



Programa de Doctorado en Bioingeniería
Universidad Miguel Hernández de Elche

Análisis de las funciones postembrionarias del gen *KEULE* de Arabidopsis

Alejandro Ruiz Bayón

Director de Tesis
José Luis Micol Molina

Codirectora de Tesis
Raquel Sarmiento Mañús

Elche, 2024

Análisis de las funciones postembrionarias del gen *KEULE* de Arabidopsis

Trabajo realizado por el Graduado Alejandro Ruiz Bayón, en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche, para optar al grado de Doctor.

Elche, 19 de junio de 2024



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

La presente Tesis Doctoral, titulada “Análisis de las funciones postembrionarias del gen *KEULE* de *Arabidopsis*”, se presenta bajo la modalidad de **tesis por compendio** de la siguiente **publicación**:

Ruiz-Bayón, A., Cara-Rodríguez, C., Sarmiento-Mañús, R., Muñoz-Viana, R., Lozano, F.M., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (2024). Roles of the *Arabidopsis KEULE* gene in postembryonic development. *International Journal of Molecular Sciences* **25**, 6667. doi: 10.3390/ijms25126667.

JOSÉ LUIS MICOL MOLINA, Catedrático de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche y director de esta Tesis Doctoral, y

RAQUEL SARMIENTO MAÑÚS, Doctora por la Universidad Miguel Hernández de Elche y codirectora de esta Tesis Doctoral,

HACEMOS CONSTAR:

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

Director de la Tesis Doctoral
José Luis Micol Molina

Codirectora de la Tesis Doctoral
Raquel Sarmiento Mañús

Elche, 19 de junio de 2024

PIEDAD NIEVES DE AZA MOYA, Coordinadora del Programa de Doctorado en Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche por Resolución Rectoral 02976/2022, de 11 de noviembre de 2022:

HACE CONSTAR:

Que da su conformidad a la presentación de la Tesis Doctoral de D. Alejandro Ruiz Bayón, titulada “Análisis de las funciones postembrionarias del gen *KEULE* de *Arabidopsis*”, que se ha desarrollado dentro del Programa de Doctorado en Bioingeniería bajo la dirección del profesor José Luis Micol Molina y la doctora Raquel Sarmiento Mañús.

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

Profesora PIEDAD NIEVES DE AZA MOYA
Coordinadora del Programa de Doctorado en Bioingeniería

A mis padres y a mi abuela.

A Gema.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS	II
I.- PREFACIO	1
II.- RESUMEN	2
III.- SUMMARY	5
IV.- INTRODUCCIÓN	8
IV.1.- Importancia de la división y la construcción de la pared de las células de las plantas.....	8
IV.2.- La citocinesis en las células de las plantas	9
IV.2.1.- Panorámica de la citocinesis vegetal.....	9
IV.2.2.- Especificación del plano de división celular.....	10
IV.2.2.1.- Organización de los microtúbulos de la banda preprofásica.....	10
IV.2.2.2.- Señalización del sitio de división cortical	13
IV.2.3.- Formación y expansión del fragmoplasto	15
IV.2.3.1.- Dinámica de los microtúbulos en el fragmoplasto	15
IV.2.3.2.- Expansión del fragmoplasto hacia el sitio de división cortical	18
IV.2.4.- Fusión de las vesículas citocinéticas en la placa celular	19
IV.2.4.1.- Expansión de la placa celular	19
IV.2.4.2.- Fase de anclaje	20
IV.2.4.3.- Fase de acoplamiento	22
IV.2.5.- Construcción de la pared celular	26
IV.2.5.1.- Fases de la maduración de la placa celular	26
IV.2.5.2.- Síntesis de polisacáridos en la membrana de la placa celular	28
IV.2.5.3.- Síntesis de polisacáridos en el aparato de Golgi	31
IV.3.- Antecedentes y objetivos	33
IV.3.1.- Los mutantes <i>serrata</i>	33
IV.3.2.- Objetivos de esta Tesis.....	33
V.- MATERIALES Y MÉTODOS	35
VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
VII.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	39
VIII.- BIBLIOGRAFÍA DE LOS APARTADOS IV-VII	41
IX.- PUBLICACIONES	50
X.- AGRADECIMIENTOS	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Estructura de los microtúbulos	9
Figura 2.- Estructura del complejo TTP	11
Figura 3.- Formación de la banda preprofásica y señalización del sitio de división cortical	14
Figura 4.- Nucleación e interdigitación de los microtúbulos en la periferia del fragmoplasto	16
Figura 5.- Expansión del fragmoplasto hacia el sitio de división cortical	18
Figura 6.- Esquema de la fusión de dos vesículas citocinéticas.....	20
Figura 7.- Estados conformacionales de las syntaxinas durante la citocinesis de las plantas.....	23
Figura 8.- Complejos SNARE de los que forma parte KNOLLE.....	24
Figura 9.- Formación de complejos <i>trans</i> -SNARE entre vesículas citocinéticas adyacentes para su posterior fusión.....	26
Figura 10.- Fases de la maduración de la placa celular.....	26
Figura 11.- Modelo del desarrollo de la placa celular en las células de las plantas superiores.....	27
Figura 12.- Estructura de los polisacáridos calosa y celulosa.....	28
Figura 13.- Formación, transporte y actividad de los Complejos de Síntesis de Celulosa	30

I.- PREFACIO

I.- PREFACIO

Siguiendo la normativa de la Universidad Miguel Hernández de Elche para la “Presentación de Tesis Doctorales por compendio de publicaciones”, este documento se ha dividido en las partes siguientes:

I.- Este *Prefacio*.

II.- Un *Resumen* en español.

III.- Un *Summary* en inglés.

IV.- Una *Introducción*, en la que se presenta el tema de la Tesis y los antecedentes y objetivos del trabajo realizado.

V.- Un resumen de los *Materiales y métodos* de las publicaciones de la Tesis.

VI.- Un resumen de los *Resultados y discusión* de las publicaciones de la Tesis.

VII.- Un resumen de las *Conclusiones y perspectivas* del trabajo realizado.

VIII.- Una *Bibliografía* de los apartados de IV-VII. Algunas de las referencias que incluye se repiten en las bibliografías de los artículos incluidos en esta memoria.

IX.- Un apartado de *Publicaciones*, que incluye la siguiente, en la que se indica el factor de impacto [FI] más reciente disponible.

Ruiz-Bayón, A., Cara-Rodríguez, C., Sarmiento-Mañús, R., Muñoz-Viana, R., Lozano, F.M., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (2024). Roles of the Arabidopsis *KEULE* gene in postembryonic development. *International Journal of Molecular Sciences* **25**, 6667. doi: 10.3390/ijms25126667. [FI: 5,6].

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

X.- Un apartado de *Agradecimientos*.

Con el fin de reducir redundancias innecesarias e inconvenientes, se han mencionado en los apartados VI y VII solo los resultados y conclusiones más relevantes obtenidos en esta Tesis. El apartado IX recoge íntegramente el trabajo realizado.

II.- RESUMEN

II.- RESUMEN

Durante la citocinesis de una célula de la línea somática de las plantas se forma una pared ecuatorial que la divide y separa a sus células hijas. Los componentes de dicha pared son aportados por vesículas citocinéticas que se originan en el aparato de Golgi y son transportadas hasta el plano de división celular, en donde se fusionan formando la placa celular. Esta última es inicialmente una red túbulo-vesicular que se expande radialmente a la vez que se transforma progresivamente en una lámina fenestrada plana, cuyos orificios darán lugar a los plasmodesmos. Durante la maduración de la placa celular se depositan en su interior polisacáridos sintetizados en el aparato de Golgi o en la propia placa, que constituirán la nueva pared.

En la primera fase de su proceso de fusión en la placa celular, la agregación de las vesículas citocinéticas está mediada por los denominados complejos de anclaje. En la segunda fase, la de acoplamiento, las proteínas Soluble NSF Attachment Protein Receptor (SNARE) de vesículas adyacentes forman complejos *trans*-SNARE, que propician un contacto estrecho entre sus membranas; el ensamblaje de estos complejos depende de la interacción entre sus subunidades (las proteínas SNARE, entre ellas las denominadas sintaxinas) y las proteínas Sec1/Munc18 (SM). KEULE (KEU) es una proteína SM que juega un importante papel en la coordinación de la fusión de las vesículas citocinéticas en el plano de división celular.

En el laboratorio de José Luis Micol se realizó en la década de los noventa una búsqueda de mutantes foliares de *Arabidopsis* tras una mutagénesis con metanosulfonato de etilo. Dos de dichos mutantes resultaron ser alélicos y las hojas de su roseta eran serradas, razón por la que fueron denominados *serrata4-1* (*sea4-1*) y *sea4-2*. Usando cartografía mediante secuenciación masiva, hemos establecido en esta Tesis que *sea4-1* y *sea4-2* son alelos recesivos, hipomorfos y viables del gen *KEU*; todos los alelos recesivos de este gen anteriormente descritos causan letalidad en el estado de plántula, como consecuencia de la perturbación de su desarrollo embrionario, que a su vez se debe a las alteraciones de la citocinesis que manifiestan los mutantes nulos *keu*.

El mutante *sea4-1* es portador de una transición G→A en el donante del *splicing* del noveno exón de *KEU*, que causa la retención del noveno intrón de este gen en la mayoría de los correspondientes ARN mensajeros, que en consecuencia codifican una proteína truncada. Por su parte, *sea4-2* presenta una transición G→A que presuntamente causa una sustitución S57L en uno de los cuarenta residuos que interaccionan con las sintaxinas. Hemos demostrado que *sea4-1* y *sea4-2* no complementan con los alelos nulos *keu-21*, *keu-*

22, *keu-23* y *keu*^{MM125} de *KEU*, confirmando así su alelismo. Hemos combinado *sea4-1* y *sea4-2* con alelos de otros genes relacionados con la fusión de membranas, como los que codifican las proteínas SEC1B y SEC6, y las sintaxinas SYNTAXIN OF PLANTS21 (SYP21), SYP132 y KNOLLE (KN): hemos obtenido dobles mutantes y sesquimutantes de *sea4-1* y *sea4-2* con *sec1b-1*, *sec1b-2*, *sec6-2*, *sec6-3*, *syp21*, *syp132^T* y *kn*^{X37-2}, casi todos los cuales presentaron un fenotipo sinérgico similar; resultaron ser plántulas letales, sin desarrollo foliar o con hojas muy pequeñas y serradas.

Hemos caracterizado algunos rasgos del fenotipo morfológico de los mutantes *sea4-1* y *sea4-2*. Sus tallos y raíces principales son más cortos que los del tipo silvestre *Ler*. Su patrón de venación foliar es más complejo que el silvestre, con mayor número de bifurcaciones y venas terminales por unidad de superficie. Hemos obtenido cortes histológicos de hojas del tercer nudo de la roseta de estos mutantes, y hemos cuantificado mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial la variabilidad del tamaño de las células de la epidermis y el mesófilo en empalizada de las hojas del primer y tercer nudo de su roseta. Muchas células del mesófilo en empalizada de los mutantes *sea4* son más pequeñas que las silvestres, pero algunas son mucho más grandes y causan protuberancias en la epidermis foliar; además, la forma de las células pavimentosas de la epidermis es más simple que en *Ler*. La senescencia foliar de los mutantes *sea4* es más temprana y afecta a más hojas que en el tipo silvestre, y *sea4-2* presenta floración temprana. Hemos establecido que la variabilidad fenotípica observada en el grado de expansión de los cotiledones y las hojas y en la aparición de senescencia prematura en los mutantes *sea4* es independiente del fenotipo de los parentales y se trata, en consecuencia, de una propiedad intrínseca de su genotipo.

Hemos determinado los niveles de ploidía de los mutantes *sea4*, constatando un incremento en la endoreduplicación de las células foliares. También hemos realizado un análisis transcriptómico de los mutantes *sea4-1* y *sea4-2*, en el que hemos encontrado más de 7000 genes desregulados. Los genes sobreexpresados pertenecen a las categorías del plegamiento de proteínas y degradación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico, la inmunidad, el ciclo de Krebs y la biosíntesis de las auxinas, el jasmonato y los monolignoles. Los genes reprimidos están relacionados con la fotosíntesis, la biosíntesis de las clorofilas y los carotenos, el ciclo de Calvin, la ruta de la acetil coenzima A, la biosíntesis de los flavín adenín dinucleótidos y flavín mononucleótidos, y el metabolismo de los aminoácidos y los ácidos grasos. Este perfil transcriptómico recuerda los de mutantes previamente descritos que manifiestan la así denominada reducción de la integridad de la pared celular y la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas. Estas características

comunes podrían estar desencadenadas por la acumulación, en el plano de división celular, de vesículas citocinéticas que no se han fusionado.

Dado que nuestro análisis transcriptómico también reveló la sobreexpresión de genes de la ruta de síntesis de la auxina, y que esta hormona regula la morfogénesis de la hoja en su conjunto y en particular la del margen foliar, hemos analizado la distribución del transportador del eflujo de la auxina PIN-FORMED 1 (PIN1) y de la propia hormona en los mutantes *sea4-1* y *sea4-2*. Hemos constatado que la distribución subcelular de PIN1 en los primordios foliares y las raíces no está alterada, aunque su concentración es inferior a la silvestre. Por su parte, la auxina se acumula más en la zona apical y la epidermis de los primordios foliares de estos mutantes que en el tipo silvestre, lo que podría justificar el margen serrado de sus hojas expandidas, ya que autores anteriores han demostrado que la morfogénesis del margen foliar en *Arabidopsis* depende de la correcta ubicación de máximos alternos de concentración de la auxina y del factor de transcripción CUP-SHAPED COTYLEDON 2 (CUC2).

De nuestro estudio de los alelos *sea4-1* y *sea4-2* del gen *KEU* concluimos, como cabía esperar, que la proteína KEU actúa a nivel subcelular de igual modo durante el desarrollo embrionario, el vegetativo y el reproductivo. La actuación de KEU parece necesaria para que alcancen su tamaño normal la raíz y el tallo principales, así como las hojas de la roseta. Los tejidos internos de las hojas de estos mutantes revelan que la actuación de KEU es necesaria para la correcta definición de las líneas de demarcación entre tejidos adyacentes, como la epidermis, el mesófilo en empalizada y el lagunar. La inexistencia previa de alelos mutantes viables del gen *KEU* confiere un particular valor a *sea4-1* y *sea4-2*, por su potencial utilidad para quienes estén interesados en el estudio de la relación entre la citocinesis y la organogénesis postembrionaria en las plantas.

III.- SUMMARY

III.- SUMMARY

During cytokinesis of plant somatic cells, an equatorial wall forms that ultimately separates the daughter cells. The components of this wall are provided by cytokinetic vesicles that originate in the Golgi apparatus and are transported to the cell division plane, where they fuse to form the cell plate. Initially, the cell plate is a tubular-vesicular network that expands radially while progressively transforming into a planar fenestrated sheet, with its fenestrae giving rise to plasmodesmata. During the maturation of the cell plate, polysaccharides synthesized in the Golgi apparatus or within the plate itself are deposited, which will constitute the new wall.

In the first phase of their fusion process in the cell plate, the cytokinetic vesicles aggregate via tethering complexes. The second phase is docking, where the Soluble NSF Attachment Protein Receptor (SNARE) proteins of adjacent vesicles form *trans*-SNARE complexes, promoting close contact between their membranes; the assembly of these complexes depends on the interaction between their subunits (SNARE proteins, including those known as syntaxins) and Sec1/Munc18 (SM) proteins. KEULE (KEU) is an SM protein that plays an important role in coordinating the fusion of cytokinetic vesicles in the cell division plane.

In the 1990s, a search for *Arabidopsis* leaf mutants was conducted in the laboratory of José Luis Micol after a mutagenesis with ethyl methanesulfonate. Two of these mutants turned out to be allelic, and the leaves of their rosettes were serrated, hence they were named *serrata4-1* (*sea4-1*) and *sea4-2*. Using mapping by sequencing, we established in this Thesis that *sea4-1* and *sea4-2* are recessive, hypomorphic, and viable alleles of the *KEU* gene; all previously described recessive alleles of this gene cause lethality at the seedling stage, due to alterations in embryonic development resulting from cytokinesis defects in null *keu* mutants.

The *sea4-1* mutant carries a transition in the splice donor site of the ninth exon of *KEU*, causing the retention of the ninth intron in most corresponding mature mRNAs, which consequently encode a truncated protein. Meanwhile, *sea4-2* presents a G→A transition that is predicted to cause an S57L substitution in one of the forty residues interacting with syntaxins. We have demonstrated that *sea4-1* and *sea4-2* do not complement the null alleles *keu-21*, *keu-22*, *keu-23*, and *keu^{MM125}* of *KEU*, thus confirming their allelism. We have combined *sea4-1* and *sea4-2* with alleles of other genes related to membrane fusion, such as those encoding the proteins SEC1B and SEC6, and the syntaxins SYNTAXIN OF PLANTS21 (SYP21), SYP132, and KNOLLE (KN): we obtained double mutants and sesquimutants of

sea4-1 and *sea4-2* with *sec1b-1*, *sec1b-2*, *sec6-2*, *sec6-3*, *syp21*, *syp132^T*, and *kn^{X37-2}*, almost all of which showed a similar synergistic phenotype; they turned out to be seedling-lethal, without leaf development or with very small and serrated leaves.

We have characterized some morphological traits of the *sea4-1* and *sea4-2* mutants. Their stems and primary roots are shorter than those of the wild type *Ler*. Their leaf venation pattern is more complex than the wild type, with a higher number of bifurcations and terminal veins per unit area. We obtained histological sections of third node leaves and quantified, using differential interference contrast microscopy, the size variability in epidermal cells and palisade mesophyll cells of first- and third-node rosette leaves of these mutants. Many palisade mesophyll cells in the *sea4* mutants are smaller than the wild type, but some are much larger and cause protuberances in the leaf epidermis; furthermore, the shape of the pavement cells of the epidermis is simpler than in *Ler*. The leaf senescence of the *sea4* mutants is earlier and affects more leaves than in the wild type, and *sea4-2* shows early flowering. We have established that the observed phenotypic variability in cotyledon and leaf expansion and premature senescence in the *sea4* mutants is independent of the parental phenotypes and it is, consequently, an intrinsic property of their genotype.

We determined the ploidy levels of the *sea4* mutants, noting an increase in endoreduplication of the leaf cells. We also conducted a transcriptomic analysis of the *sea4-1* and *sea4-2* mutants, in which we found more than 7000 deregulated genes. The overexpressed genes belong to categories such as protein folding and degradation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum, immunity, the Krebs cycle, and the biosynthesis of auxins, jasmonate, and monolignols. The repressed genes are related to photosynthesis, chlorophyll and carotenoid biosynthesis, the Calvin cycle, the acetyl-coenzyme A pathway, the biosynthesis of flavin adenine dinucleotides and flavin mononucleotides, and amino acid and fatty acid metabolism. This transcriptomic profile resembles those of previously described mutants that exhibit the so-called reduction of cell wall integrity and activation of the unfolded protein response. These common characteristics could be triggered by the accumulation of unfused cytokinetic vesicles at the cell division plane.

Since our transcriptomic analysis revealed the overexpression of auxin biosynthesis pathway genes, and this hormone is known to regulate overall leaf morphogenesis and particularly that of the leaf margin, we analyzed the distribution of the auxin efflux transporter PIN-FORMED 1 (PIN1) and the hormone itself in the *sea4-1* and *sea4-2* mutants. We found that the subcellular distribution of PIN1 in leaf primordia and roots is not altered, although its concentration is lower than in the wild type. In addition, auxin accumulates more in the apical

zone and epidermis of the mutant leaf primordia than in the wild type, which may explain their serration in expanded leaves, as previous authors have shown that *Arabidopsis* leaf margin morphogenesis depends on the correct placement of alternating concentration maxima of auxin and of the transcription factor CUP-SHAPED COTYLEDON 2 (CUC2).

Our study of the *sea4-1* and *sea4-2* alleles of the *KEU* gene concludes, as expected, that the KEU protein acts at the subcellular level similarly during embryonic, vegetative, and reproductive development. KEU appears to be required for the primary root and stem, as well as the rosette leaves, to reach their normal size. The internal tissues of these mutant leaves reveal that KEU action is essential for the correct definition of boundaries between adjacent tissues, such as the epidermis, palisade mesophyll, and spongy mesophyll. The absence of viable mutant alleles of the *KEU* gene until now gives special value to *sea4-1* and *sea4-2* for those interested in studying the relationship between cytokinesis and post-embryonic organogenesis in plants.

IV.- INTRODUCCIÓN

IV.- INTRODUCCIÓN

IV.1.- Importancia de la división y la construcción de la pared de las células de las plantas

No pocos conceptos sobre los procesos y estructuras más importantes de la biología celular de los eucariotas se fundamentan en estudios realizados en la especie humana o en otros mamíferos. En consecuencia, es hasta cierto punto comprensible que en ocasiones se exagere la universalidad de dichos hallazgos, bajo una mentalidad homocéntrica que tiende a ignorar la extraordinaria diversidad de las soluciones que ha encontrado la evolución a problemas comunes a muchos seres vivos, como la división celular, la pluricelularidad y la organogénesis. La realidad es que entre los animales, las plantas y los hongos existen numerosas diferencias en cuanto al tamaño y la forma de las células, la composición de la matriz extracelular, los tipos de uniones entre células, la presencia de orgánulos membranosos específicos, la organización del citoesqueleto, el transporte intracelular, la regulación del ciclo celular, la transducción de señales, la apoptosis y la citocinesis (Panstruga *et al.*, 2023).

La pluricelularidad ha surgido independientemente en las plantas y los animales. El desarrollo vegetal, a diferencia del animal, es fundamentalmente postembrionario, no implica migraciones celulares y depende en gran medida de la organogénesis iterativa a partir de los primordios. La división celular, en consecuencia, juega un papel muy importante en la morfogénesis y el crecimiento de las plantas, y está controlada genéticamente por factores que son específicos del reino vegetal (Gutierrez, 2016; Sablowski y Gutierrez, 2022).

La celulosa es el biopolímero más abundante en nuestro planeta; es el componente fundamental de las paredes primarias de las células de las plantas, a cuya construcción se destina hasta el 10% de los genes de algunos genomas vegetales (Carpita y McCann, 2008). Se asume que cientos, tal vez miles, de otros genes contribuyen también a este proceso, participando en el control de la organización del citoesqueleto y el tráfico de vesículas requeridos (Gu y Rasmussen, 2022). La construcción de la pared celular de las plantas no solo es importante por su contribución a la biomasa de nuestro planeta, sino también porque juega un papel central en el desarrollo y el crecimiento vegetal. En esta introducción se pretende proporcionar una visión panorámica de los genes, mutantes y proteínas cuyo estudio ha permitido comprender la construcción de la pared celular primaria de las plantas, que ocurre durante la citocinesis, en la que se compartimenta una célula madre, rindiendo dos células hijas. También se crea nueva pared primaria durante la elongación celular de las plantas, cuya discusión excede los propósitos de esta introducción.

IV.2.- La citocinesis en las células de las plantas

IV.2.1.- Panorámica de la citocinesis vegetal

En la citocinesis de las células de las plantas desempeñan papeles clave los microtúbulos, la banda preprofásica, las vesículas citocinéticas, el fragmoplasto, la placa celular y el sitio de división cortical, que se definen sucintamente en este apartado para detallarse en los siguientes.

Los microtúbulos del citoesqueleto son estructuras cilíndricas huecas y relativamente rígidas, cuya pared está formada por 13 protofilamentos, cada uno de ellos constituido por numerosos heterodímeros de tubulina α y β , alineados en tándem cabeza-cola (Figura 1). Se denomina extremos negativo y positivo de cada microtúbulo, respectivamente, a los que contienen la tubulina α y la β de los dímeros terminales de cada protofilamento (Struk y Dhonukshe, 2014).

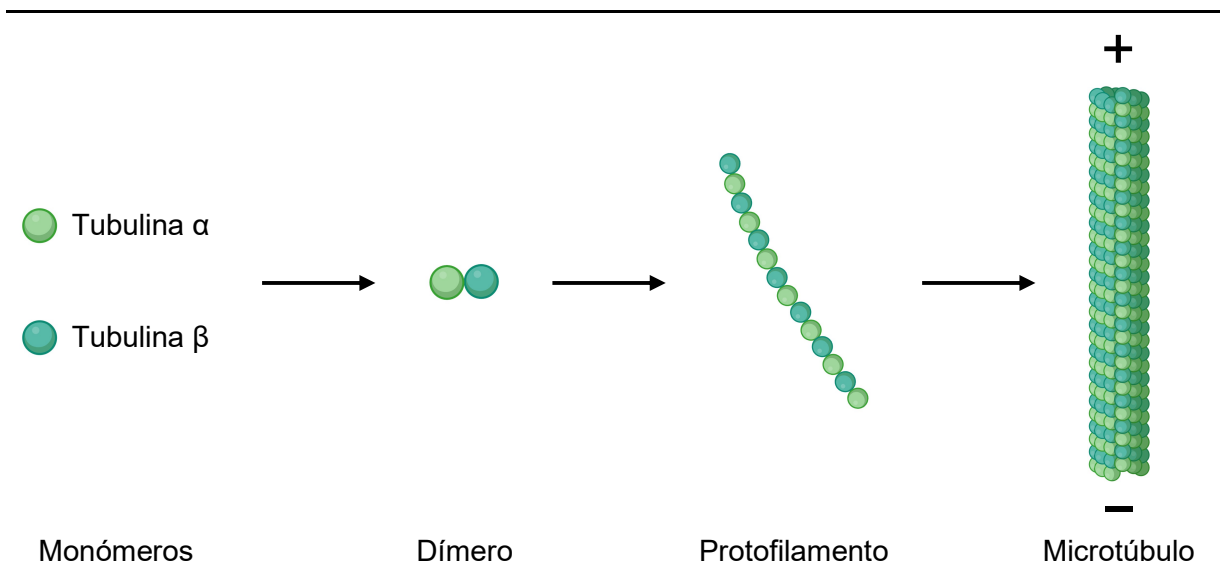


Figura 1.- Estructura de los microtúbulos. Se representan como esferas las tubulinas α (verde claro) y β (verde oscuro), así como uno de sus dímeros, un protofilamento, y 13 de estos últimos integrados en un microtúbulo, con indicación de sus extremos positivo (+) y negativo (-). Imagen obtenida con Biorender (<https://www.biorender.com/>) e inspirada en Struk y Dhonukshe (2014).

La mayor parte de las células somáticas de las plantas se encuentran en interfase, en la que los microtúbulos están dispuestos corticalmente, formando bandas paralelas entre sí y a la membrana plasmática, y adyacentes a esta última (Ehrhardt y Shaw, 2006). En la etapa final de su división se simultanean la mitosis, en la que se completa la segregación cromosómica, y la citocinesis, en la que la célula se divide; en ambos procesos el papel de los microtúbulos es importante. Al final de la fase G2 y durante la profase (la fase inicial de la mitosis), los microtúbulos corticales se despolimerizan, excepto alrededor del núcleo, en

donde forman, junto con filamentos de actina, una estructura anular transitoria, adyacente a la membrana plasmática, conocida como banda preprofásica (Müller *et al.*, 2009).

El proceso más importante de la citocinesis vegetal es la fusión de vesículas citocinéticas procedentes de la red *trans*-Golgi, que transportan los materiales con los que se construirá la pared que subdividirá la célula madre. Estas vesículas son transportadas hasta el plano de división celular por una estructura denominada fragmoplasto (Müller, 2019), que contiene dos conjuntos de microtúbulos antiparalelos y enfrentados, filamentos de actina y las propias vesículas citocinéticas. El fragmoplasto se expande radialmente desde el centro del plano de división (Smertenko, 2018), polimerizándose nuevos microtúbulos en su periferia a la vez que se despolimerizan los de su zona central. Esto último conlleva un cambio progresivo de la forma del fragmoplasto, desde la inicial, de disco, a la de un anillo que aumenta progresivamente de diámetro (Müller, 2019).

La fusión de las vesículas citocinéticas genera una endomembrana laminar denominada placa celular (Lee y Liu, 2013), que se expande radialmente por fusión sucesiva de vesículas citocinéticas desde el centro del plano de división celular hacia el sitio de división cortical (Müller, 2019), un dominio cuya posición es la ocupada anteriormente por la banda preprofásica; esta última desaparece en la metafase, a la vez que la membrana nuclear. La expansión de la placa celular acaba cuando entra en contacto con el sitio de división cortical, dividiendo así finalmente la célula madre en dos células hijas (Rasmussen *et al.*, 2011; Müller y Jürgens, 2016).

En los apartados siguientes se discutirá el papel de las proteínas que intervienen en la citocinesis, que en muchos casos se ha establecido merced al aislamiento y estudio de estirpes portadoras de alelos mutantes de los correspondientes genes. Estas proteínas se han clasificado aquí en cuatro grupos, según su función: las relacionadas con la especificación del plano de división celular (apartado IV.2.2), con la formación y expansión del fragmoplasto (apartado IV.2.3, en la página 15), con la fusión de las vesículas citocinéticas en la placa celular (apartado IV.2.4, en la página 19) y con la construcción final de la nueva pared celular (apartado IV.2.5, en la página 26) (Thiele *et al.*, 2009).

IV.2.2.- Especificación del plano de división celular

IV.2.2.1.- Organización de los microtúbulos de la banda preprofásica

Tal como se ha mencionado en el apartado anterior, el posicionamiento de la banda preprofásica especifica el plano de división celular en las plantas (Mineyuki, 1999). Los microtúbulos de las células animales son organizados por los centrosomas, que no existen en las plantas, en las que su función reguladora es ejecutada por otras proteínas y

complejos. Uno de estos últimos, que actúa durante la formación de la banda preprofásica, es el denominado TTP (Spinner *et al.*, 2013), que regula la organización del citoesqueleto y la orientación de la división celular y debe su nombre a las iniciales de los de las proteínas que lo componen: TONNEAU1 (TON1), TON1 RECRUITING MOTIF (TRM), y PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A). El complejo TTP de Arabidopsis incluye una proteína TON1 y una de la familia TRM, así como una holoenzima PP2A (Figura 2). Forman parte de esta última una subunidad de andamiaje (A1, A2 o A3), una reguladora (TON2 o subunidad B) y una catalítica (C3 o C4) (Spinner *et al.*, 2013).

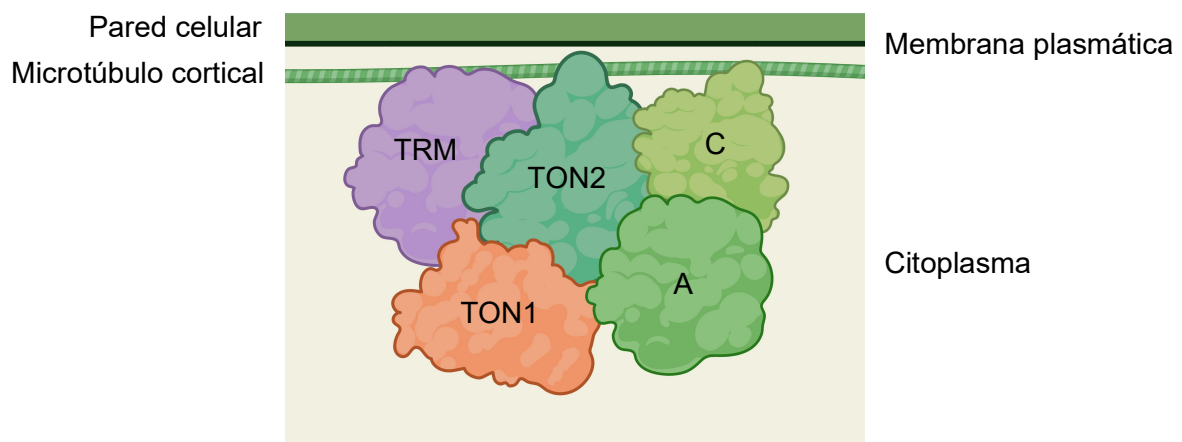


Figura 2.- Estructura del complejo TTP. Se representan las proteínas TRM y TON1, y las subunidades A, C y TON2 de la holoenzima PP2A. El complejo aparece en la figura unido a un microtúbulo cortical, que se representa con franjas verdes oscuras y claras, adyacente a la membrana plasmática (en negro) y a la pared celular (en verde). Imagen obtenida con Biorender e inspirada en Spinner *et al.* (2013).

Arabidopsis cuenta con dos proteínas TON1 (TON1a y TON1b), codificadas por los genes *TON1a* y *TON1b*, parálogos muy cercanos y dispuestos en tándem en todas las plantas terrestres, cuya expresión es constitutiva (Azimzadeh *et al.*, 2008). La región aminoterminal de TON1a y TON1b contiene dominios que también presentan las proteínas centrosómicas humanas Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Oncogene Partner (FOP) y Oral Facial Digital 1 (OFD1) (Azimzadeh *et al.*, 2008). Las TON1 interactúan físicamente con las proteínas CENTRIN1 (CEN1), de expresión constitutiva y muy similares a las centrinas de los centrosomas animales (Azimzadeh *et al.*, 2008).

Las plantas mutantes *ton1* tienen parcialmente deletionados los genes *TON1a* y *TON1b*, y son pequeñas, gruesas y estériles (Traas *et al.*, 1995). En las células *ton1* se forman correctamente el fragmoplasto y el huso mitótico (Traas *et al.*, 1995). Sus microtúbulos corticales se orientan al azar durante la interfase, acumulándose en la zona

perinuclear sin llegar a formar la banda preprofásica, lo que a su vez causa la incorrecta orientación del plano de división celular (Azimzadeh *et al.*, 2008). Sin embargo, la disposición de las células del mutante *ton1* en sus órganos y tejidos es correcta, lo que indica que no depende de la orientación de los planos de división celular. Las proteínas TON1 se encuentran en la cara citoplásmica de la membrana plasmática (Benschop *et al.*, 2007) y colocalizan con la banda preprofásica y los microtúbulos corticales, a pesar de que no contienen dominios de unión a estos últimos ni a la membrana; estas uniones, por tanto, deben depender de las otras subunidades del complejo TTP (Azimzadeh *et al.*, 2008).

Tal como se ha indicado antes, TON2 es la subunidad reguladora de la holoenzima PP2A, que forma parte del complejo TTP; se localiza en el citoplasma, y al final de la fase G2, en la banda preprofásica (Kirik *et al.*, 2012). La región carboxiterminal de TON2, que incluye el dominio que interacciona con la subunidad A de las PP2A de *Arabidopsis* (Camilleri *et al.*, 2002), es muy similar a la de la subunidad reguladora de las PP2A humanas, la 72-kDa Regulatory subunit (PR72). Los fenotipos morfológico y tisular del mutante *ton2* son muy parecidos a los de *ton1* (Traas *et al.*, 1995; Camilleri *et al.*, 2002), manifestándose la desorientación de sus planos de división desde las etapas más tempranas del desarrollo, sin que ello conlleve alteraciones de la formación del patrón embrionario (Torres-Ruiz y Jürgens, 1994).

Del estudio del mutante *ton2* se ha deducido la implicación de TON2 en la formación de nuevos microtúbulos a partir de los preexistentes, proceso al que se denomina nucleación (Kirik *et al.*, 2012). La tubulina γ forma con otras proteínas el complejo γ -TURC (por γ -tubulin ring complex), que sirve de andamio para la adición de nuevos dímeros de las tubulinas α y β a un microtúbulo preexistente. En *Arabidopsis*, el complejo γ -TURC construye nuevos microtúbulos, mayoritariamente en un ángulo de 40° con respecto a los corticales preexistentes, lo que se conoce como nucleación ramificada (Nakamura *et al.*, 2010). El transporte de los complejos γ -TURC y su capacidad de nucleación son iguales en el tipo silvestre y en el mutante *ton2*, en los que sin embargo son más frecuentes las nucleaciones paralelas que las ramificadas (Kirik *et al.*, 2012). La alteración de la ratio entre nucleaciones ramificadas y paralelas parece ser la causa de que las células de las plantas *ton2* no puedan reorganizar sus microtúbulos corticales ante un estímulo luminoso (Kirik *et al.*, 2012).

También forma parte del complejo TTP una proteína de la familia TRM. Estas proteínas presentan hasta seis motivos altamente conservados, a los que se ha denominado motivos M, siempre en el orden M5-M1-M3-M6-M4-M2. *Arabidopsis* tiene 34 proteínas TRM, todas las cuales contienen el motivo M2, estando los restantes presentes solo en algunas de

ellas (Drevensek *et al.*, 2012). Las TRM vegetales más estudiadas son TRM1, TRM2 y TRM29, también conocidas como LONGIFOLIA2 (LNG2), LNG1 y ALCATRAZ-INTERACTING PROTEIN, respectivamente (Drevensek *et al.*, 2012). El mutante hipermorfo *Ing1-1D* presenta peciolo, flores y silicuas alargados, además de hojas alargadas y serradas. Los mutantes de insuficiencia de función *Ing1* e *Ing2* presentan hojas más cortas que las silvestres, un rasgo que se acentúa en el doble mutante *Ing1 Ing2*, como consecuencia de la reducción de la elongación polar de las células del limbo foliar (Lee *et al.*, 2006). La proteína TRM1 presenta un gran dominio básico central, que interacciona con las colas ácidas de las tubulinas α y β (Drevensek *et al.*, 2012); su dominio M2 interacciona con TON1, y el M3, con TON2 (Spinner *et al.*, 2013). Se ha propuesto que el complejo TTP es conducido hacia los microtúbulos por TRM1, ya que la localización subcelular de esta última, en puntos discretos a lo largo de la matriz microtubular, coincide con la de TON1 (Spinner *et al.*, 2013). También apoya esta hipótesis la observación de que la Centrosome-Associated Protein350 (CAP350) humana, que contiene los motivos M3-M4-M2, atrae a FOP (véase el penúltimo párrafo de la página 11) hacia los centrosomas (Drevensek *et al.*, 2012).

La actividad fosfatasa de la PP2A, la tercera subunidad del TTP, es necesaria para que este complejo organice el citoesqueleto. Por su parte, TON1 parece contribuir al ensamblaje del propio complejo (Spinner *et al.*, 2013). Las mutaciones en los genes que codifican estos componentes del TTP causan rasgos fenotípicos comunes: por ejemplo, los mutantes simples *ton1* y *ton2* y los dobles *pp2aa1-a2* y *pp2ac3-c4* forman correctamente el huso mitótico y el fragmoplasto, pero acumulan microtúbulos perinucleares sin construir la banda preprofásica (excepto *pp2ac3-c4*, que sí lo hace en el 21% de sus células), lo que a su vez desorienta sus planos de división (Ballesteros *et al.*, 2013; Spinner *et al.*, 2013).

IV.2.2.2.- Señalización del sitio de división cortical

Tal como se ha mencionado en el apartado IV.2.1, en la página 10, aunque la banda preprofásica desaparece en la metafase, el fragmoplasto crece radialmente en la telofase hacia el sitio de división cortical, cuya posición especifica el plano de división celular, en el que se formará la placa celular. Esta observación indica que las modificaciones de la membrana plasmática que causa la banda preprofásica subsisten después de su desaparición. De hecho, se han identificado marcadores negativos y positivos del sitio de división cortical, que le diferencian del resto de la membrana plasmática y permanecen hasta el final de la mitosis (Figura 3, en la página 14) (Rasmussen *et al.*, 2011).

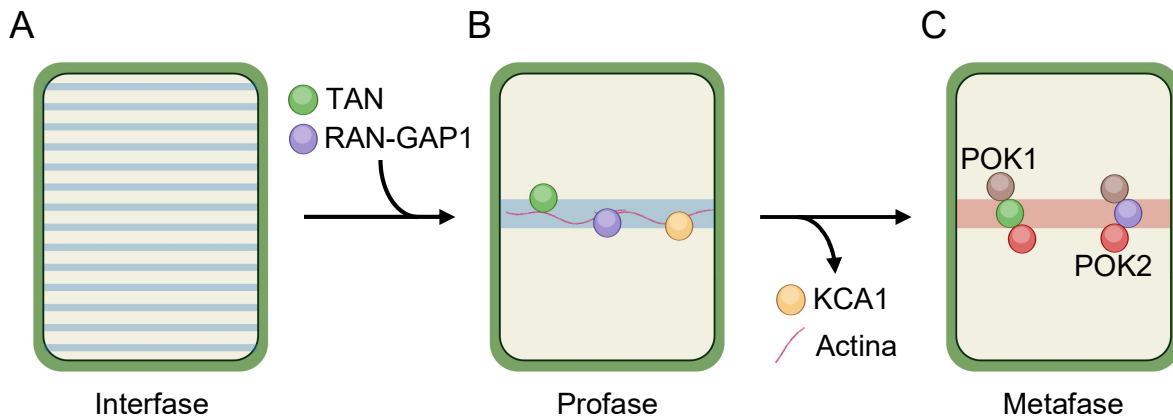


Figura 3.- Formación de la banda preprofásica y señalización del sitio de división cortical. (A) Las bandas de microtúbulos corticales visibles en la interfase (líneas azules) desaparecen durante la profase, (B) excepto en el plano de división celular, en el que se forma la banda preprofásica (franja azul), a la que se añaden los marcadores positivos del sitio de división cortical (TAN y RAN-GAP1), y en la que se pierden los marcadores negativos (KCA1 y actina). (C) En la metafase, la banda preprofásica desaparece, quedando en su lugar el sitio de división cortical (franja roja) señalizado por sus marcadores positivos. Las quinesinas POK1 y POK2 mantienen a estos marcadores en el sitio de división cortical. Imagen obtenida con Biorender e inspirada en Rasmussen *et al.* (2011).

Se denomina marcadores negativos a las moléculas cuya concentración se reduce parcial o totalmente en el sitio de división cortical, aunque siguen presentes en el resto de la membrana plasmática (Rasmussen *et al.*, 2011). Entre dichos marcadores negativos se incluyen los filamentos de actina (Panteris, 2008) y la KINESIN CDKA;1 ASSOCIATED1 (KCA1), una proteína que causa la acumulación de filamentos de actina (Vanstraelen *et al.*, 2004). La KCA1 desaparece durante la profase en el sitio de división cortical, en donde además se reduce la concentración de filamentos de actina durante la transición de la profase a la metafase.

Uno de los marcadores positivos del sitio de división cortical es la RAN GTPASE-ACTIVATING PROTEIN1 (RAN-GAP1), que se localiza también en la banda preprofásica, la placa celular, el huso mitótico y la membrana nuclear (Rasmussen *et al.*, 2011). Otro marcador positivo del sitio de división cortical es TANGLED (TAN), una proteína muy básica, que por serlo también se une a los microtúbulos de la banda preprofásica, que son ácidos. La proteína TAN forma en la profase un anillo en la posición anteriormente ocupada por la banda preprofásica; este anillo se estrecha durante la expansión de la placa celular hacia la pared celular materna, y desaparece después de completarse su inserción en esta última (Walker *et al.*, 2007). En todas las capas celulares de las hojas del mutante *tan-1* del maíz las divisiones celulares longitudinales no se orientan correctamente, aunque sí lo hacen las transversales, reduciéndose el tamaño del órgano sin alterarse su forma (Smith *et al.*, 1996).

Para el transporte de TAN y RAN-GAP1 hacia la banda preprofásica y su permanencia en el sitio de división cortical durante la citocinesis son necesarias las proteínas PHRAGMOPLAST ORIENTING KINESIN1 (POK1) y POK2 (Walker *et al.*, 2007). Estas quinesinas-12 se expresan más en tejidos y órganos ricos en células en división, como el meristemo apical de la raíz, los primordios foliares y las hojas juveniles (Müller *et al.*, 2006). El dominio carboxiterminal de POK1 y POK2 interacciona con la región I de TAN (Müller *et al.*, 2006; Rasmussen *et al.*, 2011). Como consecuencia de la redundancia funcional de *POK1* y *POK2*, los mutantes simples *pok1* y *pok2* son fenotípicamente silvestres, pero el doble mutante *pok1 pok2* es similar al mutante simple *tan-1*: son plantas enanas, fértiles aunque con pocas semillas y cuyo meristemo radicular muestra células de formas irregulares y distribuidas desordenadamente por la incorrecta orientación de sus divisiones celulares (Müller *et al.*, 2006). La interacción de TON2 con la región II de TAN es necesaria para que esta última y RAN-GAP1 permanezcan en el sitio de división cortical tras la desaparición de la banda preprofásica (Rasmussen *et al.*, 2011).

