



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Confirmación mediante análisis genético
de la relación de ICU11 con componentes
de la ruta de la S-adenosil-L-metionina
en Arabidopsis**

Carlos Palazón Almodóvar

Tutores:

José Luis Micol Molina

Lucía Juan Vicente

Máster en Biotecnología y Bioingeniería

Instituto de Bioingeniería

Curso académico 2023-2024

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

LUCÍA JUAN VICENTE, contratada predoctoral de 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 Carlos Palazón Almodóvar 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.

Lucía Juan Vicente

José Luis Micol Molina

Elche, 2 de septiembre de 2024

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE TABLAS	II
I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	1
II.- INTRODUCCIÓN	2
II.1.- La epigenética del desarrollo de las plantas	2
II.1.1.- Naturaleza y función de las marcas epigenéticas de las histonas	2
II.1.2.- La floración como ejemplo de proceso regulado epigenéticamente.....	3
II.2.- Disfunciones del ciclo de la S-adenosil-L-metionina con efectos epigenéticos	4
II.2.1.- El ciclo de la S-adenosil-L-metionina	4
II.2.2.- Mutaciones en genes que codifican proteínas del ciclo de la SAM	6
II.3.- Construcción y transferencia de transgenes silenciadores en Arabidopsis	7
II.3.1.- Transferencia de construcciones.....	7
II.3.2.- Construcción de transgenes productores de amiARN y sin-tasiARN	8
III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	9
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	10
IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria	10
IV.2.- Abreviaturas, acrónimos y fórmulas químicas	10
IV.3.- Gramática y terminología	10
IV.4.- Nomenclatura genética	11
IV.5.- Estirpes de Arabidopsis empleadas en este trabajo	11
IV.6.- Condiciones de cultivo de Arabidopsis	11
IV.6.1.- Cultivo en placa de Petri	12
IV.6.2.- Cultivo en maceta.....	12
IV.6.3.- Recolección de semillas	13
IV.7.- Disoluciones	13
IV.7.1.- Medios de cultivo para Arabidopsis.....	13
IV.7.1.1.- Medios de cultivo líquidos	14
IV.7.1.2.- Medios de cultivo sólidos.....	14
IV.7.1.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos.....	15
IV.7.2.- Disoluciones para electroforesis	15
IV.8.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos.....	15
IV.8.1.- Aislamiento de ARN para RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	15
IV.8.2.- Retrotranscripción de ARN.....	15
IV.8.3.- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	16
IV.9.- Observación de la morfología de las plantas y microfotografía	16
IV.10.- Análisis bioinformáticos	16
IV.11.- Pruebas estadísticas	17

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
V.1.- Interpretación del fenotipo morfológico de plantas transgénicas en las que se han cosilenciado los genes <i>ADK1</i> y <i>ADK2</i>	18
V.1.1.- Plantas <i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2</i>	18
V.1.2.- Plantas <i>sin-tasiR-ICU11/ADK1/ADK2</i>	20
V.2.- Análisis del fenotipo morfológico de plantas transgénicas en las que se ha silenciado el gen <i>CIMS</i>	21
V.2.1.- Plantas <i>amiR-CIMS</i>	21
V.2.2.- Plantas <i>sin-tasiR-CIMS/ICU11</i>	22
V.3.- Interpretación del fenotipo morfológico de plantas transgénicas en las que se han silenciado los genes <i>DRE2</i> e <i>ICU11</i>	24
V.3.1.- Plantas <i>icu11-1 amiR-DRE2</i>	24
V.3.2.- Plantas <i>sin-tasiR-DRE2/ICU11</i>	25
V.4.- Análisis comparativo de los perfiles transcriptómicos de los mutantes <i>atms1-1</i> , <i>dre2-4</i> , <i>icu11-5</i> e <i>icu11-5 cp2-1</i>	27
VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	33
VII.- BIBLIOGRAFÍA	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Ejemplos de marcas epigenéticas en la histona H3	2
Figura 2.- Regulación de la floración por el fotoperiodo y la vernalización	3
Figura 3.- El ciclo de la SAM	5
Figura 4.- Mapas de los dos tipos de plásmidos que componen los sistemas binarios basados en los pTi de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	8
Figura 5.- Fenotipo morfológico de las flores de las plantas <i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2</i>	19
Figura 6.- Fenotipo morfológico de las inflorescencias y las flores de las plantas <i>sin-tasiR-ADK1/ADK2/ICU11</i>	21
Figura 7.- Fenotipo morfológico de las plantas <i>amiR-CIMS</i> . Se muestran rosetas de plantas (A) Col-0 y (B) <i>amiR-CIMS</i>	22
Figura 8.- Fenotipo morfológico de las plantas <i>sin-tasiR-CIMS/ICU11</i>	23
Figura 9.- Fenotipo morfológico de las plantas <i>amiR-DRE2</i>	26
Figura 10.- Fenotipo morfológico de las plantas <i>sin-tasiR-DRE2/ICU11</i>	28
Figura 11.- Análisis comparativo de los perfiles transcriptómicos de los mutantes <i>atms1-1</i> y <i>dre2-4</i> con los de <i>icu11-5</i> e <i>icu11-5 cp2-1</i>	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Abreviaturas empleadas en este trabajo	10
Tabla 2.- Estirpes de <i>Arabidopsis</i> usadas en este trabajo	11

Tabla 3.- Análisis de la segregación de la resistencia a higromicina en líneas T ₂ derivadas de la transformación de plantas <i>icuil1-1</i> con el transgén <i>amiR-ADK1/ADK2</i>	19
Tabla 4.- Análisis de la segregación de la resistencia a higromicina en líneas T ₂ derivadas de la transformación de plantas Col-0 con el transgén <i>sin-tasiR-ICU11/ADK1/ADK2</i>	20
Tabla 5.- Análisis de la segregación de la resistencia a higromicina en líneas T ₂ derivadas de la transformación de plantas Col-0 con el transgén <i>amiR-CIMS</i>	22
Tabla 6.- Análisis de la segregación de la resistencia a higromicina en líneas T ₂ derivadas de la transformación de plantas Col-0 con el transgén <i>sin-tasiR-CIMS/ICU11</i>	23
Tabla 7.- Análisis de la segregación de la resistencia a higromicina en líneas T ₂ derivadas de la transformación de plantas Col-0 e <i>icuil1-1</i> con el transgén <i>amiR-DRE2</i>	25
Tabla 8.- Análisis de la segregación de la resistencia a higromicina en líneas T ₂ derivadas de la transformación de plantas Col-0 con el transgén <i>sin-tasiR-DRE2/ICU11</i>	27
Tabla 9.- Desregulación de los genes de las categorías identificadas en los análisis de enriquecimiento GO de los mutantes <i>atms1-1</i> e <i>icuil1-5</i> respecto a Col-0.....	29
Tabla 10.- Desregulación de los genes de las categorías identificadas en los análisis de enriquecimiento GO en <i>atms1-1</i> e <i>icuil1-5 cp2-1</i> respecto a Col-0.....	30
Tabla 11.- Niveles de expresión de los genes de las categorías detectadas en los análisis de enriquecimiento GO en mutantes <i>dre2-4</i> e <i>icuil1-5 cp2-1</i> respecto a Col-0	32

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Los genes *INCURVATA11* (*ICU11*) y *CUPULIFORMIS2* (*CP2*) de *Arabidopsis* son parálogos funcionalmente redundantes. Se sabe que la proteína ICU11 —y se asume que también CP2— contribuye a la transición entre la marca epigenética activadora H3K36me3 y la represora H3K27me3. En el laboratorio de J.L. Micol se realizó un ensayo del doble híbrido de la levadura para identificar presuntas interactoras de ICU11, en el que se identificaron tres relacionadas con el ciclo de la S-adenosil-L-metionina (SAM): ADENOSINE KINASE 2 (*ADK2*), COBALAMIN-INDEPENDENT METHIONINE SYNTHASE (*CIMS*) y DEREPRESSED FOR RIBOSOMAL PROTEIN S14 EXPRESSION 2 (*DRE2*). Para eludir los inconvenientes derivados de la letalidad de los mutantes nullos dobles *adk1 adk2* y los simples *cims* y *dre2*, se generaron y transfirieron a *Arabidopsis* transgenes productores de microARN artificiales para silenciar parcialmente *ADK1* y *ADK2*, *CIMS* o *DRE2*, y cosilenciarlos con *ICU11*. En este Trabajo de Fin de Máster hemos caracterizado el fenotipo morfológico de dichas líneas transgénicas, concluyendo que *ICU11* interacciona genéticamente con *ADK1* y *ADK2*. También hemos comparado los perfiles transcriptómicos publicados de los mutantes *atms1-1* y *dre2-4*, *icu11-5* e *icu11-5 cp2-1*, para identificar genes concordantemente desregulados y contrastar la hipótesis de la existencia de relación funcional de *CIMS* y *DRE2* con *ICU11*.

Palabras clave: SAM, amiARN, sin-tasiARN, *INCURVATA11*, epigenética.

The *Arabidopsis INCURVATA11* (*ICU11*) and *CUPULIFORMIS2* (*CP2*) genes are functionally redundant paralogs. It is known that the ICU11 protein—and assumed that CP2 as well—contributes to the transition between the activating epigenetic mark H3K36me3 and the repressive mark H3K27me3. In the laboratory of J.L. Micol, a yeast two-hybrid assay was conducted to identify potential interactors of ICU11, identifying three related to the S-adenosyl-L-methionine (SAM) cycle: ADENOSINE KINASE 2 (*ADK2*), COBALAMIN-INDEPENDENT METHIONINE SYNTHASE (*CIMS*), and DEREPRESSED FOR RIBOSOMAL PROTEIN S14 EXPRESSION 2 (*DRE2*). To circumvent the inconveniences arising from the lethality of null *adk1 adk2* double mutants and *cims* and *dre2* single mutants, transgenes producing artificial microRNAs were generated and transferred into *Arabidopsis*, to partially silence *ADK1* and *ADK2*, *CIMS*, or *DRE2*, and to cosilence these genes with *ICU11*. In this Master's thesis, we characterized the morphological phenotype of these transgenic lines concluding that *ICU11* genetically interacts with *ADK1* and *ADK2*. We also compared the published transcriptomic profiles of the *atms1-1* and *dre2-4* mutants with those of *icu11-5* and *icu11-5 cp2-1* to identify concordantly deregulated genes and to test the hypothesis of a functional relationship of *CIMS* and *DRE2* with *ICU11*.

Keywords: SAM, amiARN, sin-tasiARN, *INCURVATA11*, epigenetics.

II.- INTRODUCCIÓN

II.- INTRODUCCIÓN

II.1.- La epigenética del desarrollo de las plantas

II.1.1.- Naturaleza y función de las marcas epigenéticas de las histonas

Se considera epigenéticas a las modificaciones en la actividad génica que no están asociadas a cambios en la secuencia del ADN, son mitóticamente heredables y dependen de la modificación química de las histonas o el ADN (Mendizabal *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2014).

La metilación del ADN con efectos epigenéticos se da en los eucariotas en el quinto átomo de carbono de la citosina (5-metilcitosina; Nasrullah *et al.*, 2022). La 5-metilcitosina es frecuente en las regiones del genoma que son ricas en elementos transponibles, aunque también se observa en genes que codifican proteínas. Esta metilación suele estar asociada al silenciamiento génico o al *splicing* alternativo cuando ocurre en los promotores o en los exones, respectivamente (Richards y Elgin, 2002; Zilberman *et al.*, 2007; Maunakea *et al.*, 2013; Pikaard y Mittelsten Scheid, 2014).

Las histonas son proteínas que forman los nucleosomas, las unidades estructurales básicas de la cromatina, cada uno de los cuales incluye un segmento de ADN de 145-147 pb y dos copias cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Luger *et al.*, 1997). Se han descrito diversas modificaciones químicas de las histonas, como la acetilación, la glicosilación, la metilación, la fosforilación y la ubiquitinación, usualmente en las lisinas (K) o argininas (R) de sus colas aminoterminal (Cervantes-Laurean *et al.*, 1996; Grunstein, 1997; Lo *et al.*, 2001; Zhang y Reinberg, 2001; Sridhar *et al.*, 2007). Estas modificaciones están asociadas a la activación o la represión de la transcripción en función de su naturaleza química y del aminoácido modificado. Por ejemplo, las marcas H3K4me3 y H3K36me3 (la trimetilación de las lisinas 4 y 36 de la histona H3, respectivamente) son activadoras, mientras que las H3K9me2 y H3K27me3 son represoras (Figura 1). También es relevante el número de grupos metilo incorporados a un aminoácido: la marca H3K9me2, con dos metilos en la lisina 9 de la histona H3, es represora, pero la H3K9me3, con tres, es activadora en *Arabidopsis thaliana* (en adelante, *Arabidopsis*) (Roudier *et al.*, 2009).

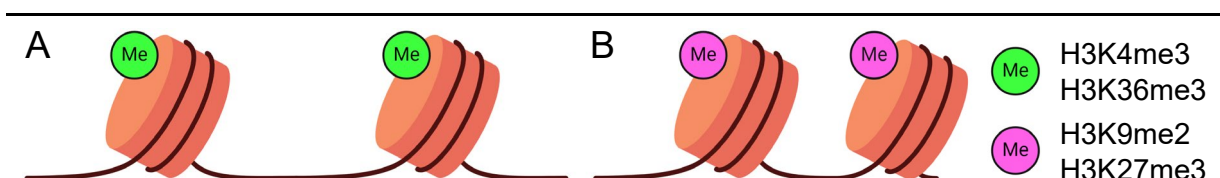


Figura 1.- Ejemplos de marcas epigenéticas en la histona H3. (A) Se representan en verde las marcas activadoras H3K4me3 y H3K36me3, y (B) en magenta, las represoras H3K9me2 y H3K27me3, que están respectivamente asociadas a estados transcripcionalmente activos o inactivos de la cromatina. Inspirado en Roudier *et al.* (2009).

II.1.2.- La floración como ejemplo de proceso regulado epigenéticamente

Las plantas perciben señales de su entorno y adaptan su desarrollo a las condiciones ambientales modulando la expresión de numerosos genes (Yaish *et al.*, 2011). En estos procesos participan las marcas epigenéticas H3K4me3 y H3K27me3, que regulan la transcripción de genes que inducen la floración en respuesta a la luz (You *et al.*, 2017).

