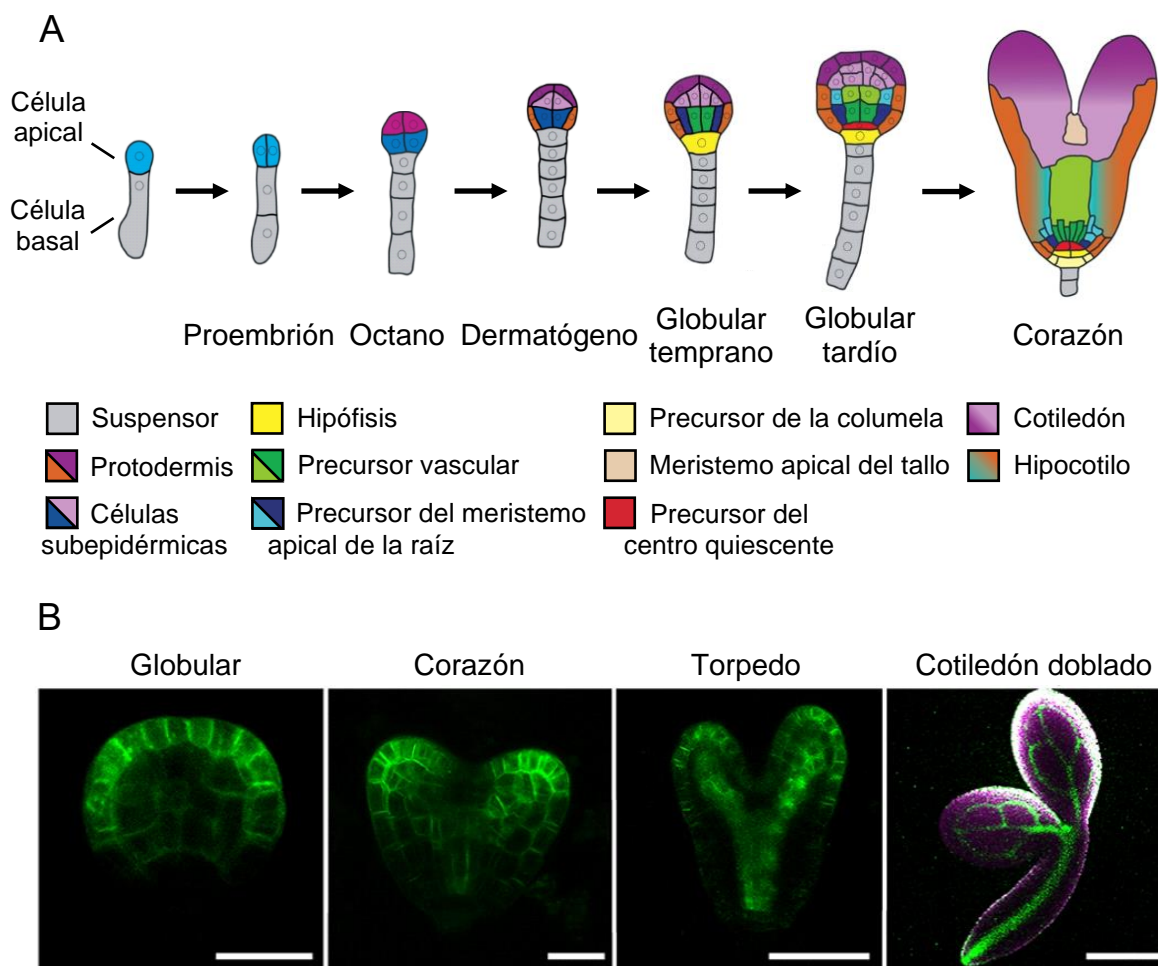
## **II.- INTRODUCCIÓN**



## II.- INTRODUCCIÓN

### II.1.- Desarrollo embrionario de los cotiledones de *Arabidopsis*

En *Arabidopsis thaliana* (en adelante, *Arabidopsis*), como en otras muchas angiospermas, el cigoto se divide asimétricamente, rindiendo una célula hija basal y otra apical (Figura 1). La célula basal genera el suspensor, que conecta al embrión con los tejidos maternos; la apical sufre tres rondas de división, alcanzando el estadio octano, de 8 células. En un estadio posterior, el globular, se inicia la diferenciación de la hipófisis, a partir de la cual se desarrollará el meristemo apical de la raíz, y la de los precursores vasculares. Posteriormente, en el estadio corazón, se diferencian la epidermis y las células provasculares, y se desarrollan el meristemo apical del tallo y la columela. Esta última contiene las células que formarán el meristemo apical de la raíz (Wendrich y Weijers, 2013).



**Figura 1.-** Polarización de PIN1 durante la embriogénesis de *Arabidopsis*. (A) Principales estadios del desarrollo embrionario de *Arabidopsis*. (B) Polarización del transportador del eflujo de la auxina PIN1, visualizada mediante una proteína de fusión PIN1:GFP en los estadios que se indican. Barras de escala: 30  $\mu\text{m}$ . Modificado a partir de (A) Wendrich y Weijers (2013) y (B) Yanagisawa *et al.* (2021).

La formación del procámbium se inicia en el estadio globular temprano; estas células provasculares se diferenciarán generando la red vascular de los cotiledones, el hipocotilo y la raíz principal (Roschztardt *et al.*, 2014). Al estadio de torpedo, en el que se manifiestan claramente los cotiledones y se inicia el desarrollo de los tejidos vasculares, le sigue el de cotiledones doblados (Figura 1, en la página 2; ten Hove *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017).

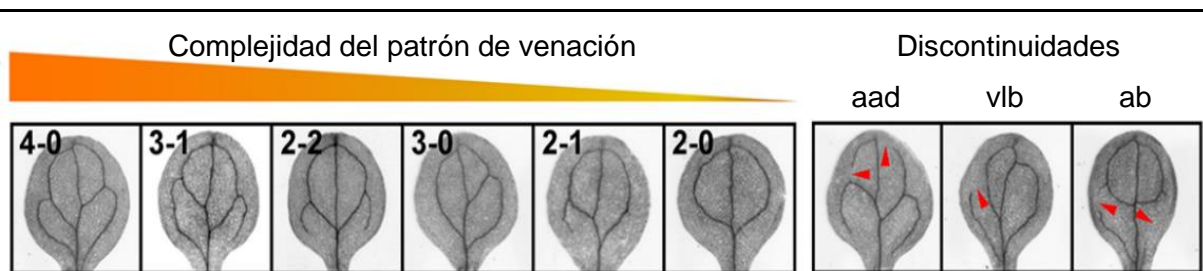
El sistema vascular de las plantas es una red que conecta sus tejidos y órganos (Kneuper *et al.*, 2021). Juega un importante papel en el desarrollo vegetal, ya que transporta agua, nutrientes y moléculas señalizadoras que comunican órganos distantes, y confiere resistencia mecánica al cuerpo de la planta. Las células preprocambiales son redondeadas y su capacidad de transporte de la fitohormona auxina —el morfógeno más importante de las plantas— es mayor que la del resto del embrión; su diferenciación rinde el procámbium, que formará el xilema y el floema del tejido vascular tras la germinación de la semilla (Biedroń y Banasiak, 2018). El patrón provascular de los cotiledones embrionarios se mantiene durante su diferenciación a venas maduras (Yanagisawa *et al.*, 2021). Las células preprocambiales que no contribuyen al desarrollo del tejido provascular forman finalmente parte del mesófilo, el principal tejido fotosintético de los cotiledones y las hojas (Donner *et al.*, 2009).

## **II.2.- Establecimiento del patrón de venación de los cotiledones de Arabidopsis**

El flujo de la auxina dentro de cada órgano y entre distintos órganos está regulado por los transportadores de esta hormona, entre los que destaca PIN-FORMED 1 (PIN1). Esta proteína se localiza en la membrana plasmática y lleva a cabo el eflujo (flujo hacia el exterior de la célula) de la auxina (Sauer y Kleine-Vehn, 2019). En las etapas iniciales del desarrollo del embrión o de un órgano, la expresión del gen *PIN1* es ubicua y se restringe posteriormente a las células que se diferenciarán para rendir tejidos vasculares o epidérmicos (Figura 1B) (Sauer y Kleine-Vehn, 2019; Govindaraju *et al.*, 2020). La auxina está presente desde la iniciación del preprocámbium hasta la diferenciación del procámbium a xilema y floema, y su transporte polar especifica el patrón de venación. En consecuencia, cualquier defecto en la polarización de PIN1 en la membrana plasmática de las células que adquirirán identidad vascular puede perturbar la formación de los patrones de la venación de los cotiledones y las hojas (Roschztardt *et al.*, 2014).

La venación de los cotiledones de *Arabidopsis* incluye una vena central o primaria que está conectada al sistema vascular del hipocotilo. De esta vena primaria emergen hasta cuatro venas laterales secundarias que se conectan a otras también secundarias, delimitando hasta cuatro areolas, dos en la parte basal y dos en la distal del cotiledón. Se denomina venas de terminación libre a las secundarias que no llegan a cerrarse; se ha propuesto que aparecen

como consecuencia de una diferenciación prematura de las células del mesófilo (Roschztardt et al., 2014; Biedroń y Banasiak, 2018; Figura 2).



**Figura 2.-** Clasificación de Yanagisawa *et al.* (2021) de los patrones de venación de los cotiledones de la estirpe silvestre Col-0 y los mutantes *vcc*. Las clases fenotípicas que representa la figura definen la complejidad del patrón de venación en función del número de areolas presentes en el cotiledón (primer dígito) y del de venas de terminación libre (segundo dígito). Las discontinuidades en el tejido vascular (señaladas con puntas de flecha rojas) se clasificaron como areolas abiertas distales (aad), venas de terminación libre basales (vlb) y aperturas basales (ab). Modificada a partir de Yanagisawa *et al.* (2021).

Se han identificado en *Arabidopsis* muchos genes cuya disfunción reduce la complejidad del patrón de venación de los cotiledones, la mayoría de los cuales están relacionados con el transporte de la auxina (Roschztardt et al., 2014), como *VASCULAR NETWORK DEFECTIVE 3* (*VAN3*) o *SCARFACE* (*SFC*) y *VAN7* o *EMBRYO DEFECTIVE 30* (*GNOM*), cuyos productos proteicos regulan la polarización de PIN1 en la membrana plasmática (Koizumi et al., 2000; Sieburth et al., 2006; Verna et al., 2019). Otros codifican factores de transcripción que participan en la síntesis de la auxina, como *SHORT INTERNODES* (*SHI*) o *STYLISH* (*STY*) (Baylis et al., 2013). Algunos promueven la expresión de genes de respuesta a auxina, como *AUXIN RESPONSE FACTOR 5* (*ARF5*) (Odat et al., 2014). Otros, como *HEMIVENATA* (*HVE*; también denominado *CULLIN-ASSOCIATED AND NEDDYLATION DISSOCIATED 1* [*CAND1*]) regulan la degradación de los represores de los ARF (Alonso-Peral et al., 2006; Zhang et al., 2008).

Uno de los genes cuya insuficiencia de función reduce la complejidad y la conectividad del patrón de venación de los cotiledones de *Arabidopsis* es *VASCULATURE COMPLEXITY AND CONNECTIVITY* (*VCC*) (Roschztardt et al., 2014; Yanagisawa et al., 2021). Para cuantificar la complejidad de la venación de los cotiledones de los mutantes *vcc* y compararla con la del tipo silvestre Col-0, Yanagisawa et al. (2021) tuvieron en cuenta el número de areolas y el de venas de terminación libre (Figura 2). Según estos autores, los cotiledones de Col-0 suelen mostrar un patrón de venación complejo, formado por tres o cuatro areolas y, como mucho, una vena de terminación libre. La clase fenotípica de complejidad más baja fue la de solo dos areolas, con o sin venas de terminación libre.

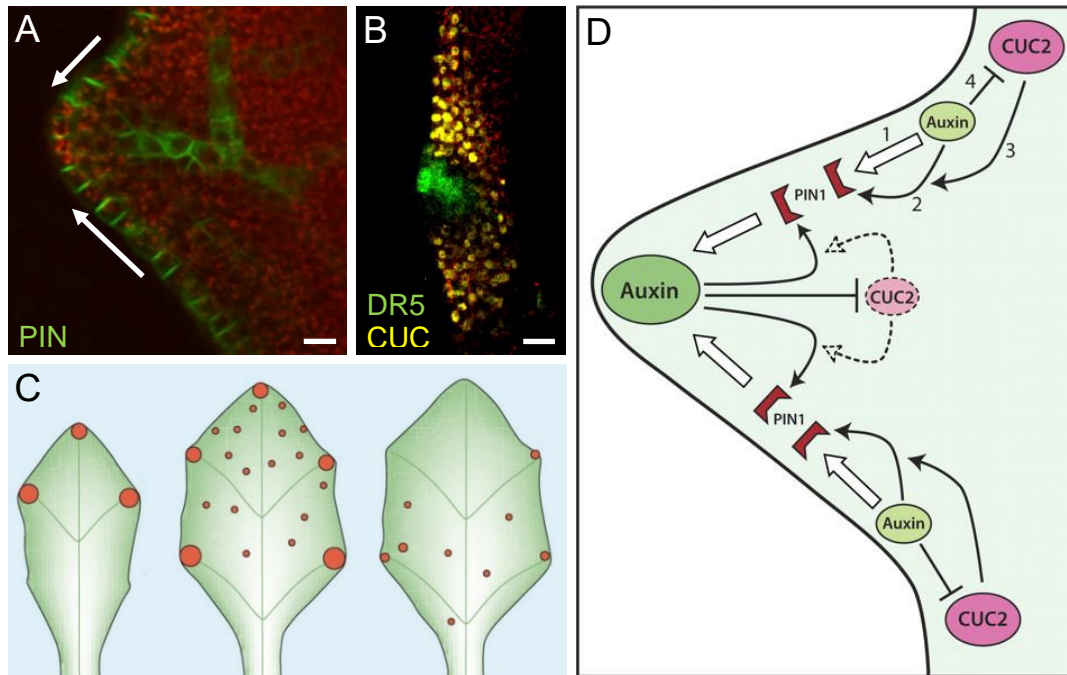
VCC, también denominado *DESIGUAL1* (*DEAL1*), codifica una proteína transmembrana que contiene el *domain of unknown function 1218* (DUF1218), que en otras proteínas se ha relacionado con el metabolismo de la lignina, las respuestas al estrés y el desarrollo del tejido provascular durante la embriogénesis (Huang *et al.*, 2012; Mewalal *et al.*, 2016). La depleción de la proteína VCC también altera la morfogénesis foliar, en concreto el establecimiento de la simetría bilateral, ya que produce hojas con lóbulos dispuestos de forma asimétrica a lo largo del margen foliar (Wilson-Sánchez *et al.*, 2018).

### II.3.- Morfogénesis del margen de las hojas de la roseta de Arabidopsis

Las hojas de Arabidopsis manifiestan tres ejes de polaridad: el proximodistal, desde la base de la hoja hasta su ápice, a lo largo de la vena primaria; el dorsoventral, desde la cara dorsal de la hoja (el ha) a la ventral (el envés) y el mediolateral, perpendicular a la vena primaria y hacia los márgenes derecho e izquierdo. La mayoría de las hojas de las plantas presentan simetría bilateral, que está relacionada con su dorsoventralidad, que a su vez conlleva una forma laminar que maximiza la ratio superficie/volumen y por tanto facilita el intercambio gaseoso y la captación de luz (Byrne *et al.*, 2001).

La formación de las hojas de las plantas se inicia en el meristemo apical del tallo. El primordio foliar comienza a manifestarse en un punto discreto de la periferia del meristemo en el que se alcanza un máximo de concentración de auxina, que se acumula como consecuencia de su transporte direccional mediado por PIN1 (Galvan-Ampudia *et al.*, 2020). El desarrollo posterior del primordio foliar conllevará la proliferación, expansión y diferenciación de sus células. En Arabidopsis, la forma del margen foliar es consecuencia de una segunda etapa de proliferación celular que permite la formación de lóbulos o indentaciones y senos (Alvarez *et al.*, 2016), que también dependen de la formación de máximos de auxina mediada por PIN1, que proporcionan información posicional (Bilsborough *et al.*, 2011).

En la formación de los lóbulos también participa *CUP-SHAPED COTYLEDON2* (*CUC2*), que codifica un factor de transcripción cuyos dominios de expresión en el margen del primordio foliar se alternan con los máximos de auxina (Nikovics *et al.*, 2006). *CUC2* promueve el transporte de auxina mediante la polarización de PIN1 hacia el polo celular más lejano a su dominio de expresión, contribuyendo así a la formación de un máximo de la hormona, que a su vez inhibe la transcripción de *CUC2*. La auxina refuerza la polarización de PIN1 generando un bucle de retroalimentación positiva. Los máximos intercalados de auxina y *CUC2* se propagan por el margen basípetamente, induciendo el desarrollo de lóbulos y senos, respectivamente (Bilsborough *et al.*, 2011; Figura 3, en la página 6).



**Figura 3.-** Papel de la auxina en el desarrollo del margen foliar de *Arabidopsis*. (A) Visualización mediante microscopía confocal de la polarización de la proteína de fusión PIN1:GFP en la membrana de las células del margen. Las flechas indican la dirección del transporte de auxina que forma un máximo de la hormona. Se aprecia claramente la acumulación de PIN1 en uno de los lados de cada célula, perpendicularmente a la dirección del transporte. (B) Acumulación de auxina, visualizada indirectamente mediante la proteína de fusión DR5:GFP (en verde; DR5 es un promotor sintético que responde a auxina) en un máximo situado entre dos dominios de expresión de la proteína de fusión CUC2:VENUS (en amarillo). (C) Formación de máximos de auxina (círculos) en sucesivos estadios (de izquierda a derecha) del desarrollo de un primordio foliar. (D) Relaciones entre la auxina, PIN1 y CUC2 en el margen foliar. La acumulación de la auxina causada por su transporte polar por PIN1 influye en la expresión y polarización de esta última proteína, lo que estabiliza el máximo. CUC2 también influye en la orientación de PIN1 para estabilizar dicho máximo, mientras que la auxina, a su vez, inhibe la expresión de CUC2. Los símbolos  $\rightarrow$  y  $\dashv$  indican regulación positiva y negativa, respectivamente. GFP: proteína verde fluorescente. VENUS: variante de la YFP (proteína amarilla fluorescente, que es a su vez una variante de la GFP). Tomado de Wilson-Sánchez *et al.* (2018), que a su vez lo modificó de (A, B, D) Bilsborough *et al.* (2011) y (C) Teale *et al.* (2006). Barras de escala: 10  $\mu$ m.

El tamaño de los máximos de auxina en el primordio foliar determina el de los lóbulos en la hoja expandida, y depende de la expresión de *CUC2* en los senos. Es por ello que la insuficiencia de función de *CUC2* en el mutante nulo *cuc2-3* produce primordios sin máximos de auxina, que a su vez dan lugar a hojas con márgenes lisos (Nikovics *et al.*, 2006; Kawamura *et al.*, 2010; Bilsborough *et al.*, 2011). La ganancia de función de *CUC2* en el mutante hipermorfo *cuc2-1D* incrementa el número de máximos de auxina, por lo que se forman más lóbulos y senos en el margen foliar (Nikovics *et al.*, 2006; Larue *et al.*, 2009).

## II.4.- Participación de las citoquininas en la morfogénesis del margen de las hojas simples

Las citoquininas son fitohormonas que participan en el crecimiento, el desarrollo y las respuestas fisiológicas de las plantas, como la diferenciación vascular, las respuestas al estrés, y el transporte de metabolitos, ARN pequeños, proteínas y virus a través de los plasmodesmos de las hojas (Horner y Brunkard, 2021). En muchos de estos procesos las citoquininas actúan de manera antagónica a la auxina (Wybouw y De Rybel, 2019). Aunque se ha descrito que las citoquininas promueven la formación de las hojas compuestas en las plantas del tomate (*Solanum lycopersicum*) y la brasicácea *Cardamine hirsuta* (Shani *et al.*, 2009; Hajheidari *et al.*, 2019), no se ha establecido claramente su implicación en la formación del margen de las hojas simples. No obstante, se han descrito plantas mutantes y/o transgénicas en las que un aumento de la degradación de las citoquininas o una disminución de su síntesis o percepción conlleva la formación de hojas con el margen más liso que las silvestres, lo que sugiere que estas hormonas regulan la morfogénesis del margen foliar (Navarro-Cartagena y Micol, 2023).