IV.2.3.- Formación y expansión del fragmoplasto

IV.2.3.1.- Dinámica de los microtúbulos en el fragmoplasto

Tal como se ha mencionado en el apartado IV.2.2.1, en el último párrafo de la página 12, los complejos γ -TURC se unen a los microtúbulos de los dos conjuntos antiparalelos del fragmoplasto, causando su nucleación ramificada hacia la zona intermedia de este último (Lee y Liu, 2013). La KINESIN-LIKE CALMODULIN-BINDING PROTEIN (KCBP) desplaza los γ -TURC hacia el extremo negativo de los microtúbulos preexistentes para que los de nueva creación alcancen su tamaño final y contribuyan a mantener el grosor del fragmoplasto (Lee y Liu, 2013). En la unión de los γ -TURC a los microtúbulos interviene otro complejo, denominado Augmina, una de cuyas ocho subunidades, la que se une al microtúbulo, es una MICROTUBULE ASSOCIATED PROTEIN (MAP) (Hotta *et al.*, 2012).

MAP65 es la familia más numerosa de proteínas MAP, cuyos miembros tienen un peso molecular de unos 65 kDa; las isoformas de MAP65 de Arabidopsis son codificadas por nueve genes, y por once en el arroz (Hussey *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2009). Una de estas isoformas es la MAP65-3, que no forma parte de la Augmina; los monómeros de MAP65-3 se unen a los extremos positivos de los microtúbulos de la periferia del fragmoplasto (Lee y Liu, 2013) y al dimerizar los interdigitan antiparalelamente, según se ha confirmado *in vitro* (Figura 4, en la página 16) (Ho *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2017). En las células del mutante *map65-3* de Arabidopsis no se interdigitan los microtúbulos (Ho *et al.*, 2011), por lo que su fragmoplasto es más ancho que el silvestre (Müller *et al.*, 2004), y en sus raíces se

aprecian células plurinucleadas con paredes celulares fragmentadas (Müller *et al.*, 2002).

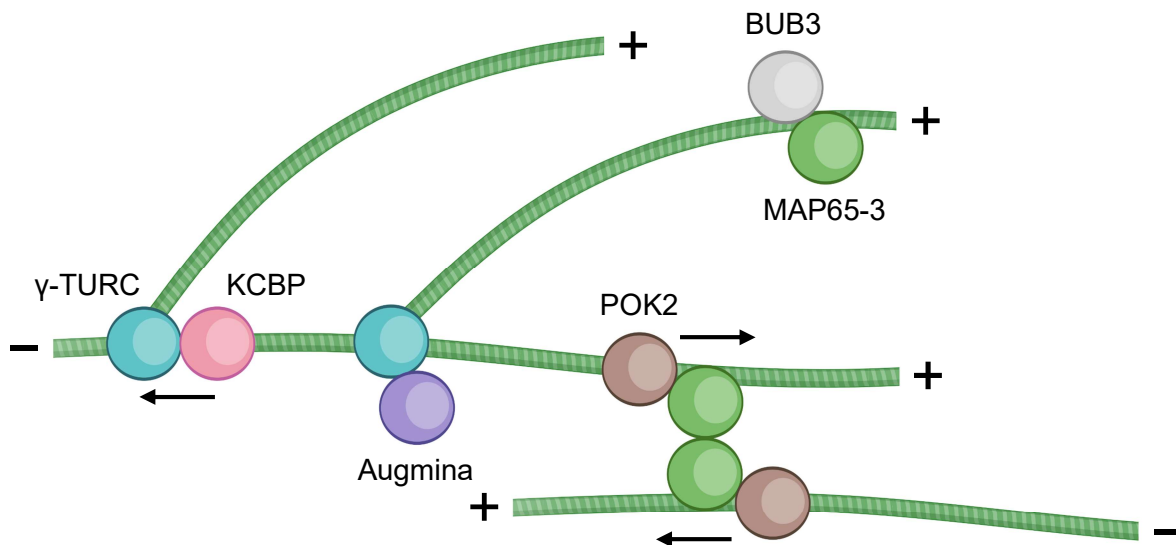


Figura 4.- Nucleación e interdigitación de los microtúbulos en la periferia del fragmoplasto. El complejo Augmina ancla los γ -TURC a los microtúbulos periféricos, para su nucleación ramificada. Para mantener el grosor del fragmoplasto, la KCBP desplaza los γ -TURC hacia el extremo negativo de los microtúbulos. Las proteínas BUB3 unen los monómeros de MAP65-3 a los extremos positivos de los microtúbulos en formación, que se interdigitan con los preexistentes al formarse dímeros de MAP65-3. Cuando los microtúbulos se elongan, POK2 desplaza los dímeros de MAP65-3 hacia sus extremos positivos a fin de reducir la longitud de las interdigitaciones. Imagen obtenida con Biorender e inspirada en Müller (2019).

Las proteínas de tipo WD40 BUDDING UNHIBITED BY BENZIMIDAZOLE3 (BUB3) estabilizan la unión entre los microtúbulos y MAP65-3 (Zhang *et al.*, 2018). Los genes parálogos *BUB3;1* y *BUB3;2* codifican dos proteínas BUB3 casi idénticas, que se localizan en la zona intermedia del fragmoplasto e interaccionan con la región carboxiterminal de MAP65-3 (Zhang *et al.*, 2018). Se asume que las BUB3 incrementan la afinidad de MAP65-3 por los microtúbulos, ya que en el doble mutante *bub3;1 bub3;2* esta última se localiza fuera de la zona intermedia del fragmoplasto, que se expande de forma asimétrica alcanzando el sitio de división cortical asincrónamente (Zhang *et al.*, 2018).

MAP65-4 es otra isoforma de MAP65, que se ha detectado en la banda preprofásica, el sitio de división cortical, el huso mitótico y el fragmoplasto (Li *et al.*, 2017). Aunque el mutante simple *map65-4* es fenotípicamente silvestre, el doble mutante *map65-3 map65-4* es letal (Li *et al.*, 2017). Los genes *MAP65-3* y *MAP65-4* son funcionalmente redundantes, ya que la transferencia de una copia del alelo silvestre de *MAP65-4* suprime casi totalmente el fenotipo del mutante *map65-3*, en el que por otra parte la proteína MAP65-4 se concentra

preferentemente en la zona intermedia del fragmoplasto (Li *et al.*, 2017). Aunque MAP65-1 y MAP65-2 no se localizan en el fragmoplasto en el tipo silvestre (Lee y Liu, 2013), el fenotipo de los dobles mutantes *map65-1 map65-3* y *map65-2 map65-3* es más severo que el del mutante simple *map65-3* (Sasabe *et al.*, 2011).

Tanto los dímeros de MAP65-3 como la interdigitación de los microtúbulos antiparalelos son necesarios para que puedan unirse otras proteínas a los extremos positivos de estos últimos en la zona intermedia del fragmoplasto (Lee y Liu, 2013), como la quinesina-12 POK2 (Ho *et al.*, 2011). Durante la citocinesis de *Arabidopsis*, POK2 se acumula en el sitio de división cortical y en el fragmoplasto, estabilizando la zona intermedia de este último al interactuar con MAP65-3 (Chugh *et al.*, 2018). POK2 regula la longitud de las interdigitaciones al desplazar los dímeros de MAP65-3 hacia los extremos positivos de los microtúbulos, que por tanto crecen antiparalelamente a la vez que se deslizan recíprocamente (Figura 4, en la página 16) (Lee y Liu, 2013).

A la vez que la periferia del fragmoplasto se expande por formación de nuevos microtúbulos, los de su zona central son progresivamente despolimerizados por varias quinasas (Lee y Liu, 2013). La ruta principal de esta despolimerización es la cascada NPK-ACTIVATING KINESIN-LIKE PROTEIN (NACK)-PQR, que incluye las quinasas NICOTIANA PROTEIN KINASE (NPK), NQK y NRK (Sasabe y Machida, 2012). Estas últimas fosforilan los dímeros de MAP65-3, forzando así su separación de los microtúbulos, que son entonces desplazados hacia el extremo negativo de sus vecinos, en donde son despolimerizados por la catanina y otras despolimerasas aún no identificadas (Lee y Liu, 2013). La cascada NACK-PQR es activada en la zona central del fragmoplasto por NACK1, una quinesina-7 específica de las plantas, que transporta vesículas hacia el extremo positivo de los microtúbulos (Strompen *et al.*, 2002; Naito y Goshima, 2015). Los mutantes *nack* del musgo *Physcomitrella patens* presentan defectos en la expansión del fragmoplasto, cromosomas desalineados en la metafase y retraso de la entrada en la anafase (Naito y Goshima, 2015). Los mutantes *nack* de *Arabidopsis* muestran células de gran tamaño, plurinucleadas y con paredes celulares inconclusas, y en la zona central de sus fragmoplastos no se despolimerizan los microtúbulos (Strompen *et al.*, 2002).

Otras quinasas que intervienen en la despolimerización de los microtúbulos son las de la familia Aurora (Müller, 2019), como las de tipo α , asociadas al huso mitótico y la placa celular e implicadas en el control de la citocinesis, y las β , asociadas a los centrómeros e implicadas en la segregación de los cromosomas (Boruc *et al.*, 2017). Se ha demostrado que la Aurora1, de tipo α , fosforila *in vivo* a MAP65-1, regulando su capacidad para agrupar a los microtúbulos (Boruc *et al.*, 2017). Los monómeros de las tubulinas α y β que se liberan

durante la despolimerización de los microtúbulos en la zona central del fragmoplasto son reciclados para su uso en la periferia de este último (Lee y Liu, 2013).

IV.2.3.2.- Expansión del fragmoplasto hacia el sitio de división cortical

El número de filamentos de actina se reduce en el sitio de división cortical al comenzar la metafase, disminuyendo en consecuencia la movilidad de las proteínas en esta región, que será el sitio de inserción de la placa celular en la pared celular materna (Panteris, 2008). Durante la mitosis, las quinesinas POK transportan a las PLECKSTRIN HOMOLOGY GTPASE ACTIVATING PROTEIN (PHGAP), presentes en el citoplasma y la membrana celular, hacia dicha zona empobrecida en actina (Stöckle *et al.*, 2016). La POK1 de *Arabidopsis* interacciona con las PHGAP1 y PHGAP2 (Stöckle *et al.*, 2016), y estas, a su vez, con las RHO OF PLANTS (ROP), GTPasas que regulan la reorganización del citoesqueleto y el tráfico de vesículas citocinéticas (Müller, 2023). En los dobles mutantes *phgap1 phgap2* se alteran el posicionamiento de POK1 en el sitio de división cortical y el de la nueva pared celular (Stöckle *et al.*, 2016).

Las quinesinas POK2, inmovilizadas en el sitio de división cortical como consecuencia de la reducción de la concentración de filamentos de actina, interaccionan con los microtúbulos periféricos del fragmoplasto (Müller, 2019), al que atraen hacia el punto de inserción de la placa celular en la pared celular materna (Figura 5), estrechando además el sitio de división cortical y los anillos de TAN y POK2 (Chugh *et al.*, 2018).

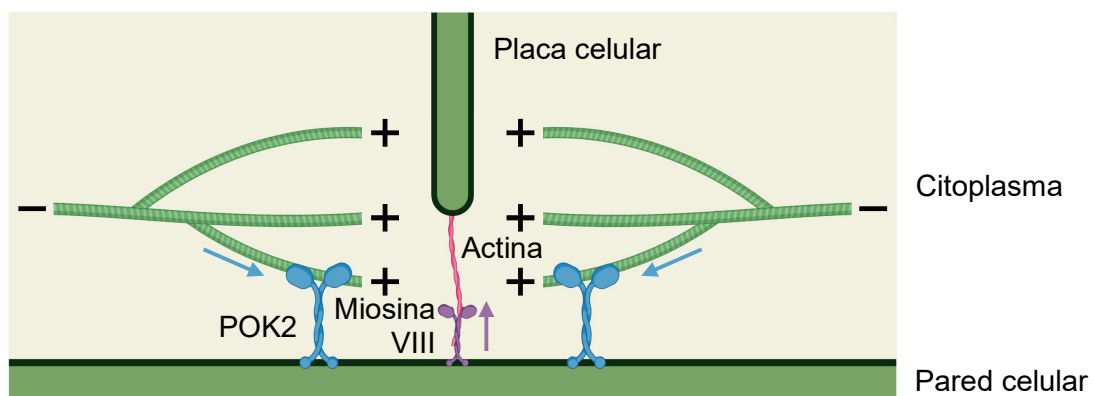


Figura 5.- Expansión del fragmoplasto hacia el sitio de división cortical. En la fase final de su expansión, el fragmoplasto se aproxima al sitio de división cortical, y sus microtúbulos se unen a las quinesinas POK2. En esta fase, la miosina VIII atrae a la placa celular hacia el sitio de división cortical. Las flechas indican la dirección del desplazamiento de la quinesina POK2 (en azul) y la miosina VIII (en violeta) a lo largo de los microtúbulos y los filamentos de actina, respectivamente. Imagen obtenida con Biorender e inspirada en Müller (2019).

Otras proteínas que participan en la expansión del fragmoplasto son las únicas miosinas que se han descrito en las plantas, la VIII y la XI (Müller, 2019). La miosina VIII de *Physcomitrella patens* y *Nicotiana tabacum* está presente en el sitio de división cortical y se asocia a los filamentos de actina de la periferia del fragmoplasto, acercando ambas estructuras (Figura 5, en la página 18) (Wu y Bezanilla, 2014). La miosina XI-K de *Arabidopsis* se localiza en la zona central del fragmoplasto al principio de la telofase, y forma posteriormente un anillo que se expande a la vez que lo hace la periferia del fragmoplasto (Abu-Abied *et al.*, 2018). El triple mutante *xi-k xi-1 xi-2*, portador de alelos mutantes de los genes *MYOSIN XI-K (XI-K)*, *XI-1* y *XI-2*, presenta paredes celulares incorrectamente alineadas, lo que altera el gradiente de auxina hacia el ápice de la raíz por la pérdida de localización polar del transportador del eflujo de la auxina PIN-FORMED 1 (PIN1), por lo que a su vez presenta más raíces laterales y adventicias que el tipo silvestre (Abu-Abied *et al.*, 2018).

IV.2.4.- Fusión de las vesículas citocinéticas en la placa celular

IV.2.4.1.- Expansión de la placa celular

Las vesículas citocinéticas que construyen la placa celular son de 50-80 nm (Austin *et al.*, 2005) y provienen de la red *trans*-Golgi, en la que se sintetizan las proteínas y polisacáridos que formarán la pared celular (Chow *et al.*, 2008; Richter *et al.*, 2014). La fusión de estas vesículas en el plano de división se ha estudiado en las células Bright Yellow-2 (BY-2) del tabaco y las de la raíz de *Arabidopsis*; se concluyó que la expansión de la placa celular se produce en tres fases (van Oostende-Triplet *et al.*, 2017). La primera fase consiste en el transporte hacia el plano de división y la posterior fusión de unas 95.000 vesículas citocinéticas, que inician la formación de la placa celular (Seguí-Simarro y Staehelin, 2006). Aunque la actina no es necesaria para el transporte de dichas vesículas, sí se requiere para retenerlas en el plano de división celular (van Oostende-Triplet *et al.*, 2017). Una vez iniciada la formación de la placa celular, la aportación de nuevas vesículas citocinéticas desde la red *trans*-Golgi se redirige hacia la periferia de la placa, que se expande rápidamente por fusión de vesículas en la segunda fase (van Oostende-Triplet *et al.*, 2017). La expansión de la placa se ralentiza en la tercera fase, hasta que se inserta en el sitio de división cortical de la pared celular materna, para lo que es necesaria la presencia de filamentos de actina (van Oostende-Triplet *et al.*, 2017). Aunque la síntesis de proteínas *de novo* es necesaria para todas las fases de la expansión de la placa celular, el reciclaje de la membrana solo es necesario para la tercera (van Oostende-Triplet *et al.*, 2017).

Cuando las membranas de dos vesículas citocinéticas entran en contacto, las capas externas de sus bicapas lipídicas se fusionan, lo que permite que las internas puedan interactuar y fusionarse también; se crea así un poro que se va ensanchando hasta la formación de una sola vesícula (Figura 6). Para propiciar esta fusión, varios complejos proteicos intervienen en dos fases diferenciadas, denominadas anclaje y acoplamiento (Stanton y Hughson, 2023).

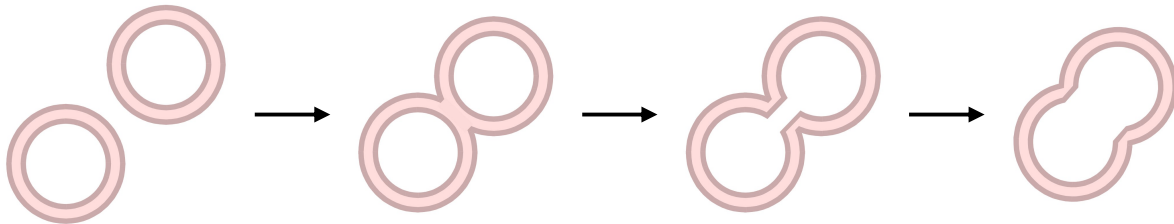


Figura 6.- Esquema de la fusión de dos vesículas citocinéticas. Se representa un corte transversal de las vesículas. La fusión de las membranas lipídicas externas permite la interacción y posterior fusión de las internas, lo que genera un poro que se ensancha hasta que las vesículas forman una sola. Imagen obtenida con Biorender e inspirada en Stanton y Hughson (2023).

IV.2.4.2.- Fase de anclaje

La primera fase de la fusión entre vesículas citocinéticas es la de anclaje (tethering), en la que se establece el contacto inicial entre sus membranas (Ravikumar *et al.*, 2017). Participan en esta fase dos tipos de complejos de anclaje, denominados homodímeros de hélice superenrollada y multisubunidad. Los homodímeros de hélice superenrollada pueden medir varios cientos de nanómetros (Stanton y Hughson, 2023). La unión de la GTPasa Rab5 al sitio alostérico del homodímero de hélice superenrollada humano EARLY ENDOSOME ANTIGEN1 (EEA1), estando cada uno de ellos ubicado en la superficie de dos vesículas cercanas, causa el plegamiento de este último sobre sí mismo, generando una fuerza de tracción que acerca ambas vesículas (Murray *et al.*, 2016).

Son complejos multisubunidad los denominados TRAPPI, TRAPPII y exocisto (Lupashin y Sztul, 2005). Solo algunas mutaciones en los genes que codifican los componentes del TRAPPI, pero todas las del TRAPPII, alteran la citocinesis (Thellmann *et al.*, 2010). El complejo TRAPPII conduce las vesículas citocinéticas que transportan proteínas de la membrana plasmática hacia la placa celular, así como las subunidades del exocisto, a las que se une (Rybak *et al.*, 2014). El complejo TRAPPII se requiere para la iniciación de la placa celular, y el exocisto, para su maduración; esto explica su aparición secuencial, con un breve solapamiento temporal (Rybak *et al.*, 2014).

El complejo TRAPP II incluye 10 subunidades, aunque solo las TRAPP SUBUNIT120 (TRS120), TRS130, TRS33 y TRAPP-INTERACTING PLANT PROTEIN (TRIPP) son esenciales para la formación de la placa celular (Shi *et al.*, 2023). TRAPP II es necesario para el transporte selectivo de vesículas en el aparato de Golgi (Thellmann *et al.*, 2010) y para el del transportador de auxina PIN2 a la membrana plasmática (Qi *et al.*, 2011). Aunque los complejos de anclaje están regulados por las GTPasas Rab, el complejo TRAPP II actúa como un Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF), activando la GTPasa Rab-A2a (Kalde *et al.*, 2019). El alelo *trs120* de *TRS120* (Thellmann *et al.*, 2010) y los *club* y *trs130* de *TRS130* (Jaber *et al.*, 2010; Qi *et al.*, 2011) causan un fenotipo similar: las plántulas mutantes son letales y muestran células plurinucleadas con paredes celulares inconclusas, acumulan vesículas citocinéticas sin fusionar en el plano de división y el transporte desde la red *trans*-Golgi hacia la placa celular y la pared celular está alterado. El mutante *trs33-1* es estéril y muestra crecimiento lento y raíces cortas (García *et al.*, 2020). Por su parte, las plantas *tripp* son enanas y estériles, sus células presentan paredes inconclusas, PIN2 aparece a lo largo de toda la membrana plasmática en las células de su raíz y TRAPP II forma una nube difusa alrededor de la placa celular (García *et al.*, 2020). Aunque su subunidad TRS33 no se ha detectado en la placa celular, se ha demostrado que es necesaria para la correcta localización de TRS120 y TRIPP (García *et al.*, 2020).

El exocisto está formado por dos subunidades: una compuesta por las proteínas SEC3, SEC5, SEC6 y SEC8, y otra, por SEC10, SEC15, EXO70 y EXO84 (Synek *et al.*, 2021). La unión entre estas dos subunidades depende de la interacción entre SEC3 y EXO70, que a su vez interacciona con fosfolípidos de las membranas que van a fusionarse (Synek *et al.*, 2021). El exocisto regula el tamaño del meristemo radicular y el ritmo de expansión celular en la zona de elongación de la raíz de *Arabidopsis* (Cole *et al.*, 2014). Salvo SEC5, todas las proteínas del exocisto se han detectado en la placa celular durante la citocinesis (Shi *et al.*, 2023), y las mutaciones en los genes que las codifican alteran severamente el fenotipo de las plantas mutantes. Son ejemplos de ello la letalidad embrionaria de *sec3a* (Zhang *et al.*, 2013) y la gametofítica masculina de *sec6* (Wu *et al.*, 2013). El mutante *pollen-rescued sec6* manifiesta defectos en las paredes celulares del embrión, y en las células de la epidermis y las de guarda de los estomas de las hojas (Wu *et al.*, 2013). Los granos de polen de *sec8* no germinan (Cole *et al.*, 2005), y los tubos polínicos de *sec15a* no se desarrollan correctamente (Batystová *et al.*, 2022).

La proteína SEC15 del exocisto presenta dos isoformas: SEC15A, que se expresa más en el gametofito masculino, y SEC15B, que lo hace en el resto de la planta, lo que explica que las plantas *sec15b* sean enanas, con pérdida de la dominancia apical y retraso

en la elongación del hipocótilo y los pelos radiculares (Batystová *et al.*, 2022). A pesar de su bajo nivel de expresión, SEC15B se requiere en el polen, ya que los tubos polínicos de *sec15b* presentan elongación reducida *in vitro* (Batystová *et al.*, 2022). Los mutantes *exo70a1-1* y *exo70a1-2* son enanos, con fertilidad muy reducida, pérdida de la dominancia apical, inflorescencias laterales en lugar de meristemos florales y menor elongación de los pelos radiculares (Synek *et al.*, 2006). Por último, el mutante *exo84b* es enano y manifiesta daños en las paredes de las células de la epidermis foliar y de las de guarda de los estomas (Fendrych *et al.*, 2010). No se han estudiado los efectos de las mutaciones en SEC10A y SEC10B, parálogos dispuestos en tándem que codifican proteínas con un 99% de identidad. Aunque muestran distintos niveles de transcripción, sus alelos mutantes carecen de manifestación fenotípica a causa de su redundancia funcional (Vukašinović *et al.*, 2014).

IV.2.4.3.- Fase de acoplamiento

Los Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptors (SNARE) están muy conservados a lo largo de la evolución, desde las levaduras hasta la especie humana. Comparten el dominio SNARE, de unos 60 aminoácidos, que actúa como módulo de interacción proteína-proteína para el ensamblaje de complejos SNARE (Fasshauer *et al.*, 1998). El genoma de Arabidopsis codifica 64 proteínas SNARE, que participan en la fusión entre membranas no solo en la citocinesis, sino también en la organización del citoesqueleto (Luo *et al.*, 2022). Estas proteínas son de dos tipos: Q-SNARE y R-SNARE, en función de que el núcleo de su dominio SNARE contenga glutamina (Q) o arginina (R), respectivamente (Fasshauer *et al.*, 1998). Para que se forme un complejo SNARE se tienen que asociar los dominios SNARE de tres proteínas Q-SNARE (denominadas Qa-SNARE o syntaxina, Qb-SNARE y Qc-SNARE) y una R-SNARE, formando una estructura muy conservada con numerosas interacciones entre las cadenas laterales de sus aminoácidos (Fasshauer *et al.*, 1998). Las proteínas SNARE se sintetizan en el retículo endoplásmico, en donde forman complejos *cis*-SNARE inactivos (Karnahl *et al.*, 2017).

En la fase de acoplamiento (docking) de la fusión de las vesículas citocinéticas, los complejos SNARE presentes en su superficie, a los que se denomina *cis*-SNARE, son disociados por la ATPasa N-ETHYLMALIMIDE SENSITIVE FACTOR (NSF) (Koike y Jahn, 2022). Las subunidades de las proteínas SNARE así disociadas interaccionan formando complejos *trans*-SNARE entre vesículas adyacentes (Shi *et al.*, 2023). Una de las subunidades de los complejos SNARE es una syntaxina que alterna en estado libre dos conformaciones: inactiva cerrada y activa abierta (Margittai *et al.*, 2003). Las proteínas

Sec1/Munc18-like (SM) mantienen a las sintaxinas en su conformación abierta para propiciar la formación de complejos *trans*-SNARE (Figura 7; Margittai *et al.*, 2003).

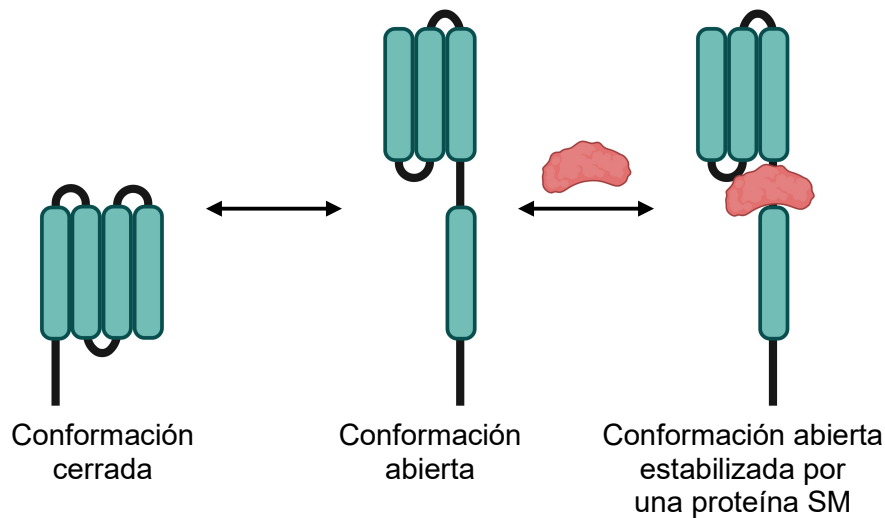


Figura 7.- Estados conformacionales de las sintaxinas durante la citocinesis de las plantas. En estado libre, una sintaxina (en azul) tiende a adoptar una conformación cerrada, en la que sus dominios SNARE interactúan, lo que a su vez impide su unión a otras subunidades de un complejo SNARE. Una proteína SM (en rojo) impide el plegamiento de la sintaxina, que conserva así su conformación abierta y en consecuencia su capacidad de interactuar con otras subunidades SNARE. Imagen obtenida con Biorender e inspirada en Margittai *et al.* (2003).

Cinco de las sintaxinas (Qa-SNARE) de *Arabidopsis* intervienen en la fusión de vesículas citocinéticas en la placa celular: KNOLLE (KN), SYNTAXIN OF PLANTS 132 (SYP132), SYP121, SYP122 y SYP31 (Shi *et al.*, 2023). La sintaxina KN es específica de la citocinesis y solo se detecta en el plano de división celular (Lauber *et al.*, 1997; Reichardt *et al.*, 2011). En el mutante *kn* el aporte de las vesículas citocinéticas al plano de división no está alterado, pero no se fusionan (Lauber *et al.*, 1997). Como consecuencia, en los embriones *kn* se observan grandes células plurinucleadas con paredes celulares inconclusas y mal alineadas, que rinden plántulas letales con alteraciones en la organización radial de sus tejidos (Lukowitz *et al.*, 1996). SYP132 también puede formar complejos SNARE en la placa celular con los mismos Q-SNARE y R-SNARE que KN, a la que puede sustituir para la fusión de las vesículas citocinéticas (Park *et al.*, 2018). Esto explica que algunas vesículas se fusionen en el plano de división durante la citocinesis en el mutante *kn*, que el mutante *syp132* muestre defectos en la citocinesis y que el doble mutante *kn syp132* sea letal, constando el embrión de solo una o varias células plurinucleadas (Park *et al.*, 2018). Las sintaxinas SYP121 y SYP122 tienen funciones redundantes en el transporte de

vesículas hacia la membrana plasmática (Karnik *et al.*, 2015). A pesar de que ambas se han detectado en la placa celular durante la citocinesis, SYP121 se acumula en el plano de división más que SYP122 (Liu *et al.*, 2022). SYP31 también se ha detectado en la placa celular, pero se desconoce su función en la citocinesis (Shi *et al.*, 2023).

La syntaxina KN forma parte de dos complejos distintos en la placa celular (Figura 8), que intervienen en la fusión de las vesículas citocinéticas. El primero es un tetrámero entre KN, NOVEL PLANT SNARE11 (NPSN11), SYP71 y VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN721 (VAMP721) o VAMP722 (El Kasmi *et al.*, 2013). NPSN11 es una Qb-SNARE específica de las plantas, que se localiza preferentemente en la placa celular, y SYP71, una Qc-SNARE que ha sido detectada en la membrana plasmática, los endosomas, el retículo endoplásmico y la placa celular (Shi *et al.*, 2023). VAMP721 y VAMP722 son proteínas R-SNARE redundantes, que se localizan en la placa celular (Zhang *et al.*, 2011) y en la membrana plasmática, en donde participan en el reciclaje de distintos transportadores de auxina (Zhang *et al.*, 2021).

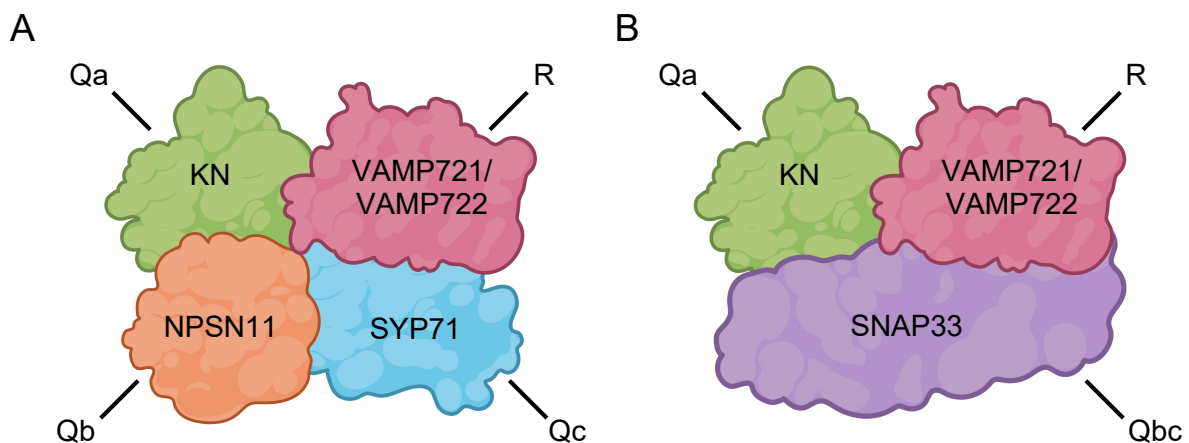


Figura 8.- Complejos SNARE de los que forma parte KNOLLE. Esta syntaxina forma parte (A) de un complejo tetramérico junto con NPSN11, YSP71 y VAMP721 o VAMP722, y (B) de otro trimérico junto con SNAP33 y VAMP721 o VAMP722. Imagen obtenida con Biorender e inspirada en El Kasmi *et al.* (2013).

El segundo complejo SNARE del que forma parte KN (Figura 8) es trimérico e incorpora las subunidades KN, SOLUBLE N-ETHYLMALEIMIDE-SENSITIVE FACTOR ADAPTOR PROTEIN33 (SNAP33) y VAMP721 o VAMP722 (El Kasmi *et al.*, 2013). SNAP33 es una Qbc-SNARE que se expresa de forma ubicua y se localiza en la membrana plasmática y en la placa celular (Heese *et al.*, 2001). Las proteínas Qbc incluyen dos dominios SNARE, por lo que pueden sustituir a las subunidades Qb y Qc en los complejos SNARE (Won y Kim, 2020).

La existencia de los dos complejos redundantes SNARE que incluyen a KN explica que las mutaciones que afectan a uno de ellos no tengan efecto o perturben solo levemente la citocinesis, como en los dobles mutantes *npsn11 syp71* (El Kasmi *et al.*, 2013). Sin embargo, los dobles mutantes en los que están dañados ambos complejos, como *snap33 npsn11* y *snap33 syp71*, manifiestan severos defectos en la citocinesis, similares a los del mutante simple *kn* (El Kasmi *et al.*, 2013). Las plántulas del doble mutante *vamp721 vamp722* son enanas y letales y presentan paredes celulares inconclusas, interrupción del tráfico de proteínas a la membrana plasmática y una disminución en la concentración de auxina en los ápices de la raíz (Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2021).

Las proteínas SM actúan como chaperonas de los complejos SNARE, propiciando su ensamblaje rápido y preciso (Zhang y Hughson, 2021). En las neuronas de los mamíferos, la proteína SM Munc18 se une a una Qa-SNARE y una R-SNARE, formando un complejo denominado molde, en el que los extremos amino de los dos dominios SNARE interaccionan (Jiao *et al.*, 2018), al que después se une la proteína Qbc-SNARE, formándose el complejo SNARE final (Jiao *et al.*, 2018). La proteína SM Vps33 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* también forma un complejo molde durante el ensamblaje de sus complejos SNARE (Baker *et al.*, 2015).

KEULE (KEU) es la más importante de las proteínas SM que intervienen en la fusión de vesículas citocinéticas en la placa celular de *Arabidopsis* (Assaad *et al.*, 2001). Se expresa en toda la planta, especialmente en los tejidos en división, y se puede encontrar en forma soluble o asociada a la placa celular, en la que interacciona con la sintaxina KN (Assaad *et al.*, 2001). Además, un segmento de la región carboxiterminal de KEU se une a la subunidad SEC6 del exocisto, interacción que podría ser el nexo de unión molecular entre los complejos de anclaje (apartado IV.2.4.2, en la página 20) y los SNARE (Wu *et al.*, 2013). El mutante *keu* presenta el fenotipo característico de una citocinesis dañada, con grandes células plurinucleadas y paredes celulares inconclusas y mal orientadas (Assaad *et al.*, 1996). Sus vesículas citocinéticas se acumulan, sin fusionarse, en el plano de división (Waizenegger *et al.*, 2000). En las plántulas *keu* se observa que, al no completarse la división celular, existen grandes células indiferenciadas que invaden tejidos vecinos, lo que causa abultamientos en la superficie de las plántulas, que terminan muriendo (Assaad *et al.*, 1996).

En la placa celular, KEU interacciona con la forma abierta de KN, estabilizándola y propiciando la formación de complejos *trans*-SNARE entre vesículas adyacentes (Figura 9, en la página 26) (Park *et al.*, 2012). Sin embargo, KEU también interacciona con la sintaxina SYP121 durante el tráfico de vesículas, pero lo hace con su forma cerrada o cuando se

encuentra integrada en un complejo (Karnik *et al.*, 2013). En este caso, parece necesaria la acción de una molécula externa que disocie a KEU de SYP121, permitiendo la formación del complejo SNARE al que luego se reincorpora KEU, estabilizándolo (Karnik *et al.*, 2013).

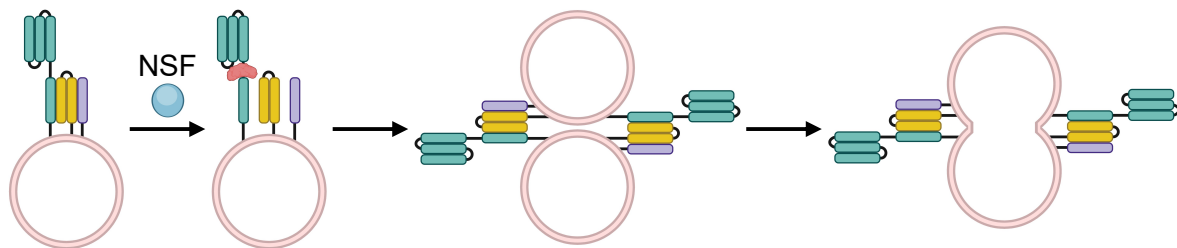


Figura 9.- Formación de complejos *trans*-SNARE entre vesículas citocinéticas adyacentes para su posterior fusión. Los complejos *cis*-SNARE presentes en la superficie de las vesículas citocinéticas (en rosa) son disociados por la ATPasa NSF, quedando libres las subunidades sintaxina (en azul), Qbc (en amarillo) y R (en violeta). La proteína SM (en rojo) mantiene a la sintaxina en su conformación abierta, propiciando su interacción con las subunidades de los complejos SNARE presentes en las vesículas adyacentes y la formación de complejos *trans*-SNARE, que causa el acercamiento de las vesículas, propiciando su fusión. Imagen obtenida con Biorender e inspirada en Jürgens *et al.* (2015).

IV.2.5.- Construcción de la pared celular

IV.2.5.1.- Fases de la maduración de la placa celular

La maduración de la placa celular para construir la pared celular en las plantas superiores se estudió inicialmente en células BY-2 y del ápice de la raíz del tabaco (Samuels *et al.*, 1995), y posteriormente en los meristemos apicales del tallo y la raíz de *Arabidopsis* (Seguí-Simarro *et al.*, 2004). Estos autores distinguieron cuatro fases en el proceso, que se simultanean en distintas regiones de la placa celular, que madura radialmente, proceso que se representa esquemáticamente en la Figura 10, y de modo más realista en la Figura 11, en la página 27 (Samuels *et al.*, 1995).

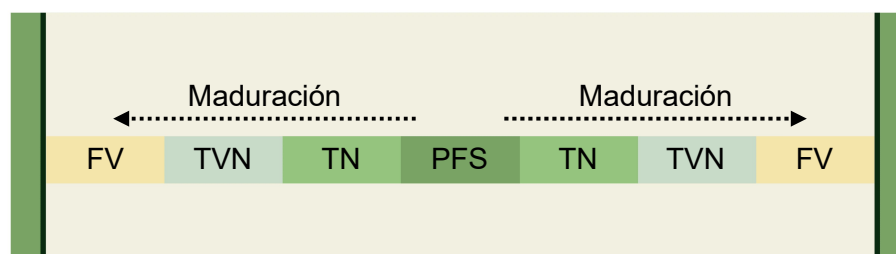


Figura 10.- Fases de la maduración de la placa celular. Las fases se simultanean desde el centro hacia la periferia y son, de más temprana a más tardía, las de fusión de vesículas (FV), red tubular (TN), red túbulo-vesicular (TVN) y lámina fenestrada plana (PFS). Imagen obtenida con Biorender e inspirada en Chen *et al.* (2018).

La primera fase de la maduración de la placa celular (FV, por Fusion of Vesicles) es la de fusión de vesículas citocinéticas de la red *trans*-Golgi. La segunda es la de actuación de las dinaminas, proteínas que se unen a las vesículas fusionadas y las constriñen, generando una red túbulo-vesicular (TVN, por Tubular-Vesicular Network). La tercera es la del engrosamiento de los túbulos, rindiendo una red en la que ya no se distinguen las vesículas (TN, por Tubular Network). La cuarta es la del engrosamiento final de los túbulos, que reduce los huecos que los separan, formándose una lámina fenestrada (con orificios) plana (PFS, por Planar Fenestrated Sheet) (Samuels *et al.*, 1995; Sinclair *et al.*, 2022).

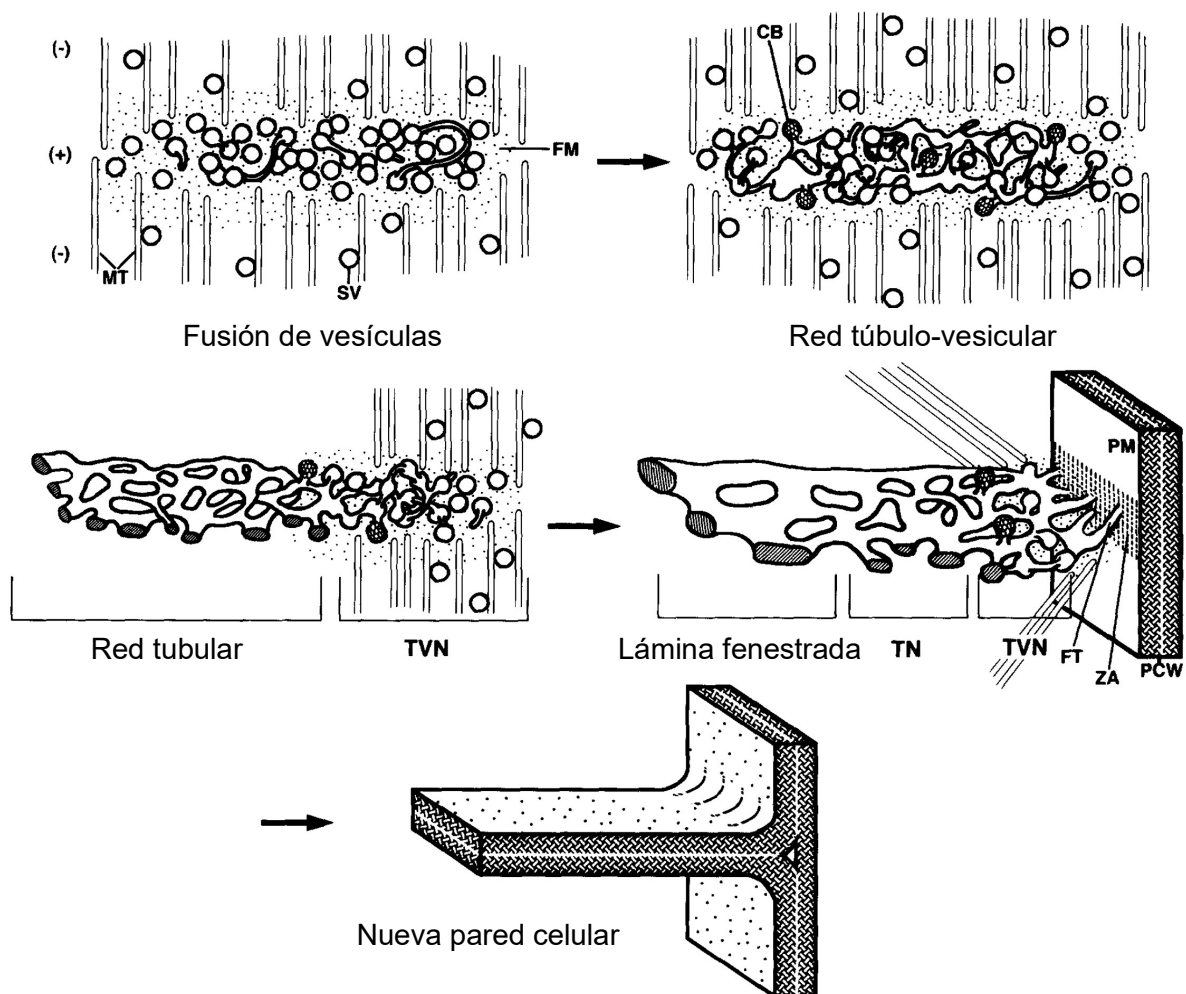


Figura 11.- Modelo del desarrollo de la placa celular en las células de las plantas superiores. MT: microtúbulos. SV: vesículas. FM: fragmoplasto. CB: vesículas recubiertas de clatrina. TN y TVN: regiones del fragmoplasto que se encuentran en las fases de red tubular y túbulo-vesicular, respectivamente. PM: membrana plasmática. PCW: pared celular materna. FT: tubos de fusión entre la placa celular y la pared celular materna. ZA: zona de adhesión al sitio de división cortical. Las abreviaturas FT y ZA se refieren a conceptos que no se han definido en esta memoria, por considerarlos innecesarios. Modificado a partir de Samuels *et al.* (1995).