En el desarrollo vegetal juegan un papel central los meristemos, tejidos integrados por células indiferenciadas, totipotentes y de división muy activa (Fletcher, 2002). La floración supone un cambio en la identidad vegetativa del meristemo apical del tallo de *Arabidopsis*, que pasa de producir órganos vegetativos, como las hojas de la roseta, a reproductivos, como las flores (Cho *et al.*, 2017). Esta transición de la fase vegetativa a la reproductiva de su ciclo de vida depende de determinantes ambientales como el fotoperiodo y la vernalización (Andrés y Coupland, 2012) y es crucial para asegurar su éxito reproductivo (Mahmood *et al.*, 2024).

Las plantas responden a los cambios del fotoperiodo (la duración del día y la noche) a lo largo del año. Uno de los genes implicados en esta respuesta es *CONSTANS* (*CO*), cuyos ARNm alcanzan sus niveles máximos al anochecer. *CO* es un factor de transcripción que activa a *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) y *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*), que codifican factores de transcripción que modulan la expresión de genes que promueven la floración. La proteína *CO* es degradada durante la noche por el proteasoma (Suárez-López *et al.*, 2001) y el gen *FT* permanece reprimido durante el día y se activa al anochecer (Figura 2; Yoo *et al.*, 2005; Andrés y Coupland, 2012).

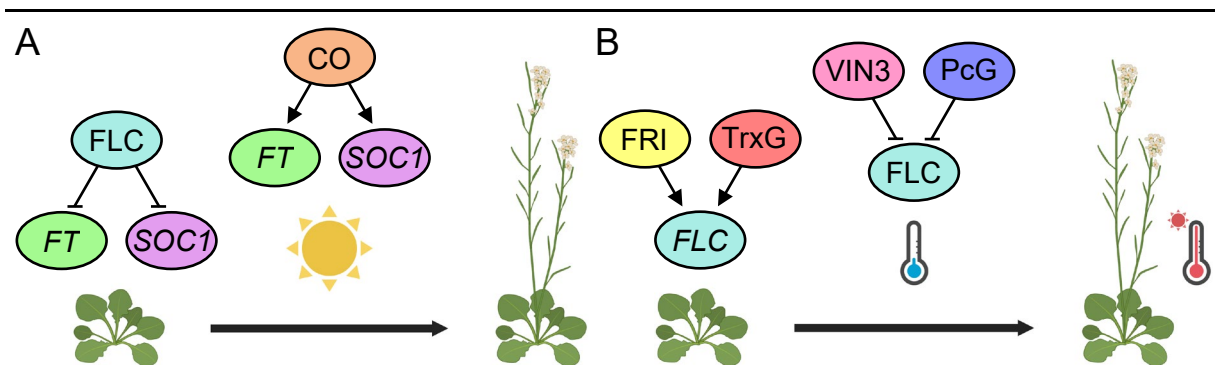


Figura 2.- Regulación de la floración por el fotoperiodo y la vernalización. (A) En días cortos o en la oscuridad, *FLC* reprime la expresión de *FT* y *SOC1*, que promueven la floración. En días largos o cuando aumenta la exposición a la luz, *CO* induce la expresión de *FT* y *SOC1* y se produce la floración. (B) Antes de la vernalización, *FRI* y determinadas proteínas del *TrxG* inducen la expresión de *FLC*, impidiendo la floración. Durante una exposición prolongada al frío, *VIN3* y algunas proteínas del *PcG* reprimen a *FLC* y solo tras el retorno del calor se produce la floración. Los símbolos →, −, ☀, ❄ y 🌡 representan la activación y la represión transcripcional, la luz solar y las temperaturas invernales y primaverales, respectivamente. Inspirado en Mahmood *et al.* (2024).

La temperatura es otra variable ambiental que contribuye a determinar el momento en el que ocurre la floración. En las plantas bienales y las anuales de invierno, la transición de la fase vegetativa a la reproductiva solo ocurre tras un periodo prolongado de frío al que sucede el retorno a temperaturas más altas (Sung y Amasino, 2004; Deng *et al.*, 2011). Este fenómeno se denomina vernalización y se debe a la represión del gen que codifica el factor de transcripción FLOWERING LOCUS C (FLC), que a su vez reprime a los genes *FT* y *SOC1*. En la fase vegetativa del ciclo de vida de *Arabidopsis*, el factor de transcripción FRIGIDA (FRI) induce la expresión del gen *FLC*, impidiendo la floración (Jiang *et al.*, 2009). La vernalización promueve la interacción del factor de transcripción VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3), que tiene un homeodominio de las plantas (PHD; Plant HomeoDomain), con proteínas del grupo Polycomb (PcG; Polycomb Group) para silenciar a *FLC* (Johanson *et al.*, 2000; Sung y Amasino, 2004). Los PHD se unen a las modificaciones químicas de las histonas y median la activación y represión de los genes (Mouriz *et al.*, 2015). Las proteínas del PcG forman parte de complejos modificadores de la cromatina denominados Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) y PRC2, que reprimen la transcripción de muchos genes. El PRC2 tiene actividad metiltransferasa y cataliza la trimetilación de la H3K27, depositando en consecuencia la marca H3K27me3 en la cromatina de *FLC*, causando la represión de la transcripción de este gen (Figura 2B, en la página 3; Di Croce y Helin, 2013; Tian *et al.*, 2019).

Las proteínas del grupo Trithorax (TrxG, por Trithorax group) también modulan la expresión génica, ya que inducen la transcripción de genes depositando marcas epigenéticas activadoras al metilar las lisinas 4 y 36 de la H3 (H3K4 y H3K36; Figura 2; Schuettengruber *et al.*, 2007). De hecho, los perfiles de las marcas H3K36me3 y H3K27me3 en *FLC* son opuestos durante la iniciación de la floración y raramente coexisten en la misma cola de una histona, lo que sugiere que la presencia de una de ellas impide el depósito de la otra, y viceversa (Yang *et al.*, 2014).

II.2.- Disfunciones del ciclo de la S-adenosil-L-metionina con efectos epigenéticos

II.2.1.- El ciclo de la S-adenosil-L-metionina

La S-adenosil-L-metionina (SAM) es el donante universal de grupos metilo en las reacciones de metilación en todos los seres vivos (Fustin *et al.*, 2020; Fukumoto *et al.*, 2022). La síntesis, el reciclaje y transporte de la SAM son consecuencia de reacciones que se agrupan en el denominado ciclo de la SAM (Figura 3, en la página 5). En *Arabidopsis*, el ciclo de la SAM comienza cuando la FOLYLPOLYGLUTAMATE SYNTHETASE 1 (FPGS1) poliglutamila al glutamato-5-metil-tetrahidrofolato (5-CH₃-THF-Glu₁) rindiendo 5-CH₃-THF-

Glu_n (Ravanel *et al.*, 2001). Posteriormente, se transfiere el grupo metilo de este último a la homocisteína (Hcy), dando lugar a THF-Glu_n y metionina (Met; Figura 3). Esta reacción está catalizada por una metionina sintasa (Friso *et al.*, 2002; Ravanel *et al.*, 2004). Se conocen dos tipos de estas enzimas, dependientes o independientes de cobalamina, habiéndose descrito en las plantas solo las segundas (Eckermann *et al.*, 2000), que en *Arabidopsis* están codificadas por los genes parálogos *COBALAMIN-INDEPENDENT METHIONINE SYNTHASE* (*CIMS*; también denominado *ARABIDOPSIS THALIANA METHIONINE SYNTHASE 1* [*ATMS1*]), *ATMS2* y *ATMS3*. La expresión de *ATMS1* es unas diez veces mayor que la de *ATMS2*, siendo mucho menor la de *ATMS3* (Yan *et al.*, 2019).

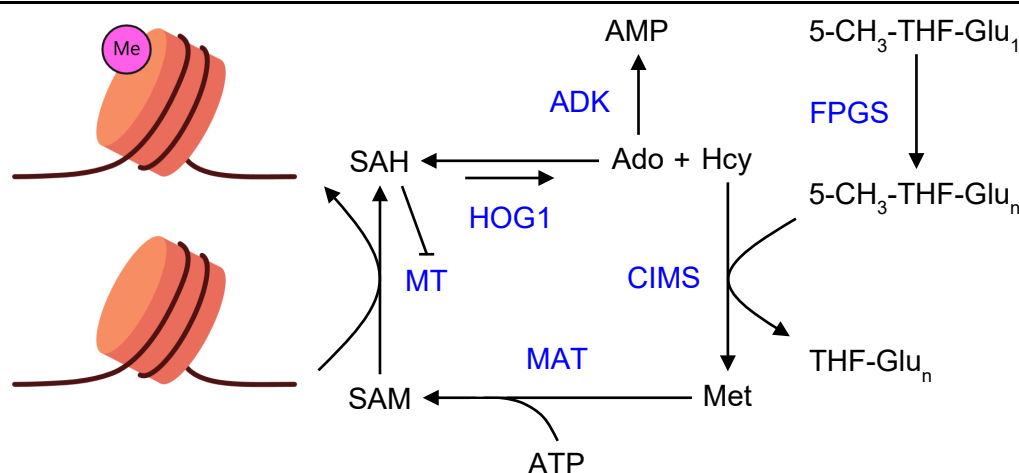


Figura 3.- El ciclo de la SAM. Se representan en negro los sustratos y productos de las reacciones y en azul las enzimas que las catalizan. Los símbolos \rightarrow y \dashv representan el sentido de las reacciones y la inhibición de la actividad de una metiltransferasa (MT), respectivamente. El ciclo comienza cuando la FPGS cataliza la síntesis de 5-CH₃-THF-Glu_n, que será el donante del grupo metilo en la reacción de síntesis de metionina (Met) a partir de homocisteína (Hcy), que es catalizada por la CIMS. Las MAT usan Met y adenosín trifosfato (ATP) como sustratos para sintetizar la SAM, que es la donante de grupos metilo en las reacciones de metilación catalizadas por las MT. Los productos de esta reacción son la SAH y un sustrato metilado, que puede ser una histona. HOG1 hidroliza la SAH rindiendo adenosina (Ado) y Hcy. Las ADK convierten la Ado en adenosín monofosfato (AMP) y la Hcy se usa como sustrato en la síntesis de Met. Inspirado en Meng *et al.* (2018).

Alrededor del 80% de la metionina disponible en las células de las plantas es usada, junto con el adenosín trifosfato (ATP), como sustratos para la síntesis de SAM por las SAM sintetasas (SAMS; Figura 3), que en *Arabidopsis* están codificadas por *METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE 1* (*MAT1*), *MAT2*, *MAT3* y *MAT4* (Bleich *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2018). La SAM es utilizada como sustrato por las metiltransferasas (MT) para la transferencia de grupos metilo a moléculas como el ADN, el ARN, determinadas proteínas como las

histonas (Figura 3, en la página 5; Struck *et al.*, 2012) y metabolitos y se genera S-adenosil-L-homocisteína (SAH; Sauter *et al.*, 2013). La SAH inhibe a las MT, y su afinidad por estas enzimas es mayor que la de la SAM (Figura 3), por lo que la ratio SAM/SAH modula las reacciones de transmetilación (Cantoni, 1953; 1985).

La SAH es hidrolizada por la SAH hidrolasa (SAHH), que en Arabidopsis está codificada por *HOMOLOGY-DEPENDENT GENE SILENCING 1 (HOG1)*, obteniendo como subproductos Hcy y adenosina (Ado; Figura 3; Rocha *et al.*, 2005). Para mantener la ratio SAM/SAH, las ADENOSINE KINASE 1 (ADK1) y ADK2 catalizan la conversión de Ado en adenosín monofosfato (AMP; Figura 3). La identidad entre estas dos enzimas es de un 92% y se expresan constitutivamente tanto en las flores como en las raíces de Arabidopsis, propiciando la degradación de la SAH para evitar la inhibición de las MT (Figura 3; Moffatt *et al.*, 2000; 2002). El ciclo de la SAM mantiene unos niveles constantes de esta molécula, cuya concentración intracelular es baja, al igual que la de la SAH.

El gen *DRE2* de Arabidopsis codifica una proteína que participa en la ruta citoplásmica de ensamblaje de centros hierro-azufre (CIA, por Cytosolic Iron-sulfur cluster Assembly). Esta ruta es esencial para las proteínas que contienen centros hierro-azufre, que participan en la respiración, la fotosíntesis, el metabolismo de los aminoácidos y las purinas, la replicación y la reparación del ADN (Lill, 2009). La proteína DRE2 contiene un dominio de unión a la SAM similar al de las MT que usan a esta última como sustrato. Aunque DRE2 carece de actividad metiltransferasa, se considera posible su unión a la SAM mediada por otras proteínas (Soler *et al.*, 2012). La presencia de dicho dominio podría hacer que DRE2 secuestre a la SAM y reduzca su disponibilidad para otras reacciones.

II.2.2.- Mutaciones en genes que codifican proteínas del ciclo de la SAM

La depleción de los componentes del ciclo de la SAM altera la metilación del ADN y de las histonas en los eucariotas (Serefidou *et al.*, 2019). Por ejemplo, en los mutantes portadores de alelos de pérdida de función de *FOLYL POLYGLUTAMATE SYNTHETASE 1 (FPGS1)* de Arabidopsis, la metilación del ADN y la marca H3K9me2 están reducidas (Zhou *et al.*, 2013).

El mutante *atms3* no muestra ningún fenotipo morfológico ni molecular, ya que ATMS3 se localiza en el cloroplasto, orgánulo que puede importar la metionina que se sintetiza en otros compartimentos subcelulares. El mutante *atms2* muestra una reducción significativa en los niveles de metionina respecto a su tipo silvestre, aunque no manifiesta alteraciones epigenéticas. Por su parte, el alelo hipomorfo *atms1-1* reduce los niveles de la metilación del ADN y de la marca H3K9me2, pero no causa alteraciones morfológicas (Yan *et al.*, 2019). Los mutantes *cims-1* y *cims-2* son letales (Cerdá Bernad, 2018).