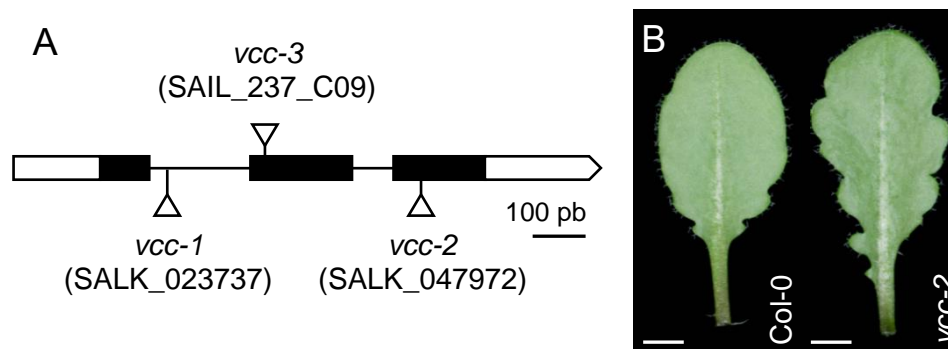
En la estirpe transgénica *ANTIGUMENTA:CYTOKININ DEHYDROGENASE/OXIDASE 3 (ANT:CKX3)* está incrementada la expresión de *CKX3* durante el desarrollo del primordio foliar, cuyo producto proteico participa en la degradación de las citoquininas. Esta degradación localizada de las citoquininas produce hojas más pequeñas, con un margen más liso y con una menor densidad vascular que las silvestres (Holst *et al.*, 2011). Adicionalmente, las ISOPENTENILTRANSFERASAS (IPT) catalizan la etapa inicial de la ruta de biosíntesis de las citoquininas. El triple mutante *ipt3 ipt5 ipt7*, portador de alelos nulos de los tres genes que codifican las IPT que más contribuyen a la síntesis de citoquininas manifiesta una depleción considerable de estas hormonas, y el margen de sus hojas es más liso que el silvestre (Miyawaki *et al.*, 2004; Miyawaki *et al.*, 2006). Por último, la insuficiencia de función de los genes *ARR* en el triple mutante *arr1 arr10 arr12* hace que su margen foliar sea liso (Argyros *et al.*, 2008). Estos ejemplos sugieren que una disminución en los niveles de citoquininas o en la respuesta a estas hormonas altera la morfogénesis del margen foliar y disminuye consecuentemente las diferencias entre lóbulos y senos, generando un margen liso (Navarro-Cartagena y Micol, 2023).

### **III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**

### III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

#### III.1.- Las hojas de los mutantes *vcc* manifiestan asimetría bilateral

En una búsqueda a gran escala realizada en el laboratorio de J.L. Micol se identificaron 706 mutantes insercionales de *Arabidopsis* con alteraciones en la morfología foliar (Wilson-Sánchez *et al.*, 2014). Solo uno de estos mutantes, SALK\_047972, al que se denominó *desigual1-1* (*deal1-1*), manifestó asimetría bilateral; era portador de una inserción de ADN-T en el gen At2g32280. Se obtuvieron otros dos mutantes con inserciones de ADN-T en At2g32280, a los que se denominó *deal1-2* y *deal1-3* (Wilson-Sánchez *et al.*, 2018; Figura 4). Durante el desarrollo de este trabajo, el grupo de M.S. Otegui denominó *VASCULATURE COMPLEXITY AND CONNECTIVITY (VCC)* a At2g32280, dado que sus alelos mutantes reducen la complejidad del patrón de venación de los cotiledones (Roschztardt *et al.*, 2014); en este artículo no se mencionó el fenotipo foliar de los mutantes *vcc*. En consecuencia, en esta memoria usamos las denominaciones *vcc-1*, *vcc-2* y *vcc-3* para referirnos a los alelos de At2g32280 inicialmente denominados *deal1-3*, *deal1-1* y *deal1-2*, respectivamente.



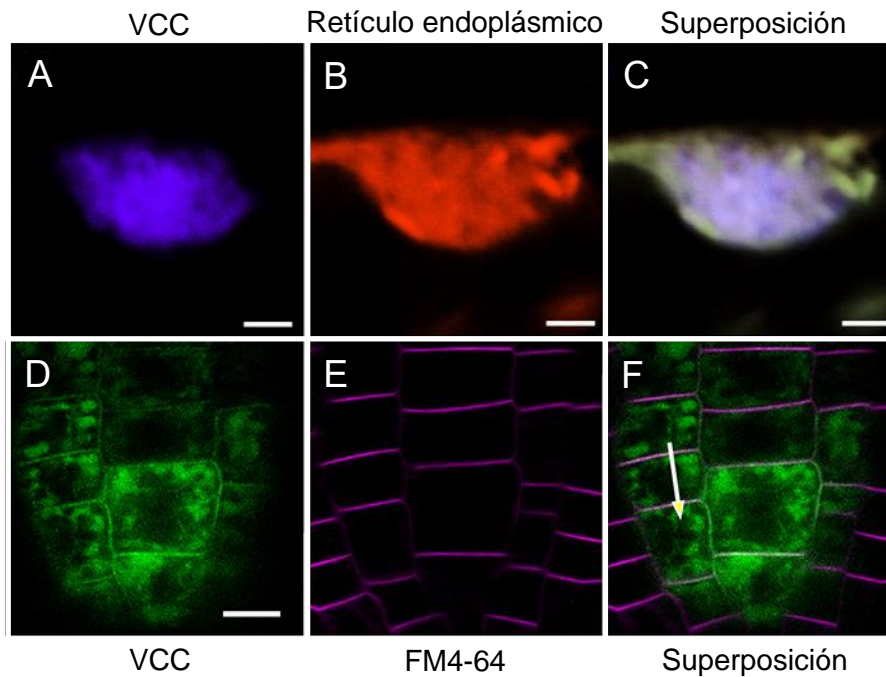
**Figura 4.-** Estructura del gen *VCC* (At2g32280) y fenotipo foliar de su alelo mutante *vcc-2*. (A) Estructura del gen *VCC*, con indicación de la naturaleza molecular de las mutaciones *vcc-1*, *vcc-2* y *vcc-3*. Los exones, intrones e inserciones de ADN-T están representados por rectángulos negros, líneas y triángulos, respectivamente. Los segmentos no traducidos de los exones terminales (líder y tráiler) se indican en blanco. (B, C) Envés de hojas del décimo nudo (B) del tipo silvestre Col-0 y (C) el mutante *vcc-2*. Las fotografías se obtuvieron 25 días después de la estratificación (dde). Barras de escala: 2 mm. Modificadas de Navarro Cartagena (2016) y Wilson-Sánchez *et al.* (2018).

#### III.2.- Observaciones discordantes sobre la localización subcelular de la proteína *VCC*

Para determinar la localización subcelular de *VCC*, en el laboratorio de J.L. Micol se diseñó el transgén  $35S_{pro}:VCC:CFP$ , en el que la expresión de *VCC* está controlada por el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor. Tras su transferencia a plantas, se visualizó la proteína de fusión *VCC:CFP* en el retículo endoplásmico de células foliares y



radiculares de *Arabidopsis* (Wilson-Sánchez *et al.*, 2018; Figura 5A). Esta observación se confirmó mediante un ensayo del doble híbrido de la levadura, en el que se estableció que VCC colocalizaba con las proteínas Alg5 (dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase) y Ost1 (dolichyl-dophosphooligosaccharide-protein glycotransferase) del retículo endoplásmico de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Wilson-Sánchez *et al.*, 2018).



**Figura 5.-** Discrepancia en la localización subcelular de VCC publicada previamente en Wilson-Sánchez *et al.* (2018) y (B) Yanagisawa *et al.* (2021). (A-C) Células de la raíz de una planta *35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP 35S<sub>pro</sub>:AtWAK2:YFP:HDEL* en las que se visualiza (A) la CFP en azul, (B) el marcador del retículo endoplásmico en rojo, y (C) su superposición. (D-F) Células de la región meristemática de la raíz de una plántula (D) en las que se expresa la proteína de fusión *3x-YFP-VCC* (en verde), (E) cuyas membranas plasmáticas habían sido teñidas con FM4-64 (en magenta), y (F) su superposición. Barras de escala: (A-C) 2  $\mu$ m y (D-F) 10  $\mu$ m. Modificadas a partir de (A-C) Wilson-Sánchez *et al.* (2018) y (D-F) Yanagisawa *et al.* (2021).

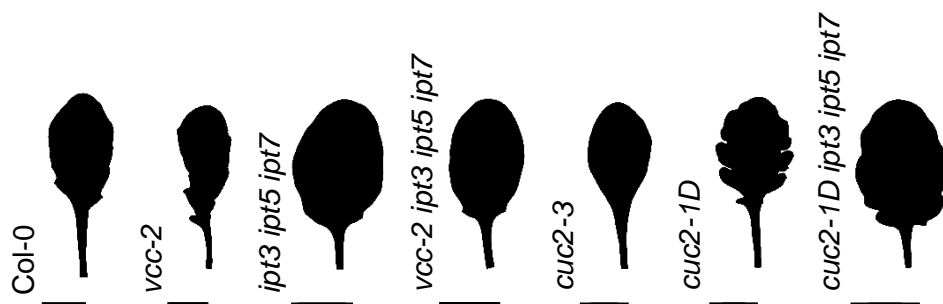
En una publicación posterior del laboratorio de M.S. Otegui se afirmó que VCC se localiza en la membrana plasmática de las células preprocambiales de los cotiledones, y que se degrada en la vacuola de las células que han adquirido la identidad procambial (Yanagisawa *et al.*, 2021; Figura 5D-F). Además, estos autores sugirieron que VCC regulaba la polarización de PIN1 durante la diferenciación vascular. Para determinar la localización subcelular de VCC, dichos autores usaron el transgén *pVCC::tdTomato-VCC*, en el que la expresión de VCC está regulada por su propio promotor endógeno, y su producto proteico está fusionado en su extremo amino a la proteína fluorescente tdTomato. Estos autores

afirmaron que su discrepancia con el laboratorio de J.L. Micol podía deberse a diferencias en el nivel de expresión de *VCC* por el uso de distintos promotores (Yanagisawa *et al.*, 2021).

Debe tenerse en cuenta que ninguno de los transgenes estudiados (*35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP* y *pVCC::tdTomato-VCC*) restablece por completo el fenotipo silvestre en las plantas *vcc* (Wilson-Sánchez *et al.*, 2018; Yanagisawa *et al.*, 2021), lo que indica que ninguna de las fusiones traduccionales obtenidas entre *VCC* y las proteínas fluorescentes CFP y tdTomato es totalmente funcional. Según el grupo de M.S. Otegui, *VCC* estabiliza la polarización de PIN1 en la membrana plasmática de las células preprocambiales (Yanagisawa *et al.*, 2021). Estos autores afirmaron además que la adquisición de la identidad procambial de estas células está reducida en el mutante *vcc-3*, posiblemente por una degradación prematura de PIN1 en la vacuola. La polarización de PIN1 en las células del margen de las hojas de *vcc-2* es similar a la silvestre (Wilson-Sánchez *et al.*, 2018).

### III.3.- Interacciones genéticas entre alelos de los genes *VCC*, *CUC2* e *IPT*

El margen de las hojas de la roseta del triple mutante *ipt3 ipt5 ipt7* es liso. Tal como se ha mencionado antes, las del mutante simple *vcc-2* presentan lóbulos distribuidos asimétricamente respecto a la vena primaria. Este fenotipo se suprime casi totalmente en el cuádruple mutante *vcc-2 ipt3 ipt5 ipt7*. Los fenotipos foliares del mutante nulo *cuc2-3* y el hipermorfo *cuc2-1D* son opuestos: margen liso y muy lobulado, aunque simétrico, respectivamente. El fenotipo de *cuc2-1D* también se suprime casi totalmente en el cuádruple mutante *ipt3 ipt5 ipt7 cuc2-1D*. Estas observaciones sugieren que las citoquininas son necesarias para la formación de lóbulos en el margen foliar (Figura 6).



**Figura 6.-** Interacciones genéticas entre mutaciones que modulan la forma del margen foliar de Arabidopsis. Siluetas de hojas del décimo nudo del tipo silvestre Col-0 y los mutantes *vcc-2*, *ipt3 ipt5 ipt7*, *vcc-2 ipt3 ipt5 ipt7*, *cuc2-3*, *cuc2-1D* y *cuc2-1D ipt3 ipt5 ipt7*. Las fotografías se obtuvieron 25 días después de la estratificación (dde). Barras de escala: 1 cm. Modificada de Navarro-Cartagena, Núñez-Delegido, Olan-Villegas, Wilson-Sánchez, Navarro-Quiles y Micol, sin publicar.

La asimetría foliar de los mutantes *vcc* podría deberse a una desregulación espacial de la señalización de la auxina y CUC2 durante la morfogénesis foliar, proceso en el cual se ha propuesto que también participan las citoquininas (Navarro-Cartagena y Micol, 2023; apartado II.4, en la página 7). Por otra parte, se ha demostrado en el laboratorio de J.L. Micol, mediante un ensayo del doble híbrido de la levadura, que VCC interactúa físicamente con componentes del complejo de elongación de los ácidos grasos de cadena muy larga, que inhiben la biosíntesis de las citoquininas (Navarro-Cartagena, Núñez-Delegido, Olan-Villegas, Wilson-Sánchez, Navarro-Quiles y Micol, sin publicar).

### **III.4.- El agente gelificante Gelrite extrema el fenotipo mutante de las plantas *vcc-2***

Se realizó en el laboratorio de J.L. Micol una búsqueda de condiciones de cultivo que extremaran el fenotipo foliar de *vcc-2*, incrementando su penetrancia, su expresividad o ambas. Se concluyó que en medio de cultivo gelificado con Gelrite, en lugar de con agar para plantas, la asimetría bilateral de *vcc-2* se manifestaba con penetrancia completa y una expresividad muy alta (Navarro-Cartagena, Núñez-Delegido, Olan-Villegas, Wilson-Sánchez, Navarro-Quiles y Micol, sin publicar). El cultivo de la estirpe silvestre Col-0 en medio preparado con Gelrite acelera su crecimiento, alcanzándose un tamaño de roseta mayor que en presencia de agar para plantas. Una explicación plausible de estas observaciones es que el crecimiento acelerado causado por el Gelrite genera un mayor requerimiento de VCC, agravando el fenotipo de las plantas *vcc-2*. A pesar de ello, se desconoce el mecanismo concreto por el cual este agente gelificante modula el crecimiento de la estirpe silvestre de *Arabidopsis* y agrava el fenotipo foliar del mutante *vcc-2*.

### **III.5.- Objetivos de este trabajo**

Los objetivos inicialmente definidos para este Trabajo de Fin de Máster fueron tres: (1) comparar el fenotipo morfológico causado por las mutaciones *vcc-2*, *cuc2-3*, *cuc2-1D* e *ipt3 ipt5 ipt7* y sus combinaciones genéticas, tras el cultivo de los correspondientes mutantes simples y múltiples en las condiciones de cultivo habituales en los laboratorios de M.S. Otegui y J.L. Micol; (2) contribuir a determinar inequívocamente la localización subcelular de VCC, y (3) estudiar la polarización de PIN1 en células de la raíz de plantas *vcc-2*.

Para alcanzar nuestro primer objetivo, nos propusimos analizar las alteraciones de la morfología foliar y el patrón de venación de los cotiledones de los mutantes antes mencionados, cultivándolos en distintas condiciones.

Para alcanzar nuestro segundo objetivo, nos propusimos visualizar mediante

microscopía confocal convencional y de superresolución la localización subcelular de VCC en plantas *vcc-2*  $35S_{pro}:VCC:CFP$ , empleando marcadores fluorescentes del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Además, dado que las construcciones de localización subcelular de VCC obtenidas hasta el momento no rescatan completamente el fenotipo de los mutantes *vcc*, también nos propusimos diseñar nuevos transgenes que permitiesen determinar la localización subcelular de VCC con una mayor fiabilidad. Para ello, se diseñaría un transgén  $VCC_{pro}:VCC:GFP$  que incluyese el promotor endógeno del gen *VCC*, a fin de evitar eventuales artefactos derivados de la elevada concentración de proteínas de fusión que suele producir el promotor 35S. También pretendíamos obtener un transgén  $35S_{pro}:GFP:VCC$  en el que la proteína fluorescente estuviese unida al extremo amino de VCC. Este intento debería dar respuesta a la pregunta de si el rescate fenotípico parcial —y localizaciones subcelulares discordantes— de los transgenes previamente obtenidos se debe a la unión de la GFP al extremo carboxilo de VCC. También nos propusimos obtener un transgén  $35S_{pro}:VCC:YFP$  en el que VCC estuviese fusionada con la proteína amarilla fluorescente (YFP), que es más fotoestable que la GFP, razón por la que es más adecuada para la microscopía de superresolución.

Para alcanzar nuestro tercer objetivo, nos propusimos visualizar la polarización de PIN1 en plantas *vcc* cultivadas en medio preparado con Gelrite, a fin de que la penetrancia de su fenotipo foliar fuese completa, ya que las observaciones publicadas en Wilson-Sánchez *et al.* (2018) fueron realizadas en plantas cultivadas en medio gelificado con agar para plantas, condición en la que la baja penetrancia del fenotipo podría haber dificultado la observación de alteraciones en la polarización de PIN1. Los resultados que esperábamos obtener deberían resultar útiles para determinar la existencia y naturaleza de la relación funcional de VCC y PIN1.

## **IV.- MATERIALES Y MÉTODOS**

## IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria

En esta memoria se han seguido las pautas definidas en varias Tesis doctorales previas (Ponce Molet, 1996; Berná Amorós, 1997; Robles Ramos, 1999; Candela Antón, 2001; Pérez Pérez, 2003; Aguilera Díaz, 2009; Sarmiento Mañús, 2011; Ferrández Ayela, 2012), Trabajos de Fin de Máster (Cabezas Fuster, 2014; Ortega Menaches, 2020) y de Grado (Muñoz Díaz, 2017; Barberá Aurá, 2022; Gallego Serna, 2022), realizados en los laboratorios de J.L. Micol y M.R. Ponce. En este apartado de Materiales y métodos se reproducen literalmente algunos párrafos procedentes de dichos trabajos anteriores.

### IV.2.- Abreviaturas, acrónimos y fórmulas químicas

Se han seguido las normas de la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) en lo referente a la formulación química y las denominaciones de los compuestos empleados en este trabajo. No obstante, se ha preferido usar los acrónimos castellanizados ADN y ARN —de uso común en los medios de comunicación españoles—, en lugar de los recomendados por la IUPAC, DNA y RNA, para los ácidos desoxirribonucleico y ribonucleico, respectivamente. Esta elección no está basada en ningún argumento que se considere incontestable; ambas opciones son aceptadas por el Diccionario de la lengua española (vigésimotercera edición, 2014) de la Real Academia Española (RAE). En esta memoria se usan abreviaturas y acrónimos que se definen la primera vez que aparecen en el texto. Además, se han utilizado las abreviaturas de la Tabla 1, correspondientes en su mayoría a las unidades de medida empleadas, que son las del Sistema Internacional.

**Tabla 1.-** Abreviaturas empleadas en este trabajo

cm: centímetros	min: minutos.	UV: ultravioleta.
dde: días después de la estratificación.	ml: mililitros.	v/v: volumen/volumen.
g: aceleración de la gravedad.	mm: milímetros.	V: voltios.
g: gramos.	mM: milimolar.	W: vatios.
h: horas.	ng: nanogramos.	°C: grados centígrados.
kb: kilobases.	nm: nanómetros.	µg: microgramos.
kg: kilogramos.	pb: pares de bases.	µl: microlitros.
l: litros.	rpm: revoluciones por minuto.	µm: micrómetros.
m/v: masa/volumen.	s: segundos.	µM: micromolar.
M: molar.	U: unidades enzimáticas.	Ω: ohmios.

### IV.3.- Gramática y terminología

Tal como recomienda la RAE en su Ortografía de la lengua española (2010), en esta

memoria no se realiza el plural de las siglas añadiendo al final una s minúscula: se escribe “el ARN” y también “los ARN”. Se emplean aquí algunos extranjerismos de uso común que carecen de una traducción al español generalmente aceptada, como *eppendorf*. El carácter foráneo de estas palabras se ha destacado en cursiva. No se han traducido al español muchos de los nombres de genes y proteínas que se mencionan en esta memoria; en estos casos solo se ha usado la cursiva para los nombres de los genes.

#### IV.4.- Nomenclatura genética

La nomenclatura que se aplica en esta memoria a genes, mutaciones y fenotipos se atiene estrictamente a las pautas propuestas para *Arabidopsis* por Meinke y Koornneef (1997), cuya versión más reciente puede encontrarse en <http://www.arabidopsis.org>. Los alelos de un gen se indican con abreviaturas en cursiva, empleándose las mayúsculas para el silvestre y las minúsculas para los mutantes. Las proteínas se indican en tipografía normal, con mayúsculas. Si existen diferentes genes que han recibido la misma denominación, se les distingue añadiendo un número al grupo de dos, tres o cuatro letras que les denota. Los diferentes alelos mutantes de un gen reciben un distintivo numérico, separado por un guion del identificador del gen. Sirva como ejemplo de lo anterior que hemos estudiado el mutante *vasculature complexity and connectivity-2* (*vcc-2*), portador del alelo *vcc-2* del gen *VASCULATURE COMPLEXITY AND CONNECTIVITY* (*VCC*), cuyo producto es la proteína *VASCULATURE COMPLEXITY AND CONNECTIVITY* (*VCC*).

No existe una nomenclatura de aceptación general para los genotipos de *Arabidopsis*. Hemos empleado la expresión línea (también planta, individuo, semilla, plántula o cualquier órgano) *vcc-2* para referirnos a cualquier homocigoto para esta mutación. Salvo que se indique lo contrario, las plantas que se describen en este trabajo son homocigóticas para las mutaciones que se mencionan en cada caso.