Durante la maduración de la placa celular se van depositando en su lumen los polisacáridos que conformarán la estructura de la pared celular, a la vez que se recicla el material excedentario en vesículas recubiertas de clatrina (Sinclair *et al.*, 2022). Se han establecido en *Arabidopsis*, usando marcadores subcelulares, las rutas de transporte de más de 400 proteínas implicadas en este proceso (Heard *et al.*, 2015). Los compartimentos de la red *trans*-Golgi marcados con SYP61 son los que transportan hasta la placa celular enzimas que sintetizan polisacáridos, como sintasas de calosa y celulosa, así como otros polisacáridos estructurales, sintetizados previamente en la red *trans*-Golgi, como las hemicelulosas, pectinas y glicoproteínas (Drakakaki *et al.*, 2012; Wilkop *et al.*, 2019). Estos compartimentos de la red *trans*-Golgi también transportan las proteínas que formarán parte de la pared celular madura, de las que se conocen 302 en *Arabidopsis* (Duruflé *et al.*, 2017). Además, algunas membranas del retículo endoplásmico se asocian a la placa celular desde la fase TVN, permaneciendo unidas a los orificios de la placa celular al final de la fase PFS y dando lugar a los plasmodesmos (Sinclair *et al.*, 2022).

IV.2.5.2.- Síntesis de polisacáridos en la membrana de la placa celular

La calosa es un β -1,3-glucano (Figura 12) sintetizado por varias enzimas GLUCAN SYNTHASE-LIKE (GSL) en la placa celular a partir de la fase TVN, que se elimina durante la fase PFS, estabiliza la expansión de la pared celular y sirve de andamiaje transitorio para el depósito de los polisacáridos y las proteínas de la pared celular madura (Sinclair *et al.*, 2022).

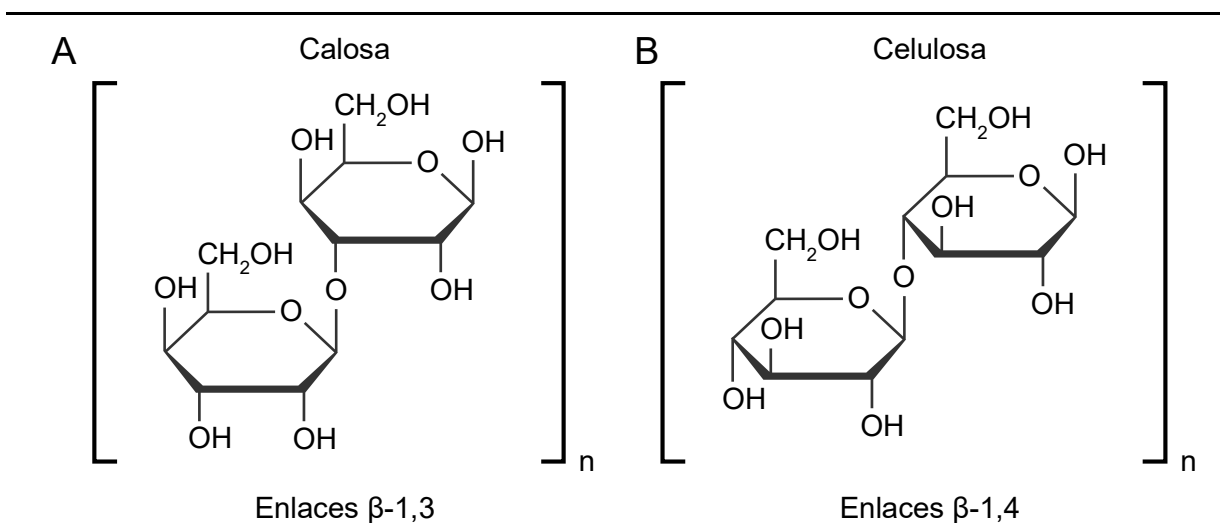


Figura 12.- Estructura de los polisacáridos calosa y celulosa. Ambos compuestos son cadenas lineales de glucosas, unidas mediante (A) enlaces β -1,3 en la calosa, y (B) β -1,4 en la celulosa. Inspirado en Sinclair *et al.* (2022).

Las GSL de *Arabidopsis* son codificadas por 12 genes (Saatian *et al.*, 2018), cuyos alelos mutantes rinden en su mayoría plantas fenotípicamente silvestres (Chen *et al.*, 2009). Solo dos de estos genes se han relacionado con la citocinesis: *GSL6* y *GSL8*. *GSL6* es una proteína transmembrana específica de la placa celular (Hong *et al.*, 2001). Mientras que el mutante *gs/6* es fenotípicamente silvestre, los mutantes *gs/8* presentan una reducción del depósito de calosa en la placa celular, así como los rasgos fenotípicos típicos de las citocinesis defectuosas, con paredes celulares incompletas y células plurinucleadas (Chen *et al.*, 2009). Algunos alelos mutantes de *GSL* son *gs/8*, que es letal gametofítico (Chen *et al.*, 2009), *massue (mas)*, que es letal en plántula (Thiele *et al.*, 2009), y *ectopic expresión of seed storage protein8 (essp8)*, que es viable aunque causa una reducción de la calosa depositada en los plasmodesmos (Saatian *et al.*, 2018). *GSL8* interacciona con la β -1,3-glucanasa PLASMODESMATA-LOCATED PROTEIN5 (PDLP5) y con *GSL10* en los plasmodesmos, lo que sugiere que podrían formar un complejo regulador del transporte simplástico (Saatian *et al.*, 2018). El alelo viable *chorus (chor)* de *GSL8* también manifiesta un aumento de la difusión macromolecular simplástica entre las células de la epidermis, que altera el desarrollo y la distribución de los estomas (Guseman *et al.*, 2010). Se conocen en *Arabidopsis* 50 β -1,3-glucanasas con funciones relacionadas con el desarrollo y la defensa frente a patógenos (Doxey *et al.*, 2007), pero ninguna parece específica de la placa celular (Sinclair *et al.*, 2022).

En cuanto a la celulosa, forma microfibrillas en las que cadenas lineales de β -1,4-glucanos (Figura 12, en la página 28) están unidas mediante puentes de hidrógeno (Chen *et al.*, 2018). Es sintetizada por los Complejos de Síntesis de Celulosa (CSC), que incluyen varias enzimas CELLULOSE SYNTHASE A (CESA), que son generadas en el retículo endoplásmico y ensambladas en los CSC en este orgánulo o en el aparato de Golgi (Chen *et al.*, 2018). Los CSC son transportados a lo largo de los microtúbulos corticales por vesículas del aparato de Golgi que contienen SYP61 en su superficie, que hacen pausas en su desplazamiento en las que incorporan a los CSC a la membrana plasmática o los retiran de esta, regulando así la síntesis de celulosa en la pared celular (Figura 13, en la página 30) (Crowell *et al.*, 2009).

La proteína CELLULOSE SYNTHASE INTERACTING1 (CSI1) conduce a dichas vesículas a lo largo de los microtúbulos (Liu *et al.*, 2016). Los filamentos de actina también intervienen en el transporte de los CSC, y además regulan la producción de celulosa al modular la duración de la vida media estos complejos en la membrana plasmática (Sampathkumar *et al.*, 2013). Del análisis cristalográfico de una CESA unida a una molécula de celulosa se concluyó que la síntesis de este polisacárido proporciona la fuerza motriz que

hace avanzar a los CSC a lo largo de los microtúbulos a una velocidad constante (Paredes *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2013). Para que el avance de los CSC no altere la disposición de los microtúbulos de la matriz cortical, estos últimos se unen entre sí en puntos fijos mediante las proteínas CELLULOSE-MICROTUBULE UNCOUPLING PROTEIN1 (CMU1) y CMU2 (Liu *et al.*, 2016), aunque solo la CMU1 se concentra en la placa celular durante la citocinesis (Chen *et al.*, 2018). Las mutaciones en los genes que codifican estas proteínas causan el desplazamiento lateral de los microtúbulos y la pérdida de su capacidad para guiar a los CSC (Liu *et al.*, 2016). Por tanto, los microtúbulos corticales son los que transportan los CSC hasta la membrana plasmática y determinan su trayectoria durante la síntesis de celulosa (Gutierrez *et al.*, 2009).

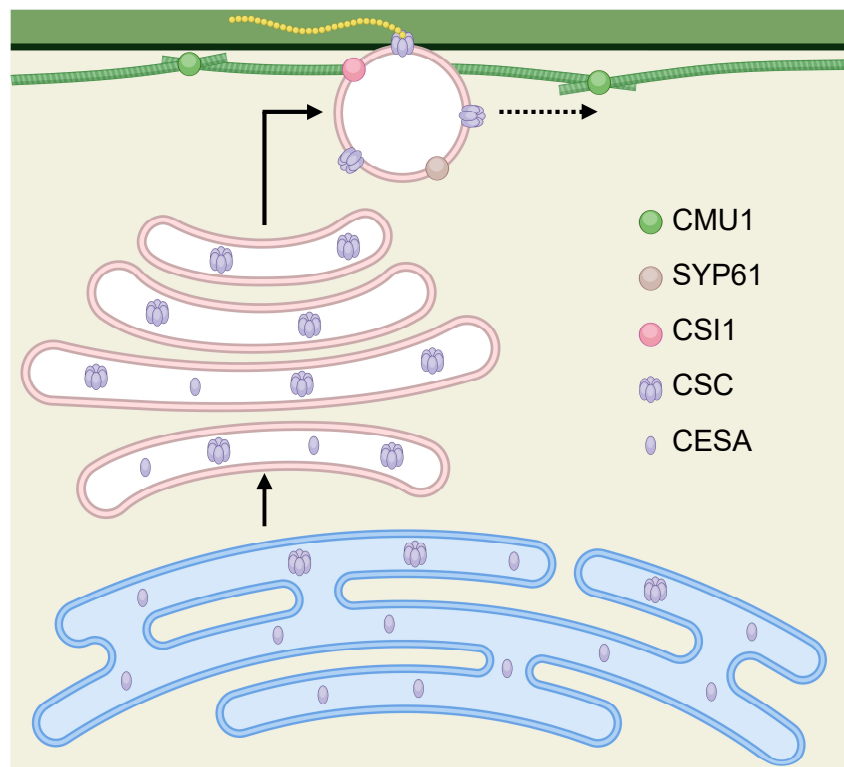


Figura 13.- Formación, transporte y actividad de los Complejos de Síntesis de Celulosa. Las CESA se sintetizan en el retículo endoplasmático (en azul) y son ensambladas formando complejos CSC en este orgánulo o en el aparato de Golgi (en rosa). A continuación, los CSC son transportados por vesículas que presentan la proteína SYP61 en su superficie. Estas vesículas, que se desplazan a lo largo de los microtúbulos corticales a los que se unen mediante CSII, introducen los CSC dentro de la pared celular, en donde se produce la síntesis de celulosa (cadena amarilla), lo que impulsa el movimiento de las vesículas (flecha discontinua). Imagen obtenida con Biorender e inspirada en Chen *et al.* (2018).

Aunque la celulosa comienza a depositarse en la placa celular en la fase TVN, la mayoría de los CSC son transportados por las vesículas citocinéticas en la fase TN (Miart *et*

al., 2014). Las vesículas recubiertas de clatrina reciclan los CSC, retirándolos de la zona central de la placa celular durante su maduración para su transporte a la periferia (Miart *et al.*, 2014). Las mutaciones que alteran la síntesis o la hidrólisis de la celulosa suelen perturbar la expansión de las células y de los órganos de los que forman parte. El alelo *rsw1* de *CESA1* reduce a la mitad la capacidad de síntesis de celulosa de las plantas mutantes cuando se cultivan a una temperatura superior a la habitual, produciendo raíces, hipocótilos y tricomas gruesos, así como cotiledones y hojas pequeños y con superficie irregular (Williamson *et al.*, 2001). Los mutantes *cesa6* también son deficientes en celulosa, por lo que sus paredes celulares presentan huecos y la elongación celular en sus raíces e hipocótilos está reducida (Fagard *et al.*, 2000). El alelo *kor1-1* de *KORRIGAN1* (*KOR1*), que codifica una endo- β -1,4-D-glucanasa de la placa celular, reduce la elongación celular, mientras que las plántulas de *kor1-2* forman un callo, con placas celulares aberrantes, paredes celulares inconclusas y células plurinucleadas (Zuo *et al.*, 2000).

En la síntesis de celulosa también participan las CELLULOSE SYNTHASE LIKE D (CSLD), que son muy parecidas en secuencia a las CESA (CSLD3 forma complejos estructuralmente similares a los CESA6) y sintetizan un polímero similar a la celulosa (Yang *et al.*, 2020). Las CSLD de *Arabidopsis* participan en la síntesis de polisacáridos *de novo*, que es necesaria para el crecimiento de los pelos radiculares (Park *et al.*, 2011) y el tallo: los mutantes *csld2* y *csld3* no tienen pelos radiculares, *csld5* presenta una reducción en el crecimiento del tallo, y sus combinaciones dobles y triples mutantes rinden plantas enanas y en su mayoría letales (Yin *et al.*, 2011). A diferencia de CSLD5, que es capaz de transferir por sí misma la manosa de la GDP-manosa a aceptores endógenos cuando se expresa en microsomas de *Nicotiana benthamiana*, CSLD2 y CSLD3 deben coexpresarse para realizar dicha función (Yin *et al.*, 2011). CSLD5 es la CSLD que más se expresa durante la división celular y aparece en la placa celular antes que las CESA, lo que sugiere que construye un esqueleto polisacárido que estas últimas usan para sintetizar celulosa (Gu *et al.*, 2016).

IV.2.5.3.- Síntesis de polisacáridos en el aparato de Golgi

Las hemicelulosas, las pectinas y las glicoproteínas son polisacáridos de matriz que se sintetizan en el aparato de Golgi y son transportados por vesículas citocinéticas hasta la placa celular (Sinclair *et al.*, 2022). Cada uno de los tres tipos de cisternas del aparato de Golgi contiene en su membrana distintos tipos de glicosiltransferasas, que catalizan reacciones de adición de azúcares activados a sustratos aceptores (Zabotina *et al.*, 2021). La interacción física entre la celulosa y estos polisacáridos de matriz convierte a la pared celular en una estructura sólida y expansible a la vez (Cosgrove, 2022).

Las hemicelulosas están formadas por un esqueleto β -1,4-glucano con sustituciones de xilosa sintetizado en las cisternas *trans*, que luego pueden ser reemplazadas por otros monosacáridos en la red *trans*-Golgi (Zhang y Staehelin, 1992; Pauly y Keegstra, 2016). En el ápice de la raíz y en las hojas de *Trifolium pratense*, las hemicelulosas están presentes en la placa celular desde la fase TVN y alcanzan su máxima concentración en la pared celular madura (Moore y Staehelin, 1988).

Las pectinas tienen un esqueleto de ácido α -1,4 galacturónico sintetizado en las cisternas *cis* y medias del aparato de Golgi, cuyos grupos carboxilo se metilesterifican en las medias y se añaden las cadenas laterales de arabinosa en las *trans* (Zhang y Staehelin, 1992). Según las modificaciones de su esqueleto y cadenas laterales, se distinguen cuatro tipos de pectinas: homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I (RG-I), RG-II y galacturonanos sustituidos (Caffall y Mohnen, 2009). Estas pectinas forman matrices con muchas conexiones débiles con las celulosas y hemicelulosas y las RG-II pueden unirse entre sí para formar geles (Zhou *et al.*, 2017). La síntesis de estos polisacáridos complejos requiere una gran cantidad de transferasas y del complejo GALACTURONOSYLTRANSFERASE1 (GAUT1):GAUT7, que retiene estas enzimas en el aparato de Golgi (Atmodjo *et al.*, 2013).

Las glicoproteínas son componentes estructurales de la pared celular sin actividad catalítica (Sinclair *et al.*, 2022). El gen *ROOT-SHOOT-HYPOCOTYL-DEFECTIVE (RSH)* codifica la EXTENSIN3 (EXT3), una glicoproteína rica en hidroxiprolina que tiende a autoensamblarse formando andamios dendríticos con carga positiva a los que se unen las pectinas, que son electronegativas. En el mutante *rsh* se observan regiones de la placa celular que no se insertan en la pared celular materna, evidenciando la implicación de RSH en la unión entre estas estructuras (Cannon *et al.*, 2008). De hecho, los embriones del mutante *rsh* presentan forma y tamaño irregulares, y rinden plántulas agravitrópicas que mueren antes de la aparición de las hojas de la roseta (Hall y Cannon, 2002). Otra familia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina es la de las proteínas con arabinogalactano, en las que el péptido estructural incorpora residuos de prolina mediante hidroxilación (Silva *et al.*, 2020). A continuación se le añade en el retículo endoplásmico un anclaje lipídico de glicosilfosfatidilinositol, lo que le permite unirse a la cara externa de la membrana plasmática, y después se glicosila en el aparato de Golgi, principalmente con arabinogalactano (Silva *et al.*, 2020). Las glicosiltransferasas que participan en la biosíntesis de EXT3 y las proteínas con arabinogalactano han sido caracterizadas en *Arabidopsis* (Showalter y Basu, 2016).

IV.3.- Antecedentes y objetivos

IV.3.1.- Los mutantes *serrata*

Con el propósito de llevar a cabo una disección genética del desarrollo foliar, en el laboratorio de J.L. Micol se realizaron en la década de los noventa varias búsquedas de mutantes viables y fértiles de *Arabidopsis* que presentasen alteraciones en la arquitectura de la hoja. Los mutantes identificados se agruparon en 19 clases fenotípicas según la forma, el tamaño y la pigmentación de sus hojas (Berná *et al.*, 1999; Serrano-Cartagena *et al.*, 1999). A la clase fenotípica denominada *Serrata* se asignaron mutantes con rosetas e inflorescencias más pequeñas que las silvestres, floración temprana y hojas onduladas con margen serrado. En esta clase se incluyeron cinco mutantes aislados tras una mutagénesis con metanosulfonato de etilo (EMS) del acceso Landsberg *erecta* (Ler), cuyo análisis de complementación indicó que correspondían a cuatro genes *SERRATA* (*SEA1* a *SEA4*; Berná *et al.*, 1999). Se definieron intervalos candidatos para dichos genes mediante cartografía de baja resolución (Robles y Micol, 2001). Se estableció así el ligamiento del gen *SEA4* a los marcadores AthZFPG y AthACS, que flanquean un segmento de 42 cM del cromosoma 1. Se estrechó más tarde este intervalo candidato mediante análisis iterativo del ligamiento a marcadores moleculares, quedando delimitado por F16J7-TRB y cer451935, que flanquean una región de 660 kb, que incluye unos 250 genes. Del análisis de complementación de los mutantes *sea* se concluyó que dos de ellos eran alélicos, a los que se denominó *sea4-1* y *sea4-2*. Observaciones cualitativas preliminares indicaron que el patrón de venación foliar de estos mutantes era aberrante. Sin embargo, tanto *sea4-1* como *sea4-2* manifestaron un rasgo que podía dificultar su estudio, que fue en consecuencia pospuesto: ambos manifestaron variabilidad fenotípica, observándose en poblaciones aparentemente isogénicas plantas cuya alteración más obvia era el margen foliar serrado, pero también otras muy pequeñas, con escaso desarrollo foliar, que completaban su ciclo de vida pero producían muy pocas semillas.

IV.3.2.- Objetivos de esta Tesis

Los dos objetivos iniciales de esta Tesis fueron (1) identificar el gen *SEA4* y formular una primera propuesta sobre la naturaleza de su función, y (2) completar la caracterización fenotípica de los mutantes *sea4-1* y *sea4-2*, previamente iniciada en el laboratorio de J.L. Micol. Se propusieron para ello inicialmente los siguientes objetivos concretos: (1.1) identificar el gen *SEA4* realizando cartografías mediante secuenciación masiva; (1.2) determinar la naturaleza molecular de las mutaciones *sea4-1* y *sea4-2*; (2.1) caracterizar el fenotipo morfológico de los mutantes *sea4*, estudiando la forma de las hojas, las

inflorescencias y las flores, así como la longitud del tallo y la raíz principal; (2.2) cuantificar su variabilidad fenotípica y determinar su heredabilidad; (2.3) realizar un análisis morfométrico del patrón de venación de sus cotiledones y hojas del primer y tercer nudo; (2.4) caracterizar su fenotipo histológico foliar, estudiando la morfología de las células de las capas celulares de la hoja en cortes transversales, y (2.5) cuantificar algunos rasgos del fenotipo fisiológico, como el momento de la floración y la senescencia foliar.

Una vez que establecimos que el gen *SEA4* es *KEU*, se definieron los siguientes objetivos sobrevenidos para el estudio de los mutantes *sea4-1* y *sea4-2*: (3.1) cruzarlos por mutantes *keu* preexistentes, para confirmar su alelismo, así como (3.2) por mutantes portadores de alelos de genes de relación previamente demostrada con la citocinesis, para establecer la eventual existencia de interacciones genéticas; (3.3) medir los niveles de ploidía en las hojas *sea4-1* y *sea4-2*, para determinar su eventual incremento en la endorreducción, tal como ocurre en los mutantes *keu* letales; (3.4) obtener sus perfiles transcriptómicos para constatar los efectos directos o indirectos sobre la expresión génica de sus alteraciones en la citocinesis, y (3.5) contrastar mediante observaciones histoquímicas la hipótesis —sugerida por los resultados de nuestro análisis transcriptómico— de que su margen serrado es consecuencia de una distribución anómala de la auxina en los primordios foliares.

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

Para la redacción de los apartados I a VII de esta memoria se han seguido las mismas pautas que en Tesis anteriores de los laboratorios de M.R. Ponce y J.L. Micol. En este apartado de Materiales y métodos se reproducen literalmente algunas frases procedentes de dichas Tesis. Se ha preferido usar los acrónimos castellanizados ADN y ARN —de uso común en los medios de comunicación españoles—, en lugar de los recomendados por la International Union of Pure and Applied Chemistry, DNA y RNA, para los ácidos desoxirribonucleico y ribonucleico, respectivamente. Esta elección no está basada en ningún argumento que se considere incontestable; ambas opciones son aceptadas por el *Diccionario de la Lengua Española* (vigésimotercera edición, 2014) de la Real Academia Española (RAE). Tal como recomienda la RAE en su *Ortografía de la lengua española* (2010), en esta memoria no se realiza el plural de las siglas añadiendo al final una s minúscula: se escribe “el ARN” y también “los ARN”.

Todos los genes, proteínas, mutaciones y fenotipos morfológicos, fisiológicos y moleculares que se discuten en esta introducción corresponden a *Arabidopsis*, salvo cuando se indica expresamente lo contrario. La nomenclatura que se aplica en esta memoria a genes, mutaciones y fenotipos nuevos se atiene a las pautas propuestas para *Arabidopsis* por Meinke y Koornneef (1997). No hemos traducido al español muchos de los nombres de genes y proteínas que se mencionan en esta memoria; en estos casos solo hemos usado la cursiva para los genes. Los genotipos completos, como *sea4-1/sea4-1*, en los que los alelos de un gen en cromosomas homólogos se separan con una barra, se han utilizado únicamente cuando fue imprescindible. Salvo que se indique lo contrario, los individuos que se describen en este trabajo son homocigóticos para la mutación que se menciona en cada caso. Hemos utilizado en algunos casos un punto y coma como separador entre mutaciones no alélicas.

Las estirpes de *Arabidopsis*, su manipulación y las condiciones de cultivo usadas en esta Tesis se describen en la página 67. Hemos identificado y caracterizado molecularmente los alelos mutantes *sea4-1* y *sea4-2* (en la página 67). Hemos realizado análisis de complementación, de interacciones genéticas, morfométricos, histológicos y de microscopía confocal de las estirpes mutantes a estudio (en las páginas 68). Hemos aislado ARN para su secuenciación masiva y análisis transcriptómico (en la página 68-69). Hemos analizado sus niveles de ploidía (en la página 69). Hemos deducido sus secuencias aminoacídicas, con las que hemos realizado alineamientos múltiples y análisis *in silico* de su estructura tridimensional (en las páginas 69).

VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta Tesis hemos estudiado dos estirpes mutantes de *Arabidopsis*, *serrata4-1* (*sea4-1*) y *sea4-2*, que manifiestan alteraciones en la forma del margen de sus hojas vegetativas, que fueron aisladas tras una mutagénesis con EMS, realizada con el propósito de identificar genes requeridos para la organogénesis foliar. Las hojas de dichos mutantes son serradas, a diferencia de las de su tipo silvestre, *Ler*, cuyo margen es relativamente liso. Hemos realizado una cartografía mediante secuenciación masiva de ADN (mapping-by-sequencing) para identificar el gen dañado por las mutaciones *sea4-1* y *sea4-2*, generando poblaciones cartográficas F₂ derivadas del retrocruzamiento de los mutantes por *Ler*. Hemos concluido que *sea4-1* y *sea4-2* son alelos recesivos, hipomorfos y viables del gen *KEULE* (*KEU*), que codifica una proteína SM crucial para la formación de la placa celular durante la citocinesis (apartado IV.2.4.3, en la página 22). *KEU* es un gen muy bien conocido por su papel durante el desarrollo embrionario. Todos los alelos previamente descritos de *KEU* causan letalidad en plántula.

Hemos realizado ensayos de complementación, cruzando plantas portadoras de los alelos letales *keu-21*, *keu-22*, *keu-23* y *keu^{MM125}* en heterocigosis por homocigotos *sea4-1* y *sea4-2*, confirmando su alélismo. Estos ensayos sugieren además el carácter hipomorfo de *sea4-1* y *sea4-2*, ya que los heterocigotos *sea4/keu* que hemos obtenido presentan un fenotipo morfológico más extremo que el de los homocigotos *sea4-1/sea4-1* y *sea4-2/sea4-2*.

El mutante *sea4-1* es portador de una transición G→A que afecta al sitio donante del *splicing* del noveno exón de *KEU*. Tal como se comenta en la página siguiente, hemos obtenido mediante secuenciación masiva de ARN el perfil transcriptómico de este mutante, que indica que el 99,17% de los ARNm maduros del alelo *sea4-1* retienen su noveno intrón, generando un codón de terminación prematuro y una proteína truncada con 302 aminoácidos, 38 de los cuales no se encuentran en la proteína silvestre; la proteína *KEU* silvestre tiene 666 aminoácidos. El alelo *sea4-2* presenta una transición C→T en su tercer exón, que causa una sustitución predicha S57L. Esta última no parece alterar la estabilidad general de la proteína mutante, aunque sí incrementar su rigidez. El aminoácido mutado es uno de los que participan en la interacción de *KEU* con las syntaxinas.

Hemos cruzado *sea4-1* y *sea4-2* por mutantes portadores de alelos de genes que codifican proteínas que participan en la citocinesis: la proteína SM SEC1B, la subunidad del exocisto SEC6, y las syntaxinas SYP21, SYP132 y KN. Los dobles mutantes *sea4 sec1b-1*, *sea4 sec1b-2*, *sea4 sec6-2*, *sea4 sec6-3*, *sea4 syp21* y *sea4 syp132^T* presentan un fenotipo

sinérgico: en las plántulas no se desarrollan las hojas verdaderas, o si lo hacen son muy pequeñas y con el margen muy serrado. Dado que la mutación kn^{X37-2} es letal recesiva, no hemos podido obtener dobles mutantes $sea4/sea4;kn^{X37-2}/kn^{X37-2}$, aunque sí los sesquimutantes $sea4/sea4;KN/kn^{X37-2}$. Sorprendentemente, estos últimos presentan un fenotipo similar al de los heterocigotos KN/kn^{X37-2} , aunque con las hojas algo más desarrolladas y serradas, y por lo demás son similares a los restantes dobles mutantes mencionados en este párrafo.

Hemos caracterizado la variabilidad fenotípica y algunos rasgos de los fenotipos morfológico, histológico, fisiológico y molecular de los mutantes *sea4*. Hemos clasificado las plantas *sea4-1* y *sea4-2*, según la expansión de sus cotiledones y hojas, y su grado de senescencia foliar, en varios puntos temporales y en dos generaciones de autofecundación sucesivas. Hemos concluido que la variabilidad fenotípica de estos mutantes es una propiedad intrínseca de su genotipo, ya que se manifiesta siempre del mismo modo, con independencia del fenotipo parental. Hemos constatado que en las inflorescencias de los mutantes *sea4* las flores se abren de forma prematura antes de su maduración completa. Hemos determinado la longitud del tallo y la raíz primaria, que es menor que la del tipo silvestre.

Hemos realizado un análisis morfométrico del patrón de venación de los cotiledones y las hojas de los mutantes *sea4*, que ha resultado ser más denso y complejo que el silvestre, por su mayor número de bifurcaciones y de venas terminales por unidad de superficie.

Hemos estudiado la aparición de la senescencia en las hojas de los mutantes *sea4*. Los primeros parches senescentes aparecen 14 días después de la estratificación (dde) en los mutantes *sea4*, mientras que en el tipo silvestre lo hacen 21 dde. Además, los mutantes *sea4* presentan 25 dde más hojas senescentes, y con mayor severidad en cada hoja. Las plantas *sea4-2* presentan floración temprana, aunque en ambos mutantes el momento de la floración parece relacionado con la severidad del fenotipo foliar de cada planta.

Hemos obtenido cortes histológicos de hojas del tercer nudo de los mutantes *sea4*. Hemos encontrado una gran variabilidad en el tamaño de las células del mesófilo en empalizada, desorganización en el mesófilo lagunar y presencia de abultamientos en las epidermis dorsal y ventral. Hemos obtenido, mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial, micrografías que hemos transformado en diagramas de las células de hojas del primer y tercer nudos de la roseta. Hemos cuantificado así la variabilidad de tamaño de las células del mesófilo en empalizada, que en su mayoría son más pequeñas que las de Ler, aunque algunas son mucho mayores. También hemos cuantificado el

tamaño de las células de la epidermis, que no varía con respecto al silvestre, aunque su morfología es más simple.

Hemos determinado los niveles de ploidía en las hojas del primer y segundo nudo de los mutantes *sea4*, constatando un descenso de las poblaciones 2C, 4C y 8C, y un aumento de las 16C, 32C, 64C y 128C, siendo este efecto más acusado en el mutante *sea4-1*.

Hemos analizado en los primordios foliares y en las raíces la distribución del transportador del eflujo de la auxina PIN1, usando el transgén testigo *PIN1_{pro}:PIN1:GFP*, y la distribución de la auxina, con *DR5rev_{pro}:GFP*. En los primordios foliares de los mutantes *sea4* la distribución de PIN1 no está alterada, aunque se observa una menor acumulación del transportador y preferentemente en los márgenes. Sin embargo, la auxina se acumula más en la zona apical y en la epidermis del primordio foliar que en el tipo silvestre. En las raíces de los mutantes *sea4* la distribución de PIN1 tampoco parece afectada, aunque también se observa en menor cantidad. A diferencia de lo que hemos constatado en la hoja, la distribución de la auxina no parece alterada en la raíz.

Hemos extraído ARN de plántulas de los mutantes *sea4* para su retrotranscripción y secuenciación masiva. Hemos identificado 3812 y 4091 genes sobreexpresados en *sea4-1* y *sea4-2*, respectivamente. Estos genes están relacionados con el plegamiento de proteínas y la degradación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico, la inmunidad, el ciclo de Krebs y la biosíntesis de las auxinas, el jasmonato y los monolignoles. Hemos identificado 3824 y 4034 genes reprimidos en *sea4-1* y *sea4-2*, respectivamente. Estos genes están relacionados con la fotosíntesis, la síntesis de las clorofilas y los carotenos, el ciclo de Calvin, la ruta de la acetil-CoA, la biosíntesis de los flavín mononucleótidos y flavín adenín dinucleótidos, y el metabolismo de los aminoácidos y ácidos grasos.

VII.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

VII.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Todos los alelos del gen *KEU* estudiados previamente son letales. En esta Tesis hemos caracterizado dos nuevos alelos, *sea4-1* y *sea4-2*, que son hipomorfos y viables. Casi todos los ARNm del alelo *sea4-1* codifican una proteína truncada, aparentemente más corta que la producida por los alelos insercionales *keu-21*, *keu-22* y *keu-23*, que son letales recesivos. Sin embargo, el 0,83% de transcritos en los que se procesa correctamente el noveno intrón de *sea4-1*, junto con su sobreexpresión, le permiten alcanzar el 4% del nivel de *KEU* en el tipo silvestre. Esta pequeña cantidad de ARNm silvestre parece suficiente como para que se lleve a cabo la citocinesis a un nivel tal que hace posible la viabilidad del mutante *sea4-1*. La mutación *sea4-2* altera uno de los 40 aminoácidos implicados en la interacción de *KEU* con las sintaxinas, que se ve aparentemente reducida, aunque no impedida.

Los resultados de nuestro análisis transcriptómico relacionan el efecto molecular de las mutaciones *sea4-1* y *sea4-2* con sus alteraciones fenotípicas. Los mutantes *sea4* muestran las alteraciones en la expresión génica típicas de un grupo de mutantes que manifiestan lo que se ha dado en llamar reducción de la integridad de la pared celular (Gigli-Bisceglia *et al.*, 2018). Las más importantes de dichas alteraciones son la activación de la respuesta inmune de la planta (Bacete *et al.*, 2018), que en los mutantes *sea4* se manifiesta no solo en la activación de las rutas de inmunidad, sino también en las de la señalización de las MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE (MAPK) y las de la biosíntesis de glucosinolatos de defensa. Otras alteraciones que caracterizan a la reducción de la integridad de la pared celular son el incremento en la biosíntesis del jasmonato (Ellis *et al.*, 2002) y la lignina (Caño-Delgado *et al.*, 2003), que también manifiestan los mutantes *sea4*. La activación de la respuesta inmune y la elevación de los niveles de jasmonato podrían explicar la aparición de los parches senescentes en las hojas de estos mutantes.

Se asume que la integridad de la pared celular regula la división celular mediante la producción de óxido nítrico, que a su vez causa la degradación de las citoquininas (Gigli-Bisceglia *et al.*, 2018). En algunos mutantes con integridad de la pared celular reducida, la disminución de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis del óxido nítrico, como *NITRIC OXIDE SYNTHASE1 (NOA1)*, *NITRATE REDUCTASE1 (NIA1)* y *NIA2*, reduce la sensibilidad a la auxina en los meristemas, causando el acortamiento de la raíz primaria (Sanz *et al.*, 2014). En los mutantes *sea4* los genes *NOA1*, *NIA1* y *NIA2* están reprimidos, por lo que la reducción en la integridad de la pared celular podría ser la causa del acortamiento de la longitud de la raíz primaria y el tallo principal. Para intentar compensar

esta reducción en la sensibilidad a la auxina, en los mutantes *sea4* los genes de la ruta de biosíntesis de esta hormona están sobreexpresados. Esto se puede observar en los primordios foliares, en los que el exceso de auxina causa la localización anómala de esta hormona, siendo una causa verosímil de la forma serrada de su margen foliar y del aumento en la complejidad del patrón de venación.

Otro efecto aparentemente causado por la acumulación de vesículas sin fusionar en el plano de división es la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas, que incrementa la actividad del retículo endoplásmico (Bicknell *et al.*, 2007). En los mutantes *sea4* se sobreexpresa el gen *INCREASED ORGAN REGENERATION1 (IRE1)*, que inicia la vía de respuesta a proteínas mal plegadas, además de genes que codifican enzimas que glicosilan, transportan y pliegan proteínas en el retículo endoplásmico. También se encuentran sobreexpresados los genes que codifican enzimas de ubiquitinación y subunidades del proteasoma. El aumento en las vías de proteólisis podría deberse al retraso en la citocinesis causado por las mutaciones en *KEU*, que hacen que haya un exceso de nuevas proteínas sintetizadas relacionadas con la citocinesis. Esto explicaría la reducción del metabolismo de algunos aminoácidos y de la biosíntesis de ácidos grasos que manifiestan los mutantes *sea4*.

Además de la reducción de la integridad de la pared celular y la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas, los mutantes *sea4* muestran una reducción de su capacidad fotosintética y de fijación de carbono que no se ha observado previamente en mutantes dañados en la citocinesis. Muchos genes relacionados con los fotosistemas I y II, la cadena de transporte de electrones, las rutas de biosíntesis de las clorofilas a y b y los α - y β -carotenos, y el ciclo de Calvin, están reprimidos en los mutantes *sea4*. Dado que las células de los mutantes *sea4* tardan más en completar la fase M del ciclo celular, es razonable suponer que sus requerimientos de carbohidratos sean menores que los del tipo silvestre y que por tanto se reduzca su producción.

Las mutaciones hipomorfas *sea4-1* y *sea4-2* confirman una vez más que las mutagénesis realizadas mediante tratamiento con un mutágeno químico como el EMS y seguidas por una selección de mutantes viables propician la identificación de alelos de insuficiencia parcial de función. Esta peculiaridad del EMS resulta particularmente útil para el análisis funcional de los genes esenciales, a diferencia de los mutágenos insercionales, como el ADN-T, que inducen mayoritariamente mutaciones nulas y letales recesivas en este tipo de genes.

**VIII.- BIBLIOGRAFÍA
DE LOS APARTADOS IV-VII**

VIII.- BIBLIOGRAFÍA DE LOS APARTADOS IV-VII

- Abu-Abied, M., Belausov, E., Hagay, S., Peremyslov, V., Dolja, V., y Sadot, E. (2018). Myosin XI-K is involved in root organogenesis, polar auxin transport, and cell division. *Journal of Experimental Botany* **69**, 2869-2881.
- Assaad, F.F., Mayer, U., Wanner, G., y Jürgens, G. (1996). The *KEULE* gene is involved in cytokinesis in *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics* **253**, 267-277.
- Assaad, F.F., Huet, Y., Mayer, U., y Jürgens, G. (2001). The cytokinesis gene *KEULE* encodes a Sec1 protein that binds the syntaxin KNOLLE. *Journal of Cell Biology* **152**, 531-543.
- Atmodjo, M.A., Hao, Z., y Mohnen, D. (2013). Evolving views of pectin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 747-779.
- Austin, J.R., II, Seguí-Simarro, J.M., y Staehelin, L.A. (2005). Quantitative analysis of changes in spatial distribution and plus-end geometry of microtubules involved in plant-cell cytokinesis. *Journal of Cell Science* **118**, 3895-3903.
- Azimzadeh, J., Nacry, P., Christodoulidou, A., Drevensek, S., Camilleri, C., Amiour, N., Parcy, F., Pastuglia, M., y Bouchez, D. (2008). *Arabidopsis* TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. *Plant Cell* **20**, 2146-2159.
- Bacete, L., Mérida, H., Miedes, E., y Molina, A. (2018). Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *Plant Journal* **93**, 614-636.
- Baker, R.W., Jeffrey, P.D., Zick, M., Phillips, B.P., Wickner, W.T., y Hughson, F.M. (2015). A direct role for the Sec1/Munc18-family protein Vps33 as a template for SNARE assembly. *Science* **349**, 1111-1114.
- Ballesteros, I., Domínguez, T., Sauer, M., Paredes, P., Duprat, A., Rojo, E., Sanmartín, M., y Sánchez-Serrano, J.J. (2013). Specialized functions of the PP2A subfamily II catalytic subunits PP2A-C3 and PP2A-C4 in the distribution of auxin fluxes and development in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **73**, 862-872.
- Batystová, K., Synek, L., Klejchová, M., Drdová, E.J., Sabol, P., Potocký, M., Žárský, V., y Hála, M. (2022). Diversification of SEC15a and SEC15b isoforms of an exocyst subunit in seed plants is manifested in their specific roles in *Arabidopsis* sporophyte and male gametophyte. *Plant Journal* **110**, 1382-1396.
- Benschop, J.J., Mohammed, S., O'Flaherty, M., Heck, A.J.R., Slijper, M., y Menke, F.L.H. (2007). Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Molecular and Cellular Proteomics* **6**, 1198-1214.
- Berná, G., Robles, P., y Micol, J.L. (1999). A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **152**, 729-742.
- Bicknell, A.A., Babour, A., Federovitch, C.M., y Niwa, M. (2007). A novel role in cytokinesis reveals a housekeeping function for the unfolded protein response. *Journal of Cell Biology* **177**, 1017-1027.
- Boruc, J., Weimer, A.K., Stoppin-Mellet, V., Mylle, E., Kosetsu, K., Cedeño, C., Jaquinod, M., Njo, M., De Milde, L., Tompa, P., Gonzalez, N., Inzé, D., Beeckman, T., Vantard, M., y Van Damme, D. (2017). Phosphorylation of MAP65-1 by *Arabidopsis* Aurora kinases is required for efficient cell cycle progression. *Plant Physiology* **173**, 582-599.
- Caffall, K.H., y Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* **344**, 1879-1900.
- Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O., y Bouchez, D. (2002). The *Arabidopsis* TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell* **14**, 833-845.

- Cannon, M.C., Terneus, K., Hall, Q., Tan, L., Wang, Y., Wegenhart, B.L., Chen, L., Lamport, D.T.A., Chen, Y., y Kieliszewski, M.J. (2008). Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**, 2226-2231.
- Caño-Delgado, A., Penfield, S., Smith, C., Catley, M., y Bevan, M. (2003). Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **34**, 351-362.
- Carpita, N.C., y McCann, M.C. (2008). Maize and sorghum: genetic resources for bioenergy grasses. *Trends in Plant Science* **13**, 415-420.
- Cole, R.A., Synek, L., Zarsky, V., y Fowler, J.E. (2005). SEC8, a subunit of the putative Arabidopsis exocyst complex, facilitates pollen germination and competitive pollen tube growth. *Plant Physiology* **138**, 2005-2018.
- Cole, R.A., McNally, S.A., y Fowler, J.E. (2014). Developmentally distinct activities of the exocyst enable rapid cell elongation and determine meristem size during primary root growth in Arabidopsis. *BMC Plant Biology* **14**, 386.
- Cosgrove, D.J. (2022). Building an extensible cell wall. *Plant Physiology* **189**, 1246-1277.
- Crowell, E.F., Bischoff, V., Desprez, T., Rolland, A., Stierhof, Y.D., Schumacher, K., Gonneau, M., Höfte, H., y Vernhettes, S. (2009). Pausing of Golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 1141-1154.
- Chen, H.W., Persson, S., Grebe, M., y McFarlane, H.E. (2018). Cellulose synthesis during cell plate assembly. *Physiologia Plantarum* **164**, 17-26.
- Chen, X.Y., Liu, L., Lee, E., Han, X., Rim, Y., Chu, H., Kim, S.W., Sack, F., y Kim, J.Y. (2009). The Arabidopsis callose synthase gene *GSL8* is required for cytokinesis and cell patterning. *Plant Physiology* **150**, 105-113.
- Chow, C.M., Neto, H., Foucart, C., y Moore, I. (2008). Rab-A2 and Rab-A3 GTPases define a trans-Golgi endosomal membrane domain in Arabidopsis that contributes substantially to the cell plate. *Plant Cell* **20**, 101-123.
- Chugh, M., Reissner, M., Bugiel, M., Lipka, E., Herrmann, A., Roy, B., Müller, S., y Schäffer, E. (2018). Phragmoplast orienting kinesin 2 is a weak motor switching between processive and diffusive modes. *Biophysical Journal* **115**, 375-385.
- Doxey, A.C., Yaish, M.W., Moffatt, B.A., Griffith, M., y McConkey, B.J. (2007). Functional divergence in the Arabidopsis β -1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1045-1055.
- Drakakaki, G., van de Ven, W., Pan, S., Miao, Y., Wang, J., Keinath, N.F., Weatherly, B., Jiang, L., Schumacher, K., Hicks, G., y Raikhel, N. (2012). Isolation and proteomic analysis of the SYP61 compartment reveal its role in exocytic trafficking in Arabidopsis. *Cell Research* **22**, 413-424.
- Drevensek, S., Goussot, M., Duroc, Y., Christodoulidou, A., Steyaert, S., Schaefer, E., Duvernois, E., Grandjean, O., Vantard, M., Bouchez, D., y Pastuglia, M. (2012). The Arabidopsis TRM1-TON1 interaction reveals a recruitment network common to plant cortical microtubule arrays and eukaryotic centrosomes. *Plant Cell* **24**, 178-191.
- Durufié, H., Clemente, H.S., Balliau, T., Zivy, M., Dunand, C., y Jamet, E. (2017). Cell wall proteome analysis of Arabidopsis thaliana mature stems. *Proteomics* **17**, 1600449.
- Ehrhardt, D.W., y Shaw, S.L. (2006). Microtubule dynamics and organization in the plant cortical array. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 859-875.
- El Kasmi, F., Krause, C., Hiller, U., Stierhof, Y.D., Mayer, U., Conner, L., Kong, L., Reichardt, I., Sanderfoot, A.A., y Jürgens, G. (2013). SNARE complexes of different composition jointly mediate membrane fusion in Arabidopsis cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell* **24**, 1593-1601.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C., y Turner, J.G. (2002). The Arabidopsis mutant *cevl* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* **14**, 1557-1566.