En los mutantes *mat1*, *mat2* y *mat3* se reducen los niveles de la SAM menos que en *mat4*, lo que sugiere que el gen *MAT4* tiene un papel más importante que los de *MAT1*, *MAT2* y *MAT3*. En los mutantes *mat4* también se reducen la metilación del ADN y la marca H3K9me2, como en los *fpgs1* y *atms1* (Meng *et al.*, 2018). Los alelos hipomorfos del gen *HOG1* retrasan la germinación y reducen el crecimiento, la fertilidad y la viabilidad de las semillas. Los mutantes *hog1-1* y *hog1-2* presentan peciolos cortos, irregularidades en el limbo foliar, crecimiento retrasado y una reducción general de la metilación del ADN y las histonas (Rocha *et al.*, 2005; Mull *et al.*, 2006).

Aunque los mutantes simples *adk1* y *adk2* son fenotípicamente silvestres, los dobles mutantes *adk1 adk2* son letales embrionarios (Young *et al.*, 2006). El silenciamiento parcial simultáneo de *ADK1* y *ADK2* con un microARN artificial (amiARN) produce plantas de crecimiento retardado; sus hojas son arrugadas y sus flores y silicuas están agrupadas. Además, estas últimas son más pequeñas y producen menos semillas que las de Col-0 (Lee, 2010). Los alelos *dre2-1* y *dre2-2* de *DRE2* son letales recesivos (Cerdá Bernad, 2018).

La semejanza del fenotipo molecular de las mutaciones en genes que codifican proteínas del ciclo de la SAM sugiere que la desregulación en la síntesis, degradación y reciclaje de esta molécula se traducen en alteraciones de los niveles de metilación, tanto del ADN como de las histonas (Serefidou *et al.*, 2019), que pueden ser letales.

II.3.- Construcción y transferencia de transgenes silenciadores en Arabidopsis

II.3.1.- Transferencia de construcciones

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria que infecta a plantas angiospermas y gimnospermas e integra en el genoma de las células hospedadoras un segmento de sus plásmidos inductores de tumores (pTi; Tumor inducing plasmid), que recibe el nombre de ADN transferente (ADN-T), generando tumores denominados agallas de la corona. El ADN-T contiene regiones flanqueantes denominadas LB (Left Border) y RB (Right Border) que se requieren para su integración en posiciones aleatorias del genoma de la planta infectada (Chilton *et al.*, 1977; Thomashow *et al.*, 1980; Gelvin, 2003).

Se han desarrollado sistemas de transformación de Arabidopsis que facilitan la construcción de transgenes y su transferencia posterior a las plantas, a los que se denomina binarios porque incluyen dos plásmidos, cada uno de los cuales contiene parte de los genes originalmente presentes en los pTi: uno de ellos contiene los genes *vir* (el denominado plásmido auxiliar) y el otro, el ADN-T (el plásmido binario; Hoekema *et al.*, 1984; Lee y Gelvin, 2008). El plásmido binario es un vector lanzadera que contiene orígenes de replicación para *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 4, en la página 8; Lee y Gelvin, 2008).

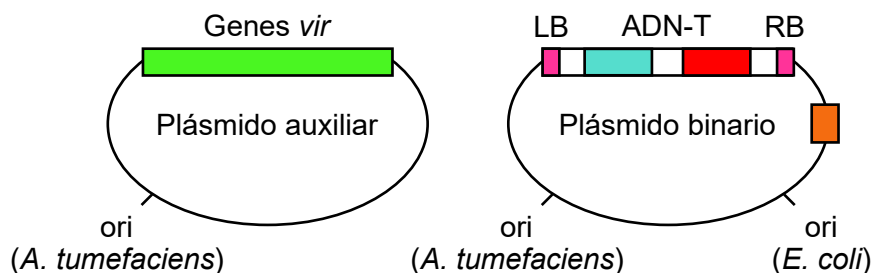


Figura 4.- Mapas de los dos tipos de plásmidos que componen los sistemas binarios basados en los pTi de *Agrobacterium tumefaciens*. El plásmido auxiliar contiene los genes *vir* (representados en verde) necesarios para el procesamiento del ADN-T, su transporte al núcleo de la célula hospedadora y su integración en el genoma de esta última. Las secuencias LB y RB (magenta) que flanquean el ADN-T son necesarias para la integración de este último en el genoma de la planta. Para la selección de las plantas transformantes, el plásmido binario contiene un marcador seleccionable (azul). El plásmido binario también incluye dos orígenes de replicación (*ori*), uno para *Escherichia coli* y otro para *Agrobacterium tumefaciens*, así como un marcador seleccionable bacteriano (naranja). Modificado a partir de Juan Vicente (2017), que a su vez se basó en Lee y Gelvin (2008).

II.3.2.- Construcción de transgenes productores de amiARN y sin-tasiARN

Por definición, la pérdida de función total de un gen esencial resulta letal. Se han desarrollado para el estudio de estos genes herramientas que generan su insuficiencia de función parcial y por tanto hacen posible su estudio (Burgos-Rivera y Dawe, 2012).

Los microARN (miARN) son moléculas monocatenarias de 21 a 25 nt que se han descrito en numerosos seres vivos, en todos los cuales regulan postranscripcionalmente la expresión génica (Lee *et al.*, 1993; Reinhart *et al.*, 2002; Arteaga-Vázquez *et al.*, 2006). Se denomina tasiARN (trans acting small interfering RNA; Filipowicz *et al.*, 2005) a un tipo de miARN cuya biogénesis es singular: mientras que cada gen *MIR* produce un solo miARN, cada gen *TAS* genera varios tasiARN. Los miARN y tasiARN maduros se unen a proteínas ARGONAUTE (AGO) y silencian a sus ARNm diana, mediante cortes endonucleolíticos o la inhibición de su traducción (Hutvagner y Simard, 2008; Li *et al.*, 2022). Se han diseñado transgenes productores de miARN artificiales (amiARN) y tasiARN sintéticos (sin-tasiARN), como los basados en los genes *MICRORNA390a* (*MIR390a*) y *TRANS-ACTING SIRNAc* (*TAS1c*) de *Arabidopsis*, respectivamente. Estos transgenes producen moléculas de amiARN y sin-tasiARN que inhiben específicamente a las moléculas de ARNm de los genes cuya función se desea estudiar, generando usualmente líneas transgénicas con diferentes grados de silenciamiento de sus genes diana, que en buena medida se comportan como una serie alélica (Cuperus *et al.*, 2011; Carbonell *et al.*, 2014).

III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los genes parálogos *INCURVATA11* (*ICU11*) y *CUPULIFORMIS2* (*CP2*) codifican reguladores epigenéticos de *Arabidopsis*. Los mutantes *icu11* nulos presentan hojas hiponásticas (recurvadas hacia el haz) y floración temprana. *ICU11* y *CP2* manifiestan redundancia funcional desigual: aunque el fenotipo morfológico de los mutantes *icu11* es relativamente débil y los *cp2* son indistinguibles del tipo silvestre, los dobles mutantes *icu11 cp2* son letales postembrionarios y florecen inmediatamente después de la germinación (Mateo-Bonmatí *et al.*, 2018; Nadi *et al.*, 2023). El perfil transcriptómico de los mutantes dobles *icu11-5 cp2-1* es similar al de varios mutantes simples y múltiples portadores de alelos de genes que codifican componentes principales del PRC2. *ICU11* parece ser una proteína accesoria del PRC2 que desmetila la marca activadora H3K36me3 (Bloomer *et al.*, 2020; Nadi *et al.*, 2024).

En el laboratorio de J.L. Micol se realizó un ensayo del doble híbrido de la levadura en el que se identificaron 31 presuntas interactoras de *ICU11*, tres de las cuales eran proteínas relacionadas con el ciclo de la SAM: *ADK2*, *CIMS* y *DRE2* (apartados II.2.1 y II.2.2, en la página 4; Bonmatí y Micol, sin publicar). Los alelos nulos de los genes *CIMS* y *DRE2* y la combinación doble de los de *ADK1* y *ADK2* es letal (apartado II.2.2, en la página 6). Antes del comienzo de este Trabajo de Fin de Máster (en adelante, TFM) se intentó eludir los inconvenientes derivados de dicha letalidad; se generaron para ello transgenes productores de amiARN y sin-tasiARN para silenciar estos genes o cosilenciarlos con *ICU11* (apartado II.2.2, en la página 6). Los transgenes fueron transferidos a plantas *icu11-1* y Col-0, y se obtuvieron semillas T₂ resultantes de la autofecundación de los presuntos transformantes T₁ seleccionados, que no pudieron ser estudiadas (Cerdá Bernad, 2018).

En este TFM nos propusimos analizar las eventuales interacciones genéticas de *ADK1* y *ADK2*, *CIMS* y *DRE2* con *ICU11*. Nuestro objetivo fue estudiar los fenotipos morfológicos de las líneas previamente obtenidas, presuntamente portadoras de transgenes productores de amiARN diseñados para silenciar individualmente los genes *CIMS* y *DRE2*, y para cosilenciar *ADK1* y *ADK2*, así como de sin-tasiARN para cosilenciar cada uno de estos genes e *ICU11*. La eventual relación funcional entre *CIMS* o *DRE2* e *ICU11* debería manifestarse en la existencia de rasgos comunes en los perfiles transcriptómicos de los mutantes *atms1-1* o *dre2-4* con *icu11-5* y el mutante doble *icu11-5 cp2-1*. En consecuencia, nos propusimos también comparar los resultados publicados de la secuenciación masiva del ARNm de *atms1-1* y *dre2-4* (Wang *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019) con los de *icu11-5* e *icu11-5 cp2-1* (Nadi *et al.*, 2024).

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

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

Para la redacción de 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 (Ortega Menaches, 2020) y de Grado (Gutiérrez Nájera, 2018; Pomares Bri, 2020), 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	M: molar.	Ω : ohmios.
m/v: masa/volumen.	min: minutos.	v/v: volumen/volumen.
g: gramos.	ml: mililitros.	V: voltios.
h: horas.	mm: milímetros.	W: vatios.
kb: kilobases.	mM: milimolar.	μ l: microlitros.
l: litros.	pb: pares de bases.	μ M: micromolar.

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 *ependorf*. 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 *incurvata11-1* (*icu11-1*), portador del alelo *icu11-1* del gen *INCURVATA11* (*ICU11*), cuyo producto es la proteína *INCURVATA11* (*ICU11*).

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) *icu11-1* 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.

IV.5.- Estirpes de *Arabidopsis* empleadas en este trabajo

Hemos empleado las estirpes silvestres y mutantes 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	Fondo genético	Mutágeno y mutación	Genes mutados	Origen
Col-0	N1092	Col-0	Tipo silvestre	-	1
<i>icu11-1</i>	-	S96	NMU (G→A)	At1g22950	2
S96	N914	S96	Tipo silvestre	-	1

¹Obtenida inicialmente del NASC. ²Se aisló tras una mutagénesis con N-nitroso-N-metilurea (NMU) de semillas del acceso silvestre S96 (Relichová, 1976; Serrano-Cartagena *et al.*, 1999).

IV.6.- Condiciones de cultivo de *Arabidopsis*

Los cultivos de *Arabidopsis* se realizaron a partir de semillas que habían sido

previamente conservadas a 4°C durante al menos un día. Los cultivos se llevaron a cabo en placa de Petri o en maceta.

IV.6.1.- 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 14). 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 estéril.

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 60 a 104 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 placas de Petri con las semillas se estratificaron durante 24 h en posición invertida, a 4°C y en la oscuridad, con el fin de sincronizar su germinación, tras lo que fueron cultivadas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50-60% de humedad relativa, bajo iluminación continua de unos $75 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ de luz blanca, suministrada por tubos fluorescentes Sylvania Standard F20W/133-RS Cool White o tubos led Sylvania 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 las condiciones que se detallan en el apartado siguiente.

IV.6.2.- 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 unos 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). Las macetas de rejilla impiden 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; Grobnull 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.

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 fluorescentes Sylvania 160 W F72T12 CW VHO Cool White, Philips F72T12/D/VHO 160 W 1500 SF, o tubos led Sylvania 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 14). 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.6.3.- 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°C .

IV.7.- Disoluciones

Se usó siempre agua desionizada, con una resistividad media de $15 \text{ M } \Omega/\text{mm}^2\cdot\text{m}$. 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 mencionados en este apartado 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 µm 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: KNO₃ 5 mM; KH₂PO₄ 2,5 mM; MgSO₄ 2 mM; Ca(NO₃)₂ 2 mM; FeNaEDTA 51 µM; H₃BO₃ 70 µM; MnCl₂ 14 µM; CuSO₄ 0,5 µM; ZnSO₄ 1 µM; NaMoO₄ 0,2 µM; NaCl 10 µM y CoCl₂ 0,01 µM (Kranz y Kirchheim, 1987).

Para su preparación, se añadieron, a 900 ml de agua, 5 ml de KNO₃ 1 M; 2,5 ml de KH₂PO₄ 1 M; 2 ml de MgSO₄ 1 M; 2 ml de Ca(NO₃)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: H₃BO₃ 70 mM; MnCl₂ 14 mM; CuSO₄ 0,5 mM; ZnSO₄ 1 mM; NaMoO₄ 0,2 mM; NaCl 10 mM, y CoCl₂ 0,01 mM. Se preparó añadiendo, a 900 ml de agua, 4,32 g de H₃BO₃; 2,77 g de MnCl₂·4H₂O; 124 mg de CuSO₄·5H₂O; 287 mg de ZnSO₄·7H₂O; 48,7 mg de NaMoO₄·2H₂O; 584,4 mg de NaCl, y 2,38 mg de CoCl₂·6H₂O. 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), o de Gelrite (Duchefa), a concentraciones finales del 0,75% o 0,6% m/v, respectivamente, 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): NH₄NO₃ 10,3 mM; H₃BO₃ 50,1 µM; CaCl₂ 1,5 mM; CoCl₂·6H₂O 0,05 µM; CuSO₄·5H₂O 0,05 µM; Na₂EDTA 55,4 µM; MgSO₄ 0,75 mM; MnSO₄·H₂O 50 µM; NaMoO₄·2H₂O 0,5 µM; KI 2,5 µM; KNO₃ 9,4 mM; KH₂PO₄ 0,62 mM; ZnSO₄·7H₂O 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 7,5 g de agar para plantas o 6 g de Gelrite. Se esterilizó en autoclave.