Las fusiones génicas se indican en cursiva, según las instrucciones a los autores de la revista *Plant Cell*: se emplean dos puntos para indicar la fusión entre el promotor de un gen y la región codificante de otro. Los promotores se indican con el nombre abreviado de un gen seguido de la sílaba “pro” en subíndice. Esta nomenclatura se emplea también para indicar que una unidad de transcripción se encuentra bajo el control de su propio promotor. Por ejemplo, la expresión *35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP* se ha utilizado para denotar una construcción en la que la región codificante del gen *VCC* de *Arabidopsis* está fusionada a la región codificante de la proteína fluorescente CFP, y que ambas están bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor.

## IV.5.- Estirpes empleadas en este trabajo

### IV.5.1.- Estirpes de Arabidopsis

Hemos empleado las estirpes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. que se recogen en la Tabla 2. Sus semillas se conservaron en tubos *ependorf* a 4°C.

**Tabla 2.-** Estirpes de Arabidopsis usadas en este trabajo

Estirpe	Código del NASC	Mutágeno y mutación	Genes mutados	Origen
Col-0	N1092	Tipo silvestre	-	1
<i>vcc-2</i>	N547972	ADN-T en el 3 <sup>er</sup> exón	At2g32280	1
<i>vcc-2 35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP</i>	-	ADN-T en el 3 <sup>er</sup> exón	At2g32280	5
<i>cuc2-3</i>	-	ADN-T 99 pb aguas arriba del codón ATG	At5g53950	3
<i>cuc2-1D</i>	N16485	EMS	At5g53950	2
<i>ipt3 ipt5 ipt7</i>	-	ADN-T en el 1 <sup>er</sup> , 2 <sup>o</sup> y 1 <sup>er</sup> exón, respectivamente	At3g63110, At5g19040 y At3g23630, respectivamente	4
<i>vcc-2 35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP</i>	-	ADN-T en el 3 <sup>er</sup> exón	At2g32280	5
<i>35S<sub>pro</sub>:AtWAK2:YFP:HDEL</i>	-			
<i>vcc-2 35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP</i>	-	ADN-T en el 3 <sup>er</sup> exón	At2g32280	5
<i>35S<sub>pro</sub>:Man49:YFP</i>	-			
<i>PIN1<sub>pro</sub>:PIN1:GFP</i>	-	-	-	5
<i>vcc-1 PIN1<sub>pro</sub>:PIN1:GFP</i>	-	ADN-T en el 1 <sup>er</sup> intrón	At2g32280	5

El fondo genético de todas las estirpes utilizadas en este trabajo es Col-0. <sup>1,2</sup>Obtenidas inicialmente del <sup>1</sup>ABRC o el <sup>2</sup>NASC y replicadas varias veces por autofecundación en el laboratorio de J.L. Micol. <sup>3</sup>P. Laufs. <sup>4</sup>T. Kakimoto. <sup>5</sup>Wilson-Sánchez *et al.* (2018).

### IV.5.2.- Estirpes bacterianas

En este trabajo se ha usado *Escherichia coli* DH5α. Para su conservación a -80°C, se realizaron cultivos en medio líquido, en presencia de los antibióticos necesarios (apartado IV.7.2.3, en la página 20), y se tomaron a continuación 500 µl de cada uno de ellos en un tubo *ependorf*, que se mezclaron mediante agitación en un *vortex* con 500 µl de glicerol al 30% esterilizado en autoclave, para congelarlos por inmersión en nitrógeno líquido.

## IV.6.- Cultivos

### IV.6.1.- Parámetros de crecimiento de Arabidopsis

Los cultivos de Arabidopsis se realizaron en placa de Petri o en maceta a partir de semillas que habían sido previamente conservadas a 4°C por 24 h.



#### IV.6.1.1.- Cultivo en placa de Petri

La mayoría de los cultivos se iniciaron en placas de Petri de 14 cm de diámetro, que contenían unos 100 ml de medio sólido GM (apartado IV.7.1.2, en la página 19). La siembra de las semillas de *Arabidopsis* se llevó a cabo tras su esterilización por inmersión con agitación, durante 8 min, en una disolución acuosa del 40% en lejía comercial (NaClO al 4-5% m/v) y 2 ml/l de Triton X-100 al 1% v/v, realizando a continuación tres lavados sucesivos con agua esterilizada. Las semillas se estratificaron durante 24 h a 4°C y en la oscuridad, con el fin de sincronizar su germinación.

La siembra en placas de Petri se realizó con material estéril, en cabinas de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Se sembraron de 16 a 100 semillas por placa de Petri, espaciándolas regularmente sobre la superficie del medio con la ayuda de una pipeta Pasteur y una plantilla dispuesta bajo la placa. Tras su siembra, las placas fueron precintadas con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, que constituye una barrera efectiva para cualquier partícula en aerosol sin impedir el intercambio de gases.

Las semillas se cultivaron a 50-60% de humedad relativa y  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  bajo luz continua o a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  bajo condiciones de fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, bajo iluminación de unos  $75 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$  de luz blanca, suministrada por tubos fluorescentes Sylvania Standard F20W/133-RS Cool White o tubos led ToLEDo T8 10 W 4000 K Cool White en cámaras de cultivo Conviron TC16.

Las plantas de interés, cuyo cultivo se había iniciado mediante siembra en placa de Petri, fueron posteriormente trasplantadas a macetas, en las que completaron su ciclo de vida en los parámetros que se detallan en el apartado siguiente.

#### IV.6.1.2.- Cultivo en maceta

Los cultivos en maceta se efectuaron en bandejas de plástico de 28 x 50 cm, con 42 alveolos, cada uno de ellos de 5 x 5 cm (diámetro x altura), introducidas en cubetas de 7 cm de profundidad. Se introdujo en cada alveolo, previamente a su relleno con el sustrato, una maceta de rejilla de 5 x 5 cm (diámetro x altura), que impide que el sustrato se adhiera al alveolo, facilitando la extracción de las plantas para la realización de cruzamientos o la recolección de semillas. Se empleó como sustrato una mezcla de perlita (granulometría de 1 a 3 mm;  $105\text{-}125 \text{ kg/m}^3$ ), vermiculita (granulometría de 1 a 3 mm;  $80\text{-}100 \text{ kg/m}^3$ ) y turba no fertilizada (turba rubia de musgo *Sphagnum*, de estructura gruesa; Grobmull Neuhaus), en una proporción volumétrica 2:2:1. Cada alveolo se destinó al cultivo de una sola planta, que en la mayoría de los casos fue trasplantada con pinzas, desde la placa de Petri en la que había permanecido durante las primeras tres semanas de su ciclo de vida.

Las plantas recién trasplantadas permanecieron durante 6 días cubiertas con un plástico transparente, en el que se realizaron algunos agujeros para reducir la condensación de agua. Cuando se manifestó el alzado y la elongación de los entrenudos al término de la etapa vegetativa, se aisló a las plantas trasplantadas enfundándolas con cilindros de plástico transparente, denominados aracones (aracons; Beta Tech), que impiden el contacto entre individuos adyacentes y facilitan la recolección de las semillas.

Para obtener plantas para la transformación de sus órganos florales mediante infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*, se sembraron alrededor de 50 semillas por maceta, en macetas de 10 × 10 × 10 cm (largo × ancho × alto) colocadas en una bandeja que se cubrió con un plástico transparente. Este último fue retirado 6 días después, a fin de que las plantas crecieran hasta alcanzar el tamaño óptimo para su transformación, que suele hacerse unas 5 o 6 semanas después de la siembra.

Los cultivos en maceta se mantuvieron en una cámara climática visitable, a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  y 50-60% de humedad relativa, bajo iluminación continua, con luz blanca suministrada por tubos led ToLEDo T8 20 W 4000 K Cool White, totalizando unos  $75 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ .

Las macetas y bandejas de alveolos estuvieron permanentemente subirrigadas, manteniéndose un nivel de unos 2-3 cm de agua en el fondo de las cubetas. El aporte de nutrientes se llevó a cabo dos veces por semana, mediante la adición de medio mínimo ATM (apartado IV.7.1.1, en la página 18). Se suspendió el riego cuando la floración se interrumpió, para propiciar el secado de las plantas, que fueron mantenidas en la cámara al menos dos semanas más, para proceder finalmente a la recolección de sus semillas.

#### **IV.6.1.3.- Recolección de semillas**

Para la recolección de todas las semillas de una planta seca, producto de su autofecundación, se restregó dicha planta contra un colador, que se sujetó sobre un papel de filtro. La mezcla de semillas, fragmentos de silicuas y otras partes secas de la planta que cayó sobre el papel fue cribada con un colador de malla más fina que la del primero. Se eliminaron así todas las partículas más grandes que las semillas. Estas últimas se almacenaron en tubos *ependorf*, que se conservaron a  $4^\circ\text{C}$ .

#### **IV.6.2.- Condiciones de los cultivos microbianos**

Los cultivos líquidos se realizaron en recipientes estériles, cuya capacidad excedía al menos dos veces el volumen de medio utilizado, garantizando así una aireación suficiente durante la incubación. Se empleó una agitación de 225 rpm en un incubador dotado de una plataforma orbital (NBS Innova 44, 4000 o 4260) que se mantuvo a  $37^\circ\text{C}$ .

Los cultivos en placas de Petri se inocularon con una micropipeta con 100  $\mu$ l de precultivo líquido, que fue esparcido por agitación manual, haciendo que rodaran sobre la superficie del medio 5-8 perlas de vidrio estériles, de 3 mm de diámetro. Se realizaron siembras por estría para la verificación de la presencia y el tamaño esperado de insertos en colonias presuntamente transformantes.

#### IV.7.- Disoluciones

Se usó siempre agua desionizada, con una resistividad media de 15  $M\Omega/mm^2 \cdot m$ . El agua se esterilizó en autoclave, y las disoluciones se conservaron a temperatura ambiente, salvo que se indique lo contrario.

##### IV.7.1.- Medios de cultivo para Arabidopsis

Los medios de cultivo para plantas se prepararon disolviendo sus componentes en agua. Todas las esterilizaciones en autoclave se efectuaron a 1  $kg/cm^2$  y 121°C durante 20 min. Las sustancias termolábiles fueron esterilizadas mediante filtración forzada por aspiración, a través de filtros Millipore de 0,22 o 0,45  $\mu m$  de diámetro de poro. Su adición a un medio de cultivo esterilizado en autoclave se realizó tras estabilizar a este último a 55°C.

##### IV.7.1.1.- Medios de cultivo líquidos

**Medio mínimo ATM:**  $KNO_3$  5 mM;  $KH_2PO_4$  2,5 mM;  $MgSO_4$  2 mM;  $Ca(NO_3)_2$  2 mM; FeNaEDTA 51  $\mu M$ ;  $H_3BO_3$  70  $\mu M$ ;  $MnCl_2$  14  $\mu M$ ;  $CuSO_4$  0,5  $\mu M$ ;  $ZnSO_4$  1  $\mu M$ ;  $NaMoO_4$  0,2  $\mu M$ ; NaCl 10  $\mu M$  y  $CoCl_2$  0,01  $\mu M$  (Kranz y Kirchheim, 1987).

Para su preparación, se añadieron, a 900 ml de agua, 5 ml de  $KNO_3$  1 M; 2,5 ml de  $KH_2PO_4$  1 M; 2 ml de  $MgSO_4$  1 M; 2 ml de  $Ca(NO_3)_2$  1 M; 2 ml de FeNaEDTA 20 mM, y 1 ml de la disolución de micronutrientes, ajustando el volumen final a 1 l. Todas las disoluciones madre se prepararon en las concentraciones indicadas y se esterilizaron por filtración. Las disoluciones madre de las sales deben añadirse a los 900 ml de agua, y no a la inversa, a fin de evitar la precipitación de complejos insolubles de fosfato cálcico.

La composición de la disolución de micronutrientes es la siguiente:  $H_3BO_3$  70 mM;  $MnCl_2$  14 mM;  $CuSO_4$  0,5 mM;  $ZnSO_4$  1 mM;  $NaMoO_4$  0,2 mM; NaCl 10 mM, y  $CoCl_2$  0,01 mM. Se preparó añadiendo, a 900 ml de agua, 4,32 g de  $H_3BO_3$ ; 2,77 g de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ; 124 mg de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ; 287 mg de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 48,7 mg de  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ ; 584,4 mg de NaCl, y 2,38 mg de  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ . Finalmente, se añadió agua hasta 1 l.

#### IV.7.1.2.- Medios de cultivo sólidos

Los medios de cultivo sólidos se prepararon por adición de agar para plantas (Plant Agar; Duchefa), a una concentración final del 0,6% y 0,7% m/v, o por adición de Gelrite (Duchefa), a una concentración final del 0,6% m/v, tras la disolución del resto de los componentes en agua. Una vez finalizada su esterilización en autoclave, los medios de cultivo se mantuvieron durante 30 min en un baño a 55°C antes de su vertido en placas de Petri, que se realizó en cabinas de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Las placas de Petri con medio sólido se conservaron hasta un mes a 4°C, en posición invertida y precintadas.

**Medio GM (Germination Medium):** NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 10,3 mM; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 50,1 μM; CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,05 μM; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,05 μM; Na<sub>2</sub>EDTA 55,4 μM; MgSO<sub>4</sub> 0,75 mM; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 50 μM; NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,5 μM; KI 2,5 μM; KNO<sub>3</sub> 9,4 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,62 mM; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 15 μM; sacarosa 29,2 mM; MES [ácido 2-(N-morfolino)-etano sulfónico] 2,3 mM, y 7,5 g/l de agar para plantas o 6 g/l de Gelrite.

Para su preparación, se añadieron, a 900 ml de agua, 2,2 g de sales de Murashige y Skoog (Duchefa; Murashige y Skoog, 1962), 10 g de sacarosa y 0,5 g de MES (ácido 2-[N-morfolino]etano sulfónico). Se agitó la suspensión hasta la total disolución de sus componentes y se ajustó el pH a 5,7 con KOH 1 M. Posteriormente, se ajustó el volumen a 1 l y se añadieron 6 o 7 g de agar para plantas, o 6 g de Gelrite. Se esterilizó en autoclave.

#### IV.7.2.- Medios de cultivo para microorganismos

##### IV.7.2.1.- Medios de cultivo líquidos

**LB (Luria - Bertani; Bertani, 1951):** 1% m/v de bacto-triptona; 0,5% m/v de extracto de levadura, y 1% m/v de NaCl. Para preparar un litro de medio se mezclaron 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Se añadió agua hasta 1 l, se ajustó el pH a 7,5 con NaOH 5 M y se esterilizó en autoclave.

##### IV.7.2.2.- Medios de cultivo sólidos

Los medios de cultivo sólidos para *Escherichia coli* fueron preparados por adición de agar bacteriológico europeo (Pronadisa), tras la disolución del resto de los componentes en agua. La concentración de agar (m/v) fue del 1,5%. Una vez finalizada su esterilización en autoclave, los medios de cultivo se mantuvieron durante 30 min en un baño a 55°C antes de su vertido en placas de Petri de 90 mm de diámetro, que se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal.

### IV.7.2.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos

Algunos de los medios anteriormente descritos se suplementaron con el antibiótico carbenicilina a una concentración final de 100 mg/l. Se prepararon disoluciones madre a una concentración mil veces superior a la de trabajo, disolviéndolos en agua y esterilizándolas por filtración, y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , alicuotadas en tubos *ependorf* de 1,5 ml. La disolución del antibiótico se añadió al medio después de la esterilización de este último en autoclave, y tras mantenerlo a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 30 min en un baño termostatzado.

### IV.7.3.- Tampones y otras disoluciones de uso general

#### IV.7.3.1.- Disoluciones para extracción de ADN

**Tampón de extracción:** Tris-HCl 100 mM pH 8,0;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  50 mM, y NaCl 0,5 M. Para preparar 50 ml de tampón TE se añadieron 5 ml de Tris-HCl 1 M, 5 ml de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,5 M y 5 ml de NaCl 5M a 35 ml de agua estéril. Puede conservarse varios meses a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**SDS al 20%:** Se preparó disolviendo, a  $68^{\circ}\text{C}$ , 100 g de SDS (dodecilo sulfato de sodio) en 500 ml de agua y ajustando el pH a 7,2 con HCl 1 N.

**Acetato de potasio 5 M:** Se preparó disolviendo, a  $50^{\circ}\text{C}$ , 49,1 g de  $\text{KCH}_3\text{COO}$  en 50 ml de agua y ajustando el pH a 7,5 con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial. Se añadió agua hasta 100 ml.

**Acetato de sodio 3 M:** Se preparó disolviendo 49,1 g de  $\text{NaKCH}_3\text{COO}$  en 300 ml de agua y ajustando el pH a 5,2 con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial. Se añadió agua hasta 500 ml.

#### IV.7.3.2.- Disoluciones para electroforesis

**Tampón TAE 50x:** Tris-base [Tris-(hidroximetil)aminometano] 2 M; 5,71% v/v de  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  50 mM pH 8,0. El pH final debe ser 7,6. Para preparar 1 l se mezclaron 242 g de Tris-base, 57,1 ml de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial y 100 ml de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,5 M pH 8,0.

**Tampón de carga 6x para electroforesis en geles de agarosa:** 20% m/v de Ficoll; 0,25% m/v de xilencianol; 0,25% m/v de azul de bromofenol, y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  10 mM.

**Marcador de peso molecular para electroforesis en geles de agarosa:** Se diluyó el marcador (1 kb Plus DNA ladder de Invitrogen;  $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en tampón de carga hasta una concentración de  $0,1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Se usaron 6  $\mu\text{l}$  por pocillo de un gel. Se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### IV.7.3.3.- Disoluciones para obtener bacterias competentes

**TFBI (transformation buffer I):**  $\text{KCH}_3\text{COO}$  30 mM; RbCl 100 mM;  $\text{CaCl}_2$  10 mM;  $\text{MnCl}_2$  50 mM, y 15% en glicerol. Para preparar 100 ml se mezclan 20 ml de RbCl 0,5 M; 2 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,5 M; 10 ml de  $\text{MnCl}_2$  0,5 M; 294 mg de  $\text{KCH}_3\text{COO}$ , y 11,9 ml de glicerol. Se añadió agua hasta 100 ml, se ajustó el pH a 5,8 con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial previamente diluido al 10% y

se esterilizó por filtración. Se conservó a 4°C.

**TFBII (transformation buffer II):** MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico] 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 75 mM; RbCl 10 mM, y 15% en glicerol. Para preparar 100 ml se mezclaron 5 ml de MOPS 0,5 M; 37,5 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,5 M; 5 ml de RbCl 0,5 M, y 29,7 ml de glicerol. Se añadió agua hasta 100 ml, se ajustó el pH a 6,5 con KOH 1 N y se esterilizó por filtración. Se conservó a 4°C.

#### IV.7.3.4.- Disoluciones para marcaje de las paredes celulares

**Yoduro de propidio:** Se preparó una disolución madre de 10 mg/ml disolviendo 10 mg de yoduro de propidio en 1 ml de agua, que se conservó a 4°C protegida de la oscuridad. Para realizar las tinciones se usó una disolución a 10 µg/ml, preparada diluyendo 10 µl de la disolución madre en 10 ml de agua, que se desechó el mismo día.

### IV.8.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

#### IV.8.1.- Síntesis de ADN

##### IV.8.1.1.- Síntesis de oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos usados en este trabajo fueron sintetizados por Merck.

**Tabla 3.-** Oligonucleótidos usados en este trabajo

Propósito	Nombre	Secuencia (5'→3')
Genotipado de ADN-T	SALK_047972_LP	GATGTAGCTGCTGCAATCCTC
	SALK_047972_RP	TTTCAAGTTTCCCGTGACAAG
	LbB1.3	ATTTTGCCGATTTGGAAC
	SALK_093023_LP	TTTGGATCTGGGTGTCTTGAG
	SALK_093023_RP <sup>c</sup>	GTGAAAGAGTAACCACGCTCG
Genotipado de las plantas 35S <sub>pro</sub> :VCC:CFP	SALK_047972_LP	GATGTAGCTGCTGCAATCCTC
	CFP_R	GACTTGAAGAAGTCGTGCTGC
Construcción del transgén 35S <sub>pro</sub> :GFP:VCC	At2g32280_attB_3_F <sup>a</sup>	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctCCATGACAAAGATAGGAGGTA
	At2g32280_R_Y2H <sup>b</sup>	ggggaccactttgtacaagaagctgggtCGTGACACTTTGTCACTTAGC
Construcción del transgén 35S <sub>pro</sub> :VCC:YFP	At2g32280_attB_2_F <sup>a</sup>	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctgaaAATGACAAAGATAGGAGGTA
	At2g32280_attB_2_R <sup>b</sup>	ggggaccactttgtacaagaagctgggtACTTAGCTTCATCTTTGGCCG
Construcción del transgén VCC <sub>pro</sub> :VCC:GFP	At2g32280_attB_1_F <sup>a</sup>	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctctgACCTTCACTCATGTTTAATC
	At2g32280_attB_2_R <sup>b</sup>	ggggaccactttgtacaagaagctgggtACTTAGCTTCATCTTTGGCCG
Secuenciación y genotipado de transgenes	At2g32280_RT_F <sup>c</sup>	CACATCACCATTTTCTCTCCATT
	M13R <sup>c</sup>	GGAAACAGCTATGACCATGAT

<sup>a,b</sup>Sus extremos 5' incluyen las secuencias <sup>a</sup>attB1 y <sup>b</sup>attB2, que se indican en minúsculas. <sup>c</sup>Se emplearon como cebadores en reacciones de secuenciación.