- Fagard, M., Desnos, T., Desprez, T., Goubet, F., Refregier, G., Mouille, G., McCann, M., Rayon, C., Vernhettes, S., y Höfte, H. (2000). *PROCUSTE1* encodes a cellulose synthase required for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 2409-2423.
- Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T., y Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 15781-15786.
- Fendrych, M., Synek, L., Pečenková, T., Toupalová, H., Cole, R., Drdová, E., Nebesářová, J., Sedinová, M., Hála, M., Fowler, J.E., y Žárský, V. (2010). The *Arabidopsis* exocyst complex is involved in cytokinesis and cell plate maturation. *Plant Cell* **22**, 3053-3065.
- Garcia, V.J., Xu, S.L., Ravikumar, R., Wang, W., Elliott, L., Gonzalez, E., Fesenko, M., Altmann, M., Brunschweiler, B., Falter-Braun, P., Moore, I., Burlingame, A., Assaad, F.F., y Wang, Z.Y. (2020). TRIPP is a plant-specific component of the *Arabidopsis* TRAPP II membrane trafficking complex with important roles in plant development. *Plant Cell* **32**, 2424-2443.
- Gigli-Bisceglia, N., Engelsdorf, T., Strnad, M., Vaahtera, L., Khan, G.A., Yamoune, A., Alipanah, L., Novák, O., Persson, S., Hejatko, J., y Hamann, T. (2018). Cell wall integrity modulates *Arabidopsis thaliana* cell cycle gene expression in a cytokinin- and nitrate reductase-dependent manner. *Development* **145**, dev166678.
- Gu, F., Bringmann, M., Combs, J.R., Yang, J., Bergmann, D.C., y Nielsen, E. (2016). *Arabidopsis* CSLD5 functions in cell plate formation in a cell cycle-dependent manner. *Plant Cell* **28**, 1722-1737.
- Gu, Y., y Rasmussen, C.G. (2022). Cell biology of primary cell wall synthesis in plants. *Plant Cell* **34**, 103-128.
- Guo, L., Ho, C.M., Kong, Z., Lee, Y.R.J., Qian, Q., y Liu, B. (2009). Evaluating the microtubule cytoskeleton and its interacting proteins in monocots by mining the rice genome. *Annals of Botany* **103**, 387-402.
- Guseman, J.M., Lee, J.S., Bogenschutz, N.L., Peterson, K.M., Virata, R.E., Xie, B., Kanaoka, M.M., Hong, Z., y Torii, K.U. (2010). Dysregulation of cell-to-cell connectivity and stomatal patterning by loss-of-function mutation in *Arabidopsis* *CHORUS* (*GLUCAN SYNTHASE-LIKE 8*). *Development* **137**, 1731-1741.
- Gutierrez, C. (2016). 25 years of cell cycle research: what's ahead? *Trends in Plant Science* **21**, 823-833.
- Gutierrez, R., Lindeboom, J.J., Paredez, A.R., Emons, A.M.C., y Ehrhardt, D.W. (2009). *Arabidopsis* cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nature Cell Biology* **11**, 797-806.
- Hall, Q., y Cannon, M.C. (2002). The cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein RSH is essential for normal embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 1161-1172.
- Heard, W., Sklenář, J., Tomé, D.F., Robatzek, S., y Jones, A.M. (2015). Identification of regulatory and cargo proteins of endosomal and secretory pathways in *Arabidopsis thaliana* by proteomic dissection. *Molecular and Cellular Proteomics* **14**, 1796-1813.
- Heese, M., Gansel, X., Sticher, L., Wick, P., Grebe, M., Granier, F., y Jürgens, G. (2001). Functional characterization of the KNOLLE-interacting t-SNARE AtSNAP33 and its role in plant cytokinesis. *Journal of Cell Biology* **155**, 239-249.
- Ho, C.M., Hotta, T., Guo, F., Roberson, R.W., Lee, Y.R., y Liu, B. (2011). Interaction of antiparallel microtubules in the phragmoplast is mediated by the microtubule-associated protein MAP65-3 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**, 2909-2923.
- Hong, Z., Delauney, A.J., y Verma, D.P.S. (2001). A cell plate-specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin. *Plant Cell* **13**, 755-768.
- Hotta, T., Kong, Z., Ho, C.M.K., Zeng, C.J.T., Horio, T., Fong, S., Vuong, T., Lee, Y.R.J., y Liu, B. (2012). Characterization of the *Arabidopsis* augmin complex uncovers its critical function in the

- assembly of the acentrosomal spindle and phragmoplast microtubule arrays. *Plant Cell* **24**, 1494-1509.
- Hussey, P.J., Hawkins, T.J., Igarashi, H., Kaloriti, D., y Smertenko, A. (2002). The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Molecular Biology* **50**, 915-924.
- Jaber, E., Thiele, K., Kindzierski, V., Loderer, C., Rybak, K., Jürgens, G., Mayer, U., Söllner, R., Wanner, G., y Assaad, F.F. (2010). A putative TRAPP II tethering factor is required for cell plate assembly during cytokinesis in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **187**, 751-763.
- Jiao, J., He, M., Port, S.A., Baker, R.W., Xu, Y., Qu, H., Xiong, Y., Wang, Y., Jin, H., Eisemann, T.J., Hughson, F.M., y Zhang, Y. (2018). Munc18-1 catalyzes neuronal SNARE assembly by templating SNARE association. *eLife* **7**, e41771.
- Jürgens, G., Park, M., Richter, S., Touihri, S., Krause, C., El Kasmi, F., y Mayer, U. (2015). Plant cytokinesis: a tale of membrane traffic and fusion. *Biochemical Society Transactions* **43**, 73-78.
- Kalde, M., Elliott, L., Ravikumar, R., Rybak, K., Altmann, M., Klaeger, S., Wiese, C., Abele, M., Al, B., Kalbfuss, N., Qi, X., Steiner, A., Meng, C., Zheng, H., Kuster, B., Falter-Braun, P., Ludwig, C., Moore, I., y Assaad, F.F. (2019). Interactions between Transport Protein Particle (TRAPP) complexes and Rab GTPases in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **100**, 279-297.
- Karnahl, M., Park, M., Mayer, U., Hiller, U., y Jürgens, G. (2017). ER assembly of SNARE complexes mediating formation of partitioning membrane in *Arabidopsis* cytokinesis. *eLife* **6**, e25327.
- Karnik, R., Grefen, C., Bayne, R., Honsbein, A., Köhler, T., Kioumourtzoglou, D., Williams, M., Bryant, N.J., y Blatt, M.R. (2013). *Arabidopsis* Sec1/Munc18 protein SEC11 is a competitive and dynamic modulator of SNARE binding and SYP121-dependent vesicle traffic. *Plant Cell* **25**, 1368-1382.
- Karnik, R., Zhang, B., Waghmare, S., Aderhold, C., Grefen, C., y Blatt, M.R. (2015). Binding of SEC11 indicates its role in SNARE recycling after vesicle fusion and identifies two pathways for vesicular traffic to the plasma membrane. *Plant Cell* **27**, 675-694.
- Kirik, A., Ehrhardt, D.W., y Kirik, V. (2012). *TONNEAU2/FASS* regulates the geometry of microtubule nucleation and cortical array organization in interphase *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* **24**, 1158-1170.
- Koike, S., y Jahn, R. (2022). SNARE proteins: zip codes in vesicle targeting? *Biochemical Journal* **479**, 273-288.
- Laubner, M.H., Waizenegger, I., Steinmann, T., Schwarz, H., Mayer, U., Hwang, I., Lukowitz, W., y Jürgens, G. (1997). The *Arabidopsis* KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *Journal of Cell Biology* **139**, 1485-1493.
- Lee, Y.K., Kim, G.T., Kim, I.J., Park, J., Kwak, S.S., Choi, G., y Chung, W.I. (2006). *LONGIFOLIA1* and *LONGIFOLIA2*, two homologous genes, regulate longitudinal cell elongation in *Arabidopsis*. *Development* **133**, 4305-4314.
- Lee, Y.R.J., y Liu, B. (2013). The rise and fall of the phragmoplast microtubule array. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 757-763.
- Li, H., Sun, B., Sasabe, M., Deng, X., Machida, Y., Lin, H., Lee, Y.R.J., y Liu, B. (2017). *Arabidopsis* MAP65-4 plays a role in phragmoplast microtubule organization and marks the cortical cell division site. *New Phytologist* **215**, 187-201.
- Liu, M., Rubiato, H.M., y Nielsen, M.E. (2022). Mobility of the syntaxin PEN1 in *Arabidopsis* reflects functional specialization of the conserved SYP12 clade. *Plant Signaling and Behavior* **17**, e2084278.
- Liu, Z., Schneider, R., Kesten, C., Zhang, Y., Somssich, M., Zhang, Y., Fernie, A.R., y Persson, S. (2016). Cellulose-microtubule uncoupling proteins prevent lateral displacement of microtubules during cellulose synthesis in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* **38**, 305-315.

- Lukowitz, W., Mayer, U., y Jürgens, G. (1996). Cytokinesis in the Arabidopsis embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product. *Cell* **84**, 61-71.
- Luo, C., Shi, Y., y Xiang, Y. (2022). SNAREs regulate vesicle trafficking during root growth and development. *Frontiers in Plant Science* **13**, 853251.
- Lupashin, V., y Sztul, E. (2005). Golgi tethering factors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1744**, 325-339.
- Margittai, M., Widengren, J., Schweinberger, E., Schröder, G.F., Felekyan, S., Haustein, E., König, M., Fasshauer, D., Grubmüller, H., Jahn, R., y Seidel, C.A.M. (2003). Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **100**, 15516-15521.
- Miart, F., Desprez, T., Biot, E., Morin, H., Belcram, K., Höfte, H., Gonneau, M., y Vernhettes, S. (2014). Spatio-temporal analysis of cellulose synthesis during cell plate formation in Arabidopsis. *Plant Journal* **77**, 71-84.
- Mineyuki, Y., ed. *The preprophase band of microtubules: its function as a cytokinetic apparatus in higher plants*. International Review of Cytology, ed. Jeon, K.W. Vol. 187. 1999, Academic Press. 1-49.
- Moore, P.J., y Staehelin, L.A. (1988). Immunogold localization of the cell-wall-matrix polysaccharides rhamnogalacturonan I and xyloglucan during cell expansion and cytokinesis in *Trifolium pratense* L.; implication for secretory pathways. *Planta* **174**, 433-445.
- Morgan, J.L., Strumillo, J., y Zimmer, J. (2013). Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* **493**, 181-186.
- Müller, S., Fuchs, E., Ovecka, M., Wysocka-Diller, J., Benfey, P.N., y Hauser, M.T. (2002). Two new loci, *PLEIADE* and *HYADE*, implicate organ-specific regulation of cytokinesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* **130**, 312-324.
- Müller, S., Smertenko, A., Wagner, V., Heinrich, M., Hussey, P.J., y Hauser, M.T. (2004). The plant microtubule-associated protein AtMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function. *Current Biology* **14**, 412-417.
- Müller, S., Han, S., y Smith, L.G. (2006). Two kinesins are involved in the spatial control of cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **16**, 888-894.
- Müller, S., Wright, A.J., y Smith, L.G. (2009). Division plane control in plants: new players in the band. *Trends in Cell Biology* **19**, 180-188.
- Müller, S., y Jürgens, G. (2016). Plant cytokinesis – No ring, no constriction but centrifugal construction of the partitioning membrane. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **53**, 10-18.
- Müller, S. (2019). Plant cell division – defining and finding the sweet spot for cell plate insertion. *Current Opinion in Cell Biology* **60**, 9-18.
- Müller, S. (2023). Update: on selected ROP cell polarity mechanisms in plant cell morphogenesis. *Plant Physiology* **193**, 26-41.
- Murray, D.H., Jahnke, M., Lauer, J., Avellaneda, M.J., Brouilly, N., Cezanne, A., Morales-Navarrete, H., Perini, E.D., Ferguson, C., Lupas, A.N., Kalaidzidis, Y., Parton, R.G., Grill, S.W., y Zerial, M. (2016). An endosomal tether undergoes an entropic collapse to bring vesicles together. *Nature* **537**, 107-111.
- Naito, H., y Goshima, G. (2015). NACK kinesin is required for metaphase chromosome alignment and cytokinesis in the moss *Physcomitrella patens*. *Cell Structure and Function* **40**, 31-41.
- Nakamura, M., Ehrhardt, D.W., y Hashimoto, T. (2010). Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal *Arabidopsis* cortical array. *Nature Cell Biology* **12**, 1064-1070.
- Panstruga, R., Antonin, W., y Lichius, A. (2023). Looking outside the box: a comparative cross-kingdom view on the cell biology of the three major lineages of eukaryotic multicellular life. *Cellular and Molecular Life Sciences* **80**, 198.

- Panteris, E. (2008). Cortical actin filaments at the division site of mitotic plant cells: a reconsideration of the 'actin-depleted zone'. *New Phytologist* **179**, 334-341.
- Paredes, A.R., Somerville, C.R., y Ehrhardt, D.W. (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* **312**, 1491-1495.
- Park, M., Touihri, S., Müller, I., Mayer, U., y Jürgens, G. (2012). Sec1/Munc18 protein stabilizes fusion-competent syntaxin for membrane fusion in *Arabidopsis* cytokinesis. *Developmental Cell* **22**, 989-1000.
- Park, M., Krause, C., Karnahl, M., Reichardt, I., El Kasmi, F., Mayer, U., Stierhof, Y.D., Hiller, U., Strompen, G., Bayer, M., Kientz, M., Sato, M.H., Nishimura, M.T., Dangl, J.L., Sanderfoot, A.A., y Jürgens, G. (2018). Concerted action of evolutionarily ancient and novel SNARE complexes in flowering-plant cytokinesis. *Developmental Cell* **44**, 500-511.
- Park, S., Szumlanski, A.L., Gu, F., Guo, F., y Nielsen, E. (2011). A role for CSLD3 during cell-wall synthesis in apical plasma membranes of tip-growing root-hair cells. *Nature Cell Biology* **13**, 973-980.
- Pauly, M., y Keegstra, K. (2016). Biosynthesis of the plant cell wall matrix polysaccharide xyloglucan. *Annual Review of Plant Biology* **67**, 235-259.
- Qi, X., Kaneda, M., Chen, J., Geitmann, A., y Zheng, H. (2011). A specific role for Arabidopsis TRAPPII in post-Golgi trafficking that is crucial for cytokinesis and cell polarity. *Plant Journal* **68**, 234-248.
- Rasmussen, C.G., Humphries, J.A., y Smith, L.G. (2011). Determination of symmetric and asymmetric division planes in plant cells. *Annual Review of Plant Biology* **62**, 387-409.
- Ravikumar, R., Steiner, A., y Assaad, F.F. (2017). Multisubunit tethering complexes in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* **40**, 97-105.
- Reichardt, I., Slane, D., El Kasmi, F., Knöll, C., Fuchs, R., Mayer, U., Lipka, V., y Jürgens, G. (2011). Mechanisms of functional specificity among plasma-membrane syntaxins in *Arabidopsis*. *Traffic* **12**, 1269-1280.
- Richter, S., Kientz, M., Brumm, S., Nielsen, M.E., Park, M., Gavidia, R., Krause, C., Voss, U., Beckmann, H., Mayer, U., Stierhof, Y.D., y Jürgens, G. (2014). Delivery of endocytosed proteins to the cell-division plane requires change of pathway from recycling to secretion. *eLife* **3**, e02131.
- Robles, P., y Micol, J.L. (2001). Genome-wide linkage analysis of *Arabidopsis* genes required for leaf development. *Molecular Genetics and Genomics* **266**, 12-19.
- Rybak, K., Steiner, A., Synek, L., Klaeger, S., Kulich, I., Facher, E., Wanner, G., Kuster, B., Zarsky, V., Persson, S., y Assaad, F.F. (2014). Plant cytokinesis is orchestrated by the sequential action of the TRAPPII and exocyst tethering complexes. *Developmental Cell* **29**, 607-620.
- Saatian, B., Austin, R.S., Tian, G., Chen, C., Nguyen, V., Kohalmi, S.E., Geelen, D., y Cui, Y. (2018). Analysis of a novel mutant allele of *GSL8* reveals its key roles in cytokinesis and symplastic trafficking in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* **18**, 295.
- Sablowski, R., y Gutierrez, C. (2022). Cycling in a crowd: coordination of plant cell division, growth, and cell fate. *Plant Cell* **34**, 193-208.
- Sampathkumar, A., Gutierrez, R., McFarlane, H.E., Bringmann, M., Lindeboom, J., Emons, A.M., Samuels, L., Ketelaar, T., Ehrhardt, D.W., y Persson, S. (2013). Patterning and lifetime of plasma membrane-localized cellulose synthase is dependent on actin organization in *Arabidopsis* interphase cells. *Plant Physiology* **162**, 675-688.
- Samuels, A.L., Giddings, T.H., Jr., y Staehelin, L.A. (1995). Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: a new model of cell plate formation in higher plants. *Journal of Cell Biology* **130**, 1345-1357.
- Sanz, L., Fernández-Marcos, M., Modrego, A., Lewis, D.R., Muday, G.K., Pollmann, S., Dueñas, M., Santos-Buelga, C., y Lorenzo, O. (2014). Nitric oxide plays a role in stem cell niche homeostasis through its interaction with auxin. *Plant Physiology* **166**, 1972-1984.

- Sasabe, M., Kosetsu, K., Hidaka, M., Murase, A., y Machida, Y. (2011). *Arabidopsis thaliana* MAP65-1 and MAP65-2 function redundantly with MAP65-3/PLEIADE in cytokinesis downstream of MPK4. *Plant Signaling and Behavior* **6**, 743-747.
- Sasabe, M., y Machida, Y. (2012). Regulation of organization and function of microtubules by the mitogen-activated protein kinase cascade during plant cytokinesis. *Cytoskeleton* **69**, 913-918.
- Seguí-Simarro, J.M., Austin, J.R., II, White, E.A., y Staehelin, L.A. (2004). Electron tomographic analysis of somatic cell plate formation in meristematic cells of *Arabidopsis* preserved by high-pressure freezing. *Plant Cell* **16**, 836-856.
- Seguí-Simarro, J.M., y Staehelin, L.A. (2006). Cell cycle-dependent changes in Golgi stacks, vacuoles, clathrin-coated vesicles and multivesicular bodies in meristematic cells of *Arabidopsis thaliana*: a quantitative and spatial analysis. *Planta* **223**, 223-236.
- 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 Genetics and Genomics* **261**, 725-739.
- Shi, Y., Luo, C., Xiang, Y., y Qian, D. (2023). Rab GTPases, tethers, and SNAREs work together to regulate *Arabidopsis* cell plate formation. *Frontiers in Plant Science* **14**, 1120841.
- Showalter, A.M., y Basu, D. (2016). Extensin and arabinogalactan-protein biosynthesis: glycosyltransferases, research challenges, and biosensors. *Frontiers in Plant Science* **7**, 814.
- Silva, J., Ferraz, R., Dupree, P., Showalter, A.M., y Coimbra, S. (2020). Three decades of advances in arabinogalactan-protein biosynthesis. *Frontiers in Plant Science* **11**, 610377.
- Sinclair, R., Hsu, G., Davis, D., Chang, M., Rosquete, M., Iwasa, J.H., y Drakakaki, G. (2022). Plant cytokinesis and the construction of new cell wall. *FEBS Letters* **596**, 2243-2255.
- Smertenko, A. (2018). Phragmoplast expansion: the four-stroke engine that powers plant cytokinesis. *Current Opinion in Plant Biology* **46**, 130-137.
- Smith, L.G., Hake, S., y Sylvester, A.W. (1996). The *tangled-1* mutation alters cell division orientations throughout maize leaf development without altering leaf shape. *Development* **122**, 481-489.
- Spinner, L., Gadeyne, A., Belcram, K., Goussot, M., Moison, M., Duroc, Y., Eeckhout, D., De Winne, N., Schaefer, E., Van De Slijke, E., Persiau, G., Witters, E., Gevaert, K., De Jaeger, G., Bouchez, D., Van Damme, D., y Pastuglia, M. (2013). A protein phosphatase 2A complex spatially controls plant cell division. *Nature Communications* **4**, 1863.
- Stanton, A.E., y Hughson, F.M. (2023). The machinery of vesicle fusion. *Current Opinion in Cell Biology* **83**, 102191.
- Stöckle, D., Herrmann, A., Lipka, E., Lauster, T., Gavidia, R., Zimmermann, S., y Müller, S. (2016). Putative RopGAPs impact division plane selection and interact with kinesin-12 POK1. *Nature Plants* **2**, 16120.
- Strompen, G., El Kasmi, F., Richter, S., Lukowitz, W., Assaad, F.F., Jürgens, G., y Mayer, U. (2002). The *Arabidopsis* *HINKEL* gene encodes a kinesin-related protein involved in cytokinesis and is expressed in a cell cycle-dependent manner. *Current Biology* **12**, 153-158.
- Struk, S., y Dhonukshe, P. (2014). MAPs: cellular navigators for microtubule array orientations in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* **33**, 1-21.
- Synek, L., Schlager, N., Eliáš, M., Quentin, M., Hauser, M.T., y Žárský, V. (2006). AtEXO70A1, a member of a family of putative exocyst subunits specifically expanded in land plants, is important for polar growth and plant development. *Plant Journal* **48**, 54-72.
- Synek, L., Pleskot, R., Sekereš, J., Serrano, N., Vukašinović, N., Ortmannová, J., Klejchová, M., Pejchar, P., Batystová, K., Gutkowska, M., Janková-Drdová, E., Marković, V., Pečenková, T., Šantrůček, J., Žárský, V., y Potocký, M. (2021). Plasma membrane phospholipid signature recruits the plant exocyst complex via the EXO70A1 subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **118**, e2105287118.

- Thellmann, M., Rybak, K., Thiele, K., Wanner, G., y Assaad, F.F. (2010). Tethering factors required for cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **154**, 720-732.
- Thiele, K., Wanner, G., Kindzierski, V., Jürgens, G., Mayer, U., Pachl, F., y Assaad, F.F. (2009). The timely deposition of callose is essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **58**, 13-26.
- Torres-Ruiz, R.A., y Jürgens, G. (1994). Mutations in the *FASS* gene uncouple pattern formation and morphogenesis in *Arabidopsis* development. *Development* **120**, 2967-2978.
- Traas, J., Bellini, C., Nacry, P., Kronenberger, J., Bouchez, D., y Caboche, M. (1995). Normal differentiation patterns in plants lacking microtubular preprophase bands. *Nature* **375**, 676-677.
- van Oostende-Triplet, C., Guillet, D., Triplet, T., Pandzic, E., Wiseman, P.W., y Geitmann, A. (2017). Vesicle dynamics during plant cell cytokinesis reveals distinct developmental phases. *Plant Physiology* **174**, 1544-1558.
- Vanstraelen, M., Torres Acosta, J.A., De Veylder, L., Inzé, D., y Geelen, D. (2004). A plant-specific subclass of C-terminal kinesins contains a conserved A-type cyclin-dependent kinase site implicated in folding and dimerization. *Plant Physiology* **135**, 1417-1429.
- Vukašinović, N., Cvrčková, F., Eliáš, M., Cole, R., Fowler, J.E., Žárský, V., y Synek, L. (2014). Dissecting a hidden gene duplication: the *Arabidopsis thaliana* *SEC10* locus. *PLoS One* **9**, e94077.
- Waizenegger, I., Lukowitz, W., Assaad, F., Schwarz, H., Jürgens, G., y Mayer, U. (2000). The *Arabidopsis* *KNOLLE* and *KEULE* genes interact to promote vesicle fusion during cytokinesis. *Current Biology* **10**, 1371-1374.
- Walker, K.L., Müller, S., Moss, D., Ehrhardt, D.W., y Smith, L.G. (2007). *Arabidopsis* TANGLED identifies the division plane throughout mitosis and cytokinesis. *Current Biology* **17**, 1827-1836.
- Wilkop, T., Pattathil, S., Ren, G., Davis, D.J., Bao, W., Duan, D., Peralta, A.G., Domozych, D.S., Hahn, M.G., y Drakakaki, G. (2019). A hybrid approach enabling large-scale glycomic analysis of post-Golgi vesicles reveals a transport route for polysaccharides. *Plant Cell* **31**, 627-644.
- Williamson, R.E., Burn, J.E., Birch, R., Baskin, T.I., Arioli, T., Betzner, A.S., y Cork, A. (2001). Morphology of *rsw1*, a cellulose-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* **215**, 116-127.
- Won, K.H., y Kim, H. (2020). Functions of the plant Qbc SNARE SNAP25 in cytokinesis and biotic and abiotic stress responses. *Molecules and Cells* **43**, 313-322.
- Wu, J., Tan, X., Wu, C., Cao, K., Li, Y., y Bao, Y. (2013). Regulation of cytokinesis by exocyst subunit SEC6 and KEULE in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **6**, 1863-1876.
- Wu, S.Z., y Bezanilla, M. (2014). Myosin VIII associates with microtubule ends and together with actin plays a role in guiding plant cell division. *eLife* **3**, e03498.
- Yang, J., Bak, G., Burgin, T., Barnes, W.J., Mayes, H.B., Peña, M.J., Urbanowicz, B.R., y Nielsen, E. (2020). Biochemical and genetic analysis identify CSLD3 as a beta-1,4-glucan synthase that functions during plant cell wall synthesis. *Plant Cell* **32**, 1749-1767.
- Yin, L., Verherbruggen, Y., Oikawa, A., Manisseri, C., Knierim, B., Prak, L., Jensen, J.K., Knox, J.P., Auer, M., Willats, W.G., y Scheller, H.V. (2011). The cooperative activities of CSLD2, CSLD3, and CSLD5 are required for normal *Arabidopsis* development. *Molecular Plant* **4**, 1024-1037.
- Zabotina, O.A., Zhang, N., y Weerts, R. (2021). Polysaccharide biosynthesis: glycosyltransferases and their complexes. *Frontiers in Plant Science* **12**, 625307.
- Zhang, G.F., y Staehelin, L.A. (1992). Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells: immunocytochemical analysis of high-pressure frozen- and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. *Plant Physiology* **99**, 1070-1083.
- Zhang, H., Deng, X., Sun, B., Van, S.L., Kang, Z., Lin, H., Lee, Y.J., y Liu, B. (2018). Role of the BUB3 protein in phragmoplast microtubule reorganization during cytokinesis. *Nature Plants* **4**, 485-494.
- Zhang, L., Zhang, H., Liu, P., Hao, H., Jin, J.B., y Lin, J. (2011). *Arabidopsis* R-SNARE proteins VAMP721 and VAMP722 are required for cell plate formation. *PLoS One* **6**, e26129.




- Zhang, L., Ma, J., Liu, H., Yi, Q., Wang, Y., Xing, J., Zhang, P., Ji, S., Li, M., Li, J., Shen, J., y Lin, J. (2021). SNARE proteins VAMP721 and VAMP722 mediate the post-Golgi trafficking required for auxin-mediated development in Arabidopsis. *Plant Journal* **108**, 426-440.
- Zhang, Y., Immink, R., Liu, C.M., Emons, A.M., y Ketelaar, T. (2013). The Arabidopsis exocyst subunit SEC3A is essential for embryo development and accumulates in transient puncta at the plasma membrane. *New Phytologist* **199**, 74-88.
- Zhang, Y., y Hughson, F.M. (2021). Chaperoning SNARE folding and assembly. *Annual Review of Biochemistry* **90**, 581-603.
- Zhou, Y., Awano, T., Kobayashi, M., Matoh, T., y Takabe, K. (2017). Immunocytochemical detection of rhamnogalacturonan II on forming cell plates in cultured tobacco cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **81**, 899-905.
- Zuo, J., Niu, Q.W., Nishizawa, N., Wu, Y., Kost, B., y Chua, N.H. (2000). KORRIGAN, an Arabidopsis endo-1,4- β -glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis. *Plant Cell* **12**, 1137-1152.

IX.- PUBLICACIONES



Article

Roles of the Arabidopsis *KEULE* Gene in Postembryonic Development

Alejandro Ruiz-Bayón, Carolina Cara-Rodríguez, Raquel Sarmiento-Mañús , Rafael Muñoz-Viana [†] , Francisca M. Lozano [‡] , María Rosa Ponce and José Luis Micol ^{*}

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Spain; alejandro.ruizb@umh.es (A.R.-B.); 22carolina5@gmail.com (C.C.-R.); rsarmiento@umh.es (R.S.-M.); rafael.munoz.viana@gmail.com (R.M.-V.); fmlozanogarcia@gmail.com (F.M.L.); mrponce@umh.es (M.R.P.)

^{*} Correspondence: jlmicol@umh.es; Tel.: +34-96-665-85-04; Fax: +34-96-665-85-11

[†] Current address: Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Puerta de Hierro, 28222 Majadahonda, Spain.

[‡] Current address: Instituto Bernabeu, 03016 Alicante, Spain.

Abstract: Cytokinesis in plant cells begins with the fusion of vesicles that transport cell wall materials to the center of the cell division plane, where the cell plate forms and expands radially until it fuses with the parental cell wall. Vesicle fusion is facilitated by *trans*-SNARE complexes, with assistance from Sec1/Munc18 (SM) proteins. The SNARE protein KNOLLE and the SM protein KEULE are required for membrane fusion at the cell plate. Due to the crucial function of KEULE, all Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) *keule* mutants identified to date are seedling lethal. Here, we identified the Arabidopsis *serrata4-1* (*sea4-1*) and *sea4-2* mutants, which carry recessive, hypomorphic alleles of *KEULE*. Homozygous *sea4-1* and *sea4-2* plants are viable and fertile but have smaller rosettes and fewer leaves at bolting than the wild type. Their leaves are serrated, small, and wavy, with a complex venation pattern. The mutant leaves also develop necrotic patches and undergo premature senescence. RNA-seq revealed transcriptome changes likely leading to reduced cell wall integrity and an increase in the unfolded protein response. These findings shed light on the roles of KEULE in postembryonic development, particularly in the patterning of rosette leaves and leaf margins.

Keywords: Arabidopsis; *KEULE* gene; SNARE; SM proteins; vesicle fusion; leaf margin patterning



Citation: Ruiz-Bayón, A.;

Cara-Rodríguez, C.; Sarmiento-Mañús, R.; Muñoz-Viana, R.; Lozano, F.M.; Ponce, M.R.; Micol, J.L. Roles of the Arabidopsis *KEULE* Gene in Postembryonic Development. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 6667. <https://doi.org/10.3390/ijms25126667>

Academic Editor: Tomotsugu Koyama

Received: 19 May 2024

Revised: 14 June 2024

Accepted: 16 June 2024

Published: 18 June 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

During cytokinesis, the cytoplasm of a cell is divided, forming two daughter cells. In plant cells, the phragmoplast, a dynamic matrix of antiparallel microtubules, transports vesicles containing cell wall materials from the *trans*-Golgi network to the center of the cell division plane. These vesicles accumulate in the cell division plane and fuse together, forming the cell plate, which expands radially toward the plasma membrane of the parental cell. Fusion between the cell plate and plasma membrane occurs at the cortical division site where the preprophase band, a densely packed matrix of actin filaments and antiparallel microtubules, was formed. Finally, callose and cellulose synthases modify the newly formed cell wall, increasing its rigidity and physically separating the daughter cells [1].

Proteins involved in cytokinesis in *Arabidopsis thaliana* (hereafter Arabidopsis) are classified into three categories: proteins responsible for the proper orientation of the division plane, proteins directly involved in executing cytokinesis, and proteins involved in cell wall biosynthesis [2]. The first category includes proteins such as TONNEAU1 (TON1) and TON2 [3], TON1-RECRUITING MOTIF1 (TRM1; [4]), and TANGLED1 (TAN1; [5]). The second category comprises proteins that organize antiparallel microtubules, such as the kinesin RADIALLY SWOLLEN7 (RSW7; [6]) and the tubulin folding cofactors PILZ [7]; proteins involved in phragmoplast reorganization, such as the microtubule-associated kinase RUNKEL (RUK; [8]), the kinesin HINKEL (HIK; [9]) and the microtubule-

associated protein PLEIADE (PLE; [10]); and proteins that participate in vesicle fusion at the cell plate, such as the subunits of the Transport Protein Particle II complex (TRAPP II), the tethering factor CLUB [11], the syntaxin KNOLLE (KN; [12]), and the Sec1/Munc18 (SM) protein KEULE (KEU; [13]). The third category includes callose synthases such as MASSUE (MAS; [2]) and CALLOSE SYNTHASE1 (CALS1; [14]), cellulose synthases such as PROSCUTE1 (PRC1; [15]) and RADIALY SWOLLEN1 (RSW1; [16]), the GDP-mannose pyrophosphorylase CYTOKINESIS DEFECTIVE1 (CYT1; [17]), and the endo-1,4-beta-D-glucanase KORRIGAN (KOR; [18]).

The formation of the cell plate during cytokinesis occurs through the fusion of vesicles from the *trans*-Golgi network. Trafficking of these vesicles begins during anaphase, when the phragmoplast transports the vesicles to the cell division plane along with other membrane and cell wall components. In Arabidopsis, the Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor (NSF) Attachment Protein Receptor complexes (SNARE) play a central role in vesicle fusion [19]. These complexes, along with other components of the vesicle fusion machinery, are highly conserved in eukaryotic cells and have been studied in many species [20].

Vesicle fusion requires proper tethering and docking [21]. During tethering, specific proteins on a vesicle surface capture other vesicles, keeping them close to facilitate their fusion [22]. These tethering proteins have supercoiled helical structures or are part of protein complexes such as TRAPP or the exocyst [21]. During docking, SNARE complexes form between a vesicle and a cell membrane (heterotypic fusion) or between biochemically identical membranes (homotypic fusion), which brings the merging membranes closer to each other [23]. SNARE complexes consist of four SNARE domains, each containing an alpha-helix anchored to a membrane via its C-terminus. SNARE components anchored to a vesicle are referred to as v-SNARE or R-SNARE, as they possess an arginine (R) residue at the center of the SNARE domain. SNARE components anchored to a target membrane are known as t-SNARE or Q-SNARE, as they contain a glutamic acid (Q) residue at the same position. The SNARE complex consists of four components: a SNARE domain from an R-SNARE, another from a syntaxin (Qa-SNARE domain), and two domains from Synaptosomal-Associated Protein 25 (SNAP25; Qbc-SNARE domain) or from two independent proteins (Qb-SNARE and Qc-SNARE domains) [24].

Syntaxins can adopt closed or open conformations. In the closed conformation, the Habc N-terminal domain, consisting of three alpha-helices, folds over its SNARE domain. In the open conformation, the Habc and SNARE domains remain separate [25]. The syntaxin KNOLLE plays a central role in cytokinesis. In Arabidopsis, KNOLLE is transported by *trans*-Golgi vesicles in *cis*-SNARE complexes with the Qbc-SNARE SOLUBLE N-ETHYLMALEIMIDE-SENSITIVE FACTOR ADAPTOR PROTEIN33 (AtSNAP33), which is the Arabidopsis homolog of human SNAP25 [26], and the R-SNARE VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN721 (VAMP721). At the division plane, the ATPase NSF separates the components of the *cis*-SNARE complexes, and KNOLLE adopts a closed conformation, preventing its interaction with other SNARE components. During cytokinesis, the presence of KEULE stabilizes the open conformation of KNOLLE by interacting with the linker region between its domains [23]. This stabilization promotes the formation of *trans*-SNARE complexes with the SNARE components of adjacent vesicles [23]. KEULE also interacts with other syntaxins in heterotypic fusions, such as the closed conformation of SYNTAXIN-RELATED PROTEIN1 (SYP121), which participates in vesicle trafficking of the cell membrane during drought stress and pathogen defense [27].

All Arabidopsis *keule* (*keu*) mutants studied to date are seedling lethal and have large multi-nucleated cells with incomplete cell walls in dividing embryonic cell populations [28]. Seedlings with the same *keu* genotype can exhibit various morphologies, ranging from balls of undifferentiated cells to seedlings with well-defined organs, although most are rod-shaped [28]. Seedlings with the most severe mutant phenotype exhibit a swollen epidermis, with poorly defined cellular layers containing undifferentiated cells in both the epidermis and inner tissues. This is not observed in seedlings with milder morphologies. The division planes in the *keu* mutants are improperly oriented, and cytokinesis occurs at

a slower pace [28]. During embryogenesis, the division of the smallest daughter cell of the zygote occurs perpendicular instead of parallel to the apical–basal axis. Additionally, the asynchronous tangential divisions of the zygote often lead to the partial or total loss of the protoderm. However, these embryos usually recover this aspect of the wild-type phenotype during development [28].

Here, we describe two new hypomorphic alleles of the Arabidopsis *KEU* gene, *serrata4-1* (*sea4-1*) and *sea4-2*, which are viable and fertile. The *sea4-1* mutation causes retention of the ninth intron of *KEU* and the *sea4-2* mutation is predicted to induce an amino acid substitution in the SNARE interaction domain of *KEU*. Both mutants display reduced rosette size and plant height, abnormal leaf venation patterns, variable cell sizes within the epidermis and palisade mesophyll, and apparently undifferentiated cells throughout these layers, as well as premature leaf senescence. Our findings shed light on the functions of *KEULE* in adult plants, paving the way for future investigation of the postembryonic roles of this essential gene.

2. Results

2.1. The *sea4* Mutants Carry Novel Hypomorphic Viable Alleles of *KEU*

In a large-scale screening for Arabidopsis leaf mutants conducted after ethyl methane-sulfonate (EMS) mutagenesis of Landsberg *erecta* (*Ler*) seeds [29], we isolated two mutants displaying serrated and wavy rosette leaves with necrotic patches. These mutants were found to be allelic and were named *serrata4-1* (*sea4-1*) and *sea4-2*. Initially, the *sea4-1* and *sea4-2* mutations were mapped at low resolution to a 660 kb candidate region of chromosome 1 containing approximately 250 genes (Figure 1A) using iterative linkage analysis to molecular markers (Table S1; [30]). We generated backcross mapping populations by selecting F_2 plants exhibiting the mutant phenotype and subjected their pooled genomic DNA to next-generation sequencing. We analyzed the resulting paired-end reads using Easymap v.2, which also pointed to the same region of chromosome 1 (Figure 1B). By comparing the lists of candidate mutations identified in *sea4-1* (Table S2) and *sea4-2* (Table S3), we identified At1g12360 as the most likely candidate gene, which encodes the Sec1/Munc18 protein *KEULE* (*KEU*), as both mutants carried a mutation in this gene.

We obtained three lines from the SALK collection that were annotated to carry T-DNA insertions within the At1g12360 transcription unit: SALK_101874C, SALKseq_085463, and SALKseq_089213. We renamed the mutations in these lines *keu-21*, *keu-22*, and *keu-23*, respectively (Figure 1C). Additionally, Prof. Gerd Jürgens provided us with the line *keu^{MM125}* [31], which carries a 100 bp deletion in the 16th exon of *KEU* (Figure 1C). As expected, plants homozygous for these putatively null *keu* alleles were embryonic lethal, and the rosettes of the *KEU/keu-21*, *KEU/keu-22*, *KEU/keu-23*, and *KEU/keu^{MM125}* heterozygotes were phenotypically wild type. Crosses of *KEU/keu-21*, *KEU/keu-22*, and *KEU/keu-23* heterozygotes to homozygous *sea4/sea4* plants produced viable heterozygous *sea4/keu* plants, exhibiting a mutant phenotype more severe than that of *sea4-1/sea4-1* or *sea4-2/sea4-2* homozygotes (Figure 2). Crosses of *KEU/keu^{MM125}* heterozygotes to homozygous *sea4/sea4* plants produced heterozygous *sea4/keu^{MM125}* plants displaying a similar phenotype (Figure 2), but they died at the end of the vegetative phase without bolting or producing inflorescences. These results confirm the notion that *sea4-1* and *sea4-2* are hypomorphic alleles of *KEU*.

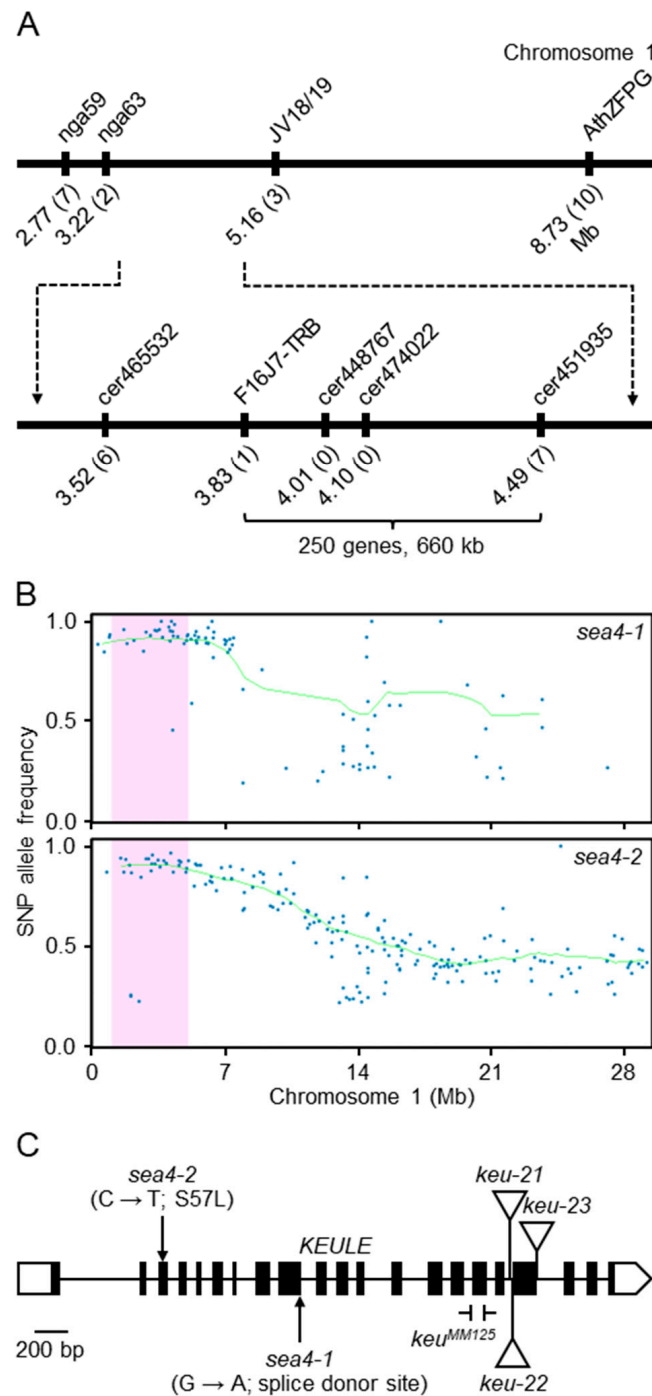


Figure 1. Mapping of the *sea4-1* and *sea4-2* mutations. (A) Analysis of a mapping population of 79 F₂ plants derived from a *sea4-1* × Col-0 cross revealed a candidate interval of 660 kb on chromosome 1 containing 250 genes. The names and physical map positions of the molecular markers used for linkage analysis are shown. The number of recombinant chromosomes found is indicated in parentheses. (B) Plots showing the allele frequency of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) versus positions in a mapping-by-sequencing analysis of the *sea4* mutants performed using Easymap v.2. SNPs are represented as blue dots, the candidate region is shaded in pink, and the average allele frequency (AF) in the test sample of SNPs used for mapping is represented by a green line. (C) Structure of the *KEU* gene showing the nature and positions of the *sea4* and *keu* mutations studied in this work. Boxes and lines between boxes indicate exons and introns, respectively. White boxes represent the 5'- and 3'-UTRs. Triangles indicate the T-DNA insertions in *keu-21*, *keu-22*, and *keu-23*, and the \dashv and \vdash symbols delimitate the deletion in *keu^{MM125}*.