IV.7.1.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos

El medio GM se suplementó con higromicina B (Invitrogen) a una concentración final de 15 mg/l, con el objetivo de seleccionar plantas portadoras de transgenes. El antibiótico se añadió al medio después de que este hubiera sido esterilizado en autoclave.

IV.7.2.- Disoluciones para electroforesis

Tampón TAE 50x: Tris-base [Tris-(hidroximetil)aminometano] 2 M; 5,71% v/v de CH₃COOH, y Na₂EDTA 50 mM pH 8,0. El pH final debe ser 7,6. Para preparar un litro se mezclaron 242 g de Tris-base, 57,1 ml de CH₃COOH glacial y 100 ml de Na₂EDTA 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 Na₂EDTA 10 mM.

Marcador de peso molecular para electroforesis en geles de agarosa: Se diluyó el marcador (1 kb Plus DNA ladder de Invitrogen; 1 µg/µl) en tampón de carga hasta una concentración de 0,1 µg/µl. Se usaron 6 µl por pocillo de un gel de agarosa convencional. Se conservó a -20°C.

IV.8.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

IV.8.1.- Aislamiento de ARN para RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Las extracciones de ARN se realizaron a partir de rosetas recolectadas 14 días después de la estratificación (dde), que fueron introducidas en tubos *ependorf* sumergidos inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. Las extracciones se llevaron a cabo empleando *TRI Reagent* (Sigma-Aldrich) según las indicaciones del fabricante. Para eliminar posibles trazas de ADN genómico se realizó un tratamiento adicional con la DNasa *TURBO DNA-free* (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante.

IV.8.2.- Retrotranscripción de ARN

La síntesis de ADN complementario se realizó mezclando disoluciones de ARN (12,5 µl; 160 ng/µl), hexanucleótidos aleatorios (1 µl; 250 ng/µl) y desoxinucleótidos (1 µl; 10 mM de cada uno), junto con 0,5 µl del inhibidor de RNasas Ribolock (Invitrogen), 1 µl de la

retrotranscriptasa termoestable Maxima Reverse Transcriptase (10.000 U/ μ l; Invitrogen) y 4 μ l del tampón de reacción (RT Buffer 5x). Esta mezcla se incubó durante 60 min a 25°C, y a continuación, 5 min a 85°C, para inactivar la enzima.

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 y ARN. Las electroforesis se realizaron en cubetas horizontales, empleando como electrolito TAE 1x (apartado IV.7.2, en la página 15). 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 μ g/ml. Las electroforesis en geles de agarosa se llevaron a cabo a voltaje constante: se aplicaron 90 V en geles preparados con 50 ml de TAE 1x y 120 V para geles preparados con 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.

IV.9.- Observación de la morfología de las plantas 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 lámpara anular de 72 mm de diámetro HAYEAR MSCled72 dotada de 144 leds.

IV.10.- Análisis bioinformáticos

Para comparar los resultados publicados de la secuenciación masiva del ARNm de *atms1-1* y *dre2-4* con los de *icu11-5* e *icu11-5 cp2-1* se fijaron como umbrales los valores de 2 y -2 del logaritmo en base 2 del *fold change* (cambio relativo) para considerar que un gen está desregulado. El *fold change* es el cociente entre los valores de expresión de un gen en dos condiciones experimentales o genotipos. Se compararon las listas de genes diferencialmente expresados mediante una herramienta bioinformática que genera diagramas de Venn (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). También se usó la herramienta DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) con sus parámetros predeterminados por defecto para analizar el enriquecimiento en genes agrupados según las ontologías génicas (GO, por Gene Ontology) de las rutas biológicas y los dominios de las proteínas codificadas por los genes. Este tipo de análisis identifica categorías de genes sobrerrepresentados entre los que están

concordante o discordantemente desregulados en dos genotipos (Khatri *et al.*, 2012; Tomczak *et al.*, 2018).

IV.11.- Pruebas estadísticas

Para determinar el modo de herencia de los fenotipos a estudio hemos realizado ensayos de bondad de ajuste basados en el estadístico χ^2 . El valor por encima del cual hemos considerado rechazable la hipótesis nula es el correspondiente a un nivel de significación del 95%, es decir $\chi^2_{0,95} = 3,84$ (GL = 1), en donde GL indica el número de grados de libertad.

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1.- Interpretación del fenotipo morfológico de plantas transgénicas en las que se han cosilenciado los genes *ADK1* y *ADK2*

V.1.1.- Plantas *icu11-1 amiR-ADK1/ADK2*

Los genes *ADK1* y *ADK2* de *Arabidopsis* son parálogos y redundantes. Sus patrones de expresión son solapantes y sus productos proteicos presentan un 92,5% de identidad y un 96,5% de semejanza (Moffatt *et al.*, 2002; Cerdá Bernad, 2018). Estos genes codifican dos isoformas de la adenosina quinasa que cataliza la conversión de Ado a AMP en el ciclo de la SAM (apartado II.2.1, en la página 4). La reducción de la expresión de *ADK1* y *ADK2* mediante un amiARN genera plantas pequeñas con un desarrollo retrasado, inflorescencias agrupadas y silicuas menores que las de Col-0 (apartado II.2.2, en la página 6). En el laboratorio de J.L. Micol se construyó el transgén *amiR-ADK1/ADK2*, productor de un amiARN diseñado para cosilenciar *ADK1* y *ADK2*, que fue transferido a plantas Col-0 e *icu11-1*. Se obtuvieron semillas T₂ presuntamente portadoras del transgén (apartado III, en la página 9; Cerdá Bernad, 2018).

En este TFM hemos estudiado 18 líneas T₂ presuntamente heterocigóticas para el transgén *amiR-ADK1/ADK2*, de cuya autofecundación esperábamos obtener una segregación 3:1 de plantas resistentes y sensibles a higromicina (Hig^R:Hig^S). Las semillas T₂ se sembraron en medio GM suplementado con 15 µg/ml de higromicina (apartado IV.7.1.3, en la página 15). Solo cuatro líneas presentaron la segregación esperada, todas en fondo genético *icu11-1* (Tabla 3, en la página 19). Se trasplantaron a macetas (apartado IV.6.2, en la página 12) 18 plantas T₂ Hig^R de cada línea.

Las plantas *icu11-1 amiR-ADK1/ADK2* presentaron un crecimiento retrasado, entrenudos acortados y silicuas pequeñas y deformes. Algunas plantas *icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#4* mostraron inflorescencias desestructuradas, con algunas flores con transformaciones homeóticas, con tejidos carpeloides, sin sépalos ni pétalos (Figura 5A, 5B, 5D y 5F, en la página 19) y algunos estambres desorganizados (Figura 5A, 5B y 5E), que surgen de los carpelos en algunas flores (Figura 5D y 5F). Las plantas de las restantes líneas T₂ *icu11-1 amiR-ADK1/ADK2* no mostraron transformaciones homeóticas.

El fenotipo morfológico de las plantas *icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#4* es variable y más extremo que el de las otras tres líneas T₂ estudiadas; sería conveniente intentar relacionar su severidad con los niveles de expresión de los genes *ADK1*, *ADK2* e *ICU11* mediante RT-qPCR. Las transformaciones homeóticas de las flores *icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#4* son similares a las del doble mutante *icu11-5 cp2-1* cultivado en medio suplementado con un 3% de sacarosa, condición en la que logra completar su ciclo de vida (Nadi *et al.*, 2023).

Tabla 3.- Análisis de la segregación de la resistencia a higromicina en líneas T₂ derivadas de la transformación de plantas *icu11-1* con el transgén *amiR-ADK1/ADK2*

Línea T ₂	Hig ^R	Hig ^S	χ^2
<i>amiR-ADK1/ADK2_#1</i>	0	100	-
<i>amiR-ADK1/ADK2_#2</i>	0	100	-
<i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#1</i>	75	25	0,000
<i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#2</i>	73	24	0,003
<i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#3</i>	79	20	1,215
<i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#4</i>	75	22	0,278
<i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#5</i>	0	100	-
<i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#6</i>	0	100	-
<i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#7</i>	0	100	-
<i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#8</i>	0	100	-
<i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#9</i>	0	100	-
<i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#10</i>	0	100	-
<i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#11</i>	0	100	-
<i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#12</i>	0	100	-
<i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#13</i>	0	100	-
<i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#14</i>	0	100	-
<i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#15</i>	0	100	-
<i>icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#16</i>	7	93	246,613

Se indica el número de plantas correspondiente a cada clase fenotípica. Los valores de χ^2 representan el ajuste de los datos de cada población T₂ a una segregación fenotípica esperada 3:1 (Hig^R:Hig^S). Hemos considerado rechazable la hipótesis nula cuando $\chi^2 < 3,84$ (apartado IV.11, en la página 17).



Figura 5.- Fenotipo morfológico de las flores de las plantas *icu11-1 amiR-ADK1/ADK2*. Se muestran seis ejemplos, de flores de tres plantas, con sépalos y pétalos transformados homeóticamente en estructuras carpeloides: flores (A, B, E) con estambres desorganizados, (D, F) con estambres que surgen de un carpelo, y (A, B, D, F) sin pétalos ni sépalos, en las que solo aparecen estructuras carpeloides. Las fotografías se tomaron 70 días después de la estratificación (dde). Las barras de escala indica 1 mm.

La desrepresión ectópica de *AGAMOUS* (*AG*) y *SEPALLATA3* (*SEP3*) causa la transformación homeótica de los sépalos y pétalos en estructuras carpeloides (Mizukami y Ma, 1992; Castillejo *et al.*, 2005). *ICU11* participa en el desarrollo de los órganos reproductivos, ya que contribuye a la represión de genes de identidad floral como *AG*, *SEP1*, *SEP2* y *SEP3*. Las flores *icu11-5 cp2-1* presentan transformaciones homeóticas de sus sépalos y pétalos en carpelos, y rinden silicuas pequeñas (Nadi *et al.*, 2023). La insuficiencia simultánea de las funciones de *ICU11*, *ADK1* y *ADK2* parece alterar la expresión de los genes de identidad floral tal como ocurre en las plantas *icu11-5 cp2-1*. Además, las líneas T₂ *icu11-1 amiR-ADK1/ADK2* que hemos estudiado se cultivaron en medio GM suplementado con higromicina, antibiótico que podría alterar el fenotipo de las plantas, aunque es dudoso que pudiera causar las transformaciones homeóticas observadas y que se manifestaran en solo una de dichas líneas. No obstante, nuestras observaciones deberán repetirse en plantas T₃ *icu11-1 amiR-ADK1/ADK2* cultivadas en ausencia de higromicina. También será necesaria la cuantificación de la expresión de los genes *ADK1*, *ADK2*, *AG*, *SEP1*, *SEP2* y *SEP3* en dichas plantas T₃, así como en las T₄ en las que se confirme la homocigosis para el transgén.

V.1.2.- Plantas *sin-tasiR-ICU11/ADK1/ADK2*

También hemos estudiado cuatro líneas T₂ *sin-tasiR-ICU11/ADK1/ADK2* previamente obtenidas en fondo Col-0 (Cerdá Bernad, 2018). Solo dos de dichas líneas mostraron una segregación 3:1 (Hig^R:Hig^S) (Tabla 4), de las que se trasplantaron 20 plantas Hig^R a macetas, en las que completaron su ciclo de vida (apartado IV.6.2, en la página 12).

Tabla 4.- Análisis de la segregación de la resistencia a higromicina en líneas T₂ derivadas de la transformación de plantas Col-0 con el transgén *sin-tasiR-ICU11/ADK1/ADK2*

Línea T ₂	Hig ^R	Hig ^S	χ^2
<i>sin-tasiR-ICU11/ADK1/ADK2_#1</i>	77	21	0,666
<i>sin-tasiR-ICU11/ADK1/ADK2_#2</i>	74	23	0,086
<i>sin-tasiR-ICU11/ADK1/ADK2_#3</i>	0	100	-
<i>sin-tasiR-ICU11/ADK1/ADK2_#4</i>	0	100	-

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 3, en la página 19.

Las plantas *sin-tasiR-ICU11/ADK1/ADK2_#1* (Figura 6, en la página 21) presentaron inflorescencias desestructuradas, con flores aberrantes similares a las *icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#4* (Figura 5, en la página 19) y con óvulos visibles en sus estructuras carpeloides. La semejanza de los fenotipos de las plantas *icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#4* y *sin-tasiR-ICU11/ADK1/ADK2_#1* sugiere que se ha logrado reducir simultáneamente la

expresión de los genes *ICU11*, *ADK1* y *ADK2* —aunque en estos dos últimos casos, solo parcialmente, eludiendo así la letalidad de los dobles mutantes nulos *adk1 adk2*— y que las funciones de las proteínas ADK e ICU11 están relacionadas. No obstante, también en este caso nuestras observaciones deberán repetirse en plantas T₃ cultivadas en ausencia de antibiótico y convendrá cuantificar la expresión de los genes *ADK1* y *ADK2*.



Figura 6.- Fenotipo morfológico de las inflorescencias y las flores de las plantas *sin-tasiR-ADK1/ADK2/ICU11*. Se muestran seis ejemplos, de flores de tres plantas, con sépalos y pétalos transformados homeóticamente en estructuras carpeloides: flores (A, C, F) con estambres desorganizados, (B, D) con estambres que surgen de un carpelo, (A, B, E, F), sin pétalos ni sépalos y solo con estructuras carpeloides, y (E, F) con óvulos visibles. Las fotografías se tomaron 104 dde. Las barras de escala indican 1 mm.