### **IV.8.1.2.- Amplificaciones mediante PCR**

Hemos realizado amplificaciones mediante PCR con varios propósitos. Se usó la enzima GoTaq Flexi (Promega) para las amplificaciones de ADN genómico de *Arabidopsis* o ADN plasmídico; es una versión recombinante, barata y suficientemente procesiva, de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*. Cuando se precisó una gran fidelidad de copia, como para la síntesis de moléculas recombinantes, se empleó la polimerasa Phusion (Finnzymes), cuya tasa de error es cincuenta veces menor.

Los cebadores y los desoxirribonucleótidos se añadieron a una concentración final de 0,4  $\mu$ M y 0,2 mM, respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos *ependorf* de pared fina de 0,2 ml, en termocicladores BioRad T100 Thermal Cycler. Los volúmenes de reacción oscilaron entre 10 y 30  $\mu$ l.

Los programas de PCR que hemos usado incluían una etapa previa de calentamiento a 95°C durante 2 min, seguida de 35 ciclos en los que se repetía una fase de 20 s a 95°C para desnaturalizar los moldes, otra de 15 s a la temperatura de hibridación de los cebadores y una final a 72°C para la polimerización, cuya duración dependió del tamaño del producto de PCR esperado, a razón de 1 min/kb en el caso de la polimerasa GoTaq Flexi, o de 30 s/kb en el caso de la Phusion. Se programó una etapa final, no cíclica, de 10 min a 72°C, para el rellenado de las moléculas bicatenarias con colas 5' sobresalientes.

Se programaron temperaturas de hibridación entre 5 y 10°C inferiores a las de fusión ( $T_m$ ), que se calcularon con los programas  $T_m$  Calculator y Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific). Este último calcula también la probabilidad de que un oligonucleótido forme apareamientos intracatenarios y autodímeros.

### **IV.8.2.- Aislamiento de ácidos nucleicos**

#### **IV.8.2.1.- Aislamiento de ADN genómico de *Arabidopsis* para su amplificación por PCR**

El ADN genómico utilizado como molde en las mezclas de PCR fue purificado según Dellaporta *et al.* (1983), con algunas modificaciones. Se introdujo en un tubo *ependorf* una planta entera recolectada 14 dde y se le añadieron 500  $\mu$ l de tampón de extracción, macerándola en un macerador automático (Mixermill 300, Qiagen). A continuación, se añadieron 35  $\mu$ l de SDS al 20%, incubando la mezcla en un baño termostático a 65°C durante 5 min. Finalmente, se añadieron 130  $\mu$ l de KCH<sub>3</sub>COO 5 M, incubando durante 15 min a 4°C, y centrifugando durante 10 min a 13.000 rpm (14.927 g) en una microfuga. El sobrenadante se transfirió a un tubo *ependorf* vacío, se precipitó durante 20 min a -20°C con 640  $\mu$ l de isopropanol y 60  $\mu$ l de NaCH<sub>3</sub>COO 3 M, y se centrifugó durante otros 10 min a

10.000 rpm. El precipitado se lavó con 300 µl de etanol del 70% y se centrifugó una vez más durante 5 min, tras lo cual se dejó secar a temperatura ambiente, para resuspenderlo después en 300 µl de agua y almacenar la disolución a 4°C.

#### **IV.8.2.2.- Aislamiento de ADN plasmídico**

Hemos llevado a cabo preparaciones a pequeña escala de ADN o minipreparaciones (minipreps), a partir de cultivos bacterianos de 4 ml de medio líquido, empleando un GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific). La determinación espectrofotométrica de la concentración de ADN se realizó en un NanoPhotometer P360 (Implen).

#### **IV.8.3.- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa**

Se utilizaron geles del 1% m/v en agarosa para las electroforesis de ADN, que se realizaron en cubetas horizontales, empleando como electrolito TAE 1× (apartado IV.7.3.2, en la página 20). La disolución de la agarosa en el tampón se llevó a cabo mediante calentamiento en un microondas. Una vez enfriada la disolución a 55°C se añadió bromuro de etidio hasta una concentración de 0,5 µg/ml. Las electroforesis se llevaron a cabo a voltaje constante: se aplicaron 90 V en geles preparados con 50 ml de TAE 1× y 120 V para volúmenes mayores (75, 100 y 200 ml). La visualización de las moléculas se consiguió iluminando los geles con luz UV de 312 nm, obteniéndose las correspondientes fotografías en un documentador de geles Vilber E-Box VX5.

Para extraer el ADN de un gel de agarosa, se recortó la banda correspondiente con una cuchilla enmangada y se transfirió el bloque así obtenido a un tubo *ependorf* de 1,5 ml. El ADN se extrajo del bloque de agarosa empleando un Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **IV.8.4.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN**

Se utilizó la variante semiautomatizada y fluorescente del método de Sanger, que se basa en el uso de didesoxinucleótidos terminadores (Smith *et al.*, 1986) marcados con fluorocromos. Las secuencias fueron obtenidas por STAB VIDA, empresa a la que se enviaron muestras que contenían 1.500 ng del ADN plasmídico obtenido de una minipreparación. También se enviaron a esta empresa 5 µl de las disoluciones 10 µM de cada cebador de secuenciación (Tabla 3, en la página 21). Algunas posiciones ambiguas en las secuencias obtenidas pudieron esclarecerse mediante la magnificación de los electroferogramas, usando el programa FinchTV v1.4.0 (<http://geospiza.com>).

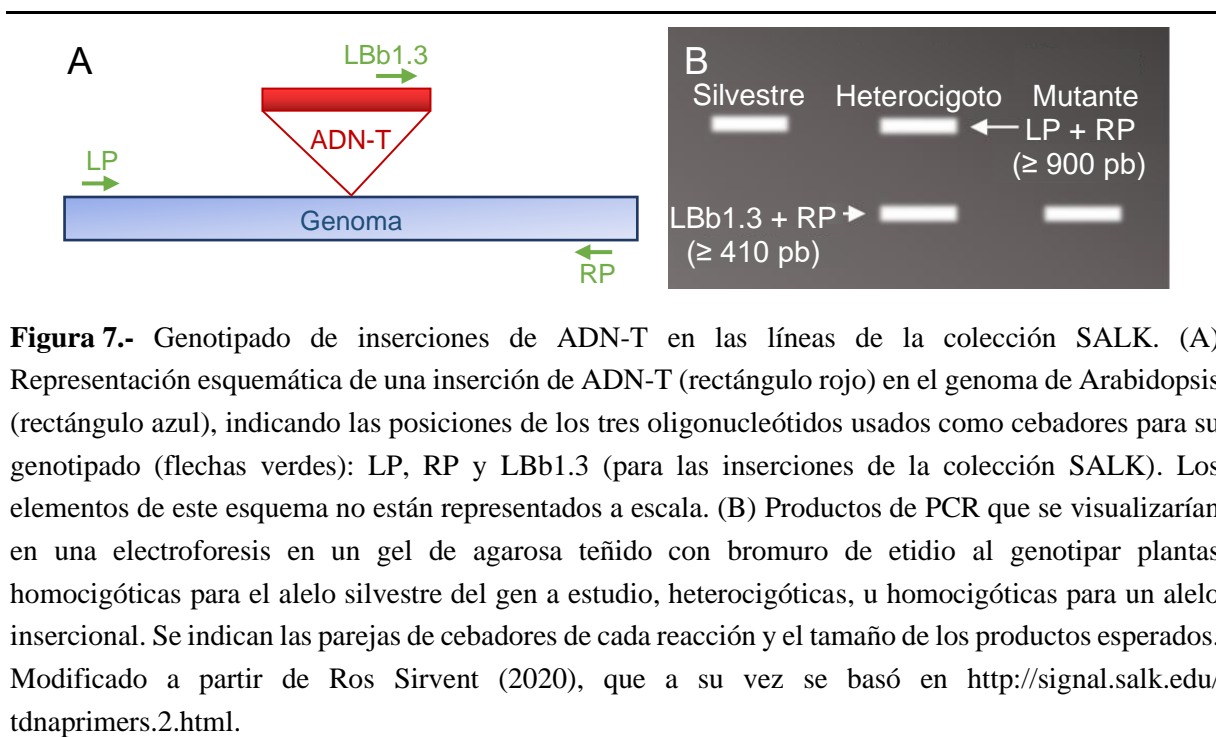
Las secuencias de ADN de *Arabidopsis* se obtuvieron de la base de datos del TAIR



(<https://www.arabidopsis.org/>). Los productos de secuenciación se visualizaron por medio del programa FinchTV versión 1.4.0, para luego llevar a cabo el análisis comparativo de secuencias por medio de Benchling (<https://benchling.com>).

#### IV.9.- Genotipado de mutantes insercionales mediante PCR

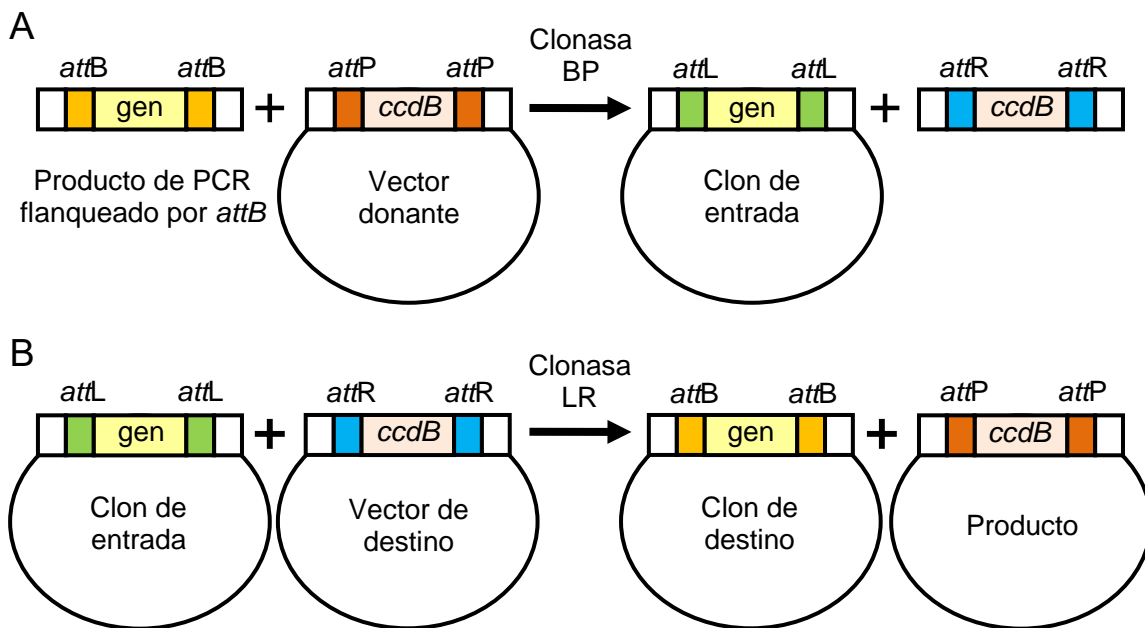
Se usaron tres oligonucleótidos para verificar la presencia de las inserciones de ADN-T de los mutantes insercionales a estudio (Figura 7). Se realizaron dos amplificaciones: (a) una con dos cebadores específicos de la región genómica que flanquea la inserción (LP y RP), y (b) la segunda con el cebador RP y otro que hibrida con uno de los extremos del ADN-T (LBb1.3). La visualización de los productos de la amplificación en un gel de agarosa permite establecer si las plantas son homocigóticas o heterocigóticas para dicha inserción.



#### IV.10.- Obtención de líneas transgénicas mediante la tecnología Gateway

Los vectores más usados para la clonación y expresión de genes son los basados en la tecnología Gateway (Invitrogen; Figura 8, en la página 25), que permiten la clonación y subclonación de insertos de secuencias específicas sin restrictasas ni ligasas, las herramientas clásicamente empleadas para la construcción de moléculas recombinantes (Hartley *et al.*, 2000). La tecnología Gateway permite insertar una molécula de interés en un vector mediante recombinación específica de sitio, mediada por recombinasas del fago  $\lambda$  de *Escherichia coli* (Landy, 1989). Su primera etapa es la reacción BP, en la que se usa un vector

de entrada o donante, que presenta dos secuencias *attP* diferentes (*attP1* y *attP2*) que flanquean un gen que codifica la proteína *ccdB*, que es tóxica para la mayoría de las estirpes de laboratorio de *Escherichia coli*. La molécula con la que se desea reemplazar al gen *ccdB* debe estar flanqueada por dos secuencias *attB* (*attB1* y *attB2*). La clonasa BP (Mix Clonasa BP II, Invitrogen) es una mezcla de la Integrasa (Int) del fago  $\lambda$  y el Factor de Integración del Hospedador (IHF) de *Escherichia coli*, que recombina las secuencias *attP* con las *attB*. La molécula resultante, cuyo inserto queda flanqueado por las secuencias *attL*, recibe el nombre de construcción de entrada (Figura 8A) y las colonias que la contienen, clones de entrada.

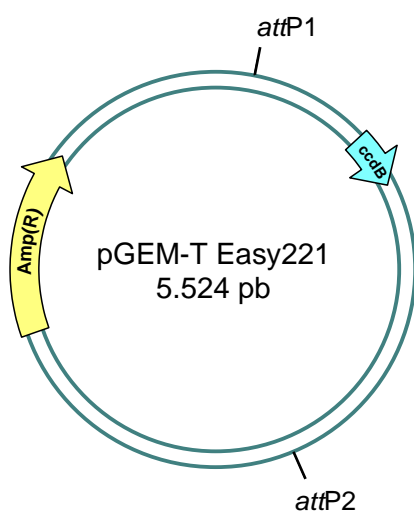


**Figura 8.-** Clonación y subclonación de un inserto en vectores Gateway. Se representa esquemáticamente el proceso de generación de los clones de (A) entrada y (B) destino para un gen amplificado mediante PCR empleando cebadores con secuencias *attB* en sus extremos 5'. Tomada de Micol Ponce (2011), que a su vez la modificó del catálogo *Gateway Technology* de Invitrogen.

La construcción de entrada actúa como intermediaria en el proceso ya que, en la etapa siguiente, denominada reacción LR, el inserto de interés se escinde del vector donante para ser subclonado en el de destino, que contiene las secuencias *attR*, empleando la clonasa LR (Mix Clonasa LR II, Invitrogen), formada por la Int, el IHF y la escisionasa Xis del fago  $\lambda$ . En la construcción de destino, el inserto de interés queda flanqueado por secuencias *attB* (Figura 8B, en la página 25). Las principales ventajas de esta tecnología son su rapidez y versatilidad, la eliminación de los problemas asociados al uso de las enzimas de restricción y la direccionalidad de la clonación. Las secuencias *att* permiten la transferencia rápida y sencilla

del inserto desde el vector de entrada a los de destino, lo que permite expresarlo en cualquier organismo bajo el control de cualquier promotor. Con esta tecnología se evitan los falsos positivos, gracias a la toxicidad de la proteína *ccdB*.

Hemos empleado la tecnología Gateway para clonar insertos en el vector de entrada pGEM-T Easy221 (Figura 9), desarrollado en el laboratorio de B. Scheres a partir del pGEM-T Easy de Promega, incorporándole el gen tóxico *ccdB*, flanqueado por las secuencias *attP1* y *attP2*. Este vector contiene un gen de resistencia a carbenicilina, para su uso como marcador seleccionable en *Escherichia coli*. Las reacciones BP se incubaron durante 24 h a 25°C y se interrumpieron con 0,5 µl de proteinasa K (2 µg/µl), a 37°C durante 10 min.



**Figura 9.-** Mapa del vector de entrada pGEM-T Easy221 empleado en este trabajo. Se destacan las secuencias *attP1* y *attP2*, el marcador de resistencia a ampicilina *Amp(R)*, que también confiere resistencia a carbenicilina, y el gen tóxico *ccdB*. Las flechas indican el sentido de la transcripción. Tomado de Navarro Quiles (2015). El plásmido se dibujó con el programa pDRAW32 en base a la información aportada por B. Scheres y Earley *et al.* (2006).

## IV.11.- Transformación de células bacterianas

### IV.11.1.- Obtención de bacterias quimiocompetentes

La preparación de células de *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes se llevó a cabo según Maniatis *et al.* (1982), con modificaciones. Se inocularon cultivos de 100 ml de medio líquido LB con *Escherichia coli*, y se incubaron a 225 rpm y 37°C hasta que se alcanzó una absorbancia a 600 nm ( $A_{600}$ ) de 0,6-0,8. A continuación, se enfriaron durante 5 min en hielo y se centrifugaron a 4°C y 5.500 rpm (5.445 g) durante otros 5 min. Tras decantar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 10 ml de TFB I (apartado IV.7.3.3, en la página 20). Se centrifugó otra vez, a 4°C y 4.500 rpm (3.645 g) durante 5 min, decantando el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en 4 ml de TFB II (apartado IV.7.3.3). Las células preparadas de este modo se distribuyeron en alícuotas de 200 µl, que se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

### **IV.11.2.-Transformación por choque térmico**

Se añadieron 5 µl de una disolución de ADN plasmídico, obtenida según se indica en el apartado IV.8.2.2, en la página 23, a un tubo *ependorf* que contenía 50 µl de células competentes de *Escherichia coli* DH5α, que se mantuvo en hielo durante 5 min. El tubo se sometió a continuación a un choque térmico, durante 90 s en un baño termostatzado a 42°C, depositándolo después en hielo. Se añadió a continuación 1 ml de medio líquido LB, incubando a 225 rpm durante 1 h a 37°C. El cultivo se centrifugó a 3.200 rpm durante 2 min y se eliminaron 950 µl del sobrenadante con una micropipeta. Se resuspendió el sedimento en el sobrenadante restante y se esparció el contenido del tubo, empleando bolas de vidrio, sobre el medio de cultivo sólido, suplementado con antibiótico, de una placa de Petri de 90 mm de diámetro. Las placas de Petri se incubaron durante 24 h en una estufa a 37°C.

### **IV.12.- Caracterización fenotípica de estirpes de Arabidopsis**

#### **IV.12.1.- Observación microscópica y microfotografía**

Las observaciones de rutina de las plantas se llevaron a cabo con una lupa binocular Olympus SZ30 60TR. Las fotografías de plantas cultivadas en placas se tomaron con una lupa trinocular Nikon SMZ1500, dotada de una cámara fotográfica Nikon DS-Ri2, con iluminación provista por una fuente de luz led anular de 72 mm de diámetro HAYEAR MSCled72. Los reflejos de la luz incidente sobre el medio de cultivo fueron eliminados de las fotografías con el programa Adobe Photoshop CS3.

#### **IV.12.2.- Visualización y análisis morfométrico del patrón de venación**

Para el estudio de su patrón de venación, las hojas fueron sumergidas inmediatamente después de su recolección y mantenidas hasta el día siguiente en etanol al 70%, con lo que se tornaron transparentes. Para la obtención de microfotografías, las hojas fueron montadas en portaobjetos de 7,5 × 2,5 cm en una disolución 8:2:1 (m/v/v) de hidrato de cloral:glicerol:agua (se prepara mezclando 80 g de hidrato de cloral, 20 ml de glicerol y 10 ml de agua). Las microfotografías de hojas decoloradas para visualizar su venación se tomaron con un microscopio Leica DMRB dotado de una cámara Nikon DXM 1200F.

### **IV.13.- Microscopía de fluorescencia**

#### **IV.13.1.- Visualización de proteínas de fusión fluorescentes**

Para la visualización de la expresión de las fusiones traduccionales VCC:CFP, ER:YFP, Golgi:YFP y PIN1:GFP se montaron en portaobjetos (7,5 × 2,5 cm) con agua raíces completas recolectadas 5 y 6 dde. Para la visualización de las proteínas de fusión

fluorescentes y las tinciones utilizadas en este trabajo, se empleó un microscopio confocal Leica Stellaris 8 STED (DM6 B CS), dotado de un láser de diodo capaz de excitar a una longitud de onda de 405 nm y un láser de luz blanca, capaz de excitar a longitudes de onda comprendidas entre los 485 y 685 nm, con 1 nm de precisión. Los valores de intensidad de excitación y de ganancia de la detección para la visualización de cada proteína y tinción fluorescentes fueron establecidos en base a los valores máximos que impedían la detección del ruido de fondo para la muestra de control utilizada, que fue una raíz de una planta silvestre Col-0 (Tabla 4).

**Tabla 4.-** Parámetros de visualización de proteínas y tinciones fluorescentes

Fluoróforo	Excitación		Detección	
	Longitud de onda (nm)	Intensidad (%)*	Ventana (nm)	Ganancia (%)
CFP	405	5	425 - 500	5
YFP	514	10	520 - 570	10
GFP	488	35	490 - 550	35
Yoduro de propidio	514	5	585 - 685	2,5

\*Estos valores se refieren al 85% de la intensidad total del láser.