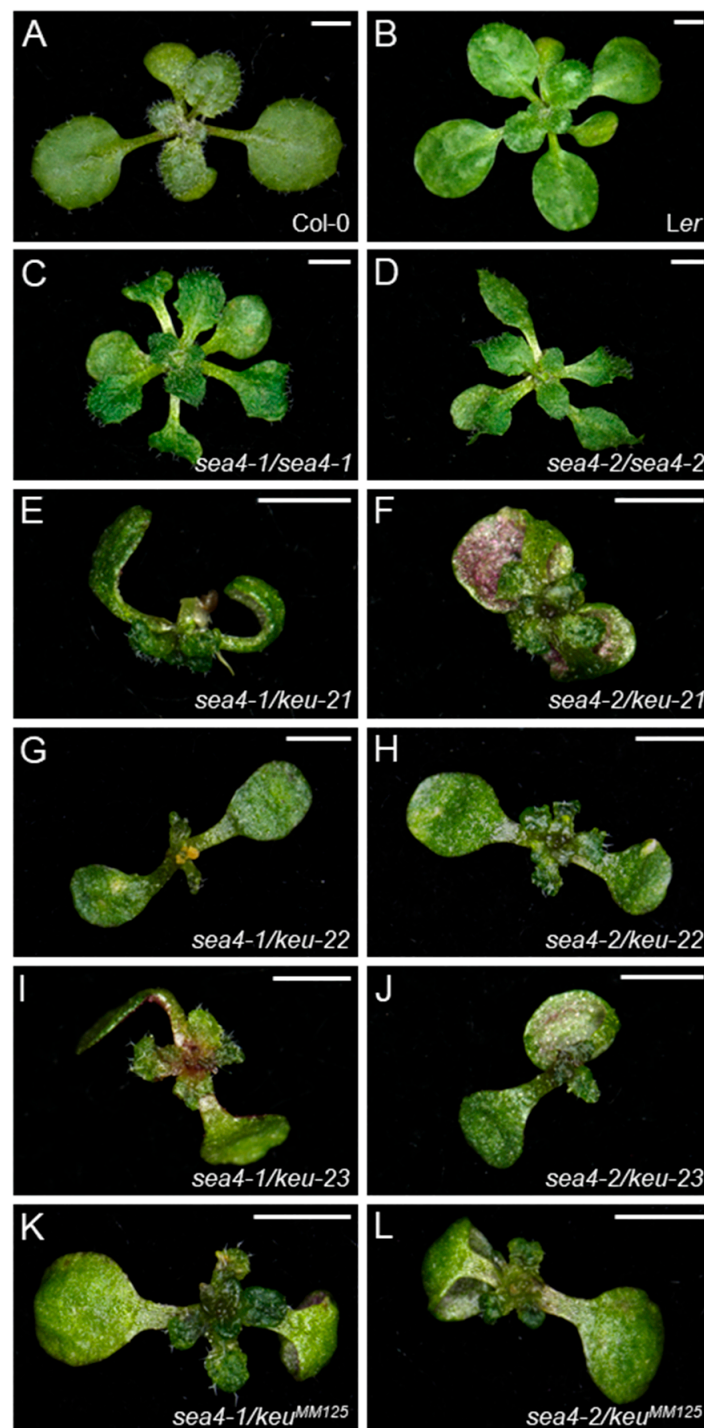


Figure 2. Leaf phenotypes and complementation analysis of the *sea4* and *keu* mutants studied in this work. Rosettes of wild-type (A) Col-0 and (B) Ler, the (C) *sea4-1/sea4-1* and (D) *sea4-2/sea4-2* homozygous mutants, and the (E) *sea4-1/keu-21*, (F) *sea4-2/keu-21*, (G) *sea4-1/keu-22*, (H) *sea4-2/keu-22*, (I) *sea4-1/keu-23*, (J) *sea4-2/keu-23*, (K) *sea4-1/keu^{MM125}*, and (L) *sea4-2/keu^{MM125}* heterozygotes. Photographs were taken 14 das. Scale bars: 2 mm.

2.2. The *sea4-1* Mutation Causes Mis-Splicing of the KEU Pre-mRNA, and *sea4-2* Appears to Perturb the Secondary Structure of the KEU Protein

The Arabidopsis *KEU* gene is expressed throughout the plant, especially in tissues undergoing division. KEU exists in soluble form in the cytoplasm or associates with membranes during cytokinesis. KEU is involved in cytokinesis, but not in cellular elongation.

KEU shares 28–30% identity with its Sec1 orthologs in mammals, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*, and 61% and 65% identity with its Arabidopsis homologs SEC1A and SEC1B, respectively [13].

In *sea4-1*, a G→A transition at the 3' end of the ninth exon of *KEU* damages the splice donor site. In *sea4-2*, a C→T transition in the third exon is predicted to result in an S57L substitution (Figure 1C). Since *sea4-1* is likely to undergo mis-splicing and produce abnormal mRNA and protein products, we conducted RNA-seq analysis of this line, finding that 99.17% of its mature mRNAs retained the ninth intron (Table S4), leading to a premature stop codon. The mutant SEA4-1 protein consists of 302 amino acids, 38 of which are absent from wild-type KEU (Figure S1). The expression level of *KEU* was five times higher in the *sea4-1* mutant than in *Ler*, as indicated by the number of RNA-seq reads aligned to *KEU*, likely to compensate for the near absence of wild-type mRNAs (Table S5).

Alignment of the KEU sequence with its rat STXBP1 ortholog revealed that the *sea4-2* mutation alters one of the amino acids that physically interact with syntaxins (Figure S2; [32]). To assess the impact of this mutation on the structural stability and dynamics of KEU, we used Dynamut and DynaMut2 to predict differences in the unfolding Gibbs free energy ($\Delta\Delta G$) and vibrational entropy energy ($\Delta\Delta S_{\text{vib}}$) between the wild-type and mutant proteins. We obtained the structure of the full-length KEU protein from the AlphaFold Protein Structure Database. However, these two predictors provided conflicting $\Delta\Delta G$ values, suggesting that the S57L substitution does not affect protein stability (Table S6). ENCoM calculated a decrease in flexibility of KEU due to this mutation based on the $\Delta\Delta S_{\text{vib}}$ value (Table S6 and Figure S3). To predict the effects of the S57L substitution on KEU protein structure, we used Missense 3D. This software did not predict any structural damage to KEU, since both residues were exposed to the solvent in a similar manner. However, two hydrogen bonds between S57 and its neighboring residues V53 and K54 were lost (Figure S4), and the cavity volume increased by 24.408 Å³.

2.3. Morphological and Histological Characterization of the *sea4* Mutants

2.3.1. The *sea4* Mutants Exhibit a Pleiotropic Morphological Phenotype

Both *sea4* mutants exhibited wavy leaves with serrated margins and senescent patches (Figure 2). Both *sea4-1* and *sea4-2* displayed phenotypic variability, including varying rates of cotyledon and leaf expansion and variations in the extent of senescent patches (Table S7). A similar phenotypic variability was observed in lethal seedlings carrying other *keu* mutant alleles [28] and reappeared in the progeny of selfed *sea4* plants, regardless of the parental phenotype (Figure S5). Inflorescences of *sea4* plants contained fertile flowers that opened prematurely before complete maturation (Figure S6E,G). Inflorescences of *KEU/keu-21*, *KEU/keu-22*, and *KEU/keu-23* plants were indistinguishable from those of Col-0 (Figure S6I,K,M). However, in inflorescences of heterozygotes of *sea4-1* or *sea4-2* with *keu21*, *keu22*, or *keu23*, only a few flowers opened prematurely. These flowers exhibited short sepals that were separated from each other and had protuberances on their margins, but they remained fertile (Figure S6Q,S,U,W,Y,AA). Inflorescences of *KEU/keu^{MM125}* plants produced a few fertile flowers that began to open slightly before reaching complete maturation (Figure S6O), while heterozygous *sea4/keu^{MM125}* plants did not produce inflorescences, as already mentioned. Taken together, the latter two observations suggest that *keu^{MM125}* is not null; rather, it is an antimorphic allele. Inflorescences of *sea4-1/sea4-2* plants contained fewer flowers than those of homozygous *sea4* mutants, but they exhibited the same phenotypes (Figure S6AC). The height of *sea4-1*, *sea4-2*, and *KEU/keu^{MM125}* plants was reduced compared to *Ler*, whereas *KEU/keu-21*, *KEU/keu-22*, and *KEU/keu-23* plants did not exhibit a significant difference from the wild type. *sea4-1/sea4-2* plants displayed an intermediate height between that of *sea4-1* and *sea4-2* homozygous plants. Heterozygous *sea4/keu* plants were even smaller, and individuals carrying a *sea4-1* allele were smaller than those carrying a *sea4-2* allele, which is consistent with the smaller height observed in *sea4-1* vs. *sea4-2* plants (Figure S7). The primary root length was also reduced in the *sea4* mutants compared to the wild type (Figure S8).

2.3.2. The *sea4* Leaves Have a Dense and Complex Venation Pattern

The presence of serrations in *sea4* leaves pointed to the existence of other alterations in the internal structures of these leaves. To observe possible alterations in the venation pattern, we decolorized cotyledons, first-node leaves, and third-node leaves of *sea4-1* (n = 12) and *sea4-2* (n = 13–15) plants and compared their venation patterns to *Ler* (n = 12–15) (Figure 3). The *sea4-1* cotyledons showed an increased number of terminal veins per unit area compared to *Ler*, whereas *sea4-2* cotyledons were smaller and exhibited increased vein length and bifurcation number per unit area. The first-node leaves of *sea4-1* and *sea4-2* were elongated, smaller, and contained more terminal veins per unit area than *Ler*. Additionally, *sea4-1* first-node leaves displayed increased vein length and bifurcations per unit area compared to *Ler*. The third-node leaves of *sea4-1* and *sea4-2* were smaller, with an increase in terminal veins per unit area compared to *Ler*. In *sea4-2*, the leaves were also elongated and exhibited increased vein length and bifurcations per unit area compared to *Ler* (Table S8). Overall, the cotyledons and leaves of the *sea4* mutants were smaller and elongated compared to the wild type. They showed a higher vein density, and their venation patterns were more complex than wild type, with a greater number of bifurcations and terminal veins per unit area.

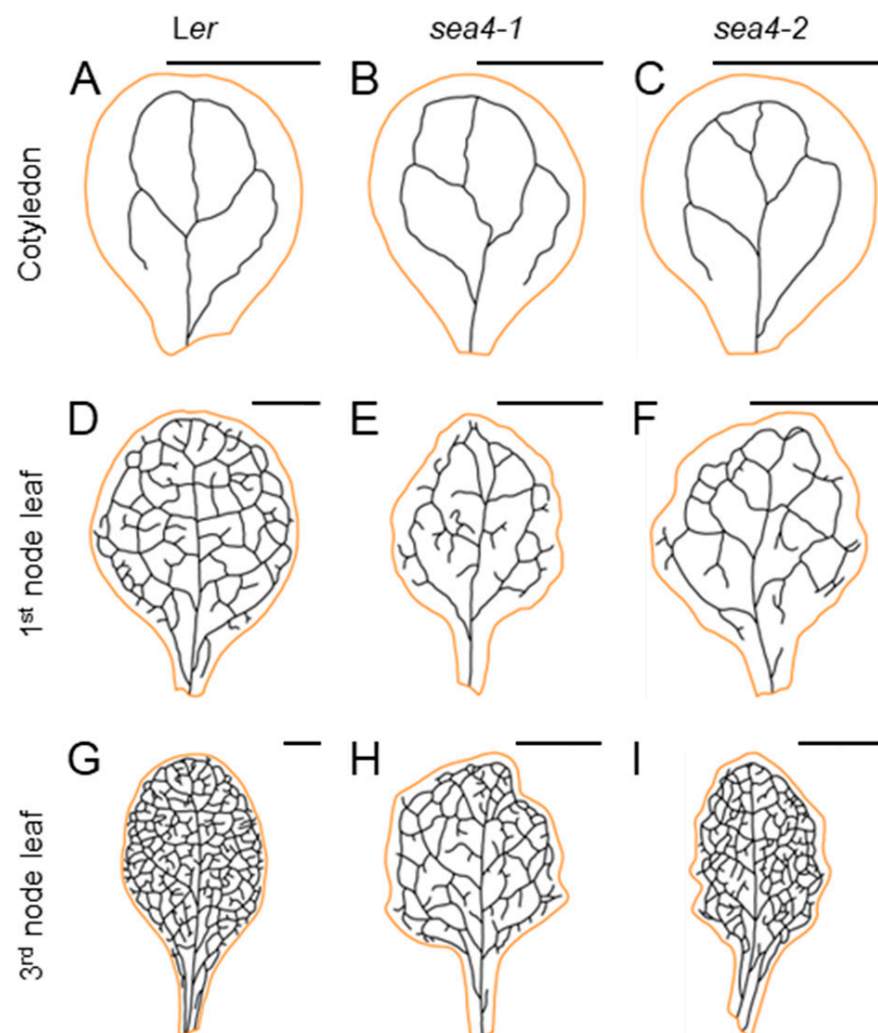


Figure 3. Venation patterns of *sea4-1* and *sea4-2* cotyledons and first- and third-node leaves. Representative diagrams of fully expanded (A–C) cotyledons, (D–F) first-node leaves, and (G–I) third-node leaves from (A,D,G) *Ler*, (B,E,H) *sea4-1*, and (C,F,I) *sea4-2* plants. Margins are drawn in orange and veins in black. The line thickness does not represent the actual thickness of the veins. Cotyledons and leaves were collected 21 das. Scale bars: 2 mm.

2.3.3. *sea4* Leaves Show Aberrant Epidermal and Mesophyll Structure

We obtained transverse sections of third-node leaves from *sea4-1*, *sea4-2*, and *Ler* plants (Figure 4). In the palisade mesophyll of the *sea4* mutants, the cells were generally well organized but were more variable in size compared to *Ler*. Some large cells were interspersed among small cells within the palisade mesophyll. The spongy mesophyll in the *sea4* mutants was disorganized, with very large cells surrounded by small cells arranged in multiple layers. The epidermal cells appeared mostly normal, although protuberances were observed on the surfaces of mutant leaves. These protuberances appeared to result from increased local proliferation or growth of mesophyll cells.

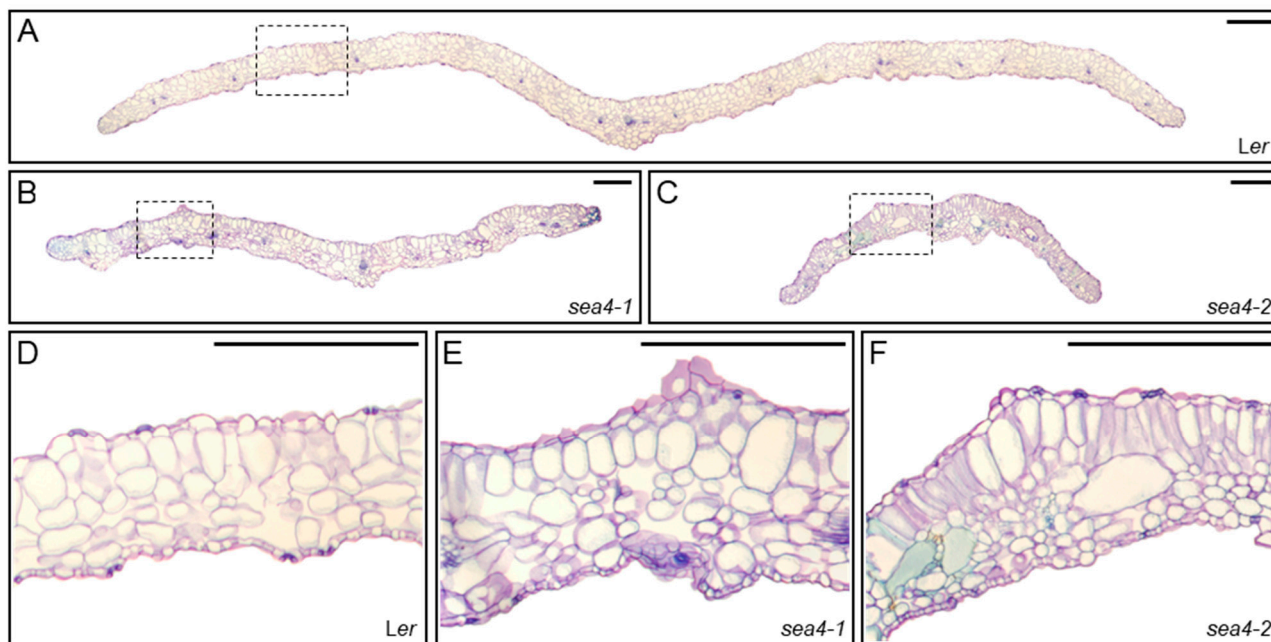


Figure 4. Internal structure of *sea4* third-node leaves. Transverse sections of leaves from (A,D) *Ler*, (B,E) *sea4-1*, and (C,F) *sea4-2* plants stained with toluidine blue. Photographs show (A–C) a complete transverse section of the lamina from margin to margin, and (D–F) the central zone of the lamina between the primary vein and margin, which is marked with a rectangle in (A–C). Photographs were taken 21 das. Scale bars: 1 mm.

We quantified the variation in palisade mesophyll, adaxial epidermis, and abaxial epidermis cells in transverse sections of third- and first-node leaves (Figures 5 and S9). In the palisade mesophyll of the two leaves analyzed, most *sea4* cells were smaller than *Ler* cells, but a small fraction of *sea4* cells were larger. In the epidermis, cells tended to have a similar size, although *sea4* cells had a simpler shape compared to *Ler* cells, with fewer protuberances observed in both first- and third-node leaves.

2.3.4. The *sea4* Mutants Show Early Leaf Senescence and Bolting

A characteristic trait of the *sea4* mutant leaves is the early appearance of senescent patches, which gradually expand until the leaves are completely senescent. To quantify the degree of senescence, we grouped all leaves from *sea4-1* (n = 38), *sea4-2* (n = 45), and *Ler* (n = 44) plants into five phenotypic classes based on their degree of senescence at 25 days after stratification (das; Figure S10). *Ler* plants displayed some senescence in their first four leaves, particularly in the first and second nodes (Figure S10F). *sea4-1* leaves exhibited senescence from the first to eighth nodes (Figure S10G), with all leaves showing more severe senescence compared to *Ler*. Similarly, *sea4-2* plants displayed senescence in their first seven leaves (Figure S10H), with leaves in the first and second nodes exhibiting more severe senescence than *Ler*. In conclusion, *sea4* plants demonstrated a more pronounced state

of senescence in their initial leaves compared to the wild type and exhibited senescence starting from the fifth-node leaves onwards, which was not observed in *Ler*.

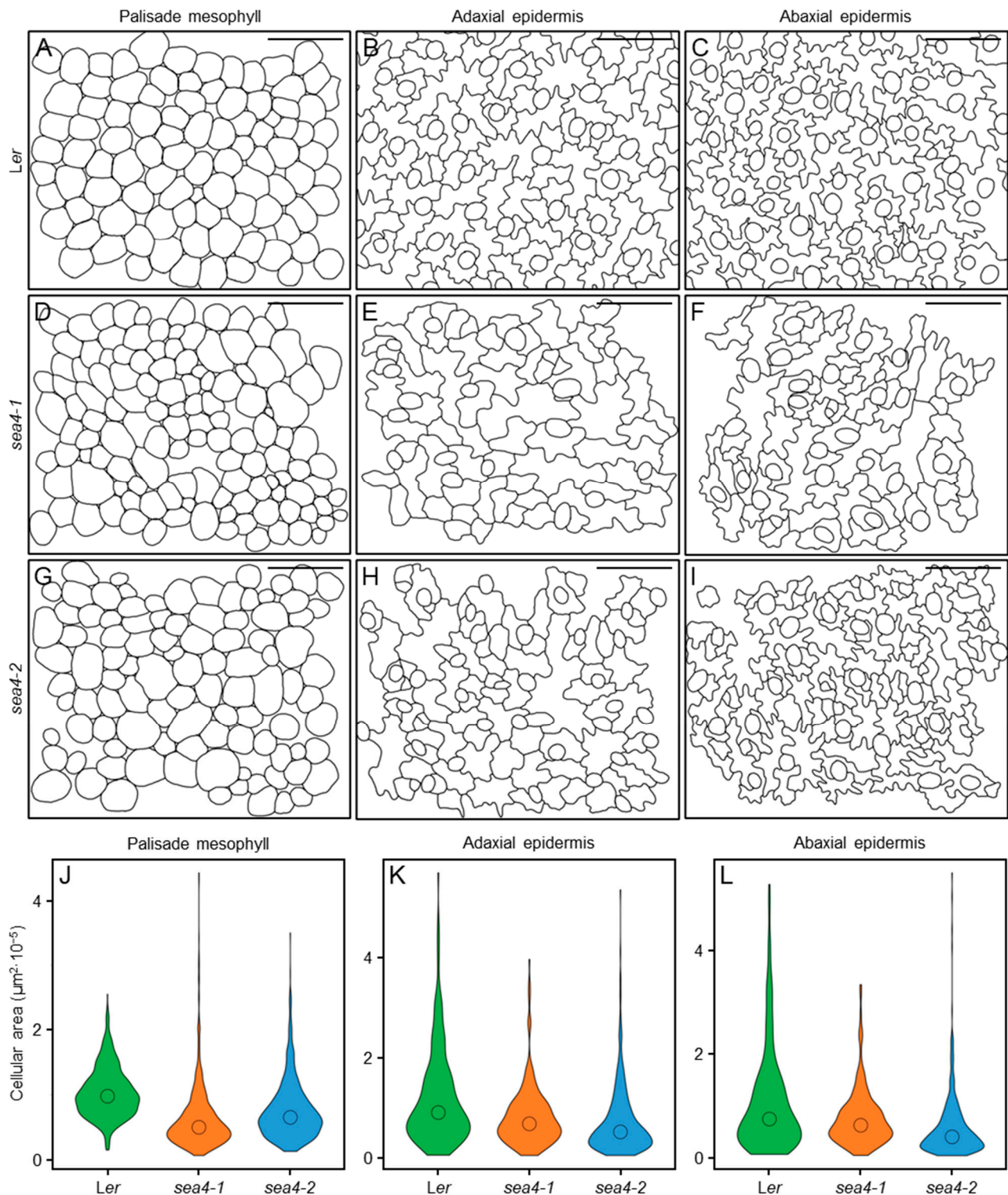


Figure 5. Structure of the cell layers in third-node leaves of the *sea4* mutants. (A–I) Diagrams of cells from the (A,D,G) palisade mesophyll, (B,E,H) adaxial epidermis, and (C,F,I) abaxial epidermis of (A–C) *Ler*, (D–F) *sea4-1*, and (G–I) *sea4-2* plants. Leaves were collected 21 das. Scale bars: 20 μm . (J–L) Violin plots representing the distribution of cell sizes in the (J) palisade mesophyll ($n = 742\text{--}982$), (K) adaxial epidermis ($n = 262\text{--}424$), and (L) abaxial epidermis ($n = 214\text{--}490$). The median is represented with a circle.

Senescence appeared earlier in *sea4* than in the wild type. The first signs of senescence appeared ~14 das in *sea4-1* (n = 95) and *sea4-2* (n = 96) plants and ~21 das in *Ler* (n = 79; Figure S11A). The early onset of senescence was consistent across different phenotypic classes in the *sea4* mutants (Figure S11A) and occurred at the same time in both *sea4-1* and *sea4-2* (Figure S11C). Only *sea4-2* exhibited a significant reduction in bolting time compared to *Ler* (Figure S11B). When considering the phenotypic classes of the *sea4* mutants, there was a positive correlation between leaf mutant phenotype severity and an increase in bolting time (Figure S11B).

2.4. Double Mutant Combinations of *sea4* Alleles and Alleles of Genes Encoding Proteins Required for Membrane Fusion Show Defects in Leaf Development

As the *sea4* mutants carry the first known viable alleles of *KEU*, we combined them with alleles of other genes involved in membrane fusion to characterize their genetic interactions in adult plants. *SEC1B* is a *KEU* homolog in Arabidopsis that is expressed at very low levels, but its overexpression rescued the phenotype of *keu* mutants [31]. We obtained two lines, *sec1b-1* and *sec1b-2*, carrying T-DNA insertions interrupting *SEC1B* in the twelfth intron and first exon, respectively (Figure S12A), and showing a wild-type phenotype as homozygotes (Figure 6E,F). The *sea4 sec1b-1* double mutants displayed small rosettes with small, highly serrated leaves. The *sea4 sec1b-2* double mutants were very small, exhibited fully expanded cotyledons, and lacked true leaves, instead showing small protuberances emerging from the shoot apical meristem (Figure 6L–O).

SEC6 encodes a protein that is part of the exocyst complex, which colocalizes with *KEU* in the cellular plate [33]. We also obtained the lines *sec6-2* and *sec6-3*, carrying T-DNA insertions in the 23rd and 26th exons of *SEC6*, respectively (Figure S12B), which presented a wild-type phenotype as homozygotes (Figure 6G,H). The *sea4-1 sec6-2* and *sea4-1 sec6-3* double mutants displayed a reduced size with small, wavy, heavily serrated leaves, and *sea4-2 sec6-2* and *sea4-2 sec6-3* exhibited a small size, with their leaves showing minimal or no development (Figure 6P–S).

We also crossed the *sea4* mutants with lines carrying mutations in genes encoding syntaxins: *SYP21*, *SYP132*, and *KNOLLE*. *SYP21* encodes a syntaxin localized to the vacuole and multivesicular bodies that physically interacts with *KEU* [23]. The *syp21* line carries a T-DNA insertion in the fourth exon of *SYP21* (Figure S12C); homozygous plants were phenotypically wild type (Figure 6I). The *sea4 syp21* double mutants displayed small rosettes with small, highly serrated leaves (Figure 6T–U). *SYP132* encodes a syntaxin that physically interacts with *KEU* during cytokinesis and with *SEC1B* in the general secretory pathway [31]. The *syp132^T* line carries a T-DNA insertion in the 5' UTR of *SYP132* (Figure S12D); homozygous plants displayed a wild-type phenotype (Figure 6J). The *sea4-1 syp132^T* double mutants exhibited reduced rosette size, with small, serrated leaves. The *sea4-2 syp132^T* double mutants showed poorly developed leaves and protuberances emerging from the apical shoot meristem (Figure 6V,W). *KNOLLE* encodes a syntaxin that plays a crucial role in cytokinesis, physically interacting with *KEU* at the cell plate [13,23,31]; this protein accumulated in previously studied *keu* mutants [34]. The *kn^{X37-2}* mutation is a 1 kb deletion that partially removes the *KN* gene (Figure S12E). Homozygous plants for this deletion were lethal, and heterozygous individuals exhibited small rosettes comprising fully expanded cotyledons and very small epinastic leaves that sometimes showed undulations (Figure 6K). The *sea4/sea4;KN/kn^{X37-2}* sesquimutants exhibited a phenotype similar to that of the *KN/kn^{X37-2}* heterozygotes, but their leaves were better developed, larger, and displayed undulations and serrations (Figure 6X,Y).

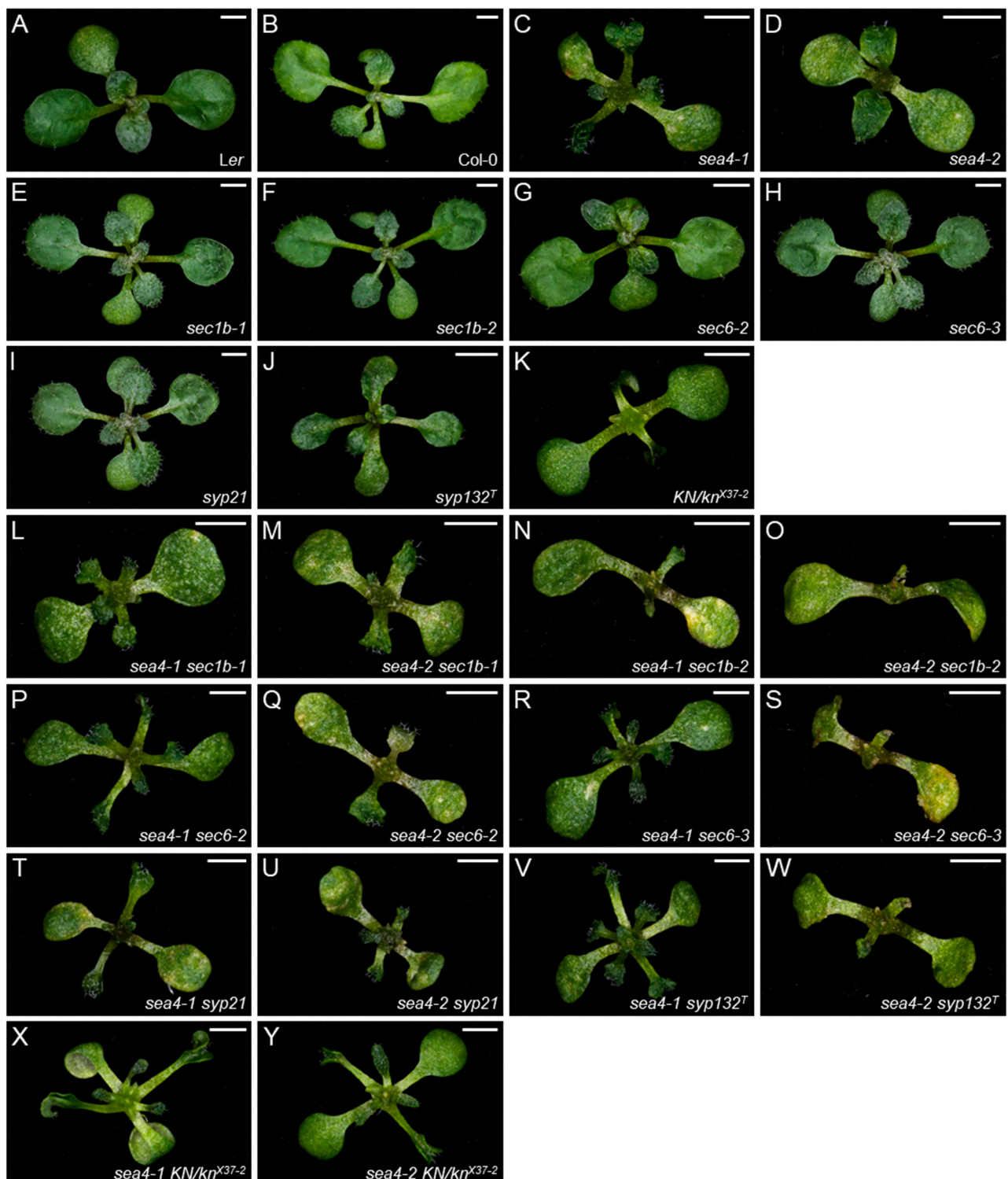


Figure 6. Leaf phenotypes of double mutant combinations between the *sea4* mutant alleles and mutations in genes involved in membrane fusion. Rosettes of wild-type (A) *Ler* and (B) *Col-0*; the (C) *sea4-1*, (D) *sea4-2*, (E) *sec1b-1*, (F) *sec1b-2*, (G) *sec6-2*, (H) *sec6-3*, (I) *syp21*, (J) *syp132^T*, and (K) *KN/kn^{X37-2}* mutants; (L,M) *sea4 sec1b-1*, (N,O) *sea4 sec1b-2*, (P,Q) *sea4 sec6-2*, (R,S) *sea4 sec6-3*, (T,U) *sea4 syp21*, and (V,W) *sea4 syp132^T* double mutants; and (X,Y) the *sea4 KN/kn^{X37-2}* sesquimutants. Photographs were taken 14 das. Scale bars: 2 mm.

2.5. *sea4* Leaves Show Increased Endoreduplication

Embryos of previously described *keu* mutants display multi-nucleate cells; these nuclei aggregate in an enlarged nucleus in seedlings [28]. To investigate whether adult plant cells exhibit the same phenotype, we conducted flow cytometry analysis of the first pair of leaves from the *sea4* mutants. As a positive control, we included *den5-1*, which carries a point mutation in *RPL7B* (encoding a ribosomal 60S subunit protein) and shows alterations in ploidy [35]. Flow cytometry revealed a decrease in populations of cells with lower ploidy levels (2C, 4C and 8C) and an increase in cell populations with higher ploidy levels (16C, 32C, 64C, and 128C; Figure S13). These altered ploidy levels were more pronounced in *sea4-1* than in *sea4-2*, which is consistent with the more severe morphological and histological phenotypes of *sea4-1* (Table S9). An increase in ploidy usually correlates with enlarged cell size [36], but we did not observe this in the *sea4* mutants. Only a small subset of cells in the mutants were enlarged, and most were smaller than the wild type. Therefore, the increase in ploidy levels in cells of adult leaves can be more likely attributed to the aggregation of nuclei in cells unable to complete cytokinesis, as observed in previous studies on *keu* lethal seedlings.

2.6. Genes Related to Protein Folding, the Degradation of Misfolded Proteins, and Plant Immunity Are Upregulated in the *sea4* Mutants

To determine whether the *sea4* mutations affect biological processes beyond cytokinesis, we conducted RNA-seq analysis of *Ler*, *sea4-1*, and *sea4-2* rosettes collected 14 das. In *sea4-1*, we identified 3812 upregulated and 3824 downregulated genes (Figure S14A and Data Set S1A). In *sea4-2*, we identified 4091 upregulated and 4034 downregulated genes (Figure S14B and Data Set S1B). We classified the differentially expressed genes in *sea4-1* and *sea4-2* by GO (Data Set S2) and KEGG pathway (Data Set S3) analyses separately for upregulated and downregulated genes.

Many upregulated genes in the *sea4* mutants were related to protein folding and the degradation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER). Most genes involved in the Sec-dependent protein export pathway, including all those encoding the translocation channel responsible for transporting newly synthesized proteins into the ER (protein export [KEGG:ath03060]), were upregulated in the mutants. Genes related to glycosylation, protein folding, labeling of misfolded proteins, ER-associated degradation, and the unfolded protein response (UPR) were also upregulated in the mutants (protein processing in endoplasmic reticulum [KEGG:ath04141]). Additionally, most genes encoding the 19S regulatory particle and all genes encoding the 20S proteolytic core particle of the proteasome were upregulated in the mutant, as was the gene encoding the PA200 regulatory particle, which stimulates the proteasomal hydrolysis of peptides (proteasome [KEGG:ath03050]). The glycosylation of newly synthesized peptides was also affected in the mutants, as evidenced by the upregulation of genes related to glycan biosynthesis and the oligosaccharyltransferase (OST) complex, which attaches glycan to peptides at the cytoplasmic face of the ER membrane. Furthermore, some genes involved in modifying glycans within the ER showed increased expression in the mutants (N-glycan biosynthesis [KEGG:ath00510]; various types of N-glycan biosynthesis [KEGG:ath00513]; other types of O-glycan biosynthesis [KEGG:ath00514]).

Other upregulated genes in the *sea4* mutants are related to plant immunity (plant-pathogen interaction [KEGG:ath04626]; MAPK signaling pathway-plant [KEGG:ath04016]; immune response [GO:0006955]; regulation of defense response [GO:0031347]). Among genes involved in pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity, most genes of the MAPK signaling pathways triggered by pathogen infection showed increased expression in the mutants (response to bacterium [GO:0009617]; response to fungus [GO:0009620]), leading to the production of ethylene, H₂O₂, and cell death (cell death [GO:0008219]). Other genes involved in MAPK signaling pathways triggered by ethylene, reactive oxygen species (ROS), salt, cold, and wounding were also upregulated in the mutants (regulation of response to stress [GO:0080134]; response to wounding

[GO:0009611]). Among genes associated with effector-triggered immunity, certain genes associated with the hypersensitive response (HR) to pathogen virulence proteins were upregulated in the mutants, whereas *FIDDLEHEAD* (*FDH*), which encodes a putative 3-ketoacyl-CoA synthase and suppresses HR and defense responses via very-long-chain fatty acids, was downregulated. Genes involved in glucosinolate biosynthesis from methionine and aromatic amino acids, which are defense compounds in plants, were also upregulated in the mutant (glucosinolate biosynthesis [KEGG:ath00966]). Genes in the metabolic pathway of glutathione, which functions as an antioxidant against ROS, were differentially expressed in both *sea4* mutants (glutathione metabolism [KEGG:ath00480]); and genes in the synthesis pathway of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol, which are also antioxidants, were downregulated in the *sea4-1* mutants (ubiquinone and other terpenoid–quinone biosynthesis [KEGG:ath00130]).

Most genes encoding the key enzymes of the tricarboxylic acid cycle were also upregulated in the *sea4* mutants (citrate cycle [KEGG:ath00020]). Additionally, several metabolic pathways responsible for producing important metabolites in plants were upregulated in the mutants. These include the pathway that synthesizes indole-3-acetic acid from tryptophan (tryptophan metabolism [KEGG:ath00380]), the pathway that produces jasmonate from phosphatidylcholine (alpha-linolenic acid metabolism [KEGG:ath00592]), the pathway that releases abscisic acid from abscisic acid glucose ester (carotenoid biosynthesis [KEGG:ath00906]), and the pathway that produces monolignols used in lignin biosynthesis (only in *sea4-2*; phenylpropanoid biosynthesis [KEGG:ath00940]).

2.7. Genes Related to Photosynthesis and the Production of Various Metabolites Are Downregulated in the *sea4* Mutants

Among the downregulated genes in the *sea4* mutants, many are related to photosynthetic processes (photosynthesis [GO:0015979]; photosynthesis, light reaction [GO:0019684]). Most genes encoding proteins of the F-type ATPase, photosystem I, and photosystem II (photosystem II assembly [GO:0010207]), and all genes encoding proteins of the photosynthetic electron transport chain and the light-harvesting chlorophyll complex (LHC) I and II, were downregulated in the mutants (photosynthesis [KEGG:ath00195]; photosynthesis–antenna proteins [KEGG:ath00196]; photosynthesis, light harvesting [GO:0009765]; photosynthetic electron transport chain [GO:0009767]). Furthermore, pathways responsible for the production of chlorophyll *a/b* and bacteriochlorophyll *a/b* from L-glutamate (porphyrin and chlorophyll metabolism [KEGG:ath00860]; chlorophyll biosynthetic process [GO:0015995]; chlorophyll metabolic process [GO:0015994]); as well as alpha/beta-carotene (carotenoid biosynthesis [KEGG:ath00906]), which are essential for photosynthesis, were also downregulated in the mutants. Additionally, genes encoding proteins involved in chlorophyll degradation were upregulated (porphyrin and chlorophyll metabolism [KEGG:ath00860]; porphyrin-containing compound metabolic process [GO:0006778]). In *sea4-1*, most genes of the synthesis pathways of phyloquinone, a photosystem I cofactor, and menaquinone, an electron transport chain component, were downregulated as well (ubiquinone and other terpenoid–quinone biosynthesis [KEGG:ath00130]). Most genes of the Calvin cycle (carbon fixation in photosynthetic organisms [KEGG:ath00710]), as well as the entire pathway that converts guanosine triphosphate (GTP) into flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD), were also downregulated (riboflavin metabolism [KEGG:ath00740]).

Other downregulated genes in the *sea4* mutants are related to amino acid metabolism. Genes encoding proteins involved in the conversion of glycine to glyoxylate, serine to pyruvate, and aspartate to threonine were downregulated in the mutants, although the pathway responsible for transforming serine into tryptophan was upregulated (glyoxylate and dicarboxylate metabolism [KEGG:ath00630]; glycine, serine, and threonine metabolism [KEGG:ath00260]). The pathway involved in converting aspartate to lysine was also downregulated in *sea4-2* (lysine biosynthesis [KEGG:ath00300]). Furthermore, most genes involved in the biosynthesis and degradation of valine, leucine, and isoleucine were down-

regulated (valine, leucine, and isoleucine biosynthesis [KEGG:ath00290]; valine, leucine, and isoleucine degradation [KEGG:ath00280]). Most genes involved in the biosynthesis of aminoacyl-tRNA, which is used by ribosomes for protein assembly, were also downregulated in the mutants (aminoacyl-tRNA biosynthesis [KEGG:ath00970]).

Lastly, genes in the pathways that interconvert alpha-D-glucose-1P, pyruvate, and acetyl-CoA were downregulated in both *sea4* mutants (glycolysis/gluconeogenesis [KEGG:ath00010]; pentose phosphate pathway [KEGG:ath00030]; pyruvate metabolism [KEGG:ath00620]). In *sea4-1*, the pathway responsible for interconverting alpha-D-glucose-1P and starch was also downregulated (starch and sucrose metabolism [KEGG:ath00500]). In addition, fatty acid metabolism was downregulated in the *sea4* mutants (fatty acid metabolism [KEGG:ath01212]). In *sea4-1*, some genes in the pathway involved in the transformation of acetyl-CoA into malonyl-[acp], as well as most genes related to the elongation pathway, were downregulated (fatty acid biosynthesis [KEGG:ath00061]). In *sea4-2*, genes involved in the biosynthesis of long-chain fatty acids, which are essential for cutin and wax biosynthesis, as well as most genes of the pathway that produces biotin from malonyl-[acp], were also downregulated in the mutant (fatty acid elongation [KEGG:ath00062]; biotin metabolism [KEGG:ath00780]).

2.8. The *sea4* Mutants Exhibit Altered Auxin Accumulation but Normal PIN1 Distribution

In our RNA-seq analysis, both *sea4* mutants exhibited upregulation of genes related to the biosynthesis of indole-3-acetic acid. As the production and distribution of this hormone contribute to leaf shape in Arabidopsis [37], we studied its spatial distribution in the *sea4* mutants. We crossed *sea4-1* and *sea4-2* plants to the *PIN1_{pro}:PIN1:GFP* transgenic line [38], which serves as a reporter for the PIN-FORMED1 (PIN1) auxin efflux carrier. Additionally, we crossed the *sea4* mutants to the *DR5rev_{pro}:GFP* transgenic line [39], harboring *GFP* driven by the auxin-responsive synthetic promoter *DR5rev*.

In Col-0 leaf primordia, the *PIN1_{pro}:PIN1:GFP* signal was detected in the basal region where protrusions were forming (Figure S15A–D). In the *sea4* mutants, the spatial distribution of the *PIN1_{pro}:PIN1:GFP* signal was similar but more confined to the primordial margins. The GFP signal intensity was also weaker, particularly in *sea4-1* (Figure S15E–L). No difference in PIN1 distribution in the cells forming the primordial protrusions was observed between the *sea4* mutants and the wild type (Figure S16). The *DR5rev_{pro}:GFP* signal was detected at the auxin maxima that formed in the margin protrusions and at the apex of Col-0 primordia, as well as in developing veins (Figure 7A–D). However, while the *DR5rev_{pro}:GFP* signal showed the same spatial distribution in the basal region of *sea4-1* primordia as in Col-0, in the apical region of the primordia, the signal was present throughout the margin (Figure 7E–H). This change was even more pronounced in *sea4-2* primordia, with the *DR5rev_{pro}:GFP* signal detected in some areas of the margin in the basal region of the primordia and in all epidermal cells of the apical region (Figure 7I–L), indicating substantial auxin accumulation. The distribution of auxin within the cells also appeared to differ. While in Col-0, the *DR5rev_{pro}:GFP* signal was relatively uniform in the cytoplasm (Figure S17A), in the *sea4* mutants, this signal was only detected near the cytoplasmic membrane (Figure S17B,C).