V.2.- Análisis del fenotipo morfológico de plantas transgénicas en las que se ha silenciado el gen *CIMS*

V.2.1.- Plantas *amiR-CIMS*

La enzima CIMS cataliza la conversión de homocisteína en metionina; cuatro de cada cinco metioninas así obtenidas son usadas como sustrato para la síntesis de la SAM (Figura 3, en la página 5). En el mutante hipomorfo *atms1-1* la metilación del ADN y la marca H3K9me2 están reducidas (Yan *et al.*, 2019). En el laboratorio de J.L. Micol se obtuvo un transgén productor de un amiARN para silenciar el gen *CIMS*, se transfirió a plantas Col-0 y se obtuvieron las correspondientes semillas T₂ (Cerdá Bernad, 2018). Hemos estudiado dos líneas T₂ *amiR-CIMS*, tal como se indicó en el apartado V.1.1, en la página 18, que manifestaron una segregación fenotípica 3:1 (Hig^R:Hig^S) (Tabla 5, en la página 22).

Tabla 5.- Análisis de la segregación de la resistencia a higromicina en líneas T₂ derivadas de la transformación de plantas Col-0 con el transgén *amiR-CIMS*

Línea T ₂	Hig ^R	Hig ^S	χ^2
<i>amiR-CIMS_#1</i>	71	27	0,340
<i>amiR-CIMS_#2</i>	78	22	0,480

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 3, en la página 19.

Se trasplantaron 12 plantas T₂ Hig^R de las líneas *amiR-CIMS_#1* y *amiR-CIMS_#2* a macetas (apartado IV.6.2, en la página 12) y se recolectaron sus semillas T₃ (apartado IV.6.3, en la página 13). Se seleccionaron las presuntamente homocigóticas para el transgén, de cuya autofecundación esperábamos obtener únicamente plantas resistentes. Estas semillas T₃ se sembraron en medio GM suplementado con 15 µg/ml de higromicina (apartado IV.7.1.3, en la página 15). Se identificaron así cuatro líneas homocigóticas para el transgén: *amiR-CIMS_#1_#1*, *amiR-CIMS_#2_#1*, *amiR-CIMS_#2_#2* y *amiR-CIMS_#2_#3*, todas las cuales fueron fenotípicamente silvestres (Figura 7). Estos resultados son verosímiles, dado que el mutante hipomorfo *atms1-1* muestra un fenotipo morfológico indistinguible del de Col-0, aunque manifiesta una reducción de la metilación del ADN y de las histonas (apartado II.2.2, en la página 6). En estas líneas se cuantificarán más adelante los niveles de ARNm del gen *CIMS* mediante RT-qPCR y se estudiará su fenotipo morfológico con el máximo grado de detalle posible.

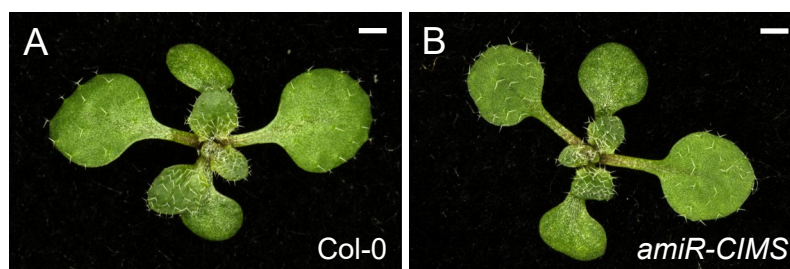


Figura 7.- Fenotipo morfológico de las plantas *amiR-CIMS*. Se muestran rosetas de plantas (A) Col-0 y (B) *amiR-CIMS*. Las fotografías se tomaron 14 dde. Las barras de escala indican 1 mm.

V.2.2.- Plantas *sin-tasiR-CIMS/ICU11*

En el laboratorio de J.L. Micol se diseñó un transgén productor de un sin-tasiARN para cosilenciar *CIMS* e *ICU11*, que se transfirió a plantas Col-0 y se obtuvieron las correspondientes semillas T₂ (Cerdá Bernad, 2018). Hemos estudiado ocho líneas T₂ *sin-tasiR-CIMS/ICU11* (como en el apartado V.1.1, en la página 18), de las cuales cuatro manifestaron una segregación fenotípica 3:1 (Hig^R:Hig^S) (Tabla 6, en la página 23).

Se trasplantaron a macetas 12 plantas T₂ Hig^R de dichas líneas y se procedió como en

los apartados anteriores, recolectando semillas T_3 y sembrándolas en medio GM suplementado con higromicina. Se identificaron seis líneas homocigóticas para el transgén: *sin-tasiR-CIMS/ICU11_#1_#1*, *sin-tasiR-CIMS/ICU11_#2_#1*, *sin-tasiR-CIMS/ICU11_#2_#2*, *sin-tasiR-CIMS/ICU11_#3_#1*, *sin-tasiR-CIMS/ICU11_#4_#1* y *sin-tasiR-CIMS/ICU11_#4_#2*, todas las cuales fueron fenotípicamente silvestres (Figura 8).

Tabla 6.- Análisis de la segregación de la resistencia a higromicina en líneas T_2 derivadas de la transformación de plantas Col-0 con el transgén *sin-tasiR-CIMS/ICU11*

Línea T_2	Hig ^R	Hig ^S	χ^2
<i>sin-tasiR-CIMS/ICU11_#1</i>	35	15	0,667
<i>sin-tasiR-CIMS/ICU11_#2</i>	34	15	0,823
<i>sin-tasiR-CIMS/ICU11_#3</i>	24	6	0,400
<i>sin-tasiR-CIMS/ICU11_#4</i>	36	13	0,061
<i>sin-tasiR-CIMS/ICU11_#5</i>	49	0	-
<i>sin-tasiR-CIMS/ICU11_#6</i>	0	50	-
<i>sin-tasiR-CIMS/ICU11_#7</i>	0	100	-
<i>sin-tasiR-CIMS/ICU11_#8</i>	56	42	16,666

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 3, en la página 19.



Figura 8.- Fenotipo morfológico de las plantas *sin-tasiR-CIMS/ICU11*. Se muestran rosetas de plantas (A) Col-0, (B) *icu11-5*, y (C) *sin-tasiR-CIMS/ICU11*. Las fotografías se tomaron 14 dde. Las fotografías se tomaron 14 dde. Las barras de escala indican 1 mm.

El fenotipo morfológico del mutante nulo *icu11-5*, cuyo fondo genético es Col-0, es relativamente débil; aunque presenta floración temprana y cotiledones epinásticos (apartado III, en la página 9), su hiponastia foliar es menos pronunciada que la de *icu11-1*, cuyo fondo es S96. La reducción de los niveles de ARNm de *ICU11* generada por el sin-tasiARN puede que no sea suficiente para causar un fenotipo morfológico apreciable en las líneas *sin-tasiR-CIMS/ICU11*, cuyo fondo es Col-0. El mutante hipomorfo *atms1-1* tampoco manifiesta fenotipo morfológico alguno (apartado V.2.1, en la página 21). La ausencia de fenotipo morfológico en las líneas portadoras del sin-tasiARN para cosilenciar *CIMS* e *ICU11* sugiere que no existe relación funcional entre estos genes. Otra hipótesis razonable es que su reducción de la

expresión de *CIMS* e *ICU11* no sea suficiente como para causar un fenotipo morfológico. En estas líneas se cuantificará más adelante el ARNm de *CIMS* mediante RT-qPCR.

V.3.- Interpretación del fenotipo morfológico de plantas transgénicas en las que se han silenciado los genes *DRE2* e *ICU11*

V.3.1.- Plantas *icu11-1 amiR-DRE2*

El gen *DRE2* codifica una proteína que participa en la ruta citoplásmica de ensamblaje de centros hierro-azufre (apartado II.2.1, en la página 4). Aunque *DRE2* no actúa en el ciclo de la SAM, contiene un dominio de unión a esta molécula, a la que podría unirse por medio de otras proteínas (Soler *et al.*, 2012). *DRE2* se une a la cromatina y participa en la regulación de genes de respuesta a auxina, cuya expresión está reducida en el mutante *dre2-4* (Wang *et al.*, 2019). La unión de *DRE2* a la SAM podría modular su disponibilidad para otras reacciones de metilación.

En el laboratorio de J.L. Micol se diseñó un transgén productor de un amiARN para silenciar el gen *DRE2*, se transfirió a plantas Col-0 o *icu11-1* y se obtuvieron las correspondientes semillas T₂ (Cerdá Bernad, 2018). Hemos estudiado ocho de dichas líneas *amiR-DRE2* y 20 *icu11-1 amiR-DRE2* (como en el apartado V.1.1, en la página 18), 19 de las cuales manifestaron una segregación 3:1 (Hig^R:Hig^S) (Tabla 7, en la página 25).

Actuando tal como se indicó en el apartado V.2.1, en la página 21, se identificaron cuatro líneas T₃ homocigóticas para el transgén: *amiR-DRE2_#1_#1*, *amiR-DRE2_#2_#1*, *amiR-DRE2_#2_#2* y *amiR-DRE2_#5_#1*. Las dos últimas mostraron clorosis en el centro de la roseta (Figura 9C, en la página 26), un rasgo que recuerda a los parches cloróticos de las hojas del mutante hipomorfo *dre2-4* (Wang *et al.*, 2019).

También identificamos ocho líneas homocigóticas para el transgén en fondo *icu11-1*: *icu11-1 amiR-DRE2_#12_#1*, *icu11-1 amiR-DRE2_#1_#1*, *icu11-1 amiR-DRE2_#1_#2*, *icu11-1 amiR-DRE2_#6_#1*, *icu11-1 amiR-DRE2_#6_#2*, *icu11-1 amiR-DRE2_#6_#3*, *icu11-1 amiR-DRE2_#6_#4* e *icu11-1 amiR-DRE2_#6_#5*. Las plantas de una de estas últimas líneas fueron pequeñas y cloróticas, con cotiledones epinásticos y hojas apuntadas (Figura 9D, en la página 26). Esta observación sugiere que en estas líneas el grado de silenciamiento de los genes *DRE2* e *ICU11* es distinto, siendo mayor en la de las plantas pequeñas y cloróticas. Dado que la posición de la inserción del transgén no se ha determinado, también es plausible que el fenotipo observado se deba a la interrupción de un gen por ahora desconocido.

Con el propósito de cuantificar el ARNm de *DRE2*, se extrajo ARN de plantas de una de las familias T₃ homocigóticas derivadas de *amiR-DRE2_#2* y de una de las de *icu11-1 amiR-DRE2_#6*. Se verificó la calidad del ARN extraído mediante electroforesis en un gel del

1% en agarosa (apartado IV.8.3, en la página 16). El ARN fue tratado con DNasa para eliminar las eventuales trazas de ADN genómico (apartado IV.8.1, en la página 15) y retrotranscrito para obtener ADNc (apartado IV.8.2, en la página 15). El análisis mediante qPCR de la concentración de estos ADNc permitirá una estimación de la eventual correlación entre los niveles de expresión de *DRE2* e *ICU11* y el fenotipo morfológico de las plantas a estudio.

Tabla 7.- Análisis de la segregación de la resistencia a higromicina en líneas T₂ derivadas de la transformación de plantas Col-0 e *icu11-1* con el transgén *amiR-DRE2*

Línea T ₂	Hig ^R	Hig ^S	χ^2
<i>amiR-DRE2_#1</i>	66	29	1,547
<i>amiR-DRE2_#2</i>	80	19	1,781
<i>amiR-DRE2_#3</i>	58	27	2,075
<i>amiR-DRE2_#4</i>	73	22	0,172
<i>amiR-DRE2_#5</i>	76	17	2,240
<i>amiR-DRE2_#6</i>	87	12	8,757
<i>amiR-DRE2_#7</i>	93	2	26,557
<i>amiR-DRE2_#8</i>	57	43	17,280
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#1</i>	69	23	0,000
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#2</i>	66	22	0,000
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#3</i>	74	16	2,503
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#4</i>	61	24	0,475
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#5</i>	64	25	0,453
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#6</i>	73	21	0,355
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#7</i>	77	17	2,397
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#8</i>	38	8	1,420
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#9</i>	65	31	2,722
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#10</i>	33	15	1,000
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#11</i>	34	12	0,029
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#12</i>	73	24	0,003
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#13</i>	66	22	0,545
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#14</i>	65	26	0,619
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#15</i>	55	39	13,631
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#16</i>	0	99	-
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#17</i>	63	33	4,500
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#18</i>	85	14	6,225
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#19</i>	20	30	32,666
<i>icu11-1 amiR-DRE2_#20</i>	0	100	-

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 3, en la página 19.

V.3.2.- Plantas *sin-tasiR-DRE2/ICU11*

En el laboratorio de J.L. Micol se diseñó un transgén productor de un sin-tasiARN para

cosilenciar *DRE2* e *ICU11*, que se transfirió a plantas Col-0 y se obtuvieron las correspondientes semillas T₂ (Cerdá Bernad, 2018).

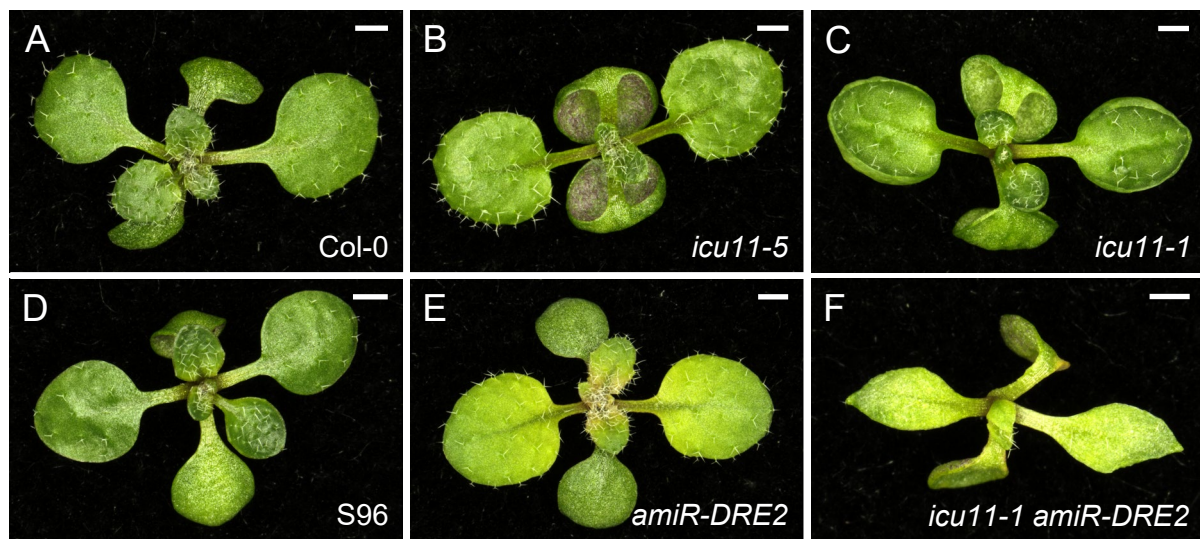


Figura 9.- Fenotipo morfológico de las plantas *amiR-DRE2*. Se muestran rosetas de (A) Col-0, (B) *icu11-5*, (C) *icu11-1*, (D) S96, (E) *amiR-DRE2*, y (F) *icu11-1 amiR-DRE2*. Las fotografías se tomaron 14 dde. La barra de escala indica 1 mm.