En las estirpes de Arabidopsis en las que se expresaban varias proteínas de fusión, se delimitó la amplitud de la ventana de detección para visualizar la fluorescencia de cada una de estas evitando su detección cruzada. La visualización, la obtención y el análisis de las imágenes fue realizada con el programa LAS X (Leica).

#### **IV.13.2.- Tinción con yoduro de propidio de plántulas de Arabidopsis**

Para visualizar las paredes y el núcleo de las células de la raíz principal, las plántulas fueron sumergidas durante 8-10 min en una disolución de yoduro de propidio (10 µg/ml) en la oscuridad, antes de ser lavadas con agua. A continuación, fueron montadas en portaobjetos de 7,5 × 2,5 cm y observadas en un microscopio confocal Leica Stellaris 8 STED (DM6 B CS). Para visualizar la fluorescencia del yoduro de propidio se emplearon los parámetros que recoge la Tabla 4.

## **V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1.- Análisis comparativo de algunos rasgos del fenotipo morfológico de los mutantes *vcc*, *ipt* y *cuc2* en diferentes condiciones de cultivo

#### V.1.1.- Efecto de las condiciones de cultivo sobre el fenotipo de *vcc-2*

El rasgo fenotípico de los mutantes *vcc* más destacado en las publicaciones del laboratorio de M.S. Otegui es la reducción de la complejidad del patrón de venación de los cotiledones. En las del laboratorio de J.L. Micol, sin embargo, es la asimetría bilateral de las hojas de la roseta. Esta diferencia puede achacarse a los diferentes intereses científicos de los dos laboratorios, pero también podría ser consecuencia de sus distintas condiciones de cultivo de *Arabidopsis*. Cabe mencionar como ejemplo (apartado III, en la página 8) que el gelificante del medio de cultivo en placa de Petri modifica la penetrancia del fenotipo foliar de las plantas *vcc*: es incompleta con agar para plantas y completa con Gelrite.

Con el fin de establecer los efectos de las condiciones de cultivo sobre el fenotipo morfológico del mutante *vcc-2*, hemos caracterizado las estirpes Col-0, *vcc-2*, *vcc-2 35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP*, *cuc2-3*, *cuc2-3 vcc-2*, *cuc2-1D*, *ipt3 ipt5 ipt7*, *cuc2-1D ipt3 ipt5 ipt7* y *vcc-2 ipt3 ipt5 ipt7*. Se han cultivado estas plantas en las condiciones descritas por el grupo de M.S. Otegui (fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y una temperatura de 23°C) y las habituales del de J.L. Micol (luz continua y a 20°C). Hemos usado medios de cultivo con un 6% o un 7% de agar para plantas, o un 6% de Gelrite. Hemos usado dos concentraciones diferentes de agar para plantas dado que en las publicaciones de M.S. Otegui no se indica la que se empleó. Se usó Col-0 como control, ya que representa el fondo genético de las estirpes mutantes estudiadas en este trabajo (Tabla 2, en la página 15).

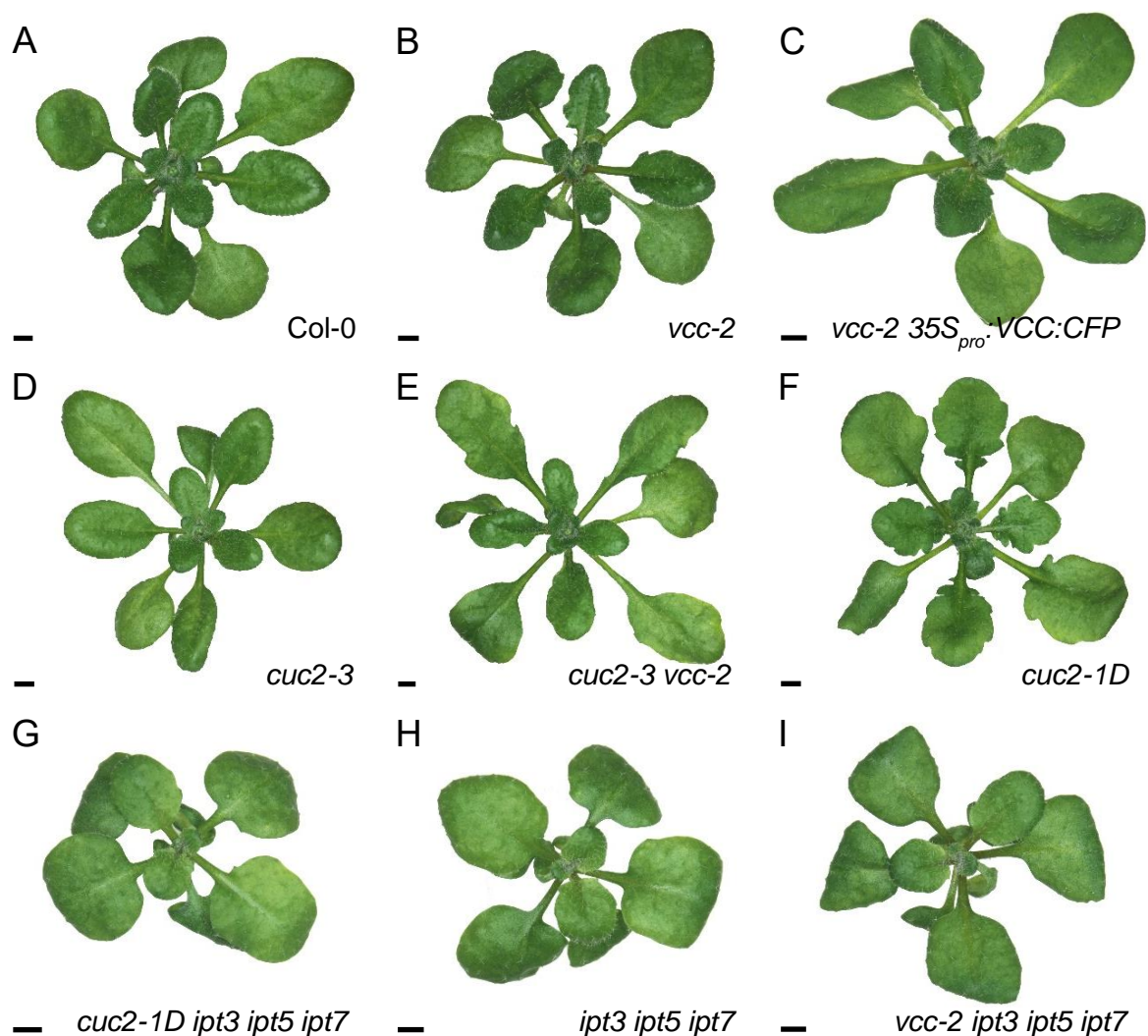
#### V.1.2.- Caracterización de la forma del margen foliar

La simetría bilateral de las hojas de la roseta y el grado de lobulación de sus márgenes no mostraron diferencias destacables en las distintas condiciones de temperatura e iluminación empleadas. No obstante, se observó que las hojas de las plantas cultivadas en luz continua y a 20°C eran de un color verde más oscuro que las obtenidas bajo fotoperiodo y a 23°C (Figura 10 y Figura 11, en las páginas 30 y 31, respectivamente). Esta no es una observación nueva, dado que se ha descrito que en condiciones de luz continua se activan genes relacionados con la fotosíntesis, la fotoprotección y la fotorrespiración (Niedermaier *et al.*, 2020). Por tanto, el color verde más oscuro que manifestaron las plantas cultivadas bajo luz continua puede deberse a la desrepresión de genes relacionados con la fotosíntesis y el estrés.

Se asume que la temperatura óptima para el cultivo de *Arabidopsis* es de 16 a 25°C

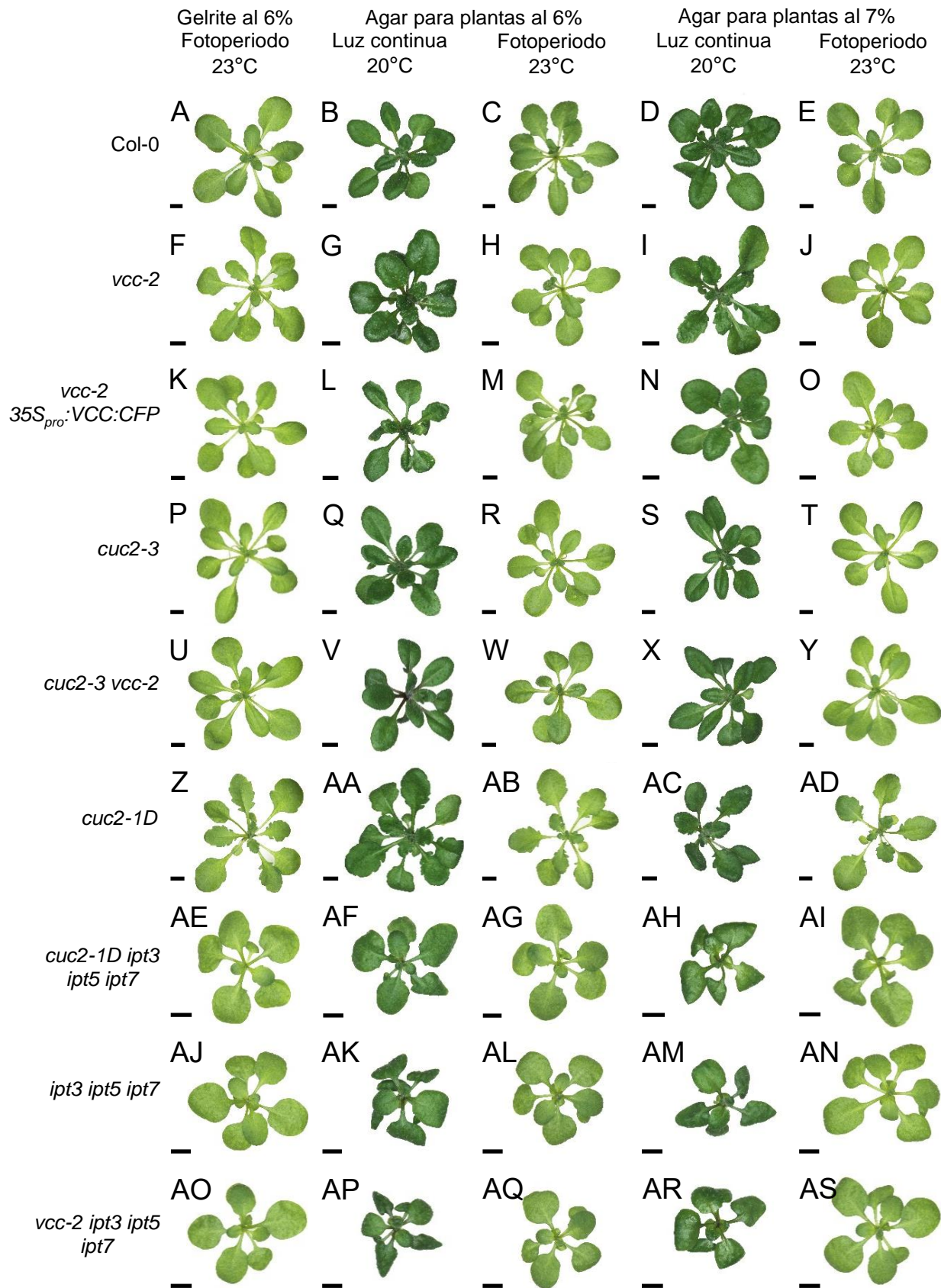
(Sanchez-Serrano y Salinas, 2014). Las temperaturas superiores a 25°C causan estrés, que se manifiesta en desnaturalización proteica, alteraciones en el desarrollo radicular, un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno y un desequilibrio metabólico que entre otros aspectos incluye la disminución en los niveles de auxina y citoquinina en las raíces (Prerostova *et al.*, 2020). No hemos establecido si el cultivo a 20 y 23°C puede tener por sí solo consecuencias en la morfología de una estirpe silvestre de *Arabidopsis*.

El tamaño de las rosetas tampoco pareció afectarse por el gelificante de los medios de cultivo, a pesar de que se ha descrito que *Arabidopsis* crece más rápidamente en medios con Gelrite que con agar para plantas (apartado III, en la página 8).



**Figura 10.-** Rosetas de los mutantes de *Arabidopsis* estudiados en este trabajo. Las imágenes corresponden a (A) Col-0, (B) *vcc-2*, (C) *vcc-2 35S<sub>pro</sub>::VCC:CFP*, (D) *cuc2-3*, (E) *cuc2-3 vcc-2*, (F) *cuc2-1D*, (G) *cuc2-1D ipt3 ipt5 ipt7*, (H) *ipt3 ipt5 ipt7* e (I) *vcc-2 ipt3 ipt5 ipt7*. Las plantas fueron cultivadas en medio de cultivo gelificado con Gelrite al 6% bajo luz continua y a 20°C. Las fotografías se tomaron 21 dde. Barras de escala: 2 mm.





**Figura 11.-** Efectos de diferentes condiciones de cultivo sobre el fenotipo morfológico de los mutantes estudiados en este trabajo. Rosetas de plantas (A-E) Col-0, (F-J) *vcc-2*, (K-O) *vcc-2 35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP*,

(P-T) *cuc2-3*, (U-Y) *cuc2-3 vcc-2*, (Z-AD) *cuc2-1D*, (AE-AI) *cuc2-1D ipt3 ipt5 ipt7*, (AJ-AN) *ipt3 ipt5 ipt7* y (AO-AS) *vcc-2 ipt3 ipt5 ipt7* de *Arabidopsis*. Las plantas se cultivaron en las condiciones que se indican. Las fotografías se tomaron 21 dde. Barras de escala: 2 mm.

---

En el mutante *vcc-2* se observó el incremento esperado en la lobulación de su margen foliar y la consiguiente asimetría bilateral de la hoja (apartado III, en la página 8) en presencia de Gelrite. Adicionalmente, las plantas *vcc-2* cultivadas bajo fotoperiodo y a 23°C presentaron una disminución en la expresividad de su fenotipo foliar en comparación con las cultivadas bajo luz continua y a 20°C con el mismo gelificante (Figura 10B y Figura 11F-J, en las páginas 30 y 31, respectivamente). Tal como cabía esperar, las plantas *vcc-2 35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP* mostraron hojas menos lobuladas y mayor simetría bilateral que las *vcc-2* (Figura 10C y Figura 11K-O).

El margen de las hojas del mutante hipomorfo *cuc2-3* fue liso, no apreciándose lóbulos ni senos (Figura 10D y Figura 11P-T), como consecuencia de la carencia de máximos de auxina en el margen del primordio foliar (apartado III, en la página 11). En el doble mutante *cuc2-3 vcc-2* se observaron patrones de lóbulos y senos que parecían corresponder a un fenotipo intermedio al de sus mutantes simples parentales, un fenotipo que puede considerarse aditivo (Figura 10E y Figura 11U-Y). Esta observación sugiere que el proceso alterado en *vcc-2* depende al menos parcialmente de CUC2, probablemente por el papel de este último en la regulación de la correcta polarización de PIN1 durante la morfogénesis del margen en el primordio foliar (apartados II.3 y II.4, en las páginas 5 y 7, respectivamente).

El mutante hiperomorfo *cuc2-1D* mostró también el fenotipo foliar esperado: un gran incremento del número de los lóbulos y la profundidad de los senos respecto al tipo silvestre (Figura 10F y Figura 11Z-AD), y no manifestó desviaciones de la simetría bilateral. Su fenotipo se debe a un aumento del número de máximos de auxina en el margen del primordio foliar (apartado II.3, en la página 5). El tamaño de la roseta de las plantas *cuc2-3*, *cuc2-3 vcc-2* y *cuc2-1D* fue similar al silvestre (Figura 10A y Figura 11A-E).

El triple mutante *ipt3 ipt5 ipt7*, cuya síntesis de citoquininas está reducida, tiene una roseta de menor tamaño que la silvestre, con hojas epinásticas y de margen liso (Figura 10H y Figura 11AJ-AN). La epinastia fue más pronunciada bajo luz continua y a 20°C, por lo que puede deberse a estrés lumínico. La reducción del tamaño de las rosetas puede deberse a sus niveles bajos de citoquininas, que son necesarias para la proliferación celular (Miyawaki *et al.*, 2004; Miyawaki *et al.*, 2006; Navarro-Cartagena, Núñez-Delegido, Olan-Villegas, Wilson-Sánchez, Navarro-Quiles y Micol, sin publicar). El fenotipo foliar de *ipt3 ipt5 ipt7* sugiere que las citoquininas son necesarias para la formación de lóbulos (o dientes) y senos

en el margen de la hoja (apartado II.4, en la página 7). En los cuádruples mutantes *cuc2-1D ipt3 ipt5 ipt7* (Figura 10G y Figura 11AE-AI) y *vcc-2 ipt3 ipt5 ipt7* (Figura 10I y Figura 11AO-AS) se suprimen parcialmente los fenotipos de *cuc2-1D* y *vcc-2*, lo que confirma que estos últimos solo pueden manifestarse en presencia de unos niveles de citoquininas que no se alcanzan como consecuencia de las mutaciones *ipt3*, *ipt5* e *ipt7*.

### V.1.3.- Caracterización del patrón de venación de los cotiledones

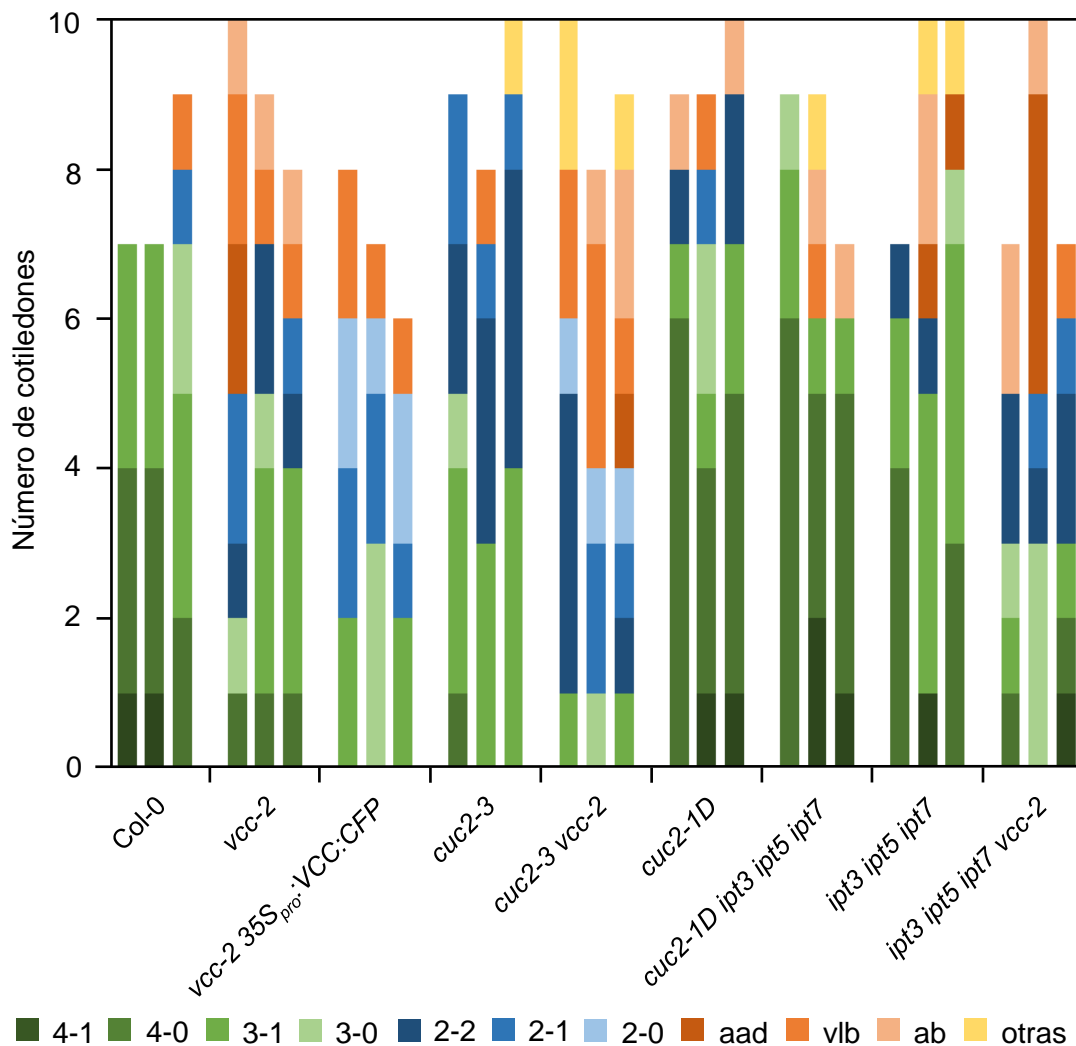
Las plantas obtenidas según se ha descrito en el apartado anterior también fueron usadas para el estudio de la venación de los cotiledones, tal como se indica en el apartado IV.12.2, en la página 27. Se recolectaron 10 cotiledones de cada genotipo y condición de cultivo 6 dde, que fueron fotografiados tras despigmentarlos en etanol al 70% y montarlos en una disolución de hidrato de cloral sobre un portaobjetos. Se determinó el número de areolas y venas de terminación libre de cada cotiledón en las fotografías. También se determinó el número de areolas abiertas distales, el de venas de terminación libre basales y de aperturas basales, para clasificar los patrones de venación según establecieron Yanagisawa *et al.* (2021) (apartado II.2, en la página 3). Además, observamos patrones de venación no incluidos en la clasificación de estos autores, entre los que cabe destacar los que contenían aperturas apicales, 5 areolas o más de 3 venas de terminación libre. Las aperturas apicales identificadas en este trabajo se diferencian de las areolas abiertas distales de la clasificación de Yanagisawa *et al.* (2021) en la posición de la desconexión: por un lado, las areolas abiertas distales presentan una vena que no llega a unirse a la primaria o secundaria más cercana (la areola queda abierta por uno de sus extremos); por otro, las aperturas apicales presentan dos venas que emergen hacia el mismo punto sin llegar a unirse, causando una apertura en la mitad de la areola.