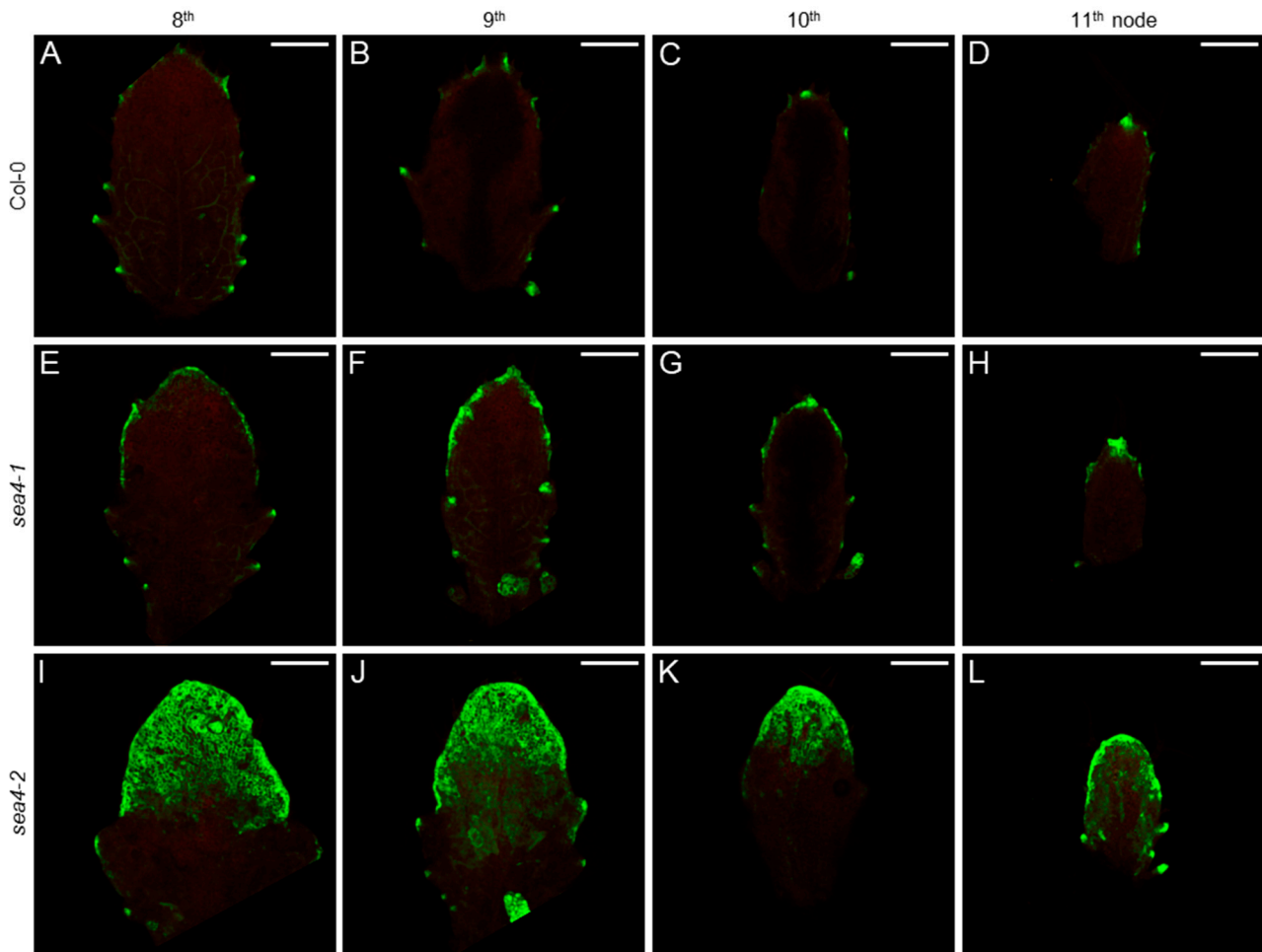


Figure 7. Expression pattern of the *DR5rev_{pro}:GFP* reporter in leaf primordia of the *sea4* mutants (20×). The visualization of *DR5rev_{pro}:GFP* (green) expression in leaf primordia from successive nodes (8th–11th) is shown for (A–D) Col-0, (E–H) *sea4-1*, and (I–L) *sea4-2* plants. Chlorophyll autofluorescence is shown in red. The primordia were collected 20 das. Scale bars: 0.2 mm.

As primary root length is reduced in the *sea4* mutants, we also studied the spatial distribution of auxin in the apical root meristem using the *PIN1_{pro}:PIN1:GFP* and *DR5rev_{pro}:GFP* reporters. The *PIN1_{pro}:PIN1:GFP* signal localized to the center of the root in both Col-0 and the *sea4* mutants, but its intensity was weaker in the mutants, particularly in *sea4-1* (Figure S18). The distribution of PIN1 along the cytoplasmic membrane of the root cells was similar in the *sea4* mutants and Col-0. However, the cell divisions in the *sea4* mutants were poorly oriented, as evidenced by the *PIN1_{pro}:PIN1:GFP* signal, which was more apparent in *sea4-1* root cells (Figure S19). The accumulation of auxin, as indicated by the *DR5rev_{pro}:GFP* signal, exhibited the same spatial distribution in the *sea4* mutants as in Col-0. However, the intensity of the signal was lower in the mutants, suggesting that auxin levels were reduced at the root tip (Figures S20 and S21).

3. Discussion

3.1. *sea4-1* and *sea4-2* Are the First Viable Recessive Alleles of *KEU*

Vesicle fusion is a key process in plant cytokinesis. The accurate fusion of vesicles in the appropriate orientation ultimately determines the capacity of plant tissues to grow and differentiate correctly. The presence of the KEU protein at the division plane enables the formation of *trans*-SNARE complexes between adjacent vesicles, resulting in the formation of the cell plate [23]. Without the activity of these complexes, vesicles fuse randomly, leading to improperly oriented cytokinesis or even preventing cytokinesis altogether [28].

This is why all previously identified null *keu* mutants suffer failed cytokinesis and seedling lethality. In this study, we investigated the *sea4-1* and *sea4-2* mutants, the first known hypomorphic alleles of *KEU*, which allowed for us to explore the effects of *KEU* gene alteration in adult plants.

The T-DNA insertional lines we studied, in which the *KEU* gene is interrupted at the 17th intron (*keu21*), or 18th exon (*keu22* and *keu23*), and the *keu^{MM125}* mutant, which has a 100 bp deletion in the 16th exon, are homozygous lethal. We would expect the same outcome for the *sea4-1* mutant allele, because its transcript encodes a SEA4-1 mutant protein that is even shorter. The viability of the *sea4-1* mutant allele likely results from the combination of two factors: the small percentage of mRNA transcripts that are correctly spliced at the 9th intron and its overexpression. Together, these factors result in the expression of normal mRNA in *sea4-1* at approximately 4% of the level found in wild-type Col-0. This limited expression appears to be sufficient to allow for enough vesicle fusion at the division plane during cytokinesis, allowing for the plant to complete its lifecycle.

The viability of the *sea4-2* mutant allele can be explained by the observation that the S57L substitution that it causes does not significantly alter the structure of KEU. This mutation reduces the flexibility of the protein and replaces only 1 of the 41 amino acids known to physically interact with syntaxins [32]. Altogether, the *sea4-2* mutation appears to reduce the capacity of KEU to interact with syntaxins and form *trans*-SNARE complexes between adjacent vesicles, but it does not entirely disrupt its function.

3.2. In the *sea4* Mutants, Defects in Cytokinesis Seem to Reduce Cell Wall Integrity and Activate the Unfolded Protein Response

The viability of our hypomorphic alleles of *KEU* allowed for us to investigate their genetic interactions with related genes: those encoding its homolog SEC1B, the exocyst component SEC6, and the syntaxins SYP21, SYP132, and KN. Except for *KN*, the T-DNA insertional lines for the other genes were phenotypically wild type when homozygous. However, all their double mutant combinations with *sea4* mutations exhibited a synergistic phenotype that was quite similar: plants with fully expanded cotyledons but leaves that failed to develop correctly. These leaves produced small protuberances emerging from the shoot apical meristem and tiny, highly serrated leaves. Surprisingly, the *sea4/sea4;KN/kn^{X37-2}* sesquimutants exhibited leaves that, while wavy and serrated, were more developed than *KN/kn^{X37-2}* leaves.

Previous studies have indicated that the *keu* mutants display some degree of polyploidy at the lethal seedling stage [28]. We confirmed that this trait persists in adult *sea4* plants, with *sea4-1* showing more pronounced polyploidy. Higher ploidy levels typically correlate with altered levels of gene expression [40], which we also observed in the *sea4* mutants. The transcriptomic profiles of the *sea4* mutants exhibit the typical alterations in gene expression observed in mutants with the so called reduced cell wall integrity: alterations in the structural and functional stability of the cell wall, such as those caused by changes in its cellulose, pectin, or hemicellulose content, or by wall damage by external causes, which lead to modifications in cellular metabolism that regulate cell cycle progression. Some examples of mutants with reduced cell wall integrity are *irregular xylem1* (*irx1*), *irx3*, *irx5*, and *isoxaben resistant1* (*ixr1*), which carry alleles of the CELLULOSE SYNTHASE A8 (*CESA8*), *CESA7*, *CESA4*, and *CESA3* genes, respectively; *powdery mildew-resistant5* (*pmr5*) and *pmr6*, mutated at the *PMR5* and *PMR6* genes, respectively, which encode two pectate lyases that depolymerize pectin; *de-etiolated3* (*det3*) and *alpha-xylosidase1-2* (*xy11-2*), mutated at the *DET3* and *XYL1* genes, respectively, encoding proteins that modify hemicelluloses; and *walls are thin1* (*wat1*), a mutant of the *WAT1* gene, which encodes a membrane transporter and exhibits reduced secondary wall thickness [41]. Immunity is activated in reduced cell wall integrity mutants. Indeed, the *sea4* mutants showed activation of PAMP- and effector-triggered immunity, increased activity of MAPK signaling pathways, and an increase in the biosynthesis of glucosinolate defense compounds. Other effects of reduced cell wall integrity include an increase in jasmonate [42] and lignin biosynthesis [43], as also observed

in the *sea4* mutants. The main pathway through which cell wall integrity seems to regulate cell division is via nitric oxide (NO) production, a process that triggers the degradation of cytokinin [44]. NO also plays a crucial role in preserving auxin sensitivity in Arabidopsis root tips [45]. Mutants affected in genes involved in NO biosynthesis, such as *NITRIC OXIDE SYNTHASE1* (*NOA1*), *NITRATE REDUCTASE1* (*NIA1*), and *NIA2*, exhibit shorter roots than the wild type. In these mutants, the distribution of PIN1 is similar to that of the wild type, but the expression of *DR5_{pro}:GUS* is reduced [45]. In the *sea4* mutants, *NOA1*, *NIA1*, and *NIA2* were downregulated, resulting in a similar root phenotype. Notably, *sea4* primordia maintained the same PIN1 distribution as Col-0, but *DR5_{revpro}:GFP* expression significantly increased. This difference may be attributed to the strong upregulation of the metabolic pathway responsible for synthesizing indole-3-acetic acid in the *sea4* mutants. This upregulation could potentially compensate for the reduced auxin sensitivity caused by the deficit in NO biosynthesis.

Defects in cytokinesis have been shown to induce the UPR, which in turn increases the activity of the ER to overcome these defects [46]. One of the principal proteins initiating the UPR pathway is INCREASED ORGAN REGENERATION1 (*IRE1*); our RNA-seq data show that *IRE1* was upregulated in the *sea4* mutants. An increase in ER activity was also observed, with higher activities of enzymes that glycosylate proteins, transport them within the ER, and fold proteins. Genes encoding ubiquitination enzymes for misfolded proteins and the proteasome were also upregulated in the mutants, which reinforces the hypothesis of UPR activation. A possible explanation for the increase in proteolysis is that the cell detects the accumulation of vesicles and proteins in the division plane and increases the degradation of newly synthesized proteins related to cytokinesis. This explanation would also account for the reduced metabolism of some amino acids, aminoacyl-tRNA biosynthesis, and biosynthesis and elongation of fatty acids, as all these components are necessary for cytokinesis and may be in excess.

Photosynthetic light harvesting and carbon fixation were also significantly affected in the *sea4* mutants. Numerous genes encoding proteins of Light-Harvesting Complex I (LHCI) and II, photosystems I and II, the F-type ATPase, and the electron transport chain were downregulated in the mutants. Additionally, enzymes involved in the metabolic pathways that synthesize chlorophyll *a* and *b* and alpha- and beta-carotene were downregulated, as were enzymes responsible for carbon fixation in the Calvin cycle. A relationship between defects in cytokinesis or reduced cell wall integrity and the decrease in photosynthetic processes has not been previously observed. Perhaps due to their extended duration of cytokinesis, *sea4* cells remain in the M phase of the cell cycle for a longer period, leading to a reduced requirement for carbohydrate compounds. The abovementioned downregulation might also be an early sign of senescence.

3.3. Other Phenotypic Effects of the Altered Cytokinesis Caused by the *sea4* Mutations

The phenotypes observed in the *sea4* mutants seem to be a direct consequence of their molecular alterations. The *sea4* mutations lead to defects in cytokinesis with some degree of variability, a phenomenon previously observed in other *keu* mutants [28]. This variability is visible at the tissue level, where palisade mesophyll cells vary in size, and epidermal cells cannot reach the same degree of shape complexity as in the wild type. Cells of improper size disrupt tissue organization, which is also evident in the spongy mesophyll, causing non-uniform leaf thickness and resulting in bulges. This effect can also be observed in petals, leading to premature flower opening. Disruption of internal tissue organization may also affect the boundary between dorsal and ventral leaf tissues, influencing the production and distribution of mobile signals that shape lamina growth [47]. However, it is not clear that alterations in the cell division plane are responsible for the serrations in *sea4* leaves. The Arabidopsis *Ing1-1D* mutant of *TRM1* have leaves with serrated margins [48], but in the maize (*Zea mays*) *tan-1* mutant, there is no direct correlation between the orientation of cell divisions and the final shape of the leaf [5]. This is because cell divisions take place after cell elongation, which primarily determines leaf shape. Nonetheless, alterations in the

cell division plane could be the cause of the reduced leaf size in the *sea4* mutants, a trait that was also observed in the *tan-1* mutant.

Although the distribution of the polar auxin transporter PIN1 remains unaltered in *sea4* leaves, the upregulation of genes in the auxin biosynthetic pathway leads to the excess accumulation of auxin, which diffuses into regions where it should not be. This ectopic auxin distribution appears to be responsible for the serrations observed in *sea4* leaves. Moreover, the presence of auxin maxima during primordia development has been linked to vascular tissue development [49,50]. The altered auxin maxima in the *sea4* mutants likely accounts for their denser and more complex vascular pattern. Reduced sensitivity to auxins in the root apical meristem via NO appears to be the reason for reduced root length. This phenomenon likely also occurs in the shoot apical meristem, explaining the observed reduction in plant height.

Premature leaf senescence is another characteristic trait of the *sea4* mutants. Genes related to plant immunity and MAPK signaling pathways are upregulated in these mutants due to a reduction in CWI. This activation triggers defense responses and, in some cases, cell death. Consequently, regions of the leaves with a high number of dead cells may form the senescent patches observed in these mutants. Defects in cytokinesis accumulate in each leaf over time and more mitotic events occur, explaining why younger leaves do not exhibit as many senescent patches as older leaves.

4. Material and Methods

4.1. Plant Materials, Growth Conditions, and Crosses

The *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. wild-type accessions Landsberg *erecta* (*Ler*) and Columbia-0 (*Col-0*), along with the *keu-21* (SALK_101874C; N661055), *keu-22* (SALK_085463; N585463), *keu-23* (SALKseq_089213; N589213), *sec1b-1* (GK-601G09; N457681; previously named *sec1b* in Karnahl et al. [31]), *sec1b-2* (GK-283F10; N427142), *syp21* (SAIL_580_C04; N875090), *syp132^T* (SAIL_403_B09; N818666), *sec6-2* (SALK_072337C; N660954), and *sec6-3* (SALK_100970; N600970) mutants, were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC, Nottingham, UK). The *keu^{MM125}* and *kn^{X37-2}* lines [31] were kindly provided by Prof. Gerd Jürgens. The *sea4-1* and *sea4-2* lines were isolated in the *Ler* background after EMS mutagenesis in our laboratory. Subsequently, they were backcrossed twice to *Ler* [29]. Unless otherwise specified, all the mutants mentioned in this work are homozygous for the indicated mutations. Seed sterilization and sowing, plant culture, crosses, and allelism tests were conducted as previously described [29,51,52].

4.2. Positional Cloning and Molecular Characterization of the *sea4* Mutant Alleles

Genomic DNA extraction was carried out as previously described [53]. The *sea4-1* and *sea4-2* mutations were initially mapped to a 660 kb candidate interval containing 250 genes using a mapping population of 79 F₂ plants derived from *sea4-1* × *Col-0* and *sea4-2* × *Col-0* outcrosses and the primers listed in Table S1, as previously described [53,54]. Subsequently, the complete genomes of *sea4-1* and *sea4-2* were sequenced by BGI (BGI, Shenzhen, China) using the BGISEQ platform. The raw data were analyzed using Easymap v.2 [55–57]. Reads were aligned to the *Ler* genome [58]; the options used were based on the assumptions that the mutations under study were present in the reference genetic background, the mapping population resulted from a backcross, and the control sample was the parental line of the mutant strain. The reads from *sea4-1* were used as the control sample for *sea4-2*, and vice versa.

For plant genotyping, the wild-type *KEULE* and *sea4* mutant alleles were identified by PCR using the At1g12360-5F/R primer pair (Table S1). The presence of T-DNA insertions in the insertional lines was confirmed by PCR, and their positions were determined via Sanger sequencing. Gene- and T-DNA-specific primers (Table S1) were employed for these analyses.

4.3. Phenotypic Analysis and Morphometry

Rosettes were photographed using a Nikon SMZ1500 stereomicroscope equipped with a Nikon DXM1200F digital camera (Nikon, Tokyo, Japan). Root length was measured from photographs taken with a Canon PowerShot SX200 IS digital camera (Canon, Tokyo, Japan) using the NIS Elements AR 3.1 image analysis package (Nikon). Shoot length from the soil to the apex of the main shoot was measured in vivo using a millimeter ruler. Whole plants were photographed with a Canon PowerShot SX200 IS digital camera.

4.4. Differential Interference Contrast and Bright-Field Microscopy

For bright-field microscopy, all samples were cleared and mounted as previously described [59]. Micrographs of venation patterns were taken under bright field using a Nikon SMZ1500 stereomicroscope equipped with a Nikon DXM1200F digital camera and NIS Elements AR 3.1 software (Nikon). The venation pattern was drawn using Photoshop CS3 (Adobe, San José, CA, USA) on a Cintiq 18SX Interactive Pen Display screen (Wacom, Kazo, Japan) and analyzed using phenoVein software (<https://quantitative-plant.org/software/phenovein>, accessed on 31 January 2018; [60]). For epidermal and palisade mesophyll cell morphometry, leaves were collected and subjected to the following clearing steps: 15 min in 90% acetone, 24 h in 70% ethanol, and 24 h in 16 M chloral hydrate at room temperature. Microscopy of leaf tissues was performed using differential interference contrast optics on a Leica DMRB microscope equipped with a Nikon DXM1200F digital camera. Cell contours were manually outlined using Photoshop CS3 on a Cintiq 18SX Interactive Pen Display screen (Wacom). Cell area measurements were performed using the NIS Elements AR 3.1 image analysis package (Nikon). Transverse sections were obtained as described in Serrano-Cartagena et al. [61]). The tissue was embedded in Technovit 7100 resin (Kulzer, Hanau, Germany), and 5 µm sections were cut using a Microm HM350S microtome (Walldorf, Germany).

4.5. Confocal Microscopy

Confocal laser scanning microscopy images were obtained with a Leica Stellaris 8 STED confocal microscope equipped with HyD X and HyD SMD detectors, HC PL APO CS2 20×/0.75 DRY and HC PL APO CS2 40×/1.10 WATER objectives, and Leica Application Suite X software (LAS X v.4.5.0.25531; Leica, Wetzlar, Germany). Visualization of fluorescent proteins was performed on leaf primordia and primary roots mounted on glass slides in deionized water. GFP was excited at 489 nm with a white light laser (WLL). The emissions were acquired within the range of 494 nm to 583 nm, and TauSeparation was utilized to distinguish the GFP signal (2 ns) from the chlorophyll autofluorescence signal (0.12 ns). The image resolution was set to 1024 × 1024 pixels, with a speed of 600 Hz, a zoom factor of 0.75, and a line accumulation of 6. Ten optical sections, encompassing the adaxial to the abaxial epidermises of the primordia or the entire root thickness, were photographed and overlapped using LAS X software. The configuration of WLL intensity, transmitted light detector gain, and look-up table values for each photograph type are detailed in Table S10.

4.6. RNA-Seq Analysis

Total RNA was extracted from the samples and subjected to massive parallel sequencing as described in Navarro-Quiles et al. [62], producing paired-end reads of 150 bp (Table S11). Read mapping to the Arabidopsis genome (TAIR10) was performed using HISAT2 v2.0.5 [63] with default parameters, and differentially expressed genes between the *sea4* mutants and *Ler* were identified by Novogene using the DESeq2 v1.20.0 R package [64]. Genes with a *p*-value < 0.05 adjusted with the Benjamini and Hochberg's method and genes with a fold change > 1 were considered to be differentially expressed. Gene Ontology (GO; <http://www.geneontology.org/>, accessed on 15 March 2021) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; <http://www.genome.jp/kegg/>, accessed on 15 March 2021) pathway enrichment analyses of the differentially expressed genes were performed by

Novogene using the clusterProfiler v3.8.1 R package. Significantly enriched terms were determined with an adjusted p -value < 0.05 .

4.7. Ploidy Analysis

Flow cytometry analysis was performed as previously described [65]. Briefly, first-node and second-node leaves from four different rosettes were harvested 21 das and chopped with a razor blade in 500 μ L of cold nuclear isolation buffer [36]. The cell suspension was filtered through a 30 μ m nylon mesh, treated with RNase A (200 μ g/mL) for 20 min, and stained with propidium iodide (50 μ g/mL) for 40 min. The nuclear DNA content was analyzed using a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), and the data were processed using the Floreada.io web platform (<https://floreada.io>, accessed on 18 October 2023). Three biological replicates (15,000 counts each) were analyzed per genotype.

4.8. Protein Sequence Alignment

The protein sequences of Arabidopsis KEU and rat SYNTAXIN-BINDING PROTEIN1 (STXBP1) were obtained from the National Center for Biotechnology Information database (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, accessed on 29 March 2021; KEU: NP_563905.1; rat STXBP1: NP_037170.1). Multiple sequence alignment was performed using Clustal Omega (EMBL-EBI, Hinxton, UK; <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, accessed on 18 March 2021; [66]).

4.9. Protein Structure Visualization and Analysis

The 3D structures of the full-length monomers of KEU and rat STXBP1 were obtained from the AlphaFold Protein Structure Database (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>, accessed on 11 April 2023; [67,68]; KEU: AF-Q9C5X3-F1; rat STXBP1: AF-P61765-F1) and visualized using UCSF ChimeraX 1.2.5 software (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax/>, accessed on 11 April 2023; [69,70]). To analyze the impact of the S57L substitution in *sea4-2* on the conformational stability and dynamics of KEU, two web structure-based protein stability predictors were used: DynaMut (<https://biosig.lab.uq.edu.au/dynamut/>, accessed on 11 April 2023; [71]) and DynaMut2 (<https://biosig.lab.uq.edu.au/dynamut2/>, accessed on 11 April 2023; [72]). These predictors quantify the difference in unfolding Gibbs free energy ($\Delta\Delta G$, expressed in $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) between wild-type and mutant proteins, classifying mutations as stabilizing when $\Delta\Delta G > 0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ or destabilizing when $\Delta\Delta G < 0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. DynaMut provides $\Delta\Delta G$ results from three additional predictors: SDM [73], mCSM [74], and DUET [75]. Furthermore, it computes the difference in vibrational entropy energy ($\Delta\Delta S_{\text{vib}}$, expressed in $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) between wild-type and mutant proteins using the ENCoM server [76], classifying mutations as rigidifying if $\Delta\Delta S_{\text{vib}} < 0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ or flexibilizing if $\Delta\Delta S_{\text{vib}} > 0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$. Finally, Missense3D (<http://missense3d.bc.ic.ac.uk/missense3d/>, accessed on 11 April 2023; [77]) was used to predict possible damaging structural effects of the S57L substitution on KEU protein.

4.10. Accession Numbers

Sequence data from this article can be found at The Arabidopsis Information Resource (<https://www.arabidopsis.org/>, accessed on 23 January 2020) under the following accession numbers: KEU (At1g12360), KN (At1g08560), SEC1B (At4g12120), SYP21 (At5g16830), SYP132 (At5g08080), and SEC6 (At1g71820).

5. Conclusions

The SM protein KEU has a known, important role in cytokinesis, where it coordinates the assembly of *trans*-SNARE complexes in vesicle fusion at the cell plate. Here, we studied the first hypomorphic, viable alleles of the KEU gene, *sea4-1* and *sea4-2*, which will serve as valuable resources for future research on the role of KEULE in regulating cytokinesis in postembryonic developmental stages. In *sea4-1*, a transition at the splice donor site of the

ninth exon leads to mis-splicing, yielding a truncated protein. In *sea4-2*, a transition in the third exon causes a S57L substitution, which impacts an amino acid crucial for physical interactions with syntaxins and reduces the protein flexibility. In these viable mutants, cytokinesis is impaired but not abolished, allowing for the functional study of the roles that *KEU* plays in vegetative and reproductive development. Our RNA-seq study of *sea4* plants strongly suggests that their phenotypes are associated with activation of the unfolded protein response and reduction in cell wall integrity. The characteristic early leaf senescence of *sea4* plants seems to be caused by the activation of plant immunity and the increase in jasmonate biosynthesis, two typical traits of mutants with reduced cell wall integrity. Their short primary shoots and roots are also likely to be a consequence of a reduction in auxin sensitivity at the meristems due to a decrease in NO biosynthesis, another typical trait of mutants with reduced cell wall integrity. We propose that the *sea4* mutants compensate for reduced auxin sensitivity by upregulating auxin biosynthesis, which results in ectopic diffusion within leaf primordia. This leads to leaf margin serrations and a dense, complex venation pattern. The *sea4* leaf surface displays protuberances caused by internal tissue disorganization due to cytokinesis defects. Such disorganization seems to disrupt the boundaries between tissues that regulate leaf morphogenesis and may also contribute to the formation of serrated leaf margins. The *sea4* mutants also exhibit a reduction in photosynthetic light harvesting and carbon fixation, a phenomenon not previously linked to either cell wall integrity or the unfolded protein response, but that could be related to the delay in cytokinesis caused by the *sea4* mutations.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms25126667/s1>.

Author Contributions: J.L.M. conceived, designed, and supervised the research, provided resources, and obtained funding. Several experiments were codesigned by A.R.-B., R.S.-M., J.L.M. and A.R.-B. performed most of the experiments. R.M.-V., F.M.L. and M.R.P. performed the low-resolution mapping of *sea4-1* and *sea4-2*. C.C.-R. contributed to the phenotypic analysis of the *sea4* mutants. A.R.-B. and J.L.M. wrote the manuscript. All authors revised and approved the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Research in the laboratory of J.L.M. was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain [PID2021-127725NB-I00 (MCI/AEI/FEDER, UE)] and the Generalitat Valenciana [CIPROM/2022/2].

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The raw data from genome resequencing and RNA-seq have been deposited in the Sequence Read Archive database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>), accessed on 24 February 2024) under accession numbers PRJNA1079917 and PRJNA1079902, respectively.

Acknowledgments: The authors would like to express their gratitude to G. Jürgens for providing seeds; J. Castelló, J.M. Serrano, and M.J. Níguez for their excellent technical assistance; and A.M. Aguilar-García, Á. Valdés-Penalva, and E. Peñataro-González for their contributions to the phenotypic characterization of the *sea4* mutants.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Müller, S.; Jürgens, G. Plant cytokinesis—No ring, no constriction but centrifugal construction of the partitioning membrane. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2016**, *53*, 10–18. [[CrossRef](#)]
2. Thiele, K.; Wanner, G.; Kindziarski, V.; Jürgens, G.; Mayer, U.; Pachel, F.; Assaad, F.F. The timely deposition of callose is essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* **2009**, *58*, 13–26. [[CrossRef](#)]
3. Struk, S.; Dhonukshe, P. MAPs: Cellular navigators for microtubule array orientations in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* **2014**, *33*, 1–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Drevensek, S.; Goussot, M.; Duroc, Y.; Christodoulidou, A.; Steyaert, S.; Schaefer, E.; Duvernois, E.; Grandjean, O.; Vantard, M.; Bouchez, D.; et al. The *Arabidopsis* TRM1–TON1 interaction reveals a recruitment network common to plant cortical microtubule arrays and eukaryotic centrosomes. *Plant Cell* **2012**, *24*, 178–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Smith, L.G.; Hake, S.; Sylvester, A.W. The *tangled-1* mutation alters cell division orientations throughout maize leaf development without altering leaf shape. *Development* **1996**, *122*, 481–489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Wiedemeier, A.M.D.; Judy-March, J.E.; Hocart, C.H.; Wasteneys, G.O.; Williamson, R.E.; Baskin, T.I. Mutant alleles of *Arabidopsis* *RADIALLY SWOLLEN 4* and *7* reduce growth anisotropy without altering the transverse orientation of cortical microtubules or cellulose microfibrils. *Development* **2002**, *129*, 4821–4830. [[CrossRef](#)]
7. Steinborn, K.; Maulbetsch, C.; Priester, B.; Trautmann, S.; Pacher, T.; Geiges, B.; Küttner, F.; Lepiniec, L.; Stierhof, Y.D.; Schwarz, H.; et al. The *Arabidopsis* *PILZ* group genes encode tubulin-folding cofactor orthologs required for cell division but not cell growth. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 959–971. [[CrossRef](#)]
8. Krupnova, T.; Sasabe, M.; Ghebreghiorghis, L.; Gruber, C.W.; Hamada, T.; Dehmel, V.; Strompen, G.; Stierhof, Y.D.; Lukowitz, W.; Kemmerling, B.; et al. Microtubule-associated kinase-like protein RUNKEL needed for cell plate expansion in *Arabidopsis* cytokinesis. *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 518–523. [[CrossRef](#)]
9. Strompen, G.; El Kasmi, F.; Richter, S.; Lukowitz, W.; Assaad, F.F.; Jürgens, G.; Mayer, U. The *Arabidopsis* *HINKEL* gene encodes a kinesin-related protein involved in cytokinesis and is expressed in a cell cycle-dependent manner. *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 153–158. [[CrossRef](#)]
10. Müller, S.; Fuchs, E.; Ovecka, M.; Wysocka-Diller, J.; Benfey, P.N.; Hauser, M.T. Two new loci, *PLEIADE* and *HYADE*, implicate organ-specific regulation of cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 312–324. [[CrossRef](#)]
11. Söllner, R.; Glässer, G.; Wanner, G.; Somerville, C.R.; Jürgens, G.; Assaad, F.F. Cytokinesis-defective mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2002**, *129*, 678–690. [[CrossRef](#)]
12. Lukowitz, W.; Mayer, U.; Jürgens, G. Cytokinesis in the *Arabidopsis* embryo involves the syntaxin-related *KNOLLE* gene product. *Cell* **1996**, *84*, 61–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Assaad, F.F.; Huet, Y.; Mayer, U.; Jürgens, G. The cytokinesis gene *KEULE* encodes a Sec1 protein that binds the syntaxin *KNOLLE*. *J. Cell Biol.* **2001**, *152*, 531–543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hong, Z.; Delauney, A.J.; Verma, D.P. A cell plate-specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin. *Plant Cell* **2001**, *13*, 755–768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Fagard, M.; Desnos, T.; Desprez, T.; Goubet, F.; Refregier, G.; Mouille, G.; McCann, M.; Rayon, C.; Vernhettes, S.; Höfte, H. *PROCUSTE1* encodes a cellulose synthase required for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2000**, *12*, 2409–2423. [[CrossRef](#)]
16. Williamson, R.E.; Burn, J.E.; Birch, R.; Baskin, T.I.; Arioli, T.; Betzner, A.S.; Cork, A. Morphology of *rsw1*, a cellulose-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* **2001**, *215*, 116–127. [[CrossRef](#)]
17. Nickle, T.C.; Meinke, D.W. A cytokinesis-defective mutant of *Arabidopsis* (*cyt1*) characterized by embryonic lethality, incomplete cell walls, and excessive callose accumulation. *Plant J.* **1998**, *15*, 321–332. [[CrossRef](#)]
18. Zuo, J.; Niu, Q.W.; Nishizawa, N.; Wu, Y.; Kost, B.; Chua, N.H. *KORRIGAN*, an *Arabidopsis* endo-1,4- β -glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis. *Plant Cell* **2000**, *12*, 1137–1152. [[CrossRef](#)]
19. Jürgens, G. Plant cytokinesis: Fission by fusion. *Trends Cell Biol.* **2005**, *15*, 277–283. [[CrossRef](#)]
20. Blatt, M.R.; Leyman, B.; Geelen, D. Tansley review No. 108: Molecular events of vesicle trafficking and control by SNARE proteins in plants. *New Phytol.* **1999**, *144*, 389–418. [[CrossRef](#)]
21. Lupashin, V.; Sztul, E. Golgi tethering factors. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1744*, 325–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Thellmann, M.; Rybak, K.; Thiele, K.; Wanner, G.; Assaad, F.F. Tethering factors required for cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2010**, *154*, 720–732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Park, M.; Touihri, S.; Müller, I.; Mayer, U.; Jürgens, G. Sec1/Munc18 protein stabilizes fusion-competent syntaxin for membrane fusion in *Arabidopsis* cytokinesis. *Dev. Cell* **2012**, *22*, 989–1000. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Fukuda, R.; McNew, J.A.; Weber, T.; Parlati, F.; Engel, T.; Nickel, W.; Rothman, J.E.; Söllner, T.H. Functional architecture of an intracellular membrane t-SNARE. *Nature* **2000**, *407*, 198–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Margittai, M.; Widengren, J.; Schweinberger, E.; Schröder, G.F.; Felekyan, S.; Hausteiner, E.; König, M.; Fasshauer, D.; Grubmüller, H.; Jahn, R.; et al. Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15516–15521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Heese, M.; Gansel, X.; Sticher, L.; Wick, P.; Grebe, M.; Granier, F.; Jürgens, G. Functional characterization of the *KNOLLE*-interacting t-SNARE AtSNAP33 and its role in plant cytokinesis. *J. Cell Biol.* **2001**, *155*, 239–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Karnik, R.; Grefen, C.; Bayne, R.; Honsbein, A.; Köhler, T.; Kioumourtzoglou, D.; Williams, M.; Bryant, N.J.; Blatt, M.R. *Arabidopsis* Sec1/Munc18 protein SEC11 is a competitive and dynamic modulator of SNARE binding and SYP121-dependent vesicle traffic. *Plant Cell* **2013**, *25*, 1368–1382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Assaad, F.F.; Mayer, U.; Wanner, G.; Jürgens, G. The *KEULE* gene is involved in cytokinesis in *Arabidopsis*. *Mol. Gen. Genet.* **1996**, *253*, 267–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Berná, G.; Robles, P.; Micol, J.L. A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **1999**, *152*, 729–742. [[CrossRef](#)]

30. Robles, P.; Micol, J.L. Genome-wide linkage analysis of *Arabidopsis* genes required for leaf development. *Mol. Genet. Genom.* **2001**, *266*, 12–19. [[CrossRef](#)]
31. Karnahl, M.; Park, M.; Krause, C.; Hiller, U.; Mayer, U.; Stierhof, Y.D.; Jürgens, G. Functional diversification of *Arabidopsis* SEC1-related SM proteins in cytokinetic and secretory membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 6309–6314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Misura, K.M.S.; Scheller, R.H.; Weis, W.I. Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1–syntaxin 1a complex. *Nature* **2000**, *404*, 355–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wu, J.; Tan, X.; Wu, C.; Cao, K.; Li, Y.; Bao, Y. Regulation of cytokinesis by exocyst subunit SEC6 and KEULE in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* **2013**, *6*, 1863–1876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Waizenegger, I.; Lukowitz, W.; Assaad, F.; Schwarz, H.; Jürgens, G.; Mayer, U. The *Arabidopsis* KNOLLE and KEULE genes interact to promote vesicle fusion during cytokinesis. *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 1371–1374. [[CrossRef](#)]
35. Horiguchi, G.; Mollá-Morales, A.; Pérez-Pérez, J.M.; Kojima, K.; Robles, P.; Ponce, M.R.; Micol, J.L.; Tsukaya, H. Differential contributions of ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development. *Plant J.* **2011**, *65*, 724–736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Galbraith, D.W.; Harkins, K.R.; Knapp, S. Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **1991**, *96*, 985–989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Bilsborough, G.D.; Runions, A.; Barkoulas, M.; Jenkins, H.W.; Hasson, A.; Galinha, C.; Laufs, P.; Hay, A.; Prusinkiewicz, P.; Tsiantis, M. Model for the regulation of *Arabidopsis thaliana* leaf margin development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3424–3429. [[CrossRef](#)]
38. Xu, J.; Hofhuis, H.; Heidstra, R.; Sauer, M.; Friml, J.; Scheres, B. A molecular framework for plant regeneration. *Science* **2006**, *311*, 385–388. [[CrossRef](#)]
39. Friml, J.; Vieten, A.; Sauer, M.; Weijers, D.; Schwarz, H.; Hamann, T.; Offringa, R.; Jürgens, G. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **2003**, *426*, 147–153. [[CrossRef](#)]
40. Bombliès, K.; Madlung, A. Polyploidy in the Arabidopsis genus. *Chromosome Res.* **2014**, *22*, 117–134. [[CrossRef](#)]
41. Bacete, L.; Mérida, H.; Miedes, E.; Molina, A. Plant cell wall-mediated immunity: Cell wall changes trigger disease resistance responses. *Plant J.* **2018**, *93*, 614–636. [[CrossRef](#)]
42. Ellis, C.; Karafyllidis, I.; Wasternack, C.; Turner, J.G. The Arabidopsis mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* **2002**, *14*, 1557–1566. [[CrossRef](#)]
43. Caño-Delgado, A.; Penfield, S.; Smith, C.; Catley, M.; Bevan, M. Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2003**, *34*, 351–362. [[CrossRef](#)]
44. Gigli-Bisceglia, N.; Engelsdorf, T.; Strnad, M.; Vaahter, L.; Khan, G.A.; Yamoune, A.; Alipanah, L.; Novák, O.; Persson, S.; Hejatko, J.; et al. Cell wall integrity modulates *Arabidopsis thaliana* cell cycle gene expression in a cytokinin- and nitrate reductase-dependent manner. *Development* **2018**, *145*, dev166678. [[CrossRef](#)]
45. Sanz, L.; Fernández-Marcos, M.; Modrego, A.; Lewis, D.R.; Muday, G.K.; Pollmann, S.; Dueñas, M.; Santos-Buelga, C.; Lorenzo, O. Nitric oxide plays a role in stem cell niche homeostasis through its interaction with auxin. *Plant Physiol.* **2014**, *166*, 1972–1984. [[CrossRef](#)]
46. Bicknell, A.A.; Babour, A.; Federovitch, C.M.; Niwa, M. A novel role in cytokinesis reveals a housekeeping function for the unfolded protein response. *J. Cell Biol.* **2007**, *177*, 1017–1027. [[CrossRef](#)]
47. Caggiano, M.P.; Yu, X.; Bhatia, N.; Larsson, A.; Ram, H.; Ohno, C.K.; Sappl, P.; Meyerowitz, E.M.; Jönsson, H.; Heisler, M.G. Cell type boundaries organize plant development. *eLife* **2017**, *6*, e27421. [[CrossRef](#)]
48. Lee, Y.K.; Kim, G.T.; Kim, I.J.; Park, J.; Kwak, S.S.; Choi, G.; Chung, W.I. LONGIFOLIA1 and LONGIFOLIA2, two homologous genes, regulate longitudinal cell elongation in *Arabidopsis*. *Development* **2006**, *133*, 4305–4314. [[CrossRef](#)]
49. Aloni, R.; Schwalm, K.; Langhans, M.; Ullrich, C.I. Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* **2003**, *216*, 841–853. [[CrossRef](#)]
50. Teale, W.D.; Paponov, I.A.; Palme, K. Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 847–859. [[CrossRef](#)]
51. Ponce, M.R.; Quesada, V.; Micol, J.L. Rapid discrimination of sequences flanking and within T-DNA insertions in the *Arabidopsis* genome. *Plant J.* **1998**, *14*, 497–501. [[CrossRef](#)]
52. Quesada, V.; Ponce, M.R.; Micol, J.L. Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **2000**, *154*, 421–436. [[CrossRef](#)]
53. Ponce, M.R.; Robles, P.; Lozano, F.M.; Brotóns, M.A.; Micol, J.L. Low-resolution mapping of untagged mutations. *Methods Mol. Biol.* **2006**, *323*, 105–113. [[CrossRef](#)]
54. Ponce, M.R.; Robles, P.; Micol, J.L. High-throughput genetic mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **1999**, *261*, 408–415. [[CrossRef](#)]
55. Lup, S.D.; Wilson-Sánchez, D.; Andreu-Sánchez, S.; Micol, J.L. Easymap: A user-friendly software package for rapid mapping-by-sequencing of point mutations and large insertions. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 655286. [[CrossRef](#)]
56. Lup, S.D.; Wilson-Sánchez, D.; Micol, J.L. Mapping-by-sequencing of point and insertional mutations with Easymap. *Methods Mol. Biol.* **2022**, *2484*, 343–361. [[CrossRef](#)]

57. Lup, S.D.; Navarro-Quiles, C.; Micol, J.L. Versatile mapping-by-sequencing with Easymap v.2. *Front. Plant Sci.* **2023**, *14*, 1042913. [[CrossRef](#)]
58. Zapata, L.; Ding, J.; Willing, E.M.; Hartwig, B.; Bezdán, D.; Jiao, W.B.; Patel, V.; Velikkakam James, G.; Koornneef, M.; Ossowski, S.; et al. Chromosome-level assembly of *Arabidopsis thaliana* Ler reveals the extent of translocation and inversion polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E4052–E4060. [[CrossRef](#)]
59. Candela, H.; Martínez-Laborda, A.; Micol, J.L. Venation pattern formation in *Arabidopsis thaliana* vegetative leaves. *Dev. Biol.* **1999**, *205*, 205–216. [[CrossRef](#)]
60. Bühler, J.; Rishmawi, L.; Pflugfelder, D.; Huber, G.; Scharr, H.; Hülkamp, M.; Koornneef, M.; Schurr, U.; Jahnke, S. phenoVein—A tool for leaf vein segmentation and analysis. *Plant Physiol.* **2015**, *169*, 2359–2370. [[CrossRef](#)]
61. Serrano-Cartagena, J.; Candela, H.; Robles, P.; Ponce, M.R.; Pérez-Pérez, J.M.; Piqueras, P.; Micol, J.L. Genetic analysis of *incurvata* mutants reveals three independent genetic operations at work in *Arabidopsis* leaf morphogenesis. *Genetics* **2000**, *156*, 1363–1377. [[CrossRef](#)]
62. Navarro-Quiles, C.; Mateo-Bonmatí, E.; Candela, H.; Robles, P.; Martínez-Laborda, A.; Fernández, Y.; Simura, J.; Ljung, K.; Rubio, V.; Ponce, M.R.; et al. The *Arabidopsis* ATP-Binding Cassette E protein ABCE2 is a conserved component of the translation machinery. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, 1009895. [[CrossRef](#)]
63. Kim, D.; Paggi, J.M.; Park, C.; Bennett, C.; Salzberg, S.L. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 907–915. [[CrossRef](#)]
64. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [[CrossRef](#)]
65. Desvoyes, B.; Ramirez-Parra, E.; Xie, Q.; Chua, N.H.; Gutierrez, C. Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during *Arabidopsis* leaf development. *Plant Physiol.* **2006**, *140*, 67–80. [[CrossRef](#)]
66. Madeira, F.; Park, Y.M.; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N.; Basutkar, P.; Tivey, A.R.N.; Potter, S.C.; Finn, R.D.; et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W636–W641. [[CrossRef](#)]
67. Tunyasuvunakool, K.; Adler, J.; Wu, Z.; Green, T.; Zielinski, M.; Židek, A.; Bridgland, A.; Cowie, A.; Meyer, C.; Laydon, A.; et al. Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature* **2021**, *596*, 590–596. [[CrossRef](#)]
68. Varadi, M.; Anyango, S.; Deshpande, M.; Nair, S.; Natassia, C.; Yordanova, G.; Yuan, D.; Stroe, O.; Wood, G.; Laydon, A.; et al. AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D439–D444. [[CrossRef](#)]
69. Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Meng, E.C.; Pettersen, E.F.; Couch, G.S.; Morris, J.H.; Ferrin, T.E. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci.* **2018**, *27*, 14–25. [[CrossRef](#)]
70. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Meng, E.C.; Couch, G.S.; Croll, T.I.; Morris, J.H.; Ferrin, T.E. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci.* **2021**, *30*, 70–82. [[CrossRef](#)]
71. Rodrigues, C.H.M.; Pires, D.E.V.; Ascher, D.B. DynaMut: Predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W350–W355. [[CrossRef](#)]
72. Rodrigues, C.H.M.; Pires, D.E.V.; Ascher, D.B. DynaMut2: Assessing changes in stability and flexibility upon single and multiple point missense mutations. *Protein Sci.* **2021**, *30*, 60–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Worth, C.L.; Preissner, R.; Blundell, T.L. SDM—A server for predicting effects of mutations on protein stability and malfunction. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, W215–W222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Pires, D.E.V.; Ascher, D.B.; Blundell, T.L. mCSM: Predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 335–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Pires, D.E.V.; Ascher, D.B.; Blundell, T.L. DUET: A server for predicting effects of mutations on protein stability using an integrated computational approach. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, W314–W319. [[CrossRef](#)]
76. Frappier, V.; Chartier, M.; Najmanovich, R.J. ENCoM server: Exploring protein conformational space and the effect of mutations on protein function and stability. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W395–W400. [[CrossRef](#)]
77. Ittisoponpisan, S.; Islam, S.A.; Khanna, T.; Alhuzimi, E.; David, A.; Sternberg, M.J.E. Can predicted protein 3D structures provide reliable insights into whether missense variants are disease associated? *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 2197–2212. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Roles of the *Arabidopsis KEULE* gene in postembryonic development

Alejandro Ruiz-Bayón, Carolina Cara-Rodríguez, Raquel Sarmiento-Mañús,
Rafael Muñoz-Viana^a, Francisca M. Lozano^b, María Rosa Ponce,
and José Luis Micol

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

^aPresent address: Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital
Universitario Puerta de Hierro, 28222 Majadahonda, Madrid, Spain.