Hemos estudiado 32 líneas T₂ portadoras del transgén *sin-tasiR-DRE2/ICU11*, tal como se indicó en el apartado V.1.1, en la página 18. De las 32 líneas analizadas, 19 presentaron una segregación 3:1 (Hig^R:Hig^S) (Tabla 8, en la página 27). Se trasplantaron 10 plantas T₂ Hig^R de estas líneas *sin-tasiR-DRE2/ICU11* a macetas y se recolectaron y sembraron las correspondientes semillas T₃ en medio GM suplementado con higromicina, según se indicó en el apartado V.2.1, en la página 21. Solo la línea *sin-tasiR-DRE2/ICU11_#15_#1* resultó ser homocigótica para el transgén. Aunque algunas de las plantas de esta línea resultaron fenotípicamente silvestres, otras fueron más pequeñas, con hojas y cotiledones epinásticos y acumulación de antocianinas en la roseta (Figura 10, en la página 28). Estas últimas murieron 85 dde sin que se llegara a manifestar el alzado. Se extrajo ARN de plantas de la línea T₃ homocigótica descendiente de *sin-tasiR-DRE2/ICU11_#15* y se obtuvo ADNc, según se indicó en los apartados IV.8.1, IV.8.2 y IV.8.3, en las páginas 15 y 16, que se usará más adelante para establecer mediante qPCR la eventual relación del silenciamiento de *DRE2* e *ICU11* y el fenotipo de estas plantas transgénicas. Los fenotipos morfológicos de las líneas T₃ descendientes de *icu11-1 amiR-DRE2_#6* y *sin-tasiR-DRE2/ICU11_#15* son distintos. Se comprobará más adelante si ello se debe a diferentes grados de silenciamiento de *ICU11* y *DRE2* o a que uno o ambos transgenes interrumpen un gen cuya disfunción tiene consecuencias fenotípicas.

Tabla 8.- Análisis de la segregación de la resistencia a higromicina en líneas T₂ derivadas de la transformación de plantas Col-0 con el transgén *sin-tasiR-DRE2/ICU11*

Línea T ₂	Hig ^R	Hig ^S	χ^2
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#1</i>	72	26	0,122
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#2</i>	74	26	0,053
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#3</i>	77	17	2,397
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#4</i>	71	27	0,340
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#5</i>	78	21	0,758
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#6</i>	70	28	0,667
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#7</i>	65	31	2.,730
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#8</i>	73	26	0,084
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#9</i>	77	21	0,667
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#10</i>	72	24	0,000
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#11</i>	75	23	0,122
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#12</i>	68	31	2,104
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#13</i>	74	25	0,003
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#14</i>	77	22	0,407
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#15</i>	78	21	0,758
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#16</i>	75	22	0,279
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#17</i>	79	20	1,215
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#18</i>	51	22	1,027
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#19</i>	52	22	0,883
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#20</i>	94	4	22,222
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#21</i>	95	3	25,156
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#22</i>	91	8	15,114
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#23</i>	0	95	-
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#24</i>	42	58	58,080
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#25</i>	93	3	24,500
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#26</i>	87	11	9,918
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#27</i>	0	71	-
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#28</i>	0	74	-
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#29</i>	12	41	77,490
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#30</i>	0	38	-
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#31</i>	11	28	45,547
<i>sin-tasiR-DRE2/ICU11_#32</i>	0	61	-

Se siguen las pautas definidas para la Tabla 3, en la página 19.

V.4.- Análisis comparativo de los perfiles transcriptómicos de los mutantes *atms1-1*, *dre2-4*, *icu11-5* e *icu11-5 cp2-1*

Hemos comparado los perfiles transcriptómicos previamente publicados de los mutantes *atms1-1* (Yan *et al.*, 2019), *dre2-4* (Wang *et al.*, 2019), *icu11-5* e *icu11-5 cp2-1* (Nadi

et al., 2024). La existencia de genes concordantemente desregulados en estos cuatro genotipos apoyaría la hipótesis de la relación funcional de *ATMS1* y *DRE2* con *ICU11* y *CP2*. Considerando los umbrales definidos en el apartado IV.10, en la página 16, el número de genes diferencialmente expresados (Figura 11) en los mutantes simples *atms-1*,



Figura 10.- Fenotipo morfológico de las plantas *sin-tasiR-DRE2/ICU11*. Se muestran rosetas (A) Col-0, (B) *icu11-5*, y (C) *sin-tasiR-DRE2/ICU11*. Las fotografías se tomaron 14 dde. La barra de escala indica 1 mm.

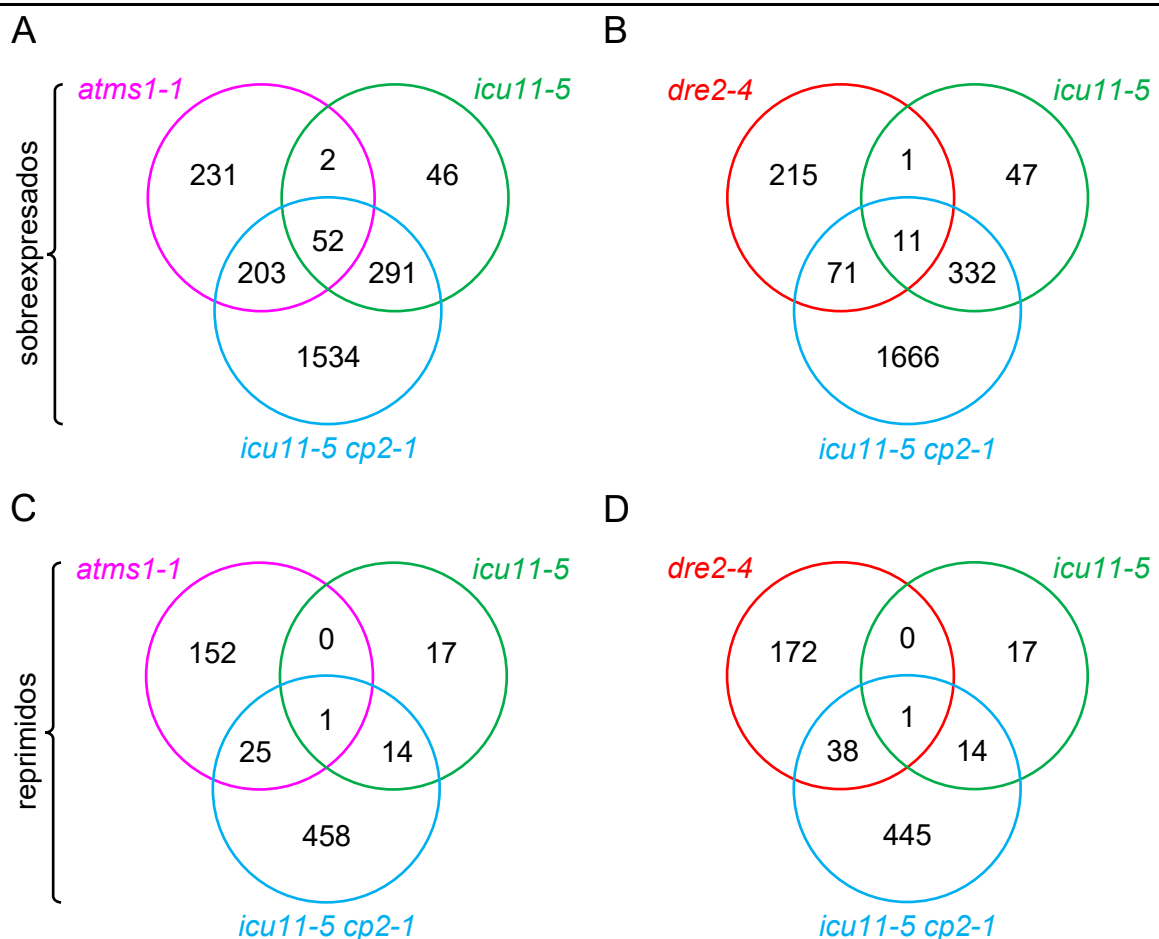


Figura 11.- Análisis comparativo de los perfiles transcriptómicos de los mutantes *atms1-1* y *dre2-4* con los de *icu11-5* e *icu11-5 cp2-1*. Se muestran diagramas de Venn en los que se indica el número de genes (A, B) sobreexpresados y (C, D) reprimidos, (A, C) en *atms1-1* y (B, D) en *dre2-4*, que también lo están en *icu11-5* e *icu11-5 cp2-1*.

dre2-4 e *icu11-5* es de 666, 509 y 423; el de los sobreexpresados es de 488, 298 y 391, y el de los reprimidos, de 178, 211 y 32, en todos los casos, respectivamente. El número de genes diferencialmente expresados en el mutante doble *icu11-5 cp2-1* es de 2578, de los cuales 2080 están sobreexpresados y 498 están reprimidos.

Un 8% de los genes (55 de 666) diferencialmente expresados en *atms1-1* también lo están en *icu11-5*, y *atms1-1* comparte un 42% de sus genes diferencialmente expresados (281 de 666) con *icu11-5 cp2-1*. De los genes sobreexpresados en *atms1-1*, un 11% (54 de 488) son comunes a *icu11-5* y un 52% (255 de 488) a *icu11-5 cp2-1* (Figura 11A, en la página 28). De los genes reprimidos en *atms1-1*, solo 1 de 178 está reprimido en *icu11-5* y un 14% (26 de 178) en *icu11-5 cp2-1* (Figura 11B).

En cuanto a los genes diferencialmente expresados en *dre2-4*, un 3% (13 de 509) también lo están en *icu11-5*, y un 24% (121 de 509) en *icu11-5 cp2-1*. De los genes sobreexpresados en *dre2-4*, un 4% (12 de 298) lo están en *icu11-5* y un 28% (82 de 298) en *icu11-5 cp2-31* (Figura 11C). De los genes reprimidos en *dre2-4*, solo 1 de 211 lo está en *icu11-5* y un 18% (39 de 211) en *icu11-5 cp2-11* (Figura 11D). Se realizó un análisis de enriquecimiento GO (apartado IV.10, en la página 16) de los genes concordantemente desregulados en los mutantes, con el fin de identificar procesos biológicos aparentemente alterados.

Entre los genes concordantemente desregulados en los mutantes *atms1-1* e *icu11-5* se encontró un enriquecimiento en los que codificaban proteínas que contienen dominios Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR) y WRKY (Tabla 9). Las proteínas con dominios TIR forman complejos de señalización que participan en la respuesta inmune innata y la defensa frente a

Tabla 9.- Desregulación de los genes de las categorías identificadas en los análisis de enriquecimiento GO de los mutantes *atms1-1* e *icu11-5* respecto a Col-0

Categoría	Código AGI	Proteína que codifica	Log 2 (<i>fold change</i>)	
			<i>atms1-1</i>	<i>icu11-5</i>
Genes que codifican proteínas con dominios TIR	AT5G41750	Disease resistance protein TIR-NBS-LRR class family	3,76	3,10
	AT1G57630	Toll-Interleukin-Resistance domain family protein	3,35	2,06
	AT2G20142	Toll-Interleukin-Resistance domain family protein	2,66	2,95
	AT2G32140	Transmembrane receptor involved in plant defense response	2,96	4,44
Genes que codifican proteínas con dominios WRKY	AT4G31800	WRKY DNA-binding protein 18	2,55	3,92
	AT2G46400	WRKY DNA-binding protein 46	4,35	3,30
	AT5G64810	WRKY DNA-binding protein 51	3,33	3,59
	AT4G23810	WRKY family transcription factor	3,63	3,57
	AT1G17380	Jasmonate-zim-domain protein 5	3,30	5,14
	AT4G23240	Ethylene response factor 1	4,72	4,31

las bacterias (Ve *et al.*, 2015). Las proteínas con dominios WRKY forman una de las mayores familias de factores de transcripción, que es exclusiva del reino vegetal. Estas proteínas participan en las respuestas a estrés biótico y abiótico, pero también en el desarrollo de los tricomas, y en la senescencia y la embriogénesis (Bakshi y Oelmüller, 2014). El análisis de enriquecimiento GO de los genes concordantemente desregulados entre *atms1-1* e *icu11-5 cp2-1* indica un enriquecimiento en los que participan en respuestas frente al estrés biótico y abiótico (Tabla 10), concretamente, en los que codifican proteínas con dominios WRKY y APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR (AP2/ERF). Estas últimas modulan la

Tabla 10.- Desregulación de los genes de las categorías identificadas en los análisis de enriquecimiento GO en *atms1-1* e *icu11-5 cp2-1* respecto a Col-0

Categoría	Código AGI	Proteína que codifica	Log 2 (<i>fold change</i>)	
			<i>atms1-1</i>	<i>icu11-5 cp2-1</i>
Genes que codifican proteínas con dominios WRKY	AT4G31800	WRKY DNA-binding protein 18	2,54	4,09
	AT5G24110	WRKY DNA-binding protein 30	3,45	2,90
	AT2G38470	WRKY DNA-binding protein 33	2,72	2,39
	AT2G46400	WRKY DNA-binding protein 46	4,35	2,84
	AT5G49520	WRKY DNA-binding protein 48	2,93	4,09
	AT5G01900	WRKY DNA-binding protein 62	3,96	5,56
	AT5G64810	WRKY DNA-binding protein 51	3,34	2,99
	AT2G40750	WRKY DNA-binding protein 54	2,44	-3,60
	AT4G23810	WRKY family transcription factor 53	3,63	3,19
Genes que codifican proteínas de la ruta del ácido jasmónico	AT3G48520	cytochrome P450, family 94, subfamily B, polypeptide 3	2,95	11,99
	AT1G19180	jasmonate-zim-domain protein 1	3,07	3,79
	AT1G17380	jasmonate-zim-domain protein 5	3,30	5,25
	AT2G34600	jasmonate-zim-domain protein 7	3,72	6,61
	AT1G30135	jasmonate-zim-domain protein 8	6,53	3,62
	AT3G19580	zinc-finger protein 2	2,71	2,60
Genes que codifican proteínas con dominios AP2/ERF	AT5G05410	DRE-binding protein 2A	3,32	2,63
	AT1G28370	ERF domain protein 11	4,18	3,98
	AT1G19210	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	6,50	5,22
	AT1G77640	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	2,04	7,08
	AT5G21960	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	4,92	7,78
	AT1G12610	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	4,80	5,64
	AT3G23240	ethylene response factor 1	4,36	7,87
	AT4G17500	ethylene responsive element binding factor 1	2,27	2,79
	AT5G47220	ethylene responsive element binding factor 2	2,44	2,00
	AT4G17490	ethylene responsive element binding factor 6	2,94	2,90
	AT2G44840	ethylene-responsive element binding factor 13	3,66	3,02
	AT4G34410	redox responsive transcription factor 1	6,17	7,74

expresión génica en condiciones de estrés, pero también en el crecimiento y el desarrollo, en la respuesta a hormonas como el ácido abscísico, el etileno, las giberelinas, las citoquininas y los brasinosteroides (Xie *et al.*, 2019). También se observó un enriquecimiento en genes concordantes relacionados con la señalización del ácido jasmónico, que interviene en el control del crecimiento y el desarrollo vegetal y modula las respuestas al estrés biótico y abiótico (Ruan *et al.*, 2019).