Casi todos los cotiledones de Col-0 presentaron 3 o 4 areolas con ninguna o solo una vena de terminación libre, independientemente del gelificante y las restantes condiciones de cultivo. El gelificante y las restantes condiciones de cultivo tampoco influyeron de manera significativa en los patrones de venación de los cotiledones de la mayoría de las estirpes mutantes estudiadas (Figura 12, en la página 34 y Figura 13, en la 35).

Las estirpes en las que predominaron los patrones de venación similares al silvestre fueron *cuc2-1D*, *ipt3 ipt5 ipt7* y *cuc2-1D ipt3 ipt5 ipt7*. A pesar de ello, las plantas *cuc2-1D* cultivadas bajo fotoperiodo y a 23°C y en medio con agar para plantas al 6% presentaron más cotiledones con patrones de baja complejidad y algunas discontinuidades.

La mayoría de los cotiledones del triple mutante *ipt3 ipt5 ipt7* presentaron un patrón de venación similar al silvestre, excepto las plantas cultivadas en medio con agar para plantas al

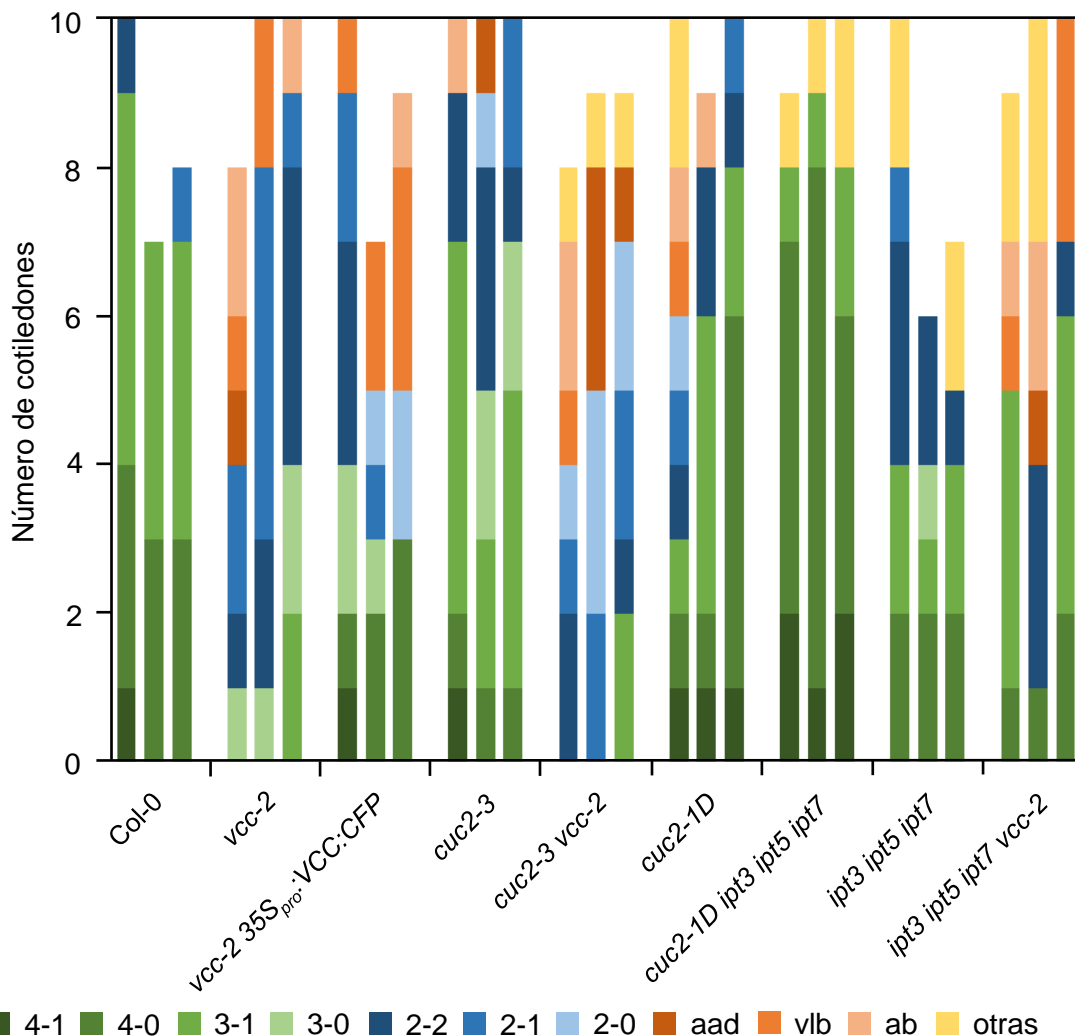
6% en condiciones de fotoperiodo y a 23°C: 4 de las 10 plantas estudiadas presentaron cotiledones con un patrón más simple que las silvestres. Además, se identificó 1 cotiledón con 5 areolas, en agar para plantas al 7% bajo luz continua y a 20°C, 2 con aperturas basales en agar para plantas al 6% bajo fotoperiodo y a 23°C, y 2 con 2 areolas y 3 venas de terminación libre en Gelrite al 6% bajo fotoperiodo y a 23°C, y con Gelrite al 6% bajo luz continua y a 20°C.



**Figura 12.-** Clasificación de los patrones de venación de los cotiledones de las estirpes de *Arabidopsis* estudiadas en este trabajo, que se cultivaron bajo luz continua y a 20°C. Se analizaron los patrones de venación de Col-0, vcc-2, vcc-2 35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP, cuc2-3, cuc2-3 vcc-2, cuc2-1D, cuc2-1D ipt3 ipt5 ipt7, ipt3 ipt5 ipt7 e ipt3 ipt5 ipt7 vcc-2. Para cada genotipo se representan, de izquierda a derecha, los valores obtenidos en los cultivos con agar para plantas al 6% y al 7% y Gelrite al 6%. En los códigos numéricos de los colores empleados en la figura, el primer dígito indica el número de areolas del cotiledón, y el segundo, el de venas de terminación libre. Las clases de color verde corresponden a una complejidad similar a la silvestre, las azules son de menor complejidad, las naranjas incluyen patrones con discontinuidades, y la amarilla, patrones no contemplados en la clasificación de Yanagisawa *et al.* (2021). Los patrones con discontinuidades incluyen areolas abiertas distales (aad), venas de terminación libre basales (vlb) y aperturas basales (ab).

Estas observaciones sugieren que el efecto de *ipt3 ipt5 ipt7* sobre la biosíntesis de las citoquininas no altera la formación del patrón de venación en los cotiledones. En cuanto al cuádruple mutante *cuc2-1D ipt3 ipt5 ipt7*, aunque los patrones de venación predominantes eran silvestres, también se identificaron cotiledones con discontinuidades no clasificadas por Yanagisawa *et al.* (2021): 2 cotiledones con 5 areolas, en plantas cultivadas en agar para plantas al 7% bajo luz continua y a 20°C, y en agar para plantas al 6% bajo fotoperiodo y a 23°C, y 3 cotiledones con 3 venas de terminación libre, en plantas cultivadas en agar para plantas al 7% y en Gelrite al 6% bajo fotoperiodo y a 23°C.

Entre los mutantes simples analizados, los cotiledones de *vcc-2* destacaron por la presencia de clases con mayor número de discontinuidades. Estas alteraciones fueron



**Figura 13.-** Clasificación de los patrones de venación de los cotiledones de las estirpes de *Arabidopsis* estudiadas en este trabajo, que se cultivaron bajo fotoperiodo y a 23°C. Se siguen las pautas establecidas en la Figura 12, en la página 34.

identificadas tanto en las condiciones de cultivo del laboratorio de J.L. Micol (luz continua y a 20°C), como en las del de M.S. Otegui (fotoperiodo y a 23°C). Además, el número de cotiledones *vcc-2* con un patrón de venación aberrante fue mayor en las plantas cultivadas en medio con agar para plantas bajo fotoperiodo y a 23°C, con resultados similares a los publicados en Yanagisawa *et al.* (2021). El fenotipo causado por la pérdida de función de *VCC* en el mutante *vcc-2* indica que la proteína *VCC* es necesaria para la formación del sistema vascular de *Arabidopsis*. Hemos constatado que la clasificación de los cotiledones de *vcc-2* *35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP* es similar a la de *vcc-2*. El transgén *35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP* no parece pues rescatar significativamente la función de *VCC* en el desarrollo vascular, a pesar de que sí lo hace parcialmente en la forma del margen foliar (Figura 10A-C, en la página 30).

El mutante *cuc2-3* presentó un número similar de cotiledones con una venación silvestre y con baja complejidad, independientemente de las condiciones de cultivo. Estas observaciones sugieren que *CUC2* podría estar implicado también en el desarrollo vascular, adicionalmente a la modulación de la morfogénesis del margen foliar (apartado II.3, en la página 5). En concordancia con nuestras observaciones del margen foliar (Figura 10B, D, E), el fenotipo vascular del doble mutante *cuc2-3 vcc-2* también parece aditivo, ya que la mayoría de sus cotiledones presentan un patrón de venación de baja complejidad o con discontinuidades. Además, hemos identificado 3 cotiledones *cuc2-3 vcc-2* con aperturas basales en plantas cultivadas en agar para plantas al 6%, tanto bajo luz continua como con fotoperiodo, y en agar para plantas al 7% y Gelrite al 6% bajo fotoperiodo. La aditividad de *cuc2-3* y *vcc-2* en el establecimiento del patrón de venación de los cotiledones sugiere que *CUC2* y *VCC* participan en este proceso de forma independiente (Pérez-Pérez *et al.*, 2009).

Tal como se ha comentado anteriormente, la mayoría de los cotiledones del triple mutante *ipt3 ipt5 ipt7* presentaron un patrón de venación similar al silvestre, con independencia de las condiciones de cultivo. En cambio, los cotiledones de *vcc-2* presentaron un patrón de venación más simple e inconexo que el silvestre. El patrón de venación del cuádruple mutante *vcc-2 ipt3 ipt5 ipt7* es intermedio entre los de *ipt3 ipt5 ipt7* y *vcc-2*, pero más similar a este último. Por ejemplo, en los cultivos en agar para plantas al 6% y al 7% bajo fotoperiodo y a 23°C, se identificaron 2 y 4 cotiledones, respectivamente, con aperturas apicales. Parece darse una mera aditividad o una supresión mutua de ambos fenotipos. El fenotipo foliar del mutante *vcc-2* es claramente suprimido por la depleción de las citoquininas causada por las mutaciones *ipt3*, *ipt5* e *ipt7* (Figura 10B, H, I), lo que abunda en la idea que las citoquininas juegan un papel importante en la formación de lóbulos y senos en el margen de las hojas simples. Sin embargo, nuestro análisis del patrón de venación sugiere que estas hormonas no contribuyen a la formación del sistema vascular de los cotiledones.

En este trabajo hemos observado un número considerable de cotiledones con patrones de venación con aperturas distales o con 5 areolas, que constituyen dos clases adicionales a las propuestas por Yanagisawa *et al.* (2021). Debe tenerse en cuenta que el nuestro ha sido un ensayo preliminar para identificar alteraciones en el patrón de venación dependientes de las condiciones de cultivo, por lo que el número máximo de cotiledones analizados por genotipo fue de 10. Para obtener conclusiones más sólidas sobre las estirpes estudiadas será necesario repetir este análisis con un número mayor de muestras.

## **V.2.- Localización subcelular de la proteína VCC**

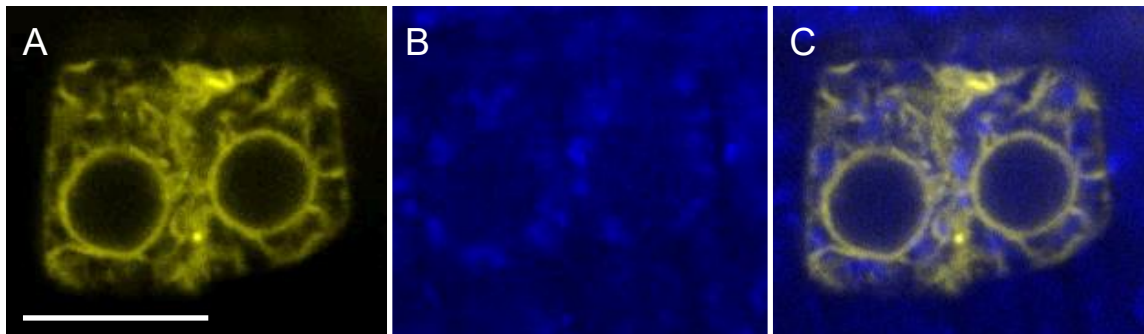
Se han publicado localizaciones subcelulares discrepantes de VCC: en el retículo endoplásmico de células radiculares y foliares en el laboratorio de J.L. Micol, y en el laboratorio de M.S. Otegui, en la membrana plasmática y la vacuola de células del meristemo apical de la raíz y de células provasculares del cotiledón (apartado III, en la página 8). Aunque estas diferencias pueden deberse al uso de diferentes transgenes en cada laboratorio, hemos realizado una comprobación preliminar con la estirpe *vcc-2 35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP*, disponible en el laboratorio de J.L. Micol, y un microscopio confocal de superresolución, de mayor resolución que el que se usó en Wilson-Sánchez *et al.* (2018). Esta comprobación se realizó en células del meristemo apical y la zona de elongación de la raíz principal, recolectadas 5 o 6 dde; se emplearon para este fin plantas *vcc-2 35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP* portadoras del transgén marcador del retículo endoplásmico *35S<sub>pro</sub>:AtWAK2:YFP:HDEL* (ER:YFP), o del transgén marcador del aparato de Golgi *35S<sub>pro</sub>:Man49:YFP* (Golgi:YFP).

Para evitar falsos positivos en el estudio de la colocación de VCC:CFP con otras proteínas fluorescentes se deben evitar solapamientos entre sus espectros de emisión. Para ello, establecimos canales independientes para la visualización de las fluorescencias de la CFP y la YFP (apartado IV.13.1, en la página 27). Además, para cada canal se definieron longitudes de onda específicas para su excitación, y ventanas de detección adaptadas a sus espectros de emisión (apartado IV.13.1).

### **V.2.1.- Análisis de la colocación de VCC con marcadores del retículo endoplásmico**

El retículo endoplásmico es un orgánulo que consta de túbulos y cisternas interconectados y rodeados por una membrana que se extiende desde la envoltura nuclear (Nelson *et al.*, 2007). En este trabajo hemos visualizado el retículo endoplásmico empleando como marcador la proteína de fusión ER:YFP en las raíces de plantas *vcc-2 35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP 35S<sub>pro</sub>:AtWAK2:YFP:HDEL* presenta una distribución que concuerda con la del retículo

endoplásmico (Figura 14A). El transgén  $35S_{pro}:VCC:CFP$  permitió la identificación de la proteína VCC:CFP y su visualización en puntos dispersos en el citoplasma (Figura 14B). No se observó una colocalización clara de VCC:CFP con la proteína marcadora del retículo endoplásmico (Figura 14C), en contra de lo descrito por Wilson-Sánchez *et al.* (2018).



**Figura 14.-** Visualización de la eventual colocalización subcelular de VCC y el retículo endoplásmico. Fluorescencia de (A) el marcador ER:YFP del retículo endoplásmico (en amarillo), (B) la proteína VCC:CFP (en azul) y (C) su superposición en una célula en división de la raíz principal de una planta  $vcc-2\ 35S_{pro}:VCC:CFP\ 35S_{pro}:AtWAK2:YFP:HDEL$ . Barra de escala: 9  $\mu$ m. El brillo de estas imágenes fue aumentado de manera homogénea en un 40% para facilitar su visualización.

La planta parental de las plántulas que hemos estudiado era heterocigótica para los dos transgenes  $35S_{pro}:VCC:CFP$  y  $35S_{pro}:AtWAK2:YFP:HDEL$ . Aunque la mayoría de las plántulas analizadas presentaron la fluorescencia correspondiente a VCC:CFP, en solo 3 de las 85 observadas se observó la de ER:YFP. Además, la intensidad de la fluorescencia de VCC:CFP varió entre las distintas raíces estudiadas. Por todo ello, no encontramos suficientes plántulas en las que se manifestaran inequívocamente ambas emisiones fluorescentes y permitieran obtener conclusiones robustas. Para facilitar la visualización simultánea de las proteínas VCC:CFP y ER:YFP en un mayor número de muestras y en otros tejidos, como los primordios foliares, será necesario obtener plantas homocigóticas para ambos transgenes, en las que estos últimos se expresen de forma estable.

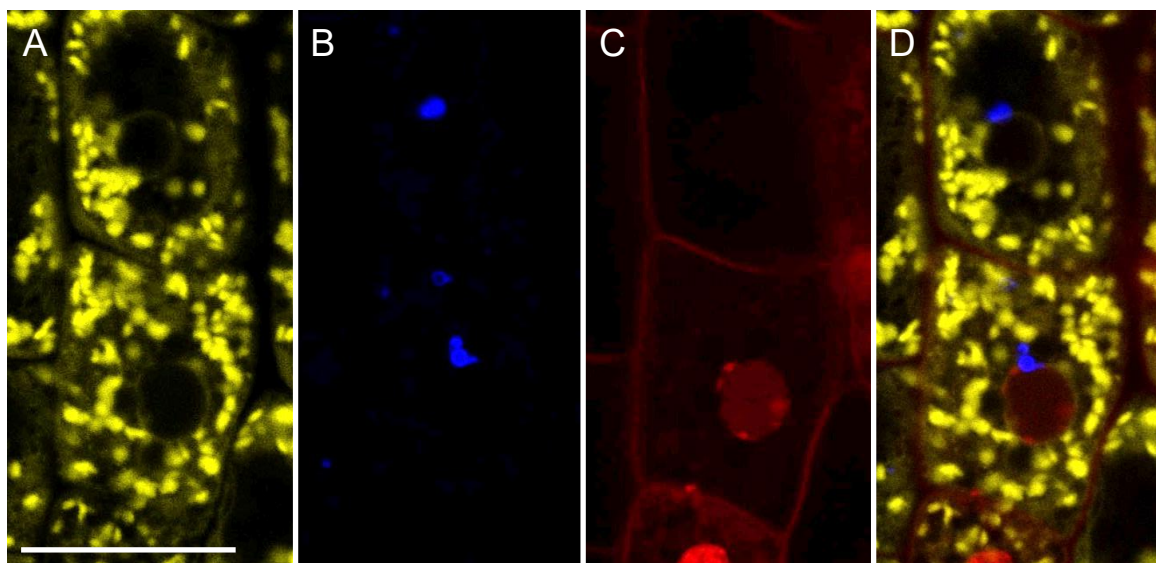
### V.2.2.- Análisis de la colocalización de VCC con marcadores del aparato de Golgi

Dado que VCC:CFP se distribuye en el citoplasma de forma similar a las vesículas del aparato de Golgi (Nelson *et al.*, 2007), se visualizó la proteína VCC:CFP en plantas  $vcc-2\ 35S_{pro}:VCC:CFP$  que también eran portadoras del transgén  $35S_{pro}:Man49:YFP$ , que codifica una proteína que sirve de marcador del aparato de Golgi (Golgi:YFP). Además, las raíces se



tiñeron con yoduro de propidio, que permite visualizar la pared y el núcleo celulares (apartado IV.13.2, en la página 28).

Las vesículas que conforman el aparato de Golgi se manifiestan como acúmulos de cuerpos pequeños y redondeados en el citoplasma, con una distribución inespecífica (Nelson *et al.*, 2007; Uemura *et al.*, 2014). Nuestras observaciones coinciden con esta descripción, ya que la fluorescencia de la Golgi:YFP se visualizó en cuerpos redondeados conectados por una matriz que rodea al núcleo (Figura 15). La distribución de VCC:CFP en las plantas *vcc-2 35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP 35S<sub>pro</sub>:Man49:YFP* resultó idéntica a la las *35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP 35S<sub>pro</sub>:AtWAK2:YFP:HDEL*, sin superponerse con el aparato de Golgi en las raíces estudiadas. Tampoco hemos encontrado evidencias de asociación de VCC a la membrana plasmática ni a la vacuola celular, tal como se ha descrito que ocurre durante la formación del tejido provascular en cotiledones en otros trabajos (apartado III, en la página 8). Es posible que VCC realice funciones diferentes en cada histotipo y estadio de desarrollo. No obstante, convendría construir transgenes para la visualización simultánea de VCC y marcadores de la membrana plasmática y del lumen de la vacuola.