^bPresent address: Instituto Bernabeu, 03016 Alicante, Spain.

Supplementary Figures and Tables

Supplementary Material included in this file:

Figures S1-S21

Tables S1-S11

Supplementary Material not included in this file:

Data Sets S1-S3

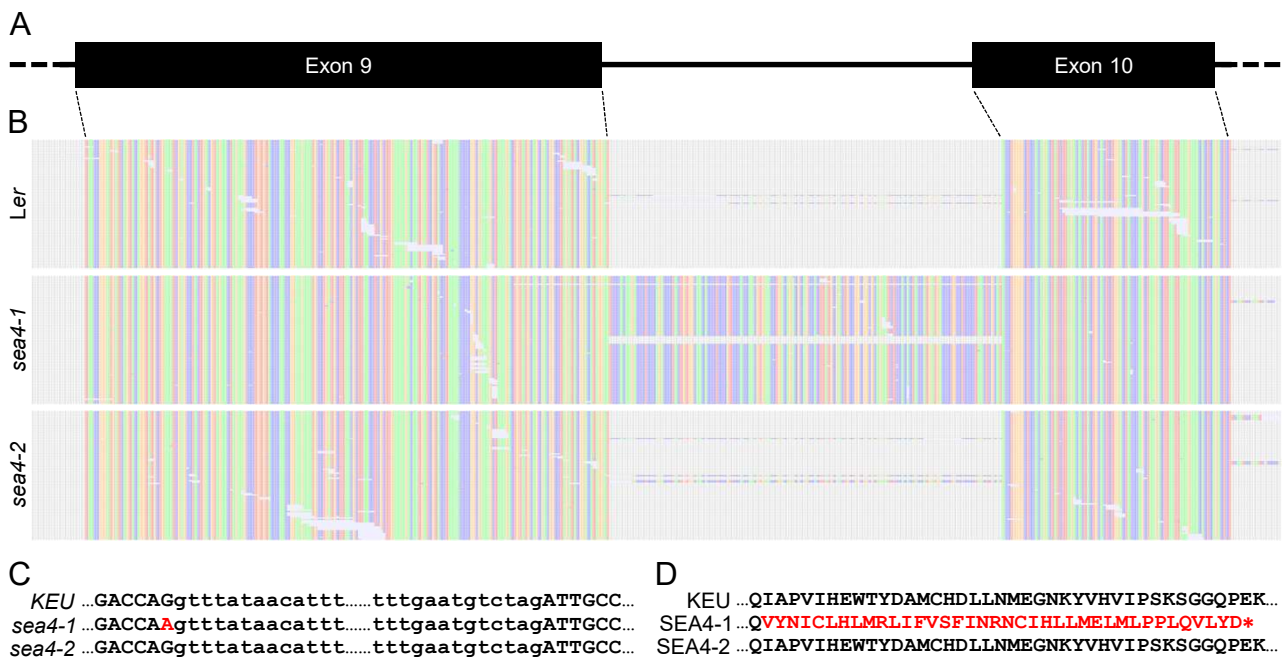


Figure S1. Mis-splicing of the *KEU* pre-mRNA caused by the *sea4-1* mutation. (A) Schematic representation of the 9th and 10th exons of the *KEU* gene. (B) Alignment of *Ler*, *sea4-1*, and *sea4-2* cDNA reads from the *KEU* gene of the Col-0 reference genome. The adenine, cytosine, thymine, and guanine bases are represented as green, orange, blue, and red squares, respectively. Positions without aligned bases are represented as gray squares. (C) Alignment of the DNA sequences of the *KEU* wild-type allele with the *sea4-1* and *sea4-2* mutant alleles. Uppercase and lowercase letters indicate exons and introns, respectively. The point mutation of *sea4-1* is indicated in red. (D) Predicted amino acid sequence of the *KEU* wild-type protein and the SEA4-1 and SEA4-2 mutant proteins. Intron retention in *sea4-1* generates a new amino acid sequence and a premature stop codon, both shown in red.

A

STXBP1	1	-----MAPIGLKAUVGEEKIMHDV---IKKVKKKGWQVLVVDQLSMRMLSSCKMTDIMEGITIVEDIINKRREPLPS
KEULE	1	MSYSDSDSSSHGGEYKNFRQITRERLLYEMLRSAGTKGSSKSTWKLIMDKLTVKIMSYACKMADITQEGVSLVEDIFRRRQPLPS
Consensus	1	. : : * : : : : * . . * . * : : : : * . * : : * * * : : * * * : : * * * : : * * * : : *
STXBP1	71	LEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFNELVKS-RAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQ
KEULE	86	MDAIYFIQPTKENVIMFLSDMSGK-SPLYKKAFFVFFSPVSKELVGHVGHKSSVLPRIKALREMNLEFFAIDSQGFITDHERALE
Consensus	86	::*:** * : : * * : : * : : * : * : * : * . . * : : * . . * * : * : * : * : * : * : * : * : : *
STXBP1	155	SFYSPHKA-QMKNPILERLAEQIATLCATLKEYPAVRVYRGEYKDALLAQ----LIQDK----LDAYKADDPTEGEGDPKARSQ
KEULE	170	DLFGDEETSRRKGDACLNVMSRIATVFASLREFPAVRVRAAKSLDASTMTTLRLDLPKLAAGIWNCLAKHKQSIENFPQETETCE
Consensus	171	... : : : : *
STXBP1	230	LLILDRGFDPPSPVLEHETFQAMSYDLLPIENDVYKYE--TSGIGEARVKEVLLDEDDDLWIALRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSS
KEULE	255	LLILDRSIDIAPVIHEWTYDAMCHDLLNMEGNKYVHVIPSKGGQPEKKDVLLEEHPWLELRHAHIADASERLHKMTNFLS
Consensus	256	***** : * * : *
STXBP1	313	SKR-----MNTGEKTTMRDLSQMLKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHY-QGTVDKLCRVEQDLAMGTDAEAGEKIDPMPRAI
KEULE	340	KNKAAQLQGRDGAELSTRDLQKMQVALPQYSEQIDKLSLHVEIARKLNDLIREQGLRELQLEQDLVFGDAGMKDVIKYL----
Consensus	341	.. : * : : *
STXBP1	391	VPILLDANVSTYDKIRIILLYI-FLKNGITEENLNKLIQHAQIPPEDSEIITNMAHLGVPIVT-----DSTLRRRSKPER
KEULE	421	---STQEEASREGKLRLLMILATIYPEKFEKGNLMLKAKLSDDMTAVNMSSLGSAVDKAKNTPGGFILKFDLHKKRAVR
Consensus	426	: : * . * : : : : : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
STXBP1	465	KERISEQTYQLSRWPTI IKDIMEDI EDKLDTKHYPYISTRSSASFSTT-----AVSARYGHWKKNKAP-----
KEULE	503	KERQEEAAWQLSRFYPMIEELIEKLSKGLPKEDFPCMNDPSPFHHGSTSLSSAASSSQGAAQSMRSRRTPTWAKPRGSDDGYS
Consensus	511	** * . * : *
STXBP1	529	-----GEYRSGPRLIIFILGGVSLNEMRCAYEVTOANGKWEVLIGSTHILTPOKLLDTLKKLNKTDEEISS-----
KEULE	588	SDSVLRHASSDFRKMQRIFVFI VGGATRSELKVCHKLS-TLKLREVLIGSTSLDDPPQFITKLKLLTANDDLSDLDLQI
Consensus	596	. : * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

B

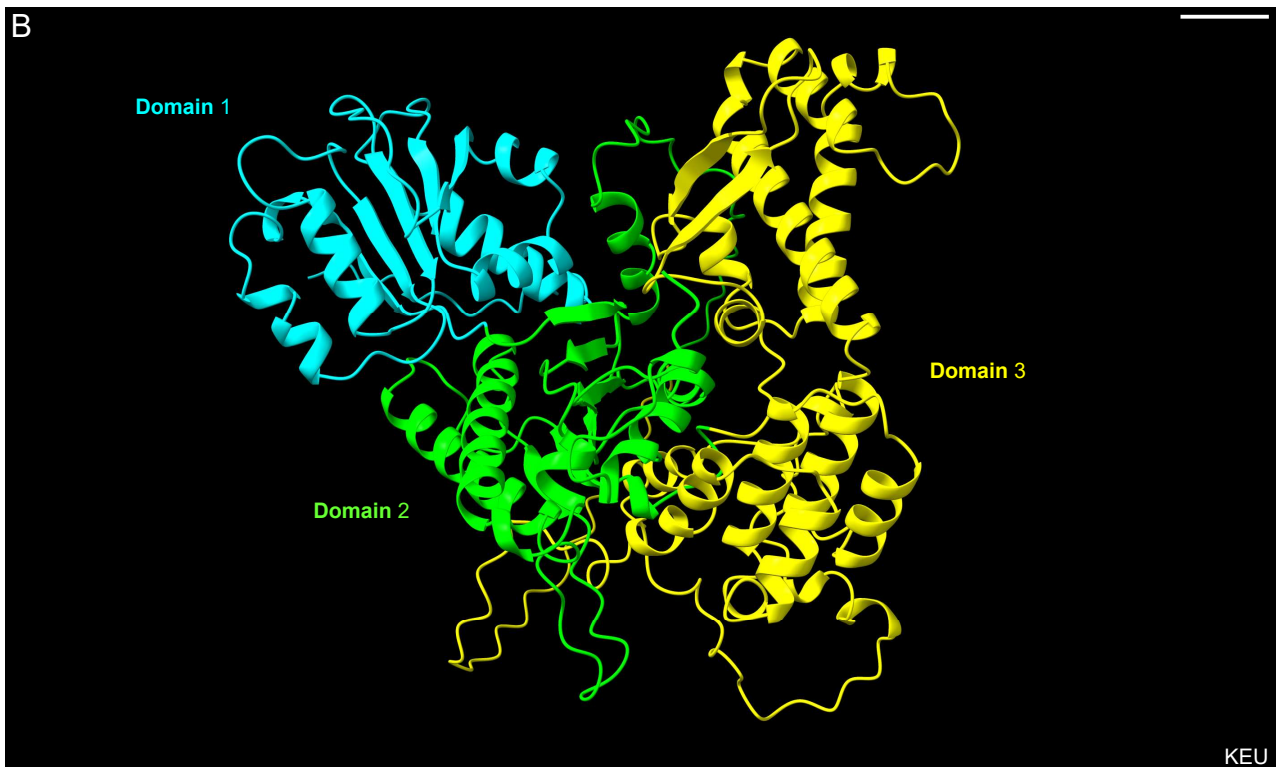


Figure S2. Sequence conservation between the Arabidopsis KEU and rat STXBP1 proteins. (A) Amino acid residues are indicated by numbers. The amino acids that physically interact with syntaxins are underlined. Residues of STXBP1 that form the secondary structures of domains 1, 2, and 3 are highlighted in blue, green, and yellow, respectively. The amino acids affected by the mutations of *sea4-1* (264) and *sea4-2* (57) are shaded in red. The amino acids with identical, similar, or weakly similar properties are denoted on the consensus line using asterisks, colons, and periods, respectively. (B) Cartoon representation of the 3D structure of KEU, with domains 1, 2, and 3 highlighted using the same color scheme. Scale bar: 10 Å.

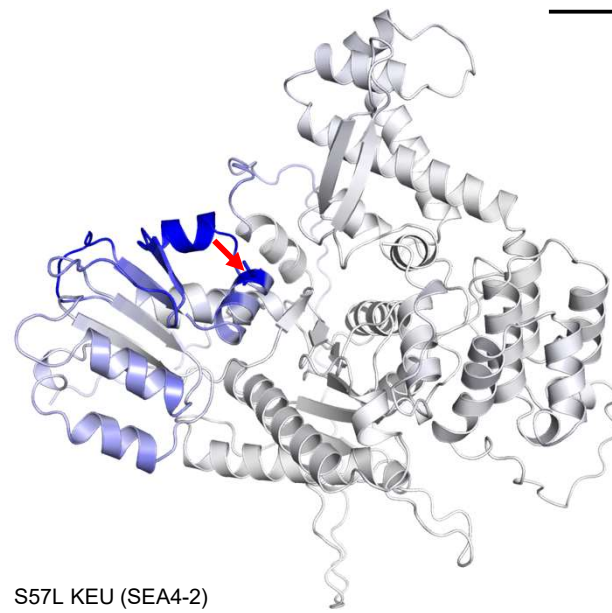


Figure S3. Predicted effect of the S57L substitution on the dynamics of KEU protein. Cartoon representation of the 3D structure of the mutated KEU protein, colored according to the change in vibrational entropy ($\Delta\Delta S_{\text{vib}}$ ENCoM) predicted by the DynaMut server. Blue corresponds to increased rigidity in the protein structure. The red arrow indicates the position of the S57L mutation. Scale bar: 10 Å.

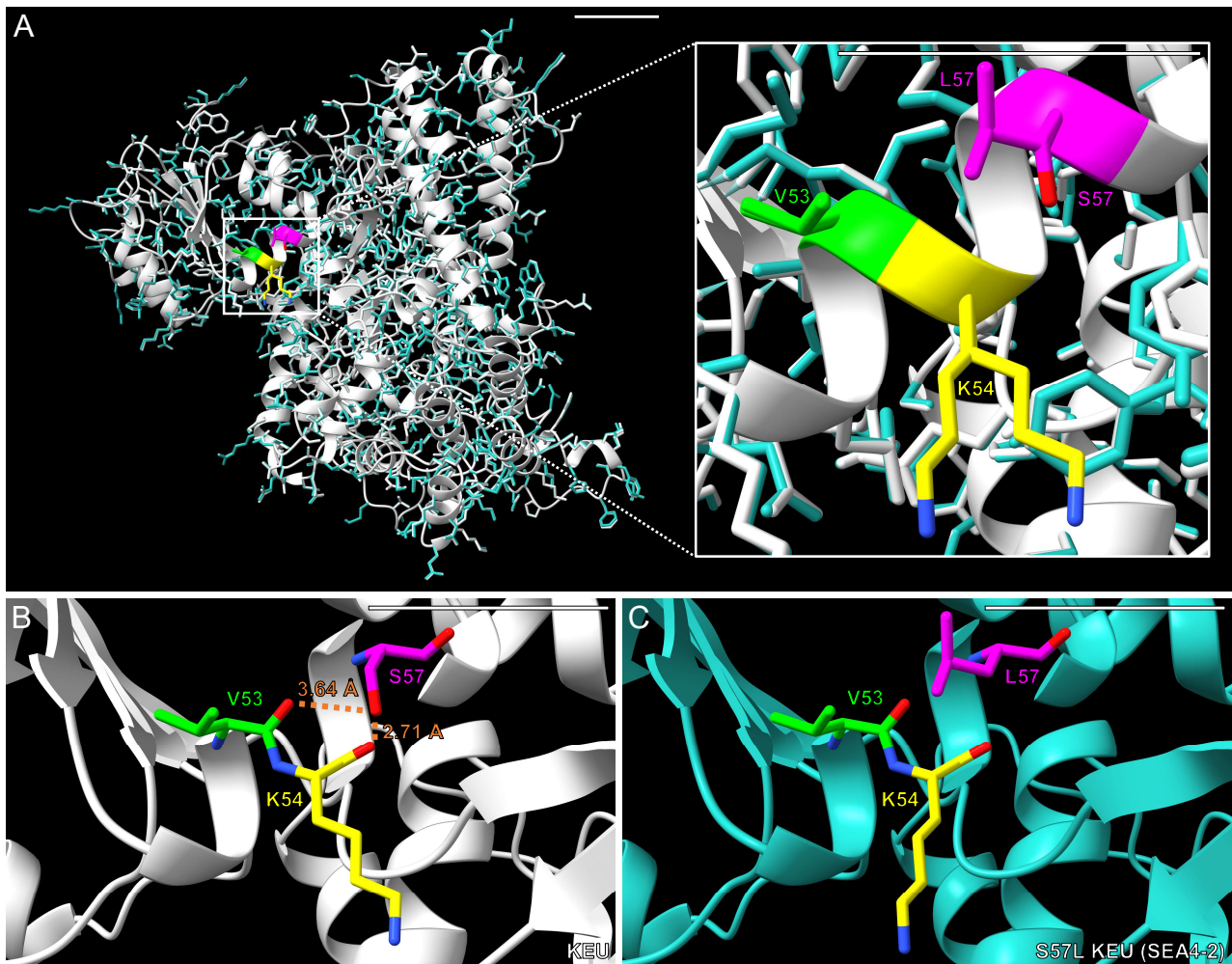


Figure S4. Comparison of the 3D structures of wild-type and S57L mutant (SEA4-2) KEU proteins. (A) Cartoon representation showing the overlay of the 3D structures of KEU (colored in gray) and SEA4-2 (colored in blue), with a close-up view of the vicinity of the substituted S residue. All residues affected by the mutation are labeled and displayed in different colors. Hydrogen bonds between amino acids in (B) KEU, which are disrupted by the S57L mutation in (C) SEA4-2, are represented as orange dotted lines. The distances between the interacting atoms are indicated in angstroms (Å). The oxygen and nitrogen atoms of the affected amino acids are highlighted in red and blue, respectively. Scale bars: 10 Å.

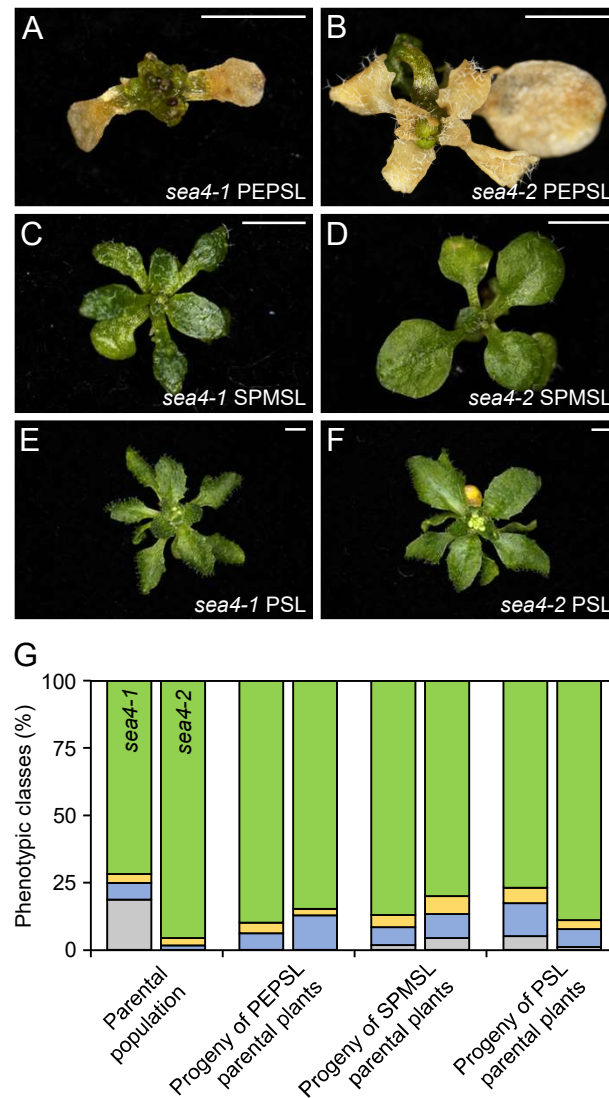


Figure S5. Phenotypic classes observed in *sea4-1* and *sea4-2* plants. A total of 180 (A, C, E) *sea4-1* and (B, D, F) *sea4-2* seeds were sown and the plants were grouped into four phenotypic classes based on their morphological phenotypes at 21 das: non-germinated seeds (NGS; not shown), (A, B) plants with poorly expanded and prematurely senescent leaves (PEPSL), (C, D) stunted plants with mildly serrated leaves (SPMSL), and (E, F) plants with serrated leaves (PSL). From each of the four viable classes, three plants were allowed to self to collect their seeds. 180 seeds per class were sown and the resulting plants classified as described above. (G) Stacked bar charts representing the percentages of plants in each phenotypic class defined above for two-year-old seeds (labeled as “Parental” on the X-axis) and the progeny of three selfed plants from each phenotypic class. Gray, blue, yellow, and green represent the NGS, PEP, SP, and PSL classes, respectively. Photographs were taken 21 das. Scale bars: 2 mm.

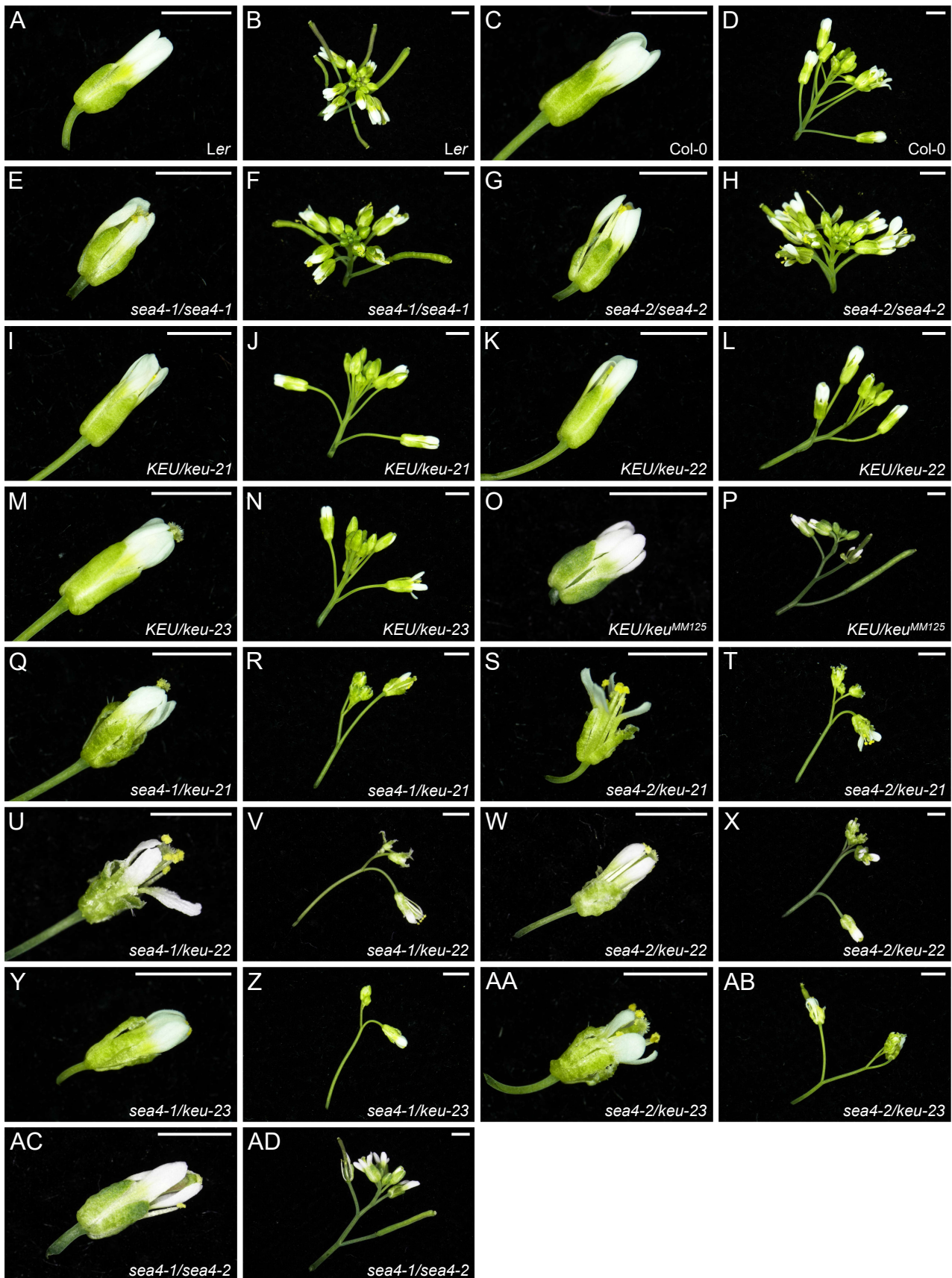


Figure S6. Flower and inflorescence morphology of plants carrying mutant alleles of *KEU*. (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S, U, W, Y, AA, AC) Flowers and (B, D, F, H, J, L, N, P, R, T, V, X, Z, AB, AD) inflorescences of wild-type (A, B) *Ler* and (C, D) *Col-0*, the (E, F) *sea4-1/sea4-1* and (G, H) *sea4-2/sea4-2* homozygous mutants, and the (I, J) *KEU/keu-21*, (K, L) *KEU/keu-22*, (M, N) *KEU/keu-23*, (O, P) *KEU/keu^{MM125}*, (Q, R) *sea4-1/keu-21*, (S, T) *sea4-2/keu-21*, (U, V) *sea4-1/keu-22*, (W, X) *sea4-2/keu-22*, (Y, Z) *sea4-1/keu-23*, (AA, AB) *sea4-2/keu-23* and (AC, AD) *sea4-1/sea4-2* heterozygotes. Photographs were taken 49 das. Scale bars: 2 mm.

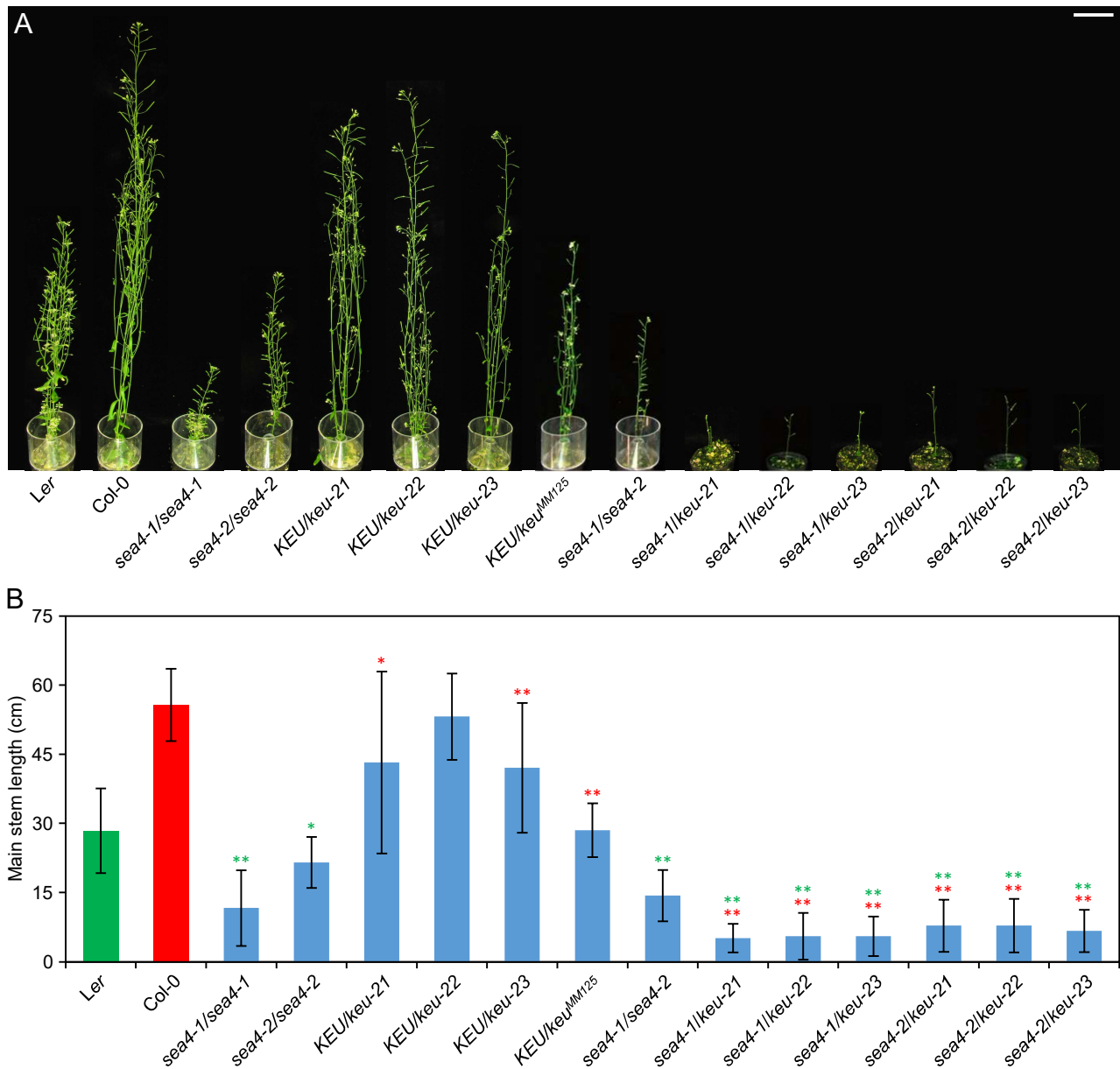


Figure S7. Morphological phenotypes of adult plants carrying mutant alleles of *KEU*. (A) From left to right, representative adult plants of *Ler*, *Col-0*, *sea4-1/sea4-1*, *sea4-2/sea4-2*, *KEU/keu-21*, *KEU/keu-22*, *KEU/keu-23*, *KEU/keu^{MM125}*, *sea4-1/sea4-2*, *sea4-1/keu-21*, *sea4-1/keu-22*, *sea4-1/keu-23*, *sea4-2/keu-21*, *sea4-2/keu-22*, and *sea4-2/keu-23*. (B) Length of the main stem in adult plants. Error bars represent the standard deviation. Asterisks indicate a significant difference from the corresponding parental lines (indicated by the color code) in a Student's *t* test ($n = 6-30$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Photographs were taken 48 das. Scale bar: 5 cm.

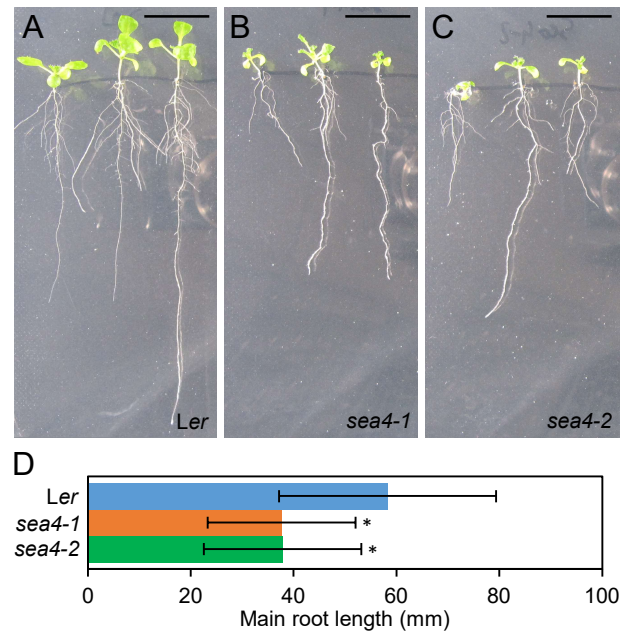


Figure S8. Main root length of *sea4-1* and *sea4-2* plants. Photographs of (A) *Ler*, (B) *sea4-1*, and (C) *sea4-2* plants grown in vertical plates. (D) Main root length of *Ler* ($n = 60$), *sea4-1* ($n = 30$), and *sea4-2* ($n = 30$). Asterisks indicate a significant difference from *Ler* in a Student's *t* test ($P < 0.01$). Photographs were taken 14 das. Scale bars: 5 mm.

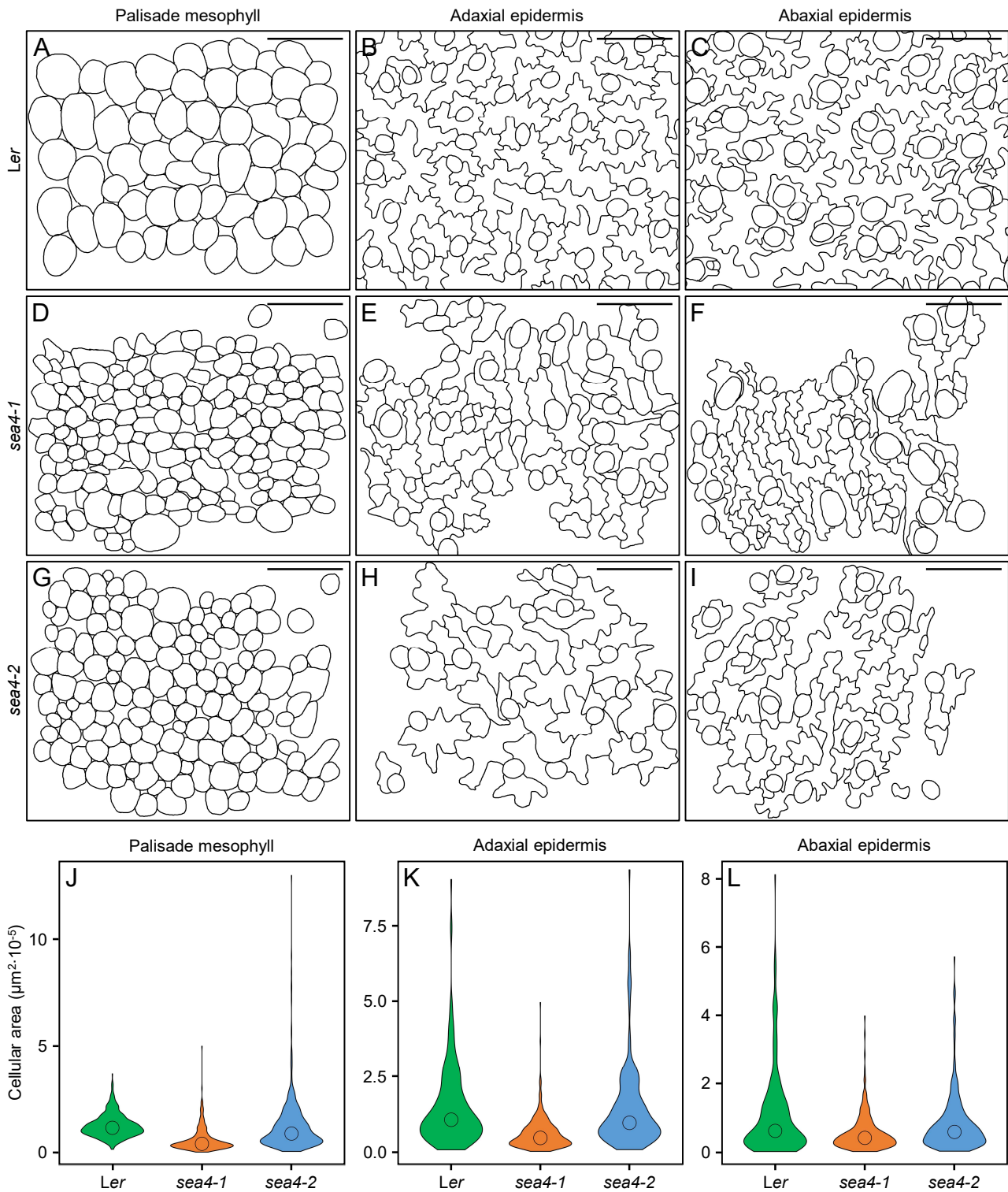


Figure S9. Structure of the cell layers in first-node leaves of the *sea4* mutants. (A-I) Diagrams illustrating cells from the (A, D, G) palisade mesophyll, (B, E, H) adaxial epidermis, and (C, F, I) abaxial epidermis of (A, B, C) *Ler*, (D, E, F) *sea4-1*, and (G, H, I) *sea4-2* plants. Leaves were collected 21 das. Scale bars: 20 μm . (J-L) Violin plots representing the distribution of cell sizes in the (J) palisade mesophyll ($n = 362\text{--}538$), (K) adaxial epidermis ($n = 199\text{--}418$), and (L) abaxial epidermis ($n = 229\text{--}304$). The median is represented with a circle.

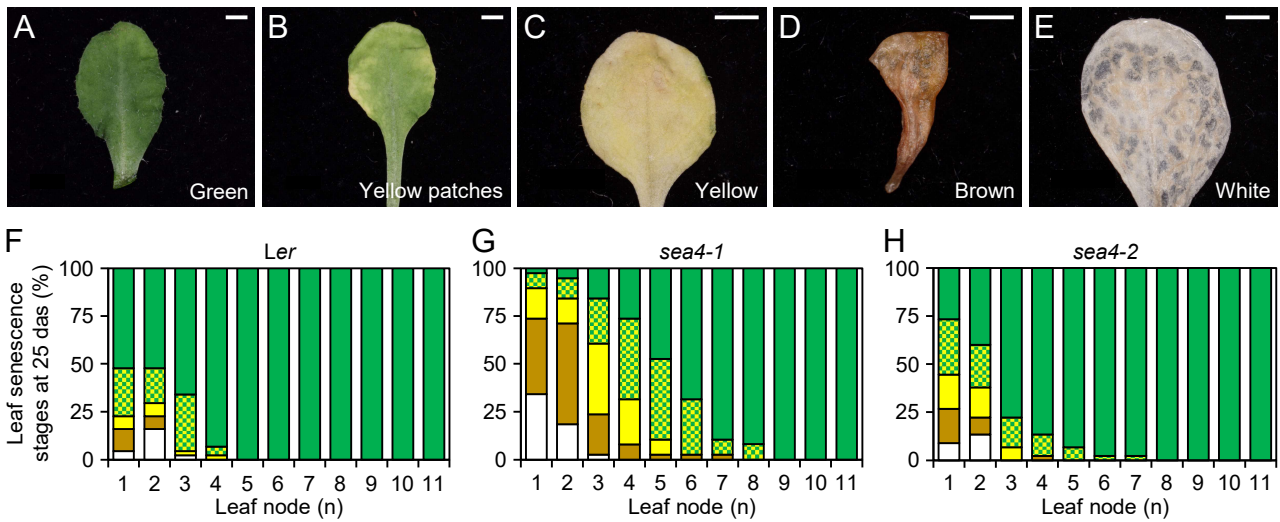


Figure S10. Progression of leaf senescence in *sea4-1* and *sea4-2* plants. All rosette leaves from 48 plants per genotype were grouped into the following categories at 25 das based on their degree of senescence: (A) green, (B) green with yellow patches, (C) yellow, (D) brown, or (E) white. The percentage of leaves from each node classified into these categories is represented for (F) *Ler*, (G) *sea4-1*, and (H) *sea4-2*. The green, green/yellow pattern, yellow, brown, and white colors correspond to the categories shown in A, B, C, D, and E, respectively. Photographs were taken 25 das. Scale bars: 2 mm.

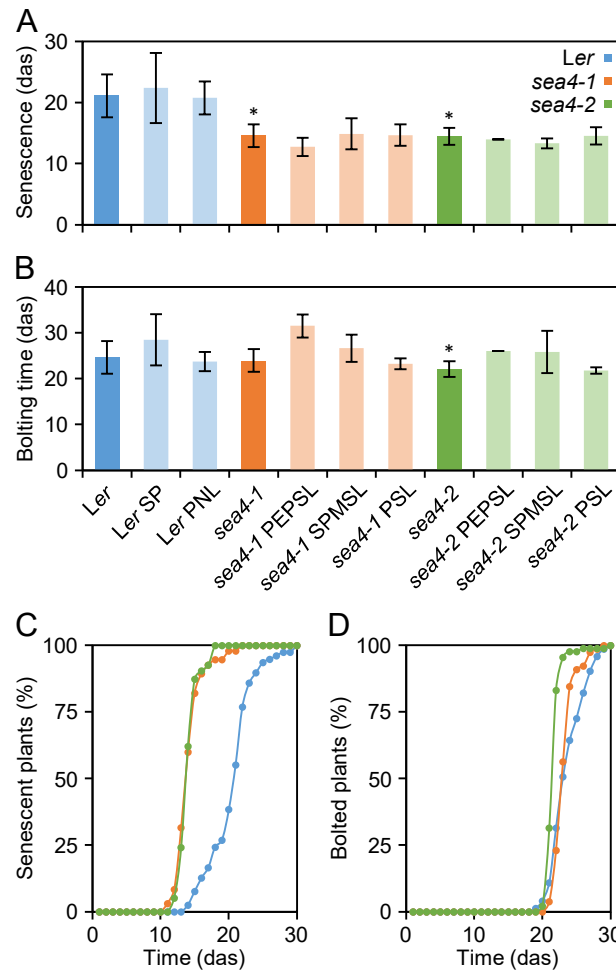


Figure S11. Extent of senescence and bolting time in the *sea4* mutants. Time at which (A) the first senescent leaf became visible in a plant and (B) bolting became visible. The mean values of all *Ler*, *sea4-1*, and *sea4-2* plants studied are shown in dark blue, dark orange, and dark green, respectively. The mean values of *Ler*, *sea4-1*, and *sea4-2* plants classified as in Figure S5 are shown in pale blue, pale orange, and pale green, respectively. Error bars represent standard deviation. Asterisks indicate a significant difference from *Ler* in a Student's *t* test ($n = 78-90$; $*P < 0.01$). Percentage of plants (C) with senescent leaves and (D) exhibiting bolting over time after stratification. Colors for *Ler*, *sea4-1*, and *sea4-2* are the same as in A.