Los análisis transcriptómicos de los mutantes simples *atms1-1*, *icu11-5* e *icu11-5 cp2-1* sugieren que la relación entre *CIMS* e *ICU11* radica en la regulación epigenética de las respuestas al estrés biótico y abiótico. *ICU11* participa presuntamente en la desmetilación de la marca H3K36me3 y *CIMS* se requiere para mantener los niveles de metilación del ADN y de H3K9me2.

La metilación del ADN y de las histonas modula el acceso de los factores de transcripción a los genes de respuesta a estrés biótico y abiótico, controlando su expresión en respuesta a cambios en el entorno (Ramírez-Prado *et al.*, 2018; González y Vera, 2019). Según esto, la desregulación de la metilación del ADN y las histonas podría alterar las respuestas al estrés.

Nuestro análisis de enriquecimiento GO de los genes concordantemente desregulados en los mutantes *dre2-4* e *icu11-5* no reveló ningún enriquecimiento de genes que participaran en procesos o rutas concretos. Este resultado era de esperar, dado el bajo porcentaje, solo un 4%, de genes concordantemente desregulados. Sin embargo, los genes concordantemente desregulados entre el mutante simple *dre2-4* y el mutante doble *icu11-5 cp2-1* indicó un enriquecimiento en genes de respuesta a auxina (Tabla 11, en la página 32). Muchos de estos últimos pertenecen a la familia de genes de respuesta a auxina denominada *SMALL AUXIN UP-REGULATED RNA (SAUR)*. Los miembros de esta familia participan en la regulación dinámica y adaptativa del crecimiento en respuesta a la auxina (Stortenbeker y Bemer, 2019).

Nuestros resultados sugieren que la relación entre *DRE2* e *ICU11* depende de la regulación epigenética de la respuesta a la auxina. Tanto *DRE2* como *ICU11* se unen a la cromatina (Wang *et al.*, 2019, Bloomer *et al.*, 2020) y *DRE2* regula la expresión de genes de respuesta a auxina (Wang *et al.*, 2019). Tanto la biosíntesis de auxina como su transporte están altamente regulados epigenéticamente (Mateo-Bonmatí *et al.*, 2019). Esta respuesta a la auxina es también crucial para el desarrollo de los primordios florales, así como para la determinación del número y la identidad de los órganos florales (Cheng y Zhao, 2007). La depleción de *DRE2* e *ICU11* podría reducir la respuesta a la auxina, que a su vez alteraría el

desarrollo floral y la fertilidad de la planta, tal como hemos observado en la línea *sin-tasiR-DRE2/ICU11_#15* (apartado V.3.2, en la página 25).

Tabla 11.- Niveles de expresión de los genes de las categorías detectadas en los análisis de enriquecimiento GO en mutantes *dre2-4* e *icu11-5 cp2-1* respecto a Col-0

Categoría	Código AGI	Proteína que codifica	Log 2 (<i>fold change</i>)	
			<i>dre2-4</i>	<i>icu11-5 cp2-1</i>
Genes de respuesta a la auxina	AT5G18060	SAUR-like auxin-responsive protein family 23 ^a	-2,15	-2,64
	AT4G38850	SAUR-like auxin-responsive protein family 15 ^a	-2,09	-3,08
	AT3G53250	SAUR-like auxin-responsive protein family 57 ^a	-3,79	-3,04
	AT3G42800	AF-like protein ^a	-2,45	-7,22
	AT3G43670	Copper amine oxidase family protein ^a	-2,33	-2,27
	AT5G50260	Cysteine proteinases superfamily protein ^a	2,11	6,09
	AT2G41800	DUF642 cell wall protein ^a	2,11	5,89
	AT5G18030	SAUR-like auxin-responsive protein family 21 ^a	-2,82	-3,79
	AT5G18020	SAUR-like auxin-responsive protein family 20 ^a	-2,55	-3,19
	AT5G18010	SAUR-like auxin-responsive protein family 19 ^a	-4,21	-4,47
	AT5G18050	SAUR-like auxin-responsive protein family 22 ^a	-3,12	-7,09
	AT2G18010	SAUR-like auxin-responsive protein family 10 ^a	-2,66	-7,72
	AT1G29460	SAUR-like auxin-responsive protein family 65 ^a	-2,42	-4,45
	AT3G03830	SAUR-like auxin-responsive protein family 28 ^a	-2,25	-7,42
	AT4G32280	indole-3-acetic acid inducible 29 ^a	-2,68	-4,80
	AT1G15580	indole-3-acetic acid inducible 5 ^a	-2,43	-5,05

VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

En este TFM hemos contribuido al estudio de la relación funcional de *ICU11* con *ADK1*, *ADK2*, *CIMS* y *DRE2*, que participan en el ciclo de la SAM y son presuntas interactoras de *ICU11*. Hemos analizado líneas transgénicas T_2 portadoras de transgenes productores de amiARN diseñados para cosilenciar parcialmente los genes *ADK1* y *ADK2*, *CIMS* o *DRE2*, y de sin-tasiARN para cosilenciar cada uno de estos genes e *ICU11*.

Hemos estudiado la segregación de la resistencia a higromicina y el fenotipo morfológico de líneas T_2 portadoras de los transgenes *amiR-ADK1/ADK2*, *sin-tasiR-ADK1/ADK2/ICU11*, *amiR-CIMS*, *sin-tasiR-CIMS/ICU11*, *amiR-DRE2* y *sin-tasiR-DRE2/ICU11*. Las plantas de las líneas *icu11-1 amiR-ADK1/ADK2_#4* y *sin-tasiR-ICU11/ADK1/ADK2_#1* presentan flores con sépalos y pétalos transformados homeóticamente en estructuras carpeloides y estambres que surgen de sus carpelos. La siembra de las semillas de estas líneas en medio GM sin higromicina y la cuantificación de los niveles de ARNm de *ADK1*, *ADK2* e *ICU11* mediante RT-qPCR o secuenciación de ARN permitirá confirmar la correlación entre estos fenotipos y el silenciamiento de dichos genes.

Hemos obtenido líneas T_3 homocigóticas para los transgenes *amiR-CIMS*, *sin-tasiR-CIMS/ICU11*, *amiR-DRE2* y *sin-tasiR-DRE2/ICU11*. Las plantas de las líneas T_3 homocigóticas para los transgenes *amiR-CIMS* y *sin-tasiR-CIMS/ICU11* presentan un fenotipo morfológico silvestre. Las plantas de una de las líneas T_3 *icu11-1 amiR-DRE2* homocigóticas para el transgén son pequeñas y cloróticas, con cotiledones epinásticos y hojas apuntadas. Las plantas de una línea T_3 homocigótica para el transgén *sin-tasiR-DRE2/ICU11* son pequeñas y acumulan antocianinas en su roseta y sus hojas y cotiledones son epinásticos. Se comprobará más adelante mediante RT-qPCR si el fenotipo de estas dos últimas líneas está relacionado con la insuficiencia de la función de *ICU11* y *DRE2*.

Hemos realizado análisis comparativos de los perfiles transcriptómicos previamente publicados de los mutantes simples *atms1-1*, *dre2-4*, *icu11-5* y el mutante doble *icu11-5 cp2-1*, con el objetivo de encontrar genes concordantemente desregulados. Los análisis de enriquecimiento GO de los genes diferencialmente expresados concordantemente entre los mutantes *atms1-1* e *icu11-5* y entre *atms1-1* y el mutante doble *icu11-5 cp2-1* sugieren que *ICU11* y *CIMS* están relacionados con la regulación epigenética de las respuestas al estrés biótico y abiótico. La comparación del mutante simple *dre2-4* y el doble *icu11-5 cp2-1* sugiere que la función de *DRE2* e *ICU11* se relaciona con la regulación epigenética de la respuesta a la auxina. Sería conveniente confirmar más adelante la sobreexpresión de algunos de estos genes mediante RT-qPCR en las líneas obtenidas en este TFM.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera Díaz, V. (2009). Búsqueda de modificadores del fenotipo morfológico de un mutante *argonaute1* viable. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Andrés, F., y Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics* **13**, 627-639.
- Arteaga-Vázquez, M., Caballero-Pérez, J., y Vielle-Calzada, J.P. (2006). A family of microRNAs present in plants and animals. *Plant Cell* **18**, 3355-3369.
- Bakshi, M., y Oelmüller, R. (2014). WRKY transcription factors: jack of many trades in plants. *Plant Signaling and Behavior* **9**, e27700.
- 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.
- Bleich, S., Semmler, A., Frieling, H., Thumfart, L., Muschler, M., Hillemacher, T., Kornhuber, J., Kallweit, U., Simon, M., y Linnebank, M. (2014). Genetic variants of methionine metabolism and DNA methylation. *Epigenomics* **6**, 585-591.
- Bloomer, R.H., Hutchison, C.E., Baurle, I., Walker, J., Fang, X., Perera, P., Velanis, C.N., Gümüs, S., Spanos, C., Rappsilber, J., Feng, X., Goodrich, J., y Dean, C. (2020). The *Arabidopsis* epigenetic regulator ICU11 as an accessory protein of Polycomb Repressive Complex 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **117**, 16660-16666.
- Burgos-Rivera, B., y Dawe, R.K. (2012). An *Arabidopsis* tissue-specific RNAi method for studying genes essential to mitosis. *PLoS One* **7**, e51388.
- Candela Antón, H. (2001). Análisis genético de la formación del patrón de venación de la hoja en *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Cantoni, G.L. (1953). S-Adenosylmethionine; a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate. *Journal of Biological Chemistry* **204**, 403-416.
- Cantoni, G.L. (1985). The role of S-adenosylhomocysteine in the biological utilization of S-adenosylmethionine. *Progress in Clinical and Biological Research* **198**, 47-65.
- Carbonell, A., Takeda, A., Fahlgren, N., Johnson, S.C., Cuperus, J.T., y Carrington, J.C. (2014). New generation of artificial microRNA and synthetic trans-acting small interfering RNA vectors for efficient gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **165**, 15-29.
- Castillejo, C., Romera-Branchat, M., y Pelaz, S. (2005). A new role of the *Arabidopsis* *SEPALLATA3* gene revealed by its constitutive expression. *Plant Journal* **43**, 586-596.
- Cerdá Bernad, D. (2018). Análisis genético de genes de *Arabidopsis* que codifican presuntos interactores de la proteína ICU11. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Cervantes-Laurean, D., Jacobson, E.L., y Jacobson, M.K. (1996). Glycation and glycooxidation of histones by ADP-ribose. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 10461-10469.
- Cuperus, J.T., Fahlgren, N., y Carrington, J.C. (2011). Evolution and functional diversification of *MIRNA* genes. *Plant Cell* **23**, 431-442.
- Cheng, Y., y Zhao, Y. (2007). A role for auxin in flower development. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**, 99-104.
- Chilton, M.D., Drummond, M.H., Merio, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P., y Nester, E.W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* **11**, 263-271.
- Cho, L.-H., Yoon, J., y An, G. (2017). The control of flowering time by environmental factors. *The Plant Journal* **90**, 708-719.
- Deng, W., Ying, H., Helliwell, C.A., Taylor, J.M., Peacock, W.J., y Dennis, E.S. (2011). FLOWERING LOCUS C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **108**, 6680-6685.