**Figura 15.-** Visualización de la eventual colocalización subcelular de VCC y el aparato de Golgi. Fluorescencia de (A) Golgi:YFP (en amarillo), (B) VCC:CFP (en azul), (C) yoduro de propidio (en rojo) y (D) su superposición en dos células de una raíz de una planta *vcc-2 35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP 35S<sub>pro</sub>:Man49:YFP*. Barra de escala: 13  $\mu$ m. El brillo de estas imágenes fue aumentado en un 40% (A, D) y un 60% (B, C) para facilitar su visualización.

### V.2.3.- Construcción de transgenes para determinar la localización subcelular de VCC

#### V.2.3.1.- Diseño de fusiones traduccionales de VCC optimizadas

Se han descrito transgenes que contienen fusiones traduccionales del alelo silvestre de VCC y el gen de una proteína fluorescente, pero ninguno de ellos restaura completamente el fenotipo silvestre en los mutantes *vcc* (apartado III, en la página 8). Este es el motivo por el que hemos iniciado en este trabajo la construcción de los transgenes *35S<sub>pro</sub>:GFP:VCC*, *35S<sub>pro</sub>:VCC:YFP* y *VCC<sub>pro</sub>:VCC:GFP*.

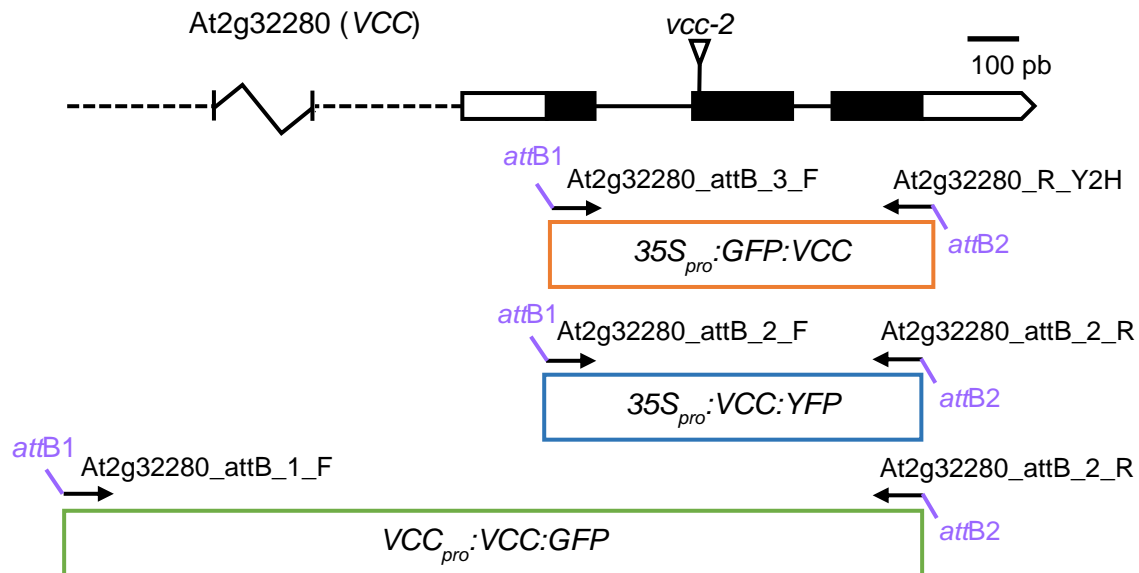
El transgén *35S<sub>pro</sub>:GFP:VCC* debe producir una proteína de fusión en la que la GFP esté unida al extremo amino de la proteína VCC. Hemos diseñado este transgén para establecer si la unión de la GFP al extremo carboxilo de VCC reduce la función y/o altera la localización subcelular de esta última. Por su parte, el transgén *35S<sub>pro</sub>:VCC:YFP* rendirá una proteína de fusión de VCC con la proteína amarilla fluorescente (YFP), cuya fotoestabilidad la hace más adecuada para la microscopía confocal de superresolución que la GFP. Por último, el transgén *VCC<sub>pro</sub>:VCC:GFP* incluirá el promotor endógeno de VCC para evitar posibles artefactos derivados de la inespecificidad y gran actividad del promotor constitutivo 35S.

#### V.2.3.2.- Amplificación de segmentos de VCC para su inclusión en transgenes

Para obtener el transgén *35S<sub>pro</sub>:GFP:VCC*, se diseñaron los oligonucleótidos At2g32280\_attB\_3\_F y At2g32280\_R\_Y2H, que hibridan con el extremo 5' del codón de inicio de la traducción de VCC, y con los nucleótidos 1.041-1.061 de la unidad de transcripción de este gen, respectivamente (Tabla 3, en la página 21). Esta pareja de cebadores debería rendir un producto de PCR de 779 pb. Para obtener el transgén *35S<sub>pro</sub>:VCC:YFP* se emplearon los oligonucleótidos At2g32280\_attB\_2\_F y At2g32280\_attB\_2\_R, que hibridan con los segmentos de posiciones 277-301 y 1.027-1.048 de la unidad de transcripción de VCC, respectivamente, con lo que se obtendría un producto de PCR de 771 pb. Ambos productos incluyen los tres exones y los dos intrones de VCC. Se excluyó el codón de terminación de la traducción de VCC para facilitar la fusión traduccional de las proteínas VCC y YFP en el transgén *35S<sub>pro</sub>:VCC:YFP* (Figura 16, en la página 41).

Para construir el transgén *VCC<sub>pro</sub>:VCC:GFP* se emplearon los oligonucleótidos At2g32280\_attB\_1\_F y At2g32280\_attB\_2\_R, que hibridan con los nucleótidos -2.570 a -2.547 aguas arriba de la posición +1 de la unidad de transcripción de VCC. El producto de PCR resultante, de 3.618 pb, contiene la región intergénica situada aguas arriba de VCC, que le separa del gen At2g32275, y la unidad de transcripción de VCC hasta el codón anterior al de terminación de la traducción (Figura 16). Los oligonucleótidos At2g32280\_attB\_1\_F y

At2g32280\_attB\_R incluyen en sus extremos 5' las secuencias *attB1* y *attB2*, respectivamente, que permiten la recombinación específica de sitio con las *attP* del vector Gateway de entrada pGEM-T Easy221, mediante una reacción BP (apartado IV.10, en la página 24).



**Figura 16.-** Estructura del gen *VCC*, con indicación de sus segmentos amplificados mediante PCR en este trabajo para la construcción de transgenes. Se representa *At2g32280 (VCC)* con líneas continuas, y la región intergénica situada aguas arriba de este gen en el cromosoma 2 de *Arabidopsis*, con una discontinua. Los exones e intrones son representados por rectángulos y líneas continuas negros, respectivamente. Los rectángulos blancos corresponden a las regiones no traducidas líder y tráiler de los exones terminales. Los rectángulos de trazo de color representan los segmentos amplificados mediante PCR para la obtención de los transgenes  $35S_{pro}:GFP:VCC$  (en naranja),  $35S_{pro}:VCC:YFP$  (azul) y  $VCC_{pro}:VCC:GFP$  (verde). Las flechas representan los oligonucleótidos utilizados, que no están dibujados a escala. Se indican los sitios *att* incorporados a sus colas 5'.

Las amplificaciones de PCR se realizaron por duplicado, empleando como molde ADN genómico de Col-0. Las mezclas de reacción se prepararon con 6,4  $\mu$ l de agua, 6  $\mu$ l del tampón para secuencias con alto contenido en guanina y citosina 5 $\times$  (Tampón GC de Thermo Fisher Scientific), 2,4  $\mu$ l de una disolución que contiene los cuatro desoxinucleótidos (0,2 mM), 6  $\mu$ l de las disoluciones correspondientes de cada oligonucleótido (2,5  $\mu$ M; apartado IV.8.1.1, en la página 21), 0,9  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,3  $\mu$ l de la polimerasa Phusion (2 U/ $\mu$ l), y 1  $\mu$ l de la disolución de ADN genómico. El programa de termociclaje utilizado para obtener los insertos de los transgenes  $35S_{pro}:GFP:VCC$  y  $35S_{pro}:VCC:YFP$  fue el siguiente: 95°C, 2 min; 40  $\times$  (95°C, 20 s; 53°C, 15 s; 72°C, 65 s); 72°C, 10 min; 12°C,  $\infty$ . Para obtener el inserto del

transgén *VCC<sub>pro</sub>:VCC:GFP* se empleó el programa siguiente: 95°C, 2 min; 40 × (95°C, 20 s; 58°C, 15 s; 72°C, 2 min); 72°C, 10 min; 12°C, ∞ (apartado IV.8.1.2, en la página 22).

Los productos de estas amplificaciones fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (apartado IV.8.3, en la página 23). Las bandas así obtenidas fueron extraídas del gel, obteniéndose 20 µl de disoluciones de 11,0 y 55,5 ng/µl de ADN de los insertos de *35S<sub>pro</sub>:GFP:VCC*; 62,5 y 87,5 ng/µl de los de *35S<sub>pro</sub>:VCC:YFP*, y 25,5 y 27,5 ng/µl de los de *VCC<sub>pro</sub>:VCC:GFP*.

### V.2.3.3.- Clonación de insertos en el vector pGEM-T Easy221

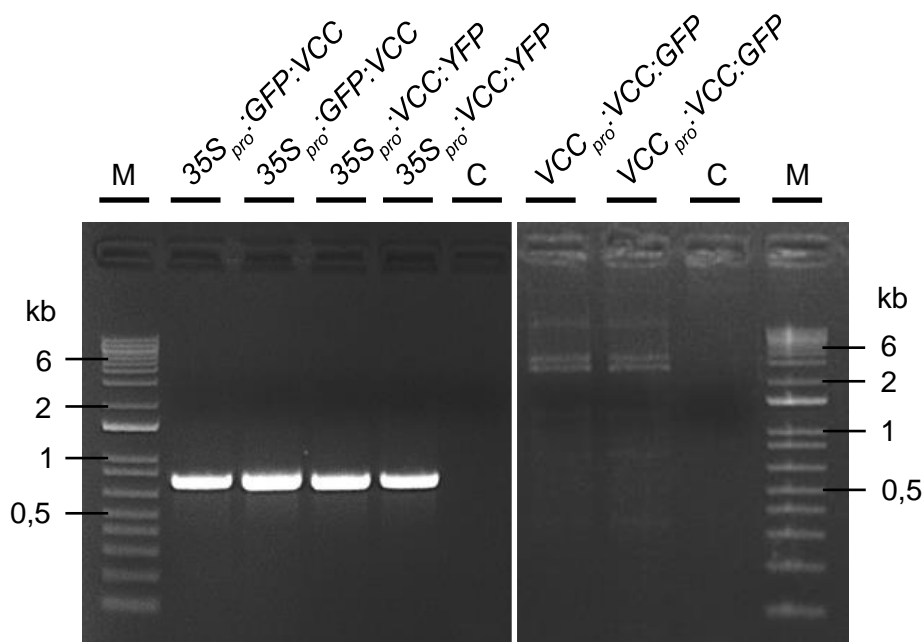
Para la realización de las reacciones BP, se emplearon cantidades similares del producto purificado de PCR que del vector de entrada pGEM-T Easy221 (200 ng/µl) en un volumen de reacción de 4 µl. Se usaron 40,7 y 177,6 ng de ADN de los productos de PCR con 60,0 y 160,0 ng del vector, respectivamente, para obtener el transgén *35S<sub>pro</sub>:GFP:VCC*; 187,5 y 236,3 ng de ADN de los productos de PCR con 200,0 y 260,0 ng del vector para *35S<sub>pro</sub>:VCC:YFP*, y 91,8 y 96,3 ng de ADN de los productos de PCR con 80,0 y 100,0 ng del vector para *VCC<sub>pro</sub>:VCC:GFP*. Tras agregar a cada mezcla 1 µl de la Mix Clonasa BP II (Invitrogen), las reacciones se incubaron durante 18 h a temperatura ambiente (apartado IV.10, en la página 24), interrumpiendo finalmente la reacción con 0,5 µl de proteinasa K (2 µg/µl) y una incubación de 10 min a 37°C.

Una vez finalizadas las reacciones BP, las mezclas de reacción se usaron para transformar células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5α (una suspensión de 200 µl) mediante choque térmico (apartado IV.11.2, en la página 27). La mezcla de transformación fue después esparcida por el medio de cultivo LB suplementado con 100 mg/l de carbenicilina de una placa de Petri, ya que el vector pGEM-T Easy221 contiene un gen de resistencia a este antibiótico (apartado IV.7.2.3, en la página 20). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 18 h, obteniéndose así 10 y 20 colonias resistentes a carbenicilina (Carb<sup>R</sup>) para *35S<sub>pro</sub>:GFP:VCC*, 8 y 8 para *35S<sub>pro</sub>:VCC:YFP*, y 20 y 7 para *VCC<sub>pro</sub>:VCC:GFP*. Se realizaron siembras por estría de todas las colonias y la presencia de las construcciones de entrada fue confirmada en 5 de ellas en cada caso mediante PCR. En estas últimas se usaron 7,4 µl de agua, 4 µl del tampón 5× GoTaq Flexi (Thermo Fisher Scientific), 1,6 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1,6 µl de una disolución 2,5 mM de los cuatro desoxinucleótidos, 1,6 µl de las disoluciones de cada oligonucleótido (2,5 µM, apartado IV.8.1.2 en la página 22), 0,16 µl de la polimerasa Taq (5 U/µl), y 1 µl de la disolución de ADN plasmídico. El programa de termociclaje utilizado para obtener los insertos de los transgenes *35S<sub>pro</sub>:GFP:VCC* y *35S<sub>pro</sub>:VCC:YFP* fue el siguiente: 95°C, 2 min; 35 × (95°C, 20 s; 55°C, 15 s; 72°C, 65 s); 72°C, 10 min; 12°C, ∞. El programa

para el transgén  $VCC_{pro}:VCC:GFP$  fue el siguiente: 95°C, 2 min; 35 × (95°C, 20 s; 60°C, 15 s; 72°C, 2 min); 72°C, 10 min; 12°C, ∞ (apartado IV.8.1.2, en la página 22).

Se tomaron células de dos estrías Carb<sup>R</sup> de cada construcción para inocular 4 ml de medio LB líquido suplementado con 100 mg/l de carbenicilina, que a continuación fue incubado durante 24 h a 37°C. A partir de estos precultivos se obtuvieron minipreparaciones del ADN plasmídico (apartado IV.8.2.2, en la página 23) con las siguientes concentraciones: 144 y 152 ng/μl para  $35S_{pro}:GFP:VCC$ ; 156 y 183 ng/μl para  $35S_{pro}:VCC:YFP$ , y 66 y 50 ng/μl para  $VCC_{pro}:VCC:GFP$ .

Para verificar la presencia de los transgenes en los cultivos Carb<sup>R</sup> así obtenidos se realizó una amplificación de PCR con los mismos cebadores y programas de termociclaje que para el genotipado de las estrías. Los productos de PCR se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa (apartado IV.8.3, en la página 23; Figura 17). Las bandas de los clones  $35S_{pro}:GFP:VCC$  y  $35S_{pro}:VCC:YFP$  se correspondieron con los tamaños esperados, mientras que las de los  $VCC_{pro}:VCC:GFP$  presentaron múltiples bandas tenues, todas ellas de un tamaño mayor al esperado. En consecuencia, la construcción del transgén de  $VCC_{pro}:VCC:GFP$  fue interrumpida.



**Figura 17.-** Verificación de la presencia y el tamaño de los insertos  $35S_{pro}:GFP:VCC$ ,  $35S_{pro}:VCC:YFP$  y  $VCC_{pro}:VCC:GFP$  en clones Carb<sup>R</sup> de *Escherichia coli* DH5α. Las electroforesis se realizaron en gels de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. En algunas calles las bandas obtenidas muestran los tamaños esperados, las de  $35S_{pro}:GFP:VCC$  (837 pb) y  $35S_{pro}:VCC:YFP$  (833 pb), pero no en las de  $VCC_{pro}:VCC:GFP$  (1.096 pb). M: marcador de peso molecular. C: control negativo, sin molde.

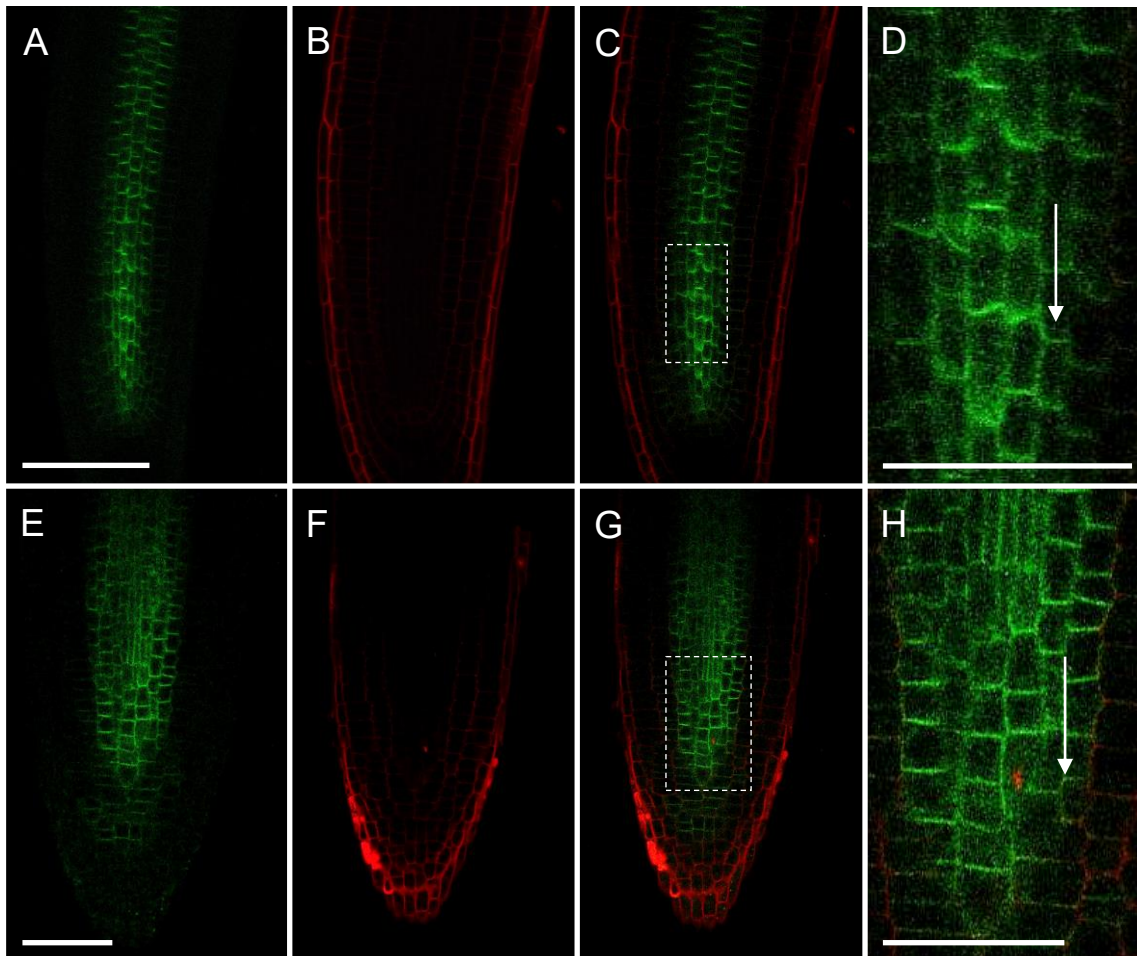
La integridad de las construcciones de entrada  $35S_{pro}:GFP:VCC$  y  $35S_{pro}:VCC:YFP$  se confirmó mediante secuenciación por el método de Sanger (apartado IV.9, en la página 24), empleando los oligonucleótidos de la página 21. Se verificó así que las construcciones contienen la región de *VCC* amplificada mediante PCR a partir de ADN genómico, flanqueada por las secuencias *attL1* y *attL2* del vector de entrada. Su posterior transferencia a *Arabidopsis* permitirá determinar la localización subcelular de *VCC*.

### V.3.- Visualización de la polarización de PIN1 en plantas *vcc-1*

Los resultados obtenidos en el laboratorio de M.S. Otegui indican que la pérdida de función de *VCC* altera la polarización de PIN1 en la membrana plasmática de las células preprocambiales de los cotiledones *vcc* durante la embriogénesis (Yanagisawa *et al.*, 2021). En cambio, en el laboratorio de J.L. Micol no se encontraron alteraciones de la polarización de PIN1 en los primordios foliares de los mutantes *vcc* (apartado III, en la página 8). Por estos motivos, en este trabajo hemos visualizado la polarización de PIN1 en las raíces de plantas *vcc-1* mediante microscopía confocal (apartado IV.13.1, en la página 27).

La polarización del transportador de auxina PIN1 fue visualizada en la membrana plasmática de las células del meristemo apical de la raíz principal de plántulas Col-0 y *vcc-1 PIN1<sub>pro</sub>:PIN1:GFP* recolectadas 5 y 6 dde, que además fueron teñidas con yoduro de propidio (apartado IV.13.2, en la página 28). Constatamos que *PIN1* se expresa en las células del tejido vascular cercanas al meristemo apical de la raíz de Col-0 y de *vcc-1*, y que la polarización de PIN1 hacia el ápice radicular es la misma en ambas estirpes (Figura 18, en la página 45).

Concluimos que la mutación *vcc-1* no altera ni el patrón de expresión de *PIN1* ni la polarización de su producto proteico durante el crecimiento de la raíz principal. Esta observación es contraria a lo previamente descrito durante la formación del tejido vascular en los cotiledones *vcc*, en cuyas células procambiales la polarización de PIN1 es menor que en las plantas silvestres (apartado II.4, en la página 7). Nuestras observaciones concuerdan con las de Wilson-Sánchez *et al.* (2018), realizadas en primordios foliares, en los que la polarización de PIN1 no se alteraba en el mutante *vcc-1*. No obstante, dado que los resultados publicados en Wilson-Sánchez *et al.* (2018) se obtuvieron con plantas cultivadas en medio gelificado con agar para plantas (apartado III, en la página 8), sería conveniente visualizar la polarización de PIN1 durante la morfogénesis del margen foliar en plantas *vcc* cultivadas en medio gelificado con Gelrite. En efecto, en presencia de este último la penetrancia del fenotipo de *vcc* se incrementa considerablemente (Navarro-Cartagena, Núñez-Delegido, Olan-Villegas, Wilson-Sánchez, Navarro-Quiles y Micol, sin publicar).



**Figura 18.-** Visualización de la polarización de PIN1 en células de la raíz de Col-0 y *vcc-1*. Las fotografías de microscopía confocal corresponden a raíces de plantas (A-D) Col-0 y (E-H) *vcc-1 PIN1<sub>pro</sub>:PIN1:GFP* (la fluorescencia de la GFP se visualiza en verde), teñidas con yoduro de propidio (en rojo). (D, H) Ampliación de (C) y (G), respectivamente. Las flechas blancas indican la dirección de la polarización de PIN1 en la membrana plasmática. Las barras de escala indican 58  $\mu$ m. Las células de Col-0 son más alargadas que las de *vcc-1* porque las primeras corresponden a una capa más interna que las segundas. No se apreciaron cambios en la polarización de PIN1 en ninguna de las capas de las raíces que presentaron fluorescencia (27 de Col-0 y 14 de *vcc-1*). El brillo de estas imágenes fue aumentado de manera homogénea en un 60% para facilitar su visualización.

**VI.- CONCLUSIONES**



## VI.- CONCLUSIONES

Se han publicado descripciones discrepantes del fenotipo del mutante *vasculature complexity and connectivity-2* (*vcc-2*) y de la localización subcelular de la proteína VCC de *Arabidopsis*. Por un lado, Roschttardt et al. (2014) y Yanagisawa et al. (2021) afirmaron que el patrón de venación de los cotiledones de *vcc-2* es más simple e inconexo que el silvestre, y que VCC se localiza en la membrana celular. Por otro, según Wilson-Sánchez et al. (2018), las hojas de *vcc-2* muestran asimetría bilateral, y VCC radica en el retículo endoplásmico. Hemos intentado establecer si tales discrepancias se deben a diferentes condiciones de cultivo o a diseños erróneos de los transgenes usados para la obtención y visualización de proteínas de fusión entre VCC y una proteína fluorescente. Es por esto que en este Trabajo de Fin de Máster se ha estudiado el fenotipo foliar y el patrón de venación de los cotiledones de la estirpe silvestre Col-0 y de los mutantes simples *vcc-2*, *cuc2-3* y *cuc2-1D*, los mutantes múltiples *ipt3 ipt5 ipt7*, *cuc2-1D ipt3 ipt5 ipt7* y *vcc-2 ipt3 ipt5 ipt7*, y la estirpe mutante y transgénica *vcc-2 35S<sub>pro</sub>:VCC:CFP* de *Arabidopsis* en diferentes condiciones de luz y temperatura y en medios de cultivo gelificados con agar para plantas o Gelrite.

Los fenotipos foliares de las estirpes mencionadas en el párrafo anterior en diferentes condiciones de luz y temperatura arrojaron conclusiones similares a las previamente publicadas. No se observaron cambios apreciables en la morfología de su roseta, salvo bajo luz continua y a 20°C, situación en la que las plantas presentaron un color verde más oscuro que en las restantes condiciones de cultivo, posiblemente por estrés lumínico. No obstante, se observó que las plantas *vcc-2* cultivadas bajo fotoperiodo y a 23°C presentaron un margen foliar menos lobulado y asimétrico que bajo luz continua y a 20°C. Concluimos que el cultivo de los mutantes *vcc* bajo fotoperiodo y a 23°C es la causa más probable de que el fenotipo foliar del mutante *vcc-2* haya resultado desapercibido en el laboratorio de M.S. Otegui.

El uso de diferentes agentes gelificantes del medio de cultivo no influyó significativamente en el patrón de venación de los cotiledones de la mayoría de los mutantes estudiados en este trabajo. Solo se apreció una disminución en la complejidad de dicho patrón en las plantas *vcc-2*, que presentaron un mayor número de cotiledones con complejidad similar a la silvestre cuando se cultivaron bajo luz continua y a 20°C. El mutante *cuc2-3* presentó cotiledones con patrones de venación similares a los silvestres, pero también otros de menor complejidad, lo que sugiere que *CUC2* está implicado en el desarrollo vascular. Sin embargo, la aditividad observada en el doble mutante *cuc2-3 vcc-2* sugiere que los genes *CUC2* y *VCC* contribuyen de manera independiente al establecimiento del patrón de venación de los cotiledones. Los patrones de venación de los mutantes *cuc2-1D*, *ipt3 ipt5 ipt7* y *cuc2-1D ipt3 ipt5 ipt7* fueron similares al silvestre. Se identificaron patrones de venación con

aperturas apicales en cotiledones de distintas líneas analizadas, un tipo discontinuidad no contemplado en Yanagisawa *et al.* (2021). Con independencia de esta observación, nuestro análisis debería ser repetido analizando un número mayor de cotiledones por genotipo, a fin de realizar un análisis estadístico más concluyente.

Para establecer si la proteína VCC se localiza en el retículo endoplásmico o en la membrana plasmática y la vacuola (Wilson-Sánchez *et al.*, 2018; Yanagisawa *et al.*, 2021), en este Trabajo de Fin de Máster hemos usado un microscopio de fluorescencia confocal de superresolución para visualizar simultáneamente en células del meristemo apical de la raíz la proteína de fusión VCC:CFP y una proteína marcadora del retículo endoplásmico fusionada a la YFP. No se observó una colocación clara de estas dos proteínas. También se visualizó VCC:CFP a la vez que una proteína marcadora del aparato de Golgi, descartando claramente su posible colocación.

Ninguno de los transgenes descritos en los que VCC está fusionado a la región codificante de una proteína fluorescente rescata completamente el fenotipo de los mutantes *vcc*. Por este motivo, en este trabajo hemos iniciado el diseño y la construcción de los transgenes  $35S_{pro}:GFP:VCC$ ,  $35S_{pro}:VCC:YFP$  y  $VCC_{pro}:VCC:GFP$ , cuya transferencia a plantas *vcc* permitirá establecer si las proteínas de fusión que codifican son completamente funcionales y, si lo fuesen, permitirían determinar la localización subcelular de VCC con mayor fiabilidad.

Se ha descrito que la polarización del transportador de auxina PIN1 en la membrana plasmática de las células preprocambiales de los cotiledones de las plantas *vcc* está alterada (Yanagisawa *et al.*, 2021). No hemos confirmado esta observación, dado que en nuestras condiciones de trabajo se ha comprobado que PIN1 está polarizado hacia el ápice radicular en las células del meristemo apical de la raíz de modo similar en las plantas *vcc-1* y las silvestres. En consecuencia, la insuficiencia de función de VCC no parece alterar el transporte polar de la auxina en el meristemo apical de la raíz en nuestras condiciones de trabajo, al igual que se ha descrito previamente para los primordios foliares (Wilson-Sánchez *et al.*, 2018). Nuestras observaciones de la polarización de PIN1 en células del margen foliar de plantas *vcc* se realizaron en plantas cultivadas en medio gelificado con agar para plantas, en las que la penetrancia del fenotipo de asimetría bilateral es incompleta. Será necesario repetir estas observaciones en plantas *vcc* cultivadas en medio con Gelrite, en las que la penetrancia del fenotipo foliar es completa.

## **VII.- BIBLIOGRAFÍA**

## VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera Díaz, V. (2009). Búsqueda de modificadores del fenotipo morfológico de un mutante *argonaute1* viable. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Alonso-Peral, M.M., Candela, H., del Pozo, J.C., Martínez-Laborda, A., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (2006). The *HVE/CAND1* gene is required for the early patterning of leaf venation in *Arabidopsis*. *Development* **133**, 3755-3766.
- Alvarez, J.P., Furumizu, C., Efroni, I., Eshed, Y., y Bowman, J.L. (2016). Active suppression of a leaf meristem orchestrates determinate leaf growth. *Elife* **5**, e15023.
- Argyros, R.D., Mathews, D.E., Chiang, Y.H., Palmer, C.M., Thibault, D.M., Etheridge, N., Argyros, D.A., Mason, M.G., Kieber, J.J., y Schaller, G.E. (2008). Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development. *Plant Cell* **20**, 2102-2116.
- Barberá Aurá, I. (2022). Obtención y caracterización preliminar de plantas transgénicas *CUC2pro:CKX1* de *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Baylis, T., Cierlik, I., Sundberg, E., y Mattsson, J. (2013). *SHORT INTERNODES/STYLISH* genes, regulators of auxin biosynthesis, are involved in leaf vein development in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **197**, 737-750.
- Berná Amorós, G. (1997). Disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*: aislamiento y caracterización de mutantes inducidos mediante metanosulfonato de etilo. Tesis doctoral. Universidad de Alicante.
- Biedroń, M., y Banasiak, A. (2018). Auxin-mediated regulation of vascular patterning in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Cell Reports* **37**, 1215-1229.
- Bilsborough, G.D., Runions, A., Barkoulas, M., Jenkins, H.W., Hasson, A., Galinha, C., Laufs, P., Hay, A., Prusinkiewicz, P., y Tsiantis, M. (2011). Model for the regulation of *Arabidopsis thaliana* leaf margin development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **108**, 3424-3429.
- Byrne, M., Timmermans, M., Kidner, C., y Martienssen, R. (2001). Development of leaf shape. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 38-43.
- Cabezas Fuster, A. (2014). Construcción de microARN artificial en *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Candela Antón, H. (2001). Análisis genético de la formación del patrón de venación de la hoja en *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B. (1983). A plant miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **4**, 19-21.
- Donner, T.J., Sherr, I., y Scarpella, E. (2009). Regulation of preprocambial cell state acquisition by auxin signaling in *Arabidopsis* leaves. *Development* **136**, 3235-3246.
- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., y Pikaard, C.S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant Journal* **45**, 616-629.
- Ferrández Ayela, A. (2012). Caracterización genética y molecular de los mutantes *transcurvata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Gallego Serna, J.F. (2022). caracterización genética de los mutantes foliares *den6-1*, *den7-1*, *den10-1* y *as1-14* de *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Galvan-Ampudia, C.S., Cerutti, G., Legrand, J., Brunoud, G., Martin-Arevalillo, R., Azais, R., Bayle, V., Moussu, S., Wenzl, C., Jaillais, Y., Lohmann, J.U., Godin, C., y Vernoux, T. (2020). Temporal integration of auxin information for the regulation of patterning. *Elife* **9**, e55832.
- Govindaraju, P., Verna, C., Zhu, T., y Scarpella, E. (2020). Vein patterning by tissue-specific auxin transport. *Development* **147**, dev187666.
- Hajheidari, M., Wang, Y., Bhatia, N., Vuolo, F., Franco-Zorrilla, J.M., Karady, M., Mentink, R.A., Wu, A., Oluwatobi, B.R., Muller, B., Dello Ioio, R., Laurent, S., Ljung, K., Huijser, P., Gan, X., y Tsiantis, M. (2019). Autoregulation of *RCO* by low-affinity binding modulates cytokinin action and shapes leaf diversity. *Current Biology* **29**, 4183-4192.

- Hartley, J.L., Temple, G.F., y Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Research* **10**, 1788-1795.
- Holst, K., Schmülling, T., y Werner, T. (2011). Enhanced cytokinin degradation in leaf primordia of transgenic *Arabidopsis* plants reduces leaf size and shoot organ primordia formation. *Journal of Plant Physiology* **168**, 1328-1334.
- Horner, W., y Brunkard, J.O. (2021). Cytokinins stimulate plasmodesmatal transport in leaves. *Frontiers in Plant Science* **12**, 674128.
- Huang, X., Wang, G., Shen, Y., y Huang, Z. (2012). The wheat gene *TaST* can increase the salt tolerance of transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* **31**, 339-347.
- Kawamura, E., Horiguchi, G., y Tsukaya, H. (2010). Mechanisms of leaf tooth formation in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **62**, 429-441.
- Kneuper, I., Teale, W., Dawson, J.E., Tsugeki, R., Katifori, E., Palme, K., y Ditegou, F.A. (2021). Auxin biosynthesis and cellular efflux act together to regulate leaf vein patterning. *Journal of Experimental Botany* **72**, 1151-1165.
- Koizumi, K., Sugiyama, M., y Fukuda, H. (2000). A series of novel mutants of *Arabidopsis thaliana* that are defective in the formation of continuous vascular network: calling the auxin signal flow canalization hypothesis into question. *Development* **127**, 3197-3204.
- Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1987). Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service* **24**.
- Larue, C.T., Wen, J., y Walker, J.C. (2009). A microRNA-transcription factor module regulates lateral organ size and patterning in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **58**, 450-463.
- Liu, Y., Dong, Q., Kita, D., Huang, J.B., Liu, G., Wu, X., Zhu, X., Cheung, A.Y., Wu, H.M., y Tao, L.Z. (2017). RopGEF1 plays a critical role in polar auxin transport in early development. *Plant Physiology* **175**, 157-171.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., y Engel, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Primera edición. Cold Spring Harbord Laboratory Press.
- Meinke, D., y Koornneef, M. (1997). Community standards for *Arabidopsis* genetics. *Plant Journal* **12**, 247-253.
- Mewalal, R., Mizrachi, E., Coetzee, B., Mansfield, S.D., y Myburg, A.A. (2016). The *Arabidopsis* Domain of Unknown Function 1218 (DUF1218) containing proteins, MODIFYING WALL LIGNIN-1 and 2 (At1g31720/MWL-1 and At4g19370/MWL-2) function redundantly to alter secondary cell wall lignin content. *PLoS One* **11**, e0150254.
- Micol Ponce, R. (2011). Aislamiento y caracterización de nuevas mutaciones supresoras del fenotipo de *argonaute1-52*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M., y Kakimoto, T. (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal* **37**, 128-138.
- Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G., y Kakimoto, T. (2006). Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **103**, 16598-16603.
- Muñoz Díaz, E. (2017). Análisis de las interacciones de *DESIGUAL1* con *PASTICCINO2* y *ECERIFERUM10* en *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Navarro-Cartagena, S., y Micol, J.L. (2023). Is auxin enough? Cytokinins and margin patterning in simple leaves. *Trends in Plant Science* **28**, 54-73.
- Navarro Cartagena, S. (2016). Análisis de la regulación de la expresión del gen *DEALI* de *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández.

- Navarro Quiles, C. (2015). El gen *APICULATA7* contribuye a la dorsoventralidad foliar en *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández.
- Nelson, B.K., Cai, X., y Nebenführ, A. (2007). A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant Journal* **51**, 1126-1136.
- Niedermaier, S., Schneider, T., Bahl, M.O., Matsubara, S., y Huesgen, P.F. (2020). Photoprotective acclimation of the *Arabidopsis thaliana* leaf proteome to fluctuating light. *Frontiers in Genetics* **11**.
- Nikovics, K., Blein, T., Peaucelle, A., Ishida, T., Morin, H., Aida, M., y Laufs, P. (2006). The balance between the *MIR164A* and *CUC2* genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 2929-2945.
- Odat, O., Gardiner, J., Sawchuk, M.G., Verna, C., Donner, T.J., y Scarpella, E. (2014). Characterization of an allelic series in the *MONOPTEROS* gene of *Arabidopsis*. *Genesis* **52**, 127-133.
- Ortega Menaches, A. (2020). Identificación y caracterización de nuevos genes *DENTICULATA* en *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández.
- Pérez-Pérez, J.M., Candela, H., y Micol, J.L. (2009). Understanding synergy in genetic interactions. *Trends in Genetics* **25**, 368-376.
- Pérez Pérez, J.M. (2003). Caracterización genética y molecular de los mutantes *ultracurvata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Ponce Molet, M.R. (1996). Aislamiento y caracterización molecular de genes de la superfamilia del TGF-beta que se expresan en el embrión de *Strogylocentrotus purpuratus*. Tesis doctoral. Universidad de Alicante.
- Prerostova, S., Dobrev, P.I., Kramna, B., Gaudinova, A., Knirsch, V., Spichal, L., Zatloukal, M., y Vankova, R. (2020). Heat acclimation and inhibition of cytokinin degradation positively affect heat stress tolerance of *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **11**, 87-100.
- Robles Ramos, P. (1999). Análisis genético de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología de la hoja. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Ros Sirvent, M. (2020). Identificación de genes implicados en la morfogénesis del margen foliar en *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Roschttardt, H., Paez-Valencia, J., Dittakavi, T., Jali, S., Reyes, F.C., Baisa, G., Anne, P., Gissot, L., Palauqui, J.C., Masson, P.H., Bednarek, S.Y., y Otegui, M.S. (2014). The *VASCULATURE COMPLEXITY AND CONNECTIVITY* gene encodes a plant-specific protein required for embryo provascular development. *Plant Physiology* **166**, 889-902.
- Sanchez-Serrano, J.J., y Salinas, J. (2014). *Arabidopsis Protocols*. Tercera edición. Humana Press.
- Sarmiento Mañús, R. (2011). Análisis genético de mutantes variegados de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Sauer, M., y Kleine-Vehn, J. (2019). PIN-FORMED and PIN-LIKES auxin transport facilitators. *Development* **146**, dev168088.
- Shani, E., Burko, Y., Ben-Yaakov, L., Berger, Y., Amsellem, Z., Goldshmidt, A., Sharon, E., y Ori, N. (2009). Stage-specific regulation of *Solanum lycopersicum* leaf maturation by class 1 KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN proteins. *Plant Cell* **21**, 3078-3092.
- Sieburth, L.E., Muday, G.K., King, E.J., Benton, G., Kim, S., Metcalf, K.E., Meyers, L., Seamen, E., y Van Norman, J.M. (2006). *SCARFACE* encodes an ARF-GAP that is required for normal auxin efflux and vein patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1396-1411.
- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B., y Hood, L.E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**, 674-679.
- Teale, W.D., Paponov, I.A., y Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 847-859.
- ten Hove, C.A., Lu, K.J., y Weijers, D. (2015). Building a plant: cell fate specification in the early *Arabidopsis* embryo. *Development* **142**, 420-430.

- Uemura, T., Suda, Y., Ueda, T., y Nakano, A. (2014). Dynamic behavior of the *trans*-golgi network in root tissues of *Arabidopsis* revealed by super-resolution live imaging. *Plant and Cell Physiology* **55**, 694-703.
- Verna, C., Ravichandran, S.J., Sawchuk, M.G., Linh, N.M., y Scarpella, E. (2019). Coordination of tissue cell polarity by auxin transport and signaling. *eLIFE* **8**, e51061.
- Wendrich, J.R., y Weijers, D. (2013). The *Arabidopsis* embryo as a miniature morphogenesis model. *New Phytologist* **199**, 14-25.
- Wilson-Sánchez, D., Rubio-Díaz, S., Muñoz-Viana, R., Pérez-Pérez, J.M., Jover-Gil, S., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (2014). Leaf phenomics: a systematic reverse genetic screen for *Arabidopsis* leaf mutants. *Plant Journal* **79**, 878-891.
- Wilson-Sánchez, D., Martínez-López, S., Navarro-Cartagena, S., Jover-Gil, S., y Micol, J.L. (2018). Members of the DEAL subfamily of the DUF1218 gene family are required for bilateral symmetry but not for dorsoventrality in *Arabidopsis* leaves. *New Phytologist* **217**, 1307-1321.
- Wybouw, B., y De Rybel, B. (2019). Cytokinin – A developing story. *Trends in Plant Science* **24**, 177-185.
- Yanagisawa, M., Poitout, A., y Otegui, M.S. (2021). *Arabidopsis* vascular complexity and connectivity controls PIN-FORMED1 dynamics and lateral vein patterning during embryogenesis. *Development* **148**, dev197210.
- Zhang, W., Ito, H., Quint, M., Huang, H., Noël, L.D., y Gray, W.M. (2008). Genetic analysis of CAND1-CUL1 interactions in *Arabidopsis* supports a role for CAND1-mediated cycling of the SCFTIR1 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**, 8470-8475.