- Di Croce, L., y Helin, K. (2013). Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nature Structural and Molecular Biology* **20**, 1147-1155.
- Eckermann, C., Eichel, J., y Schröder, J. (2000). Plant methionine synthase: new insights into properties and expression. *Biological Chemistry* **381**, 695-703.
- Ferrández Ayela, A. (2012). Caracterización genética y molecular de los mutantes *transcurvata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F.A., y Pillai, R.S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current Opinion in Structural Biology* **15**, 331-341.
- Fletcher, J.C. (2002). Shoot and floral meristem maintenance in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 45-66.
- Friso, S., Choi, S.W., Girelli, D., Mason, J.B., Dolnikowski, G.G., Bagley, P.J., Olivieri, O., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., Corrocher, R., y Selhub, J. (2002). A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**, 5606-5611.
- Fukumoto, K., Ito, K., Saer, B., Taylor, G., Ye, S., Yamano, M., Toriba, Y., Hayes, A., Okamura, H., y Fustin, J.M. (2022). Excess S-adenosylmethionine inhibits methylation via catabolism to adenine. *Communications Biology* **5**, 313.
- Fustin, J.M., Ye, S., Rakers, C., Kaneko, K., Fukumoto, K., Yamano, M., Versteven, M., Grünewald, E., Cargill, S.J., Tamai, T.K., Xu, Y., Jabbur, M.L., Kojima, R., Lamberti, M.L., Yoshioka-Kobayashi, K., Whitmore, D., Tammam, S., Howell, P.L., Kageyama, R., Matsuo, T., Stanewsky, R., Golombek, D.A., Johnson, C.H., Kakeya, H., van Ooijen, G., y Okamura, H. (2020). Methylation deficiency disrupts biological rhythms from bacteria to humans. *Communications Biology* **3**, 211.
- Gelvin, S.B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 16-37.
- González, B., y Vera, P. (2019). Folate metabolism interferes with plant immunity through 1C methionine synthase-directed genome-wide DNA methylation enhancement. *Molecular Plant* **12**, 1227-1242.
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-352.
- Gutiérrez Nájera, N. (2018). *DENTICULATA10* codifica *FTSH14*, una proteína del cloroplasto implicada en la dorsoventralidad foliar en Arabidopsis. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Hoekema, A., Roelvink, P.W., Hooykaas, P.J., y Schilperoort, R.A. (1984). Delivery of T-DNA from the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome into plant cells. *EMBO Journal* **3**, 2485-2490.
- Hutvagner, G., y Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 22-32.
- Jiang, D., Gu, X., y He, Y. (2009). Establishment of the winter-annual growth habit via *FRIGIDA*-mediated histone methylation at *FLOWERING LOCUS C* in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 1733-1746.
- Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S., Amasino, R., y Dean, C. (2000). Molecular analysis of *FRIGIDA*, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science* **290**, 344-347.
- Juan Vicente, L. (2017). Caracterización funcional de los genes *CP3*, *CP4* y *CP5* de Arabidopsis. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Khatri, P., Sirota, M., y Butte, A.J. (2012). Ten years of pathway analysis: current approaches and outstanding challenges. *PLoS Computational Biology* **8**, e1002375.
- Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1987). Genetic resources in Arabidopsis. *Arabidopsis Information Service* **24**.
- Lee, L.Y., y Gelvin, S.B. (2008). T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiology* **146**, 325-332.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., y Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-854.

- Lee, S. (2010). Subcellular localization and protein-protein interactions of two methyl recycling enzymes from *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. University of Waterloo.
- Li, Z., Li, W., Guo, M., Liu, S., Liu, L., Yu, Y., Mo, B., Chen, X., y Gao, L. (2022). Origin, evolution and diversification of plant ARGONAUTE proteins. *Plant Journal* **109**, 1086-1097.
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**, 831-838.
- Lo, W.S., Duggan, L., Emre, N.C., Belotserkovskaya, R., Lane, W.S., Shiekhhattar, R., y Berger, S.L. (2001). Snf1—a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* **293**, 1142-1146.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., y Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.
- Mahmood, T., He, S., Abdullah, M., Sajjad, M., Jia, Y., Ahmar, S., Fu, G., Chen, B., y Du, X. (2024). Epigenetic insight into floral transition and seed development in plants. *Plant Science* **339**, 111926.
- Mateo-Bonmatí, E., Esteve-Bruna, D., Juan-Vicente, L., Nadi, R., Candela, H., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Pérez-Pérez, J.M., y Micol, J.L. (2018). *INCURVATA11* and *CUPULIFORMIS2* are redundant genes that encode epigenetic machinery components in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **30**, 1596-1616.
- Mateo-Bonmatí, E., Casanova-Sáez, R., y Ljung, K. (2019). Epigenetic regulation of auxin homeostasis. *Biomolecules* **9**, 623.
- Maunakea, A.K., Chepelev, I., Cui, K., y Zhao, K. (2013). Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. *Cell Research* **23**, 1256-1269.
- Meinke, D., y Koornneef, M. (1997). Community standards for *Arabidopsis* genetics. *Plant Journal* **12**, 247-253.
- Mendizabal, I., Keller, T.E., Zeng, J., y Yi, S.V. (2014). Epigenetics and evolution. *Integrative and Comparative Biology* **54**, 31-42.
- Meng, J., Wang, L., Wang, J., Zhao, X., Cheng, J., Yu, W., Jin, D., Li, Q., y Gong, Z. (2018). METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE4 mediates DNA and histone methylation. *Plant Physiology* **177**, 652-670.
- Mizukami, Y., y Ma, H. (1992). Ectopic expression of the floral homeotic gene *AGAMOUS* in transgenic *Arabidopsis* plants alters floral organ identity. *Cell* **71**, 119-131.
- Moffatt, B.A., Wang, L., Allen, M.S., Stevens, Y.Y., Qin, W., Snider, J., y von Schwartzenberg, K. (2000). Adenosine kinase of *Arabidopsis*. Kinetic properties and gene expression. *Plant Physiology* **124**, 1775-1785.
- Moffatt, B.A., Stevens, Y.Y., Allen, M.S., Snider, J.D., Pereira, L.A., Todorova, M.I., Summers, P.S., Weretilnyk, E.A., Martin-McCaffrey, L., y Wagner, C. (2002). Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. *Plant Physiology* **128**, 812-821.
- Mouriz, A., López-González, L., Jarillo, J.A., y Piñeiro, M. (2015). PHDs govern plant development. *Plant Signaling and Behavior* **10**, e993253.
- Mull, L., Ebbs, M.L., y Bender, J. (2006). A histone methylation-dependent DNA methylation pathway is uniquely impaired by deficiency in *Arabidopsis* S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Genetics* **174**, 1161-1171.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Nadi, R., Juan-Vicente, L., Mateo-Bonmatí, E., y Micol, J.L. (2023). The unequal functional redundancy of *Arabidopsis* *INCURVATA11* and *CUPULIFORMIS2* is not dependent on genetic background. *Frontiers in Plant Science* **14**, 1239093.
- Nadi, R., Juan-Vicente, L., Lup, S.D., Fernández, Y., Rubio, V., y Micol, J.L. (2024). Overlapping roles of *Arabidopsis* *INCURVATA11* and *CUPULIFORMIS2* as Polycomb Repressive Complex 2 accessory proteins. *bioRxiv*, doi: 10.1101/2024.03.15.585069
- Nasrullah, Hussain, A., Ahmed, S., Rasool, M., y Shah, A.J. (2022). DNA methylation across the tree of life, from micro to macro-organism. *Bioengineered* **13**, 1666-1685.

- Ortega Menaches, À. (2020). Identificación y caracterización de nuevos genes *DENTICULATA* en *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Pérez Pérez, J.M. (2003). Caracterización genética y molecular de los mutantes *ultracurvata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Pikaard, C.S., y Mittelsten Scheid, O. (2014). Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6**, a019315.
- Pomares Bri, I. (2020). El gen *APICULATA7* de *Arabidopsis* participa en el reciclaje del ribosoma citoplásmico. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- 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.
- Ramírez-Prado, J.S., Piquerez, S.J.M., Bendahmane, A., Hirt, H., Raynaud, C., y Benhamed, M. (2018). Modify the histone to win the battle: chromatin dynamics in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* **9**, 355.
- Ravanel, S., Cherest, H., Jabrin, S., Grunwald, D., Surdin-Kerjan, Y., Douce, R., y Rébeillé, F. (2001). Tetrahydrofolate biosynthesis in plants: molecular and functional characterization of dihydrofolate synthetase and three isoforms of folylpolyglutamate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**, 15360-15365.
- Ravanel, S., Block, M.A., Rippert, P., Jabrin, S., Curien, G., Rébeillé, F., y Douce, R. (2004). Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for *de novo* methionine synthesis and can import *S*-adenosylmethionine from the cytosol. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 22548-22557.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., y Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes and Development* **16**, 1616-1626.
- Relichová, J. (1976). Some new mutants. *Arabidopsis Information Service* **13**, 25-28.
- Richards, E.J., y Elgin, S.C. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* **108**, 489-500.
- Robles Ramos, P. (1999). Análisis genético de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología de la hoja. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Rocha, P.S., Sheikh, M., Melchiorre, R., Fagard, M., Boutet, S., Loach, R., Moffatt, B., Wagner, C., Vaucheret, H., y Furner, I. (2005). The *Arabidopsis* *HOMOLOGY-DEPENDENT GENE SILENCING1* gene codes for an *S*-adenosyl-L-homocysteine hydrolase required for DNA methylation-dependent gene silencing. *Plant Cell* **17**, 404-417.
- Roudier, F., Teixeira, F.K., y Colot, V. (2009). Chromatin indexing in *Arabidopsis*: an epigenomic tale of tails and more. *Trends in Genetics* **25**, 511-517.
- Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., Cheng, J., y Zhang, K. (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 2479.
- Sarmiento Mañús, R. (2011). Análisis genético de mutantes variegados de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Sauter, M., Moffatt, B., Saechao, M.C., Hell, R., y Wirtz, M. (2013). Methionine salvage and *S*-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. *Biochemical Journal* **451**, 145-154.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., y Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* **128**, 735-745.
- Serefidou, M., Venkatasubramani, A.V., y Imhof, A. (2019). The impact of one carbon metabolism on histone methylation. *Frontiers in Genetics* **10**, 764.
- Serrano-Cartagena, J., Robles, P., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (1999). Genetic analysis of leaf form mutants from the *Arabidopsis* Information Service collection. *Molecular and General Genetics* **261**, 725-739.

- Shi, J., Dong, A., y Shen, W.H. (2014). Epigenetic regulation of rice flowering and reproduction. *Frontiers in Plant Science* **5**, 803.
- Soler, N., Craescu, C.T., Gally, J., Frapart, Y.M., Mansuy, D., Raynal, B., Baldacci, G., Pastore, A., Huang, M.E., y Vernis, L. (2012). A S-adenosylmethionine methyltransferase-like domain within the essential, Fe-S-containing yeast protein Dre2. *FEBS Journal* **279**, 2108-2119.
- Sridhar, V.V., Kapoor, A., Zhang, K., Zhu, J., Zhou, T., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., y Zhu, J.K. (2007). Control of DNA methylation and heterochromatic silencing by histone H2B deubiquitination. *Nature* **447**, 735-738.
- Stortenbeker, N., y Bemer, M. (2019). The *SAUR* gene family: the plant's toolbox for adaptation of growth and development. *Journal of Experimental Botany* **70**, 17-27.
- Struck, A.W., Thompson, M.L., Wong, L.S., y Micklefield, J. (2012). S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications. *ChemBioChem* **13**, 2642-2655.
- Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., y Coupland, G. (2001). *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* **410**, 1116-1120.
- Sung, S., y Amasino, R.M. (2004). Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* **427**, 159-164.
- Thomashow, M.F., Nutter, R., Montoya, A.L., Gordon, M.P., y Nester, E.W. (1980). Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell* **19**, 729-739.
- Tian, Y., Zheng, H., Zhang, F., Wang, S., Ji, X., Xu, C., He, Y., y Ding, Y. (2019). PRC2 recruitment and H3K27me3 deposition at *FLC* require FCA binding of *COOLAIR*. *Science Advances* **5**, eaau7246.
- Tomczak, A., Mortensen, J.M., Winnenburg, R., Liu, C., Alessi, D.T., Swamy, V., Vallania, F., Lofgren, S., Haynes, W., Shah, N.H., Musen, M.A., y Khatri, P. (2018). Interpretation of biological experiments changes with evolution of the Gene Ontology and its annotations. *Scientific Reports* **8**, 5115.
- Ve, T., Williams, S.J., y Kobe, B. (2015). Structure and function of Toll/interleukin-1 receptor/resistance protein (TIR) domains. *Apoptosis* **20**, 250-261.
- Wang, X., Chen, X., Sun, L., y Qian, W. (2019). Canonical cytosolic iron-sulfur cluster assembly and non-canonical functions of DRE2 in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* **15**, e1008094.
- Xie, Z., Nolan, T.M., Jiang, H., y Yin, Y. (2019). AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **10**, 228.
- Yaish, M.W., Colasanti, J., y Rothstein, S.J. (2011). The role of epigenetic processes in controlling flowering time in plants exposed to stress. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3727-3735.
- Yan, X., Ma, L., Pang, H., Wang, P., Liu, L., Cheng, Y., Cheng, J., Guo, Y., y Li, Q. (2019). METHIONINE SYNTHASE1 is involved in chromatin silencing by maintaining DNA and histone methylation. *Plant Physiology* **181**, 249-261.
- Yang, H., Howard, M., y Dean, C. (2014). Antagonistic roles for H3K36me3 and H3K27me3 in the cold-induced epigenetic switch at *Arabidopsis FLC*. *Current Biology* **24**, 1793-1797.
- Yoo, S.K., Chung, K.S., Kim, J., Lee, J.H., Hong, S.M., Yoo, S.J., Yoo, S.Y., Lee, J.S., y Ahn, J.H. (2005). *CONSTANS* activates *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* through *FLOWERING LOCUS T* to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**, 770-778.
- You, Y., Sawikowska, A., Neumann, M., Posé, D., Capovilla, G., Langenecker, T., Neher, R.A., Krajewski, P., y Schmid, M. (2017). Temporal dynamics of gene expression and histone marks at the *Arabidopsis* shoot meristem during flowering. *Nature Communications* **8**, 15120.
- Young, L.S., Harrison, B.R., Narayana Murthy, U.M., Moffatt, B.A., Gilroy, S., y Masson, P.H. (2006). Adenosine kinase modulates root gravitropism and cap morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **142**, 564-573.

- Zhang, Y., y Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes and Development* **15**, 2343-2360.
- Zhou, H.R., Zhang, F.F., Ma, Z.Y., Huang, H.W., Jiang, L., Cai, T., Zhu, J.K., Zhang, C., y He, X.J. (2013). Folate polyglutamylation is involved in chromatin silencing by maintaining global DNA methylation and histone H3K9 dimethylation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 2545-2559.
- Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R.K., Ballinger, T., y Henikoff, S. (2007). Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics* **39**, 61-69.