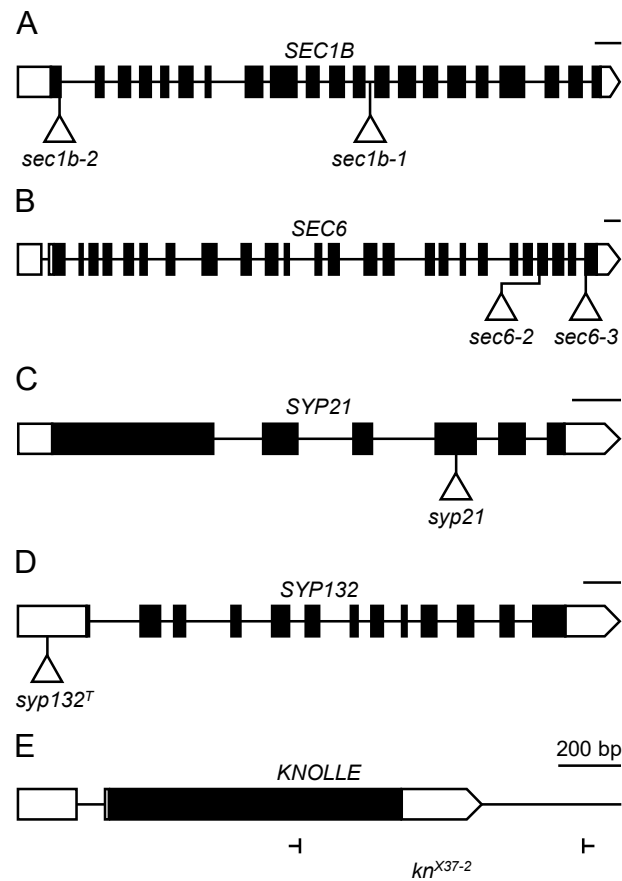


Figure S12. Structures of the genes that genetically interact with *KEU*, indicating the nature and positions of their mutations. Structures are shown for (A) *SEC1B*, (B) *SEC6*, (C) *SYP21*, (D) *SYP132* and (E) *KNOLLE* genes. Boxes and lines between boxes indicate exons and introns, respectively. White boxes represent the 5'- and 3'-UTRs. Triangles indicate the T-DNA insertions in *kn^{X37-2}*, *sec1b-2*, *sec1b-1*, *syp21*, *syp132^T*, *sec6-2*, and *sec6-3*, and the T symbols delimitate the deletion in *kn^{X37-2}*. For simplicity, only one isoform of *SYP132* is shown.

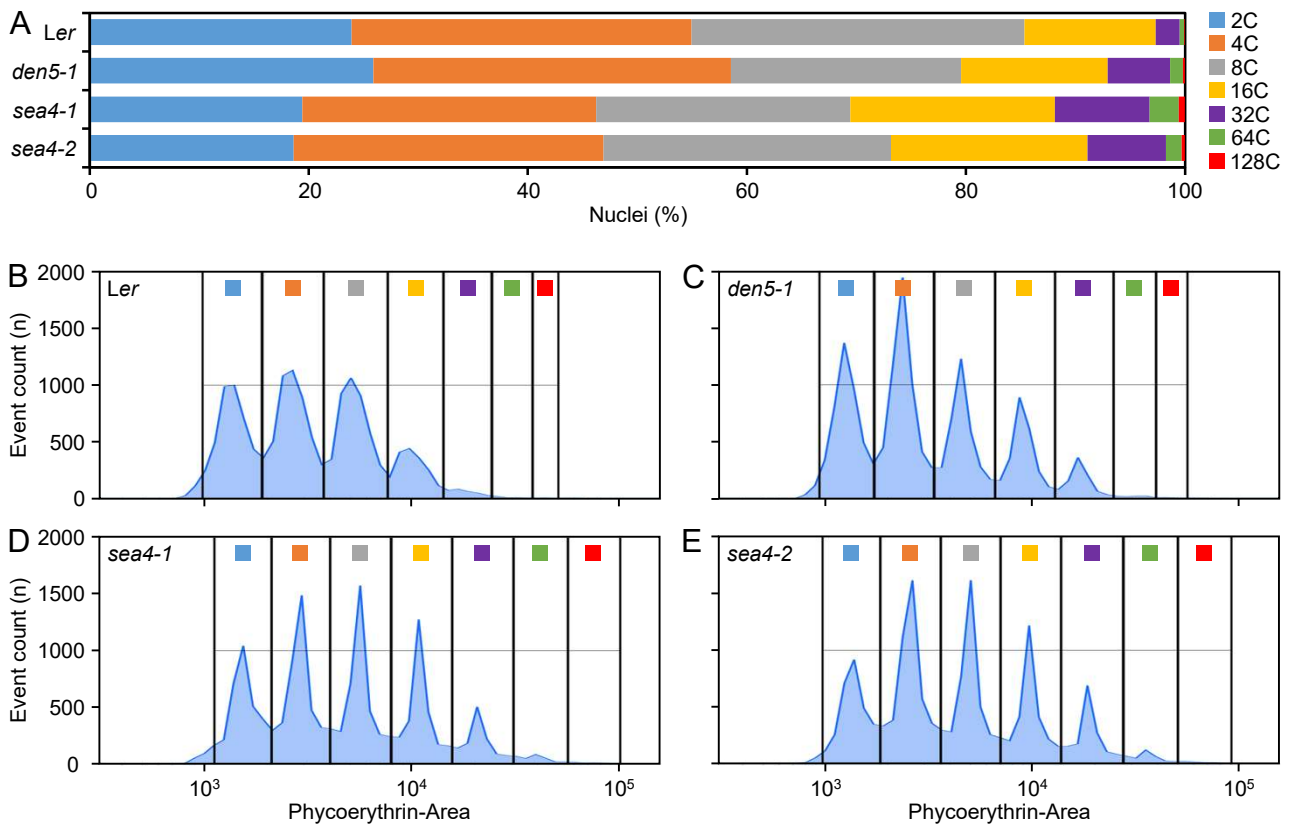


Figure S13. Nuclear ploidy levels in *sea4* leaves. (A) Distribution of nuclear DNA ploidy in *Ler*, *den5-1*, *sea4-1*, and *sea4-2* plants. Populations with different ploidy levels are indicated by different colors. (B-E) Histograms representing the frequency distribution of propidium iodide fluorescence (detected by the phycoerythrin [PE] detector of the flow cytometer) in the first pair of leaves from (B) *Ler*, (C) *den5-1*, (D) *sea4-1*, and (E) *sea4-2* plants at 21 das. Gates delineate the populations of nuclei with different ploidy levels. Squares with the same color scheme as in A represent the populations with different ploidy levels.

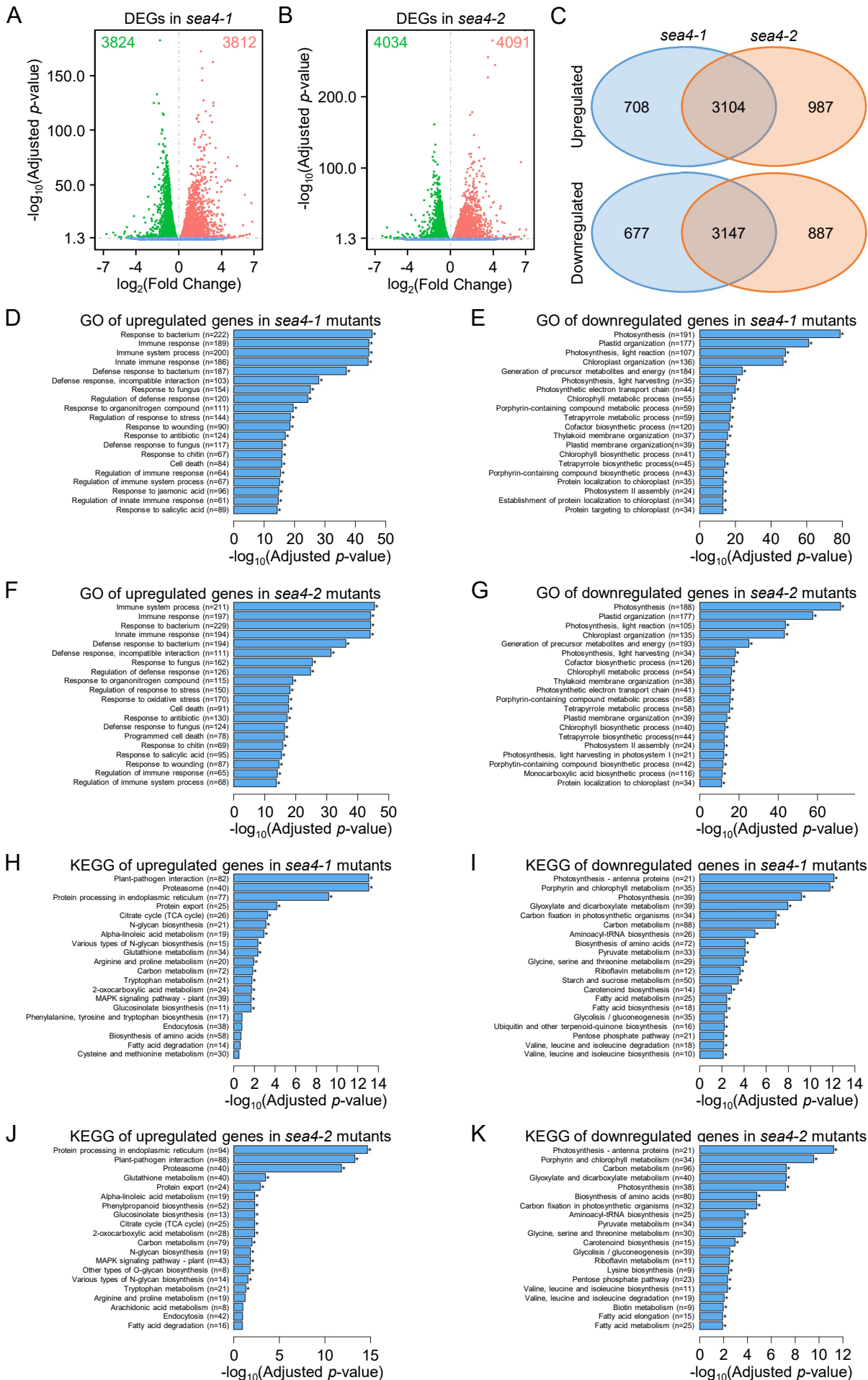


Figure S14. Differentially expressed genes in the *sea4* mutants identified by RNA-seq. Volcano plots for (A) *sea4-1* and (B) *sea4-2*, illustrating the overall distribution of differentially expressed genes (DEGs). Upregulated, downregulated, and non-differentially regulated genes are represented by red, green, and blue dots, respectively. Total number of upregulated and downregulated genes is indicated using the same color scheme. (C) Venn diagrams displaying the overlap between upregulated and downregulated genes in *sea4-1* and *sea4-2*. (D-G) GO and (H-K) KEGG enrichment analyses of upregulated (D, F, H, J) and downregulated (E, G, I, K) genes in (D, E, H, I) *sea4-1* and (F, G, J, K) *sea4-2*. The assays were performed with three biological replicates. The threshold for significance was set at $p_{adj} < 0.05$. n represents the number of DEGs associated with a specific GO or KEGG term.

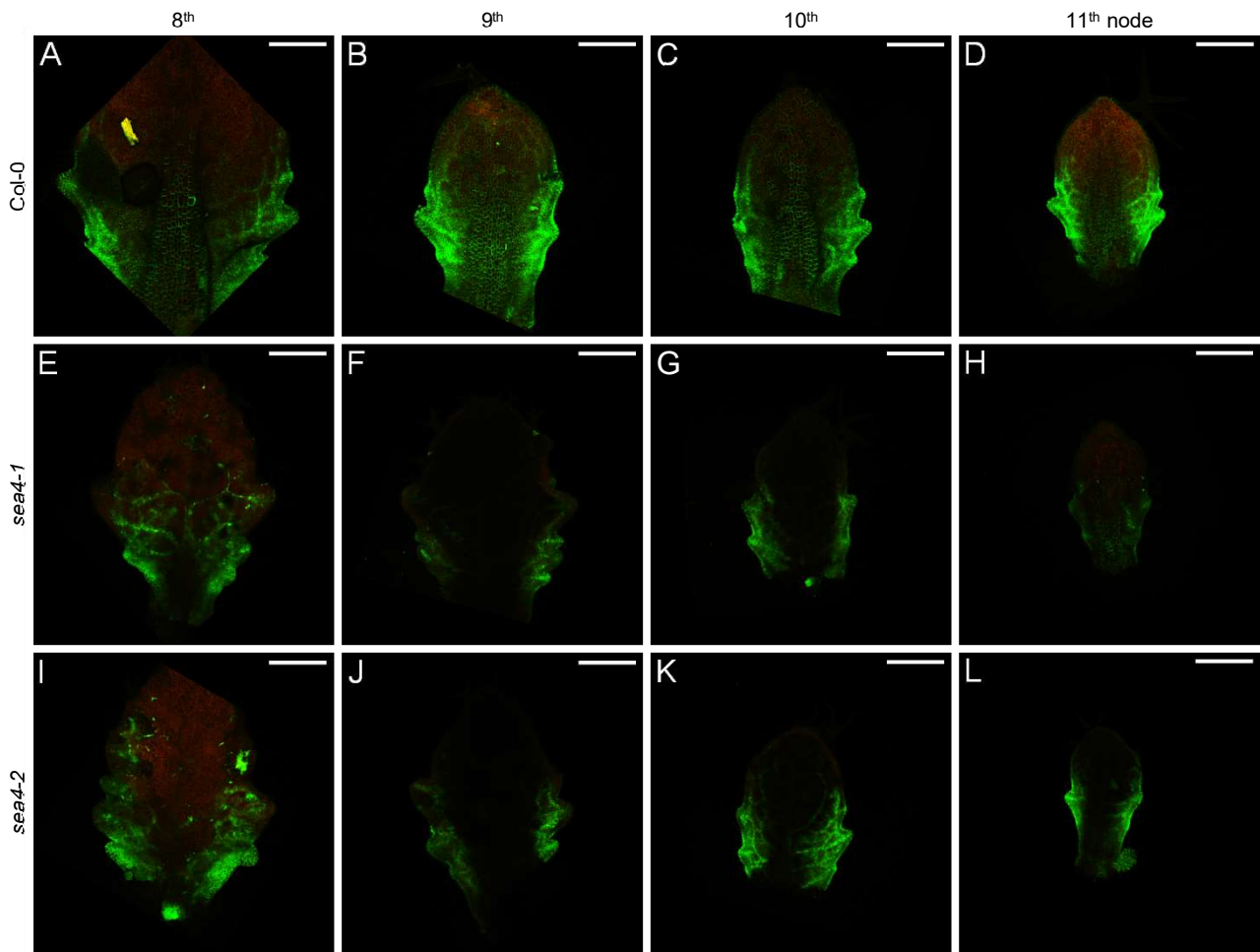


Figure S15. $PIN1_{pro}:PIN1:GFP$ expression in leaf primordia of the *sea4* mutants (20 \times). The visualization of $PIN1_{pro}:PIN1:GFP$ (green) expression in leaf primordia from successive nodes (8th-11th) is shown for (A-D) Col-0, (E-H) *sea4-1*, and (I-L) *sea4-2* plants. Chlorophyll autofluorescence is shown in red. The primordia were collected 20 das. In all figures, the primordia shown for each genotype were collected from the same plant. Scale bars: 0.2 mm.

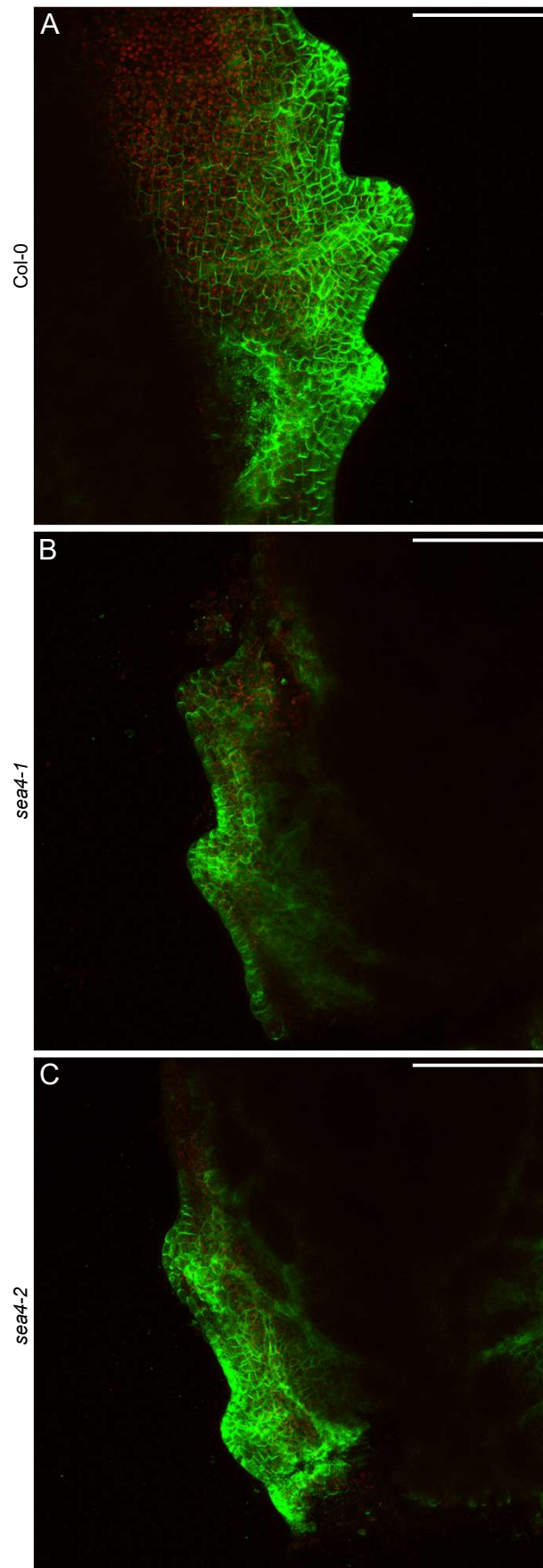


Figure S16. $PIN1_{pro}:PIN1:GFP$ expression in leaf primordia of the *sea4* mutants (40 \times). The visualization of $PIN1_{pro}:PIN1:GFP$ (green) expression at the margin of leaf primordia from the 10th node is shown for (A) Col-0, (B) *sea4-1*, and (C) *sea4-2* plants. Chlorophyll autofluorescence is shown in red. The primordia were collected 20 das. Scale bars: 0.2 mm.

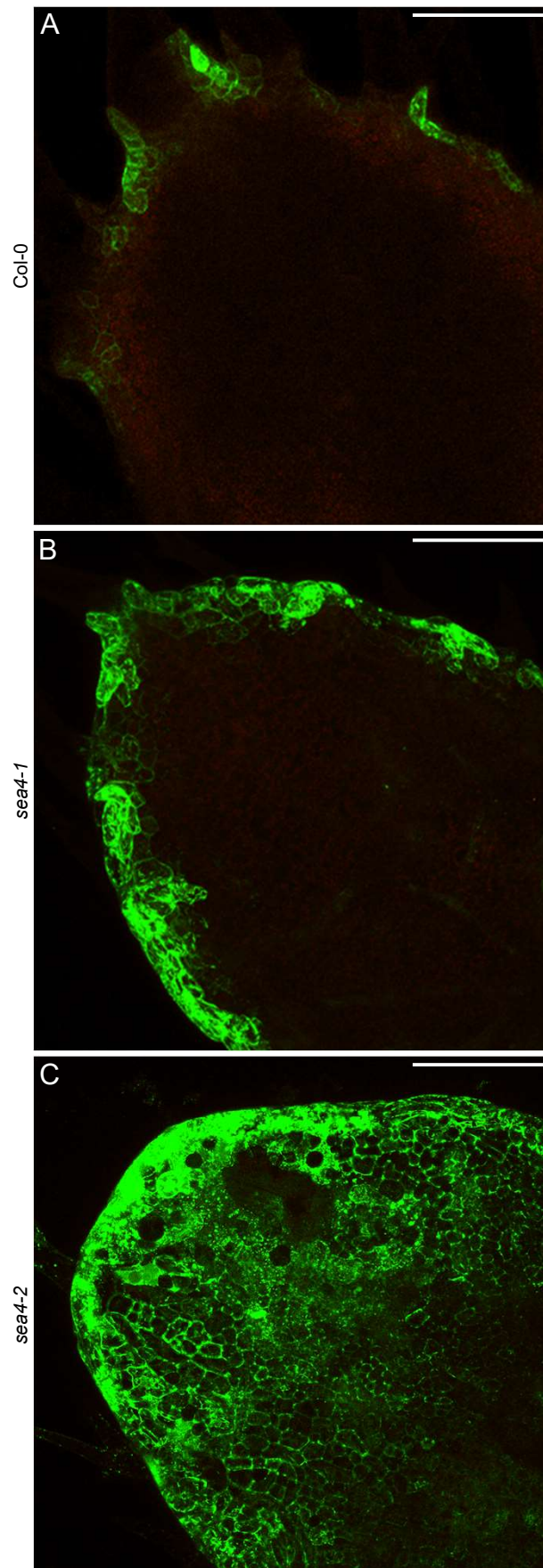


Figure S17. *DR5rev_{pro}::GFP* expression in leaf primordia of the *sea4* mutants (40×). The visualization of *DR5rev_{pro}::GFP* (green) expression at the apex of leaf primordia from the 9th node is shown for (A) Col-0, (B) *sea4-1*, and (C) *sea4-2* plants. Chlorophyll autofluorescence is shown in red. The primordia were collected 20 das. Scale bars: 0.2 mm.

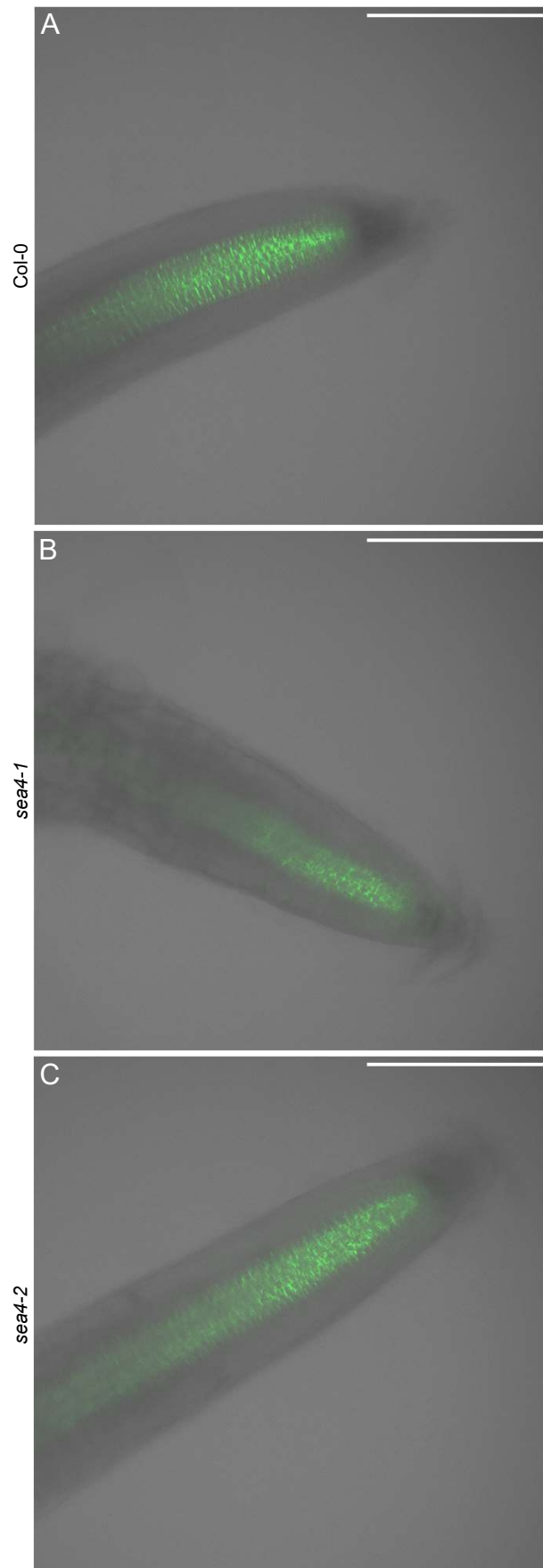


Figure S18. $PIN1_{pro}:PIN1:GFP$ expression in the root apex of the *sea4* mutants (20×). The visualization of $PIN1_{pro}:PIN1:GFP$ (green) expression in the root apex is shown for (A) Col-0, (B) *sea4-1*, and (C) *sea4-2* plants. Transillumination is shown in gray. The roots were collected 7 das. Scale bars: 0.2 mm.

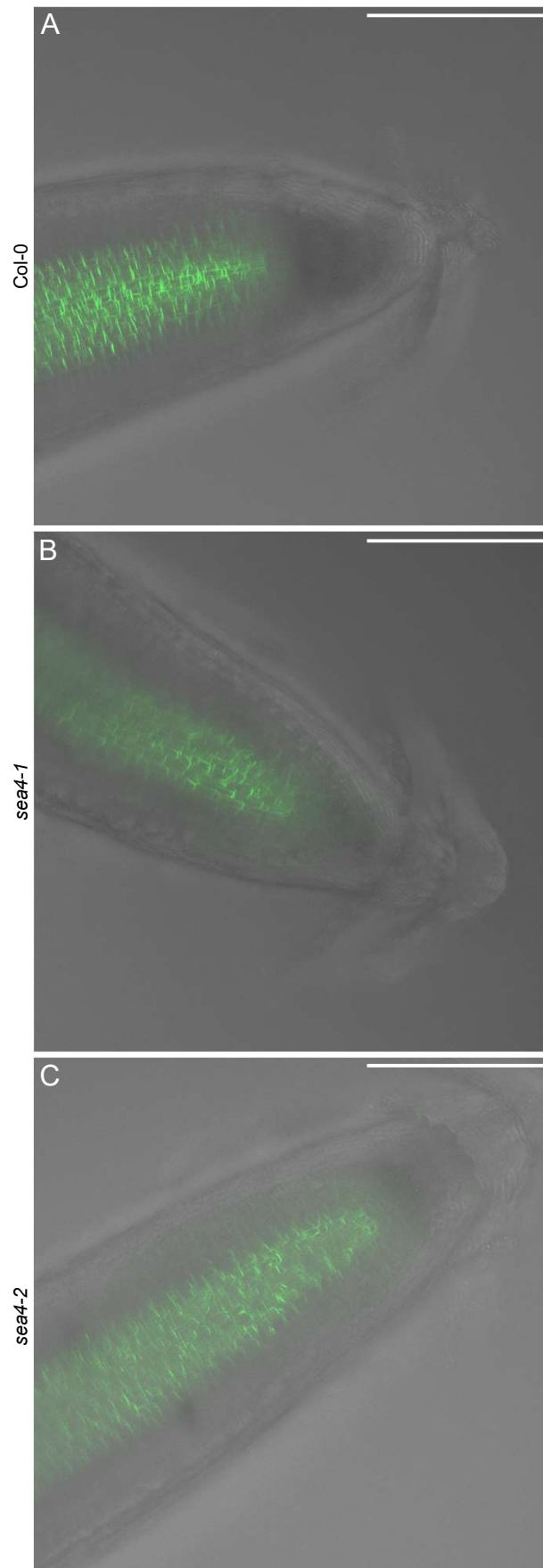


Figure S19. $PIN1_{pro}:PIN1:GFP$ expression in the root apex of the *sea4* mutants (40×). The visualization of $PIN1_{pro}:PIN1:GFP$ (green) expression in the root apex is shown for (A) Col-0, (B) *sea4-1*, and (C) *sea4-2* plants. Transillumination is shown in gray. The roots were collected 7 das. Scale bars: 0.2 mm.

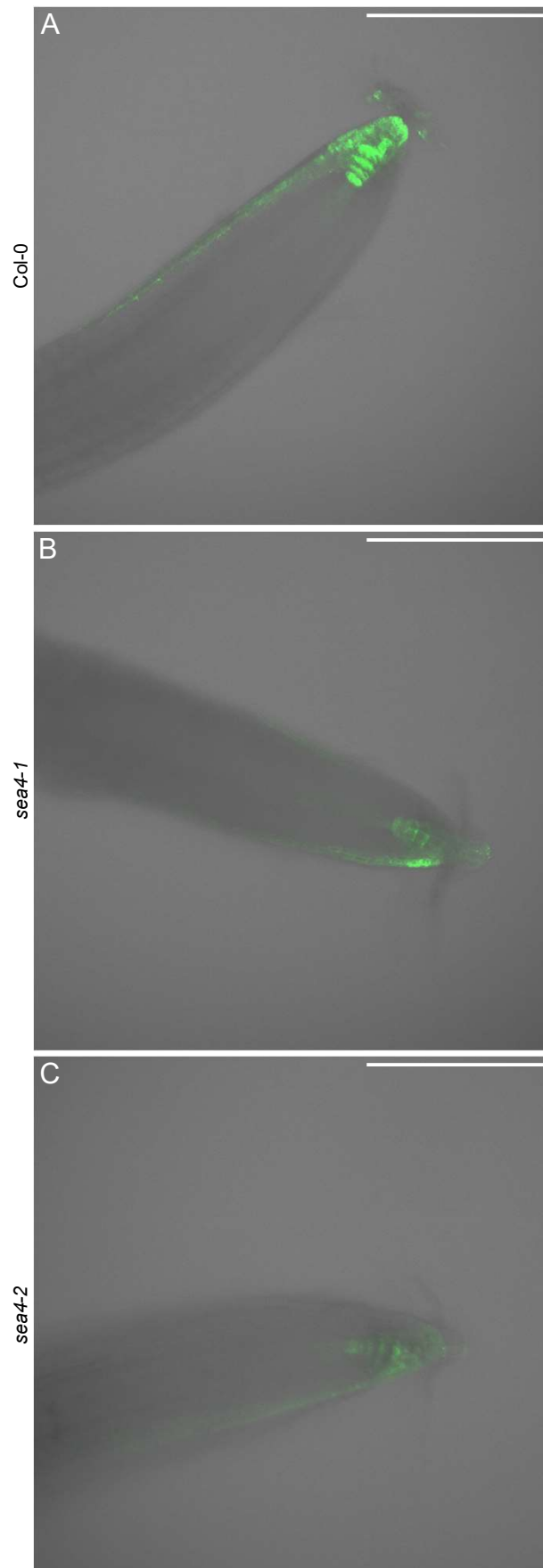


Figure S20. *DR5rev_{pro}:GFP* expression in the root apex of the *sea4* mutants (20×). The visualization of *DR5rev_{pro}:GFP* (green) expression in the root apex is shown for (A) Col-0, (B) *sea4-1*, and (C) *sea4-2* plants. Transillumination is shown in gray. The roots were collected 7 das. Scale bars: 0.2 mm.

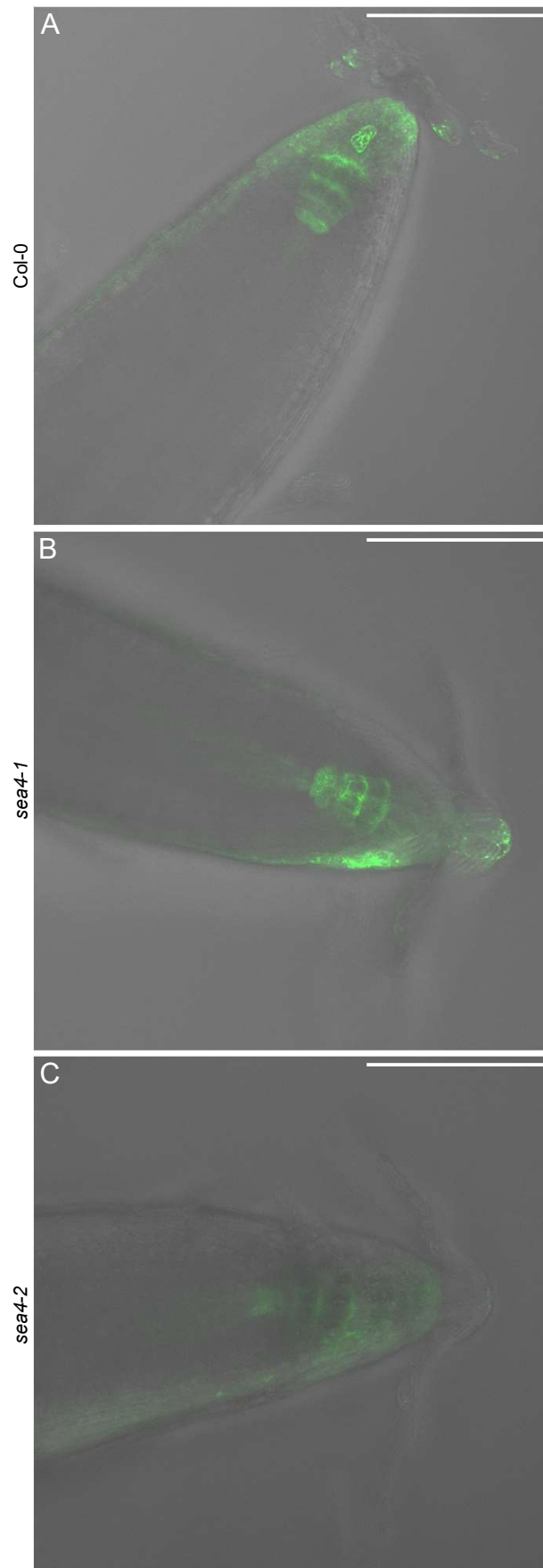


Figure S21. *DR5rev_{pro}::GFP* expression in the root apex of the *sea4* mutants (40×). The visualization of *DR5rev_{pro}::GFP* (green) expression in the root apex is shown for (A) Col-0, (B) *sea4-1*, and (C) *sea4-2* plants. Transillumination is shown in gray. The roots were collected 7 das. Scale bars: 0.2 mm.

Table S1. Primer sets used in this work

Purpose	Names	Oligonucleotide sequence (5' → 3')		
		Forward primer (F or D)	Reverse primer (R or C)	
Low-resolution mapping	nga59-F/R ^a	ATCTGTGTTCACTCGCCGCC	GCCTAACAAATTTAAAGTTAAGACT	
	nga63-F/R	AACCAAGGCACAGAAGCG	ACCCAAGTGATCGCCACC	
	cer465532-F/R	CATTACACTAGAGACTAGAC	TAATATACATGTGAGCATCCTGAC	
	F16J7-TRB-F/R	GTGTCTTGATACGCGTGCATC	TGATGTTGAGATCTGTGTGCAG	
	cer448767-F/R	GCTAGCAGTCGTAACATAA	TGGGATAAACTCGTTGTCGTT	
	cer474022-F/R	GGAGATAAGCGATGAACGAGA	CGGATTAGCGCAGAGGGTTT	
	cer451935-F/R	CCAACAAATTCGTAAACGGCGAA	GGGCTAGGTTAGTCTCCCTT	
	JV18/19-F/R ^a	TGTCGTATATCAATCGAAAAAGAG	AATTCAGTATCGAGATACCCT	
AthZFPG-F/R ^b	TTGCGTTTCCACATTTGTTT	TGGGTCAATTCACATGTAGAGA		
Sequencing	At1g12360-5F/R	GCTCACAATGAAAGCATGTACTG	CTCATGTATAACAGGGGCAATC	
Genotyping of <i>keu-21</i> , <i>keu-22</i> and <i>keu-23</i>	At1g12360-2F/2R	GGTACTTGGGGTTTTAGCGC	TGAATGCCTTGGTATTGTTACTTG	
	<i>keu</i> ^{MM125}	KEU in 14/KEU in 17 ^c	CATGAGATATTGAGCTGATGAGC	AGTAGTGTCTGTGCAAATAGG
	<i>kn</i> ^{X37-2}	X37-2DIII/2CIII ^c	GGGATGGATATGGTGGTGC	AAGGCTCTCTGGGACTCCGG
	SALK_072337C and SALK_100970	At1g71820-2F/2R	TCGTGGTGAATACTGGATGCA	ATCCTAGTGCAAGTGGCCAC
	SAIL_580_C04	At5g16830-F/R	GGAGATATGAAGGAACGAGGA	CATGCATTTTGTCTCTCGAGAG
	SAIL_403_B09	At5g08080-F/R	TGCCTGGATGTAACACGTGTA	ACTCTCACCTTCAGAAGATCG
	GK-601G09	At4g12120-F/R	AGCTGCCCGAGATCTCTTAG	GATGTATGTCGTGCCTCCTC
	GK-283F10	At4g12120-2F/2R	AGCTTCCATTTCTTTCTGGCC	CCCAGGAACGGCAAAAATCTA
T-DNA insertion verification	LBb1.3 ^d	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC		
	LB (SAIL) ^d	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC		
	LB-PAC161 ^d	ATATTGACCATCATACTCATTGC		

The *sea4-1* and *sea4-2* alleles were genotyped using the At1g12360-5F/R primer pair. ^{a-d}Sequences taken from ^aPonce et al. (2006), ^bPonce et al. (1999), ^cKarnahl et al. (2018) and ^d<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>.

Table S2. Candidate mutations identified in *sea4-1* by Easymap

Position ^a	Allele Frequency	DTP ^b	Nucleotide (ref → alt) ^c	Gene	Gene element	Amino acid (ref → alt) ^c
1787746	0.89	– 1212254	G → A	At1g05890	CDS	G → E
2165044	0.90	– 834956	G → A	At1g07030	CDS	–
2791816	0.95	– 208184	G → A	At1g08730	CDS	–
3010996	0.93	10996	G → A	At1g09320	Intron	–
3253461	0.96	253461	G → A	At1g09970	CDS	–
3363247	0.95	363247	G → A	–	–	–
3500496	0.96	500496	G → A	At1g10540	CDS	L → F
3578311	1.00	578311	G → A	At1g10700	CDS	G → S
3660993	0.92	660993	G → A	At1g10890	Promoter	–
3980566	0.97	980566	G → A	At1g11700	CDS	G → R
4045453	0.90	1045453	G → A	–	–	–
4112858	1.00	1112858	G → A	At1g12060	CDS	E → K
4198211	0.95	1198211	G → A	At1g12260	Intron	–
4241496	0.93	1241496	G → A	At1g12360	CDS	–
4308352	0.98	1308352	G → A	At1g12540	CDS	–
4464407	0.92	1464407	G → A	At1g12990	CDS	R → H
4779263	0.89	1779263	G → A	At1g13860	CDS	L → F
4919214	0.91	1919214	G → A	At1g14310	CDS	R → Q
4949064	0.93	1949064	G → A	At1g14370	Intron	–
4982999	0.93	1982999	G → A	At1g14460	CDS	–

^aPosition of the nucleotide mutated in the reference genome. ^bDistance to selected position. ^cref: reference. alt: alternative.

Table S3. Candidate mutations identified in *sea4-2* by EasyMap

Position ^a	Allele Frequency	DTP ^b	Nucleotide (ref → alt) ^c	Gene	Gene element	Amino acid (ref → alt) ^c
1615441	0.87	- 1384559	C → T	-	-	-
1705363	0.93	- 1294637	C → T	At1g05670	CDS	A → T
1905773	0.90	- 1094227	C → T	At1g06220	CDS	P → L
2027916	0.86	- 972084	C → T	At1g06590	CDS	G → E
2538673	0.84	- 461327	C → T	-	-	-
2797435	0.93	- 202565	C → T	At1g08750	CDS	L → F
2928659	0.94	- 71341	C → T	At1g09080	CDS	-
3055323	0.88	55323	C → T	At1g09470	Intron	-
3101327	0.91	101327	C → T	At1g09575	Intron	-
3121169	0.96	121169	C → T	At1g09640	CDS	P → L
3240677	0.91	240677	C → T	At1g09940	Intron	-
3407630	0.93	407630	C → T	At1g10320	Intron	-
3520858	0.90	520858	C → T	At1g10586	Intron	-
3732394	0.93	732394	C → T	-	-	-
3843073	0.91	843073	C → T	At1g11340	CDS	V → I
4088965	0.96	1088965	C → T	At1g12000	CDS	G → D
4240281	0.87	1240281	C → T	At1g12360	CDS	S → L
4510248	0.93	1510248	C → T	At1g13130	Intron	-
4515482	0.90	1515482	C → T	-	-	-
4634835	0.92	1634835	C → T	At1g13410	Intron	-
4895717	0.87	1895717	C → T	At1g14230	Intron	-
4924756	0.89	1924756	C → T	At1g14330	Intron	-

^aPosition of the nucleotide mutated in the reference genome. ^bDistance to selected position. ^cref: reference. alt: alternative.

Table S4. Retention of the 9th intron of *KEU* as shown by RNA-seq data

Sample	Number of reads		Total reads	
	with retention	without retention	with retention (%)	without retention (%)
Ler replicate #1	0	172	2.32	97.68
Ler replicate #2	7	212		
Ler replicate #3	6	164		
<i>sea4-1</i> replicate #1	899	13	99.17	0.83
<i>sea4-1</i> replicate #2	1101	4		
<i>sea4-1</i> replicate #3	733	6		
<i>sea4-2</i> replicate #1	15	177	2.40	97.60
<i>sea4-2</i> replicate #2	0	263		
<i>sea4-2</i> replicate #3	2	250		

Table S5. Expression of *KEU* shown by RNA-seq data

Sample	<i>KEU</i> reads	RNA-seq reads	SC ^a	Mean SC	Relative mean SC
Ler replicate #1	1354	57171674	23.67	24.98	1.00
Ler replicate #2	1536	62084344	24.73		
Ler replicate #3	1456	54922570	26.52		
<i>sea4-1</i> replicate #1	7897	58983680	133.85	127.36	5.10
<i>sea4-1</i> replicate #2	9319	70165558	132.75		
<i>sea4-1</i> replicate #3	6328	54794912	115.47		
<i>sea4-2</i> replicate #1	2049	5450562	37.60	38.76	1.55
<i>sea4-2</i> replicate #2	2337	60379150	38.69		
<i>sea4-2</i> replicate #3	2328	58217096	40.00		

^aStandardized coverage (SC) represents the division of *KEU* reads by the total RNA-seq reads for each sample (measured in millions).

Table S6. Predicted effects of the S57L substitution on the stability and dynamics of the KEU protein

Predictor	$\Delta\Delta G$ (kcal·mol ⁻¹)	$\Delta\Delta S_{\text{vib}}$ (kcal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)
DynaMut	0.648	– 0.303
mCSM	– 0.194	–
SDM	1.310	–
DUET	0.463	–
DynaMut2	– 0.380	–

Values indicate predicted differences in the unfolding Gibbs free energy ($\Delta\Delta G$) and vibrational entropy energy ($\Delta\Delta S_{\text{vib}}$) between wild-type and mutant proteins. Positive and negative $\Delta\Delta G$ values indicate conformational stabilization and destabilization, respectively. Negative $\Delta\Delta S_{\text{vib}}$ values indicate loss of flexibility.

Table S7. Phenotypic variability in the progeny of selfed *sea4* plants

		Ler			<i>sea4-1</i>				<i>sea4-2</i>			
		NGS	SP	PNL	NGS	PEPSL	SPMSL	PSL	NGS	PEPSL	SPMSL	PSL
NGS ^a	NGS ^b	6			73				1			
	SPEC ^b		1			1						
	SEC ^b						1					
	PTL ^b											
SUC ^a	NGS ^b											
	SPEC ^b					2						
	SEC ^b					3	3					
	PTL ^b			1			1	2				
SDC ^a	NGS ^b											
	SPEC ^b		2									
	SEC ^b		4			6	1					
	PTL ^b		3	10			6	5		1		2
SCEC ^a	NGS ^b											
	SPEC ^b		1				1					
	SEC ^b		12	1		11		1		1	1	
	PTL ^b		7	174		4	5	130		16	5	213

^{a,b}Phenotypes observed ^a7 das and ^b14 das. All the remaining data were collected 21 das. NGS: non-germinated seeds. SUC: seedlings with unexpanded cotyledons. SDC: seedlings with defined cotyledons. SCEC: seedlings with completely expanded cotyledons. SPEC: seedlings with partially expanded cotyledons. SEC: seedlings with expanded cotyledons. PTL: plants with true leaves. SP: small plants. PNL: plants with normal leaves. PEPSL: plants with poorly expanded and prematurely senescent leaves. SPMSL: stunted plants with mildly serrated leaves. PSL: plants with serrated leaves.

Table S8. Venation pattern characteristics of *sea4* cotyledons and leaves

		<i>Ler</i>	<i>sea4-1</i>	<i>sea4-2</i>
Leaf area (mm ²)	Cotyledon	8.62 ± 1.88	7.40 ± 1.32	6.93 ± 0.89*
	1 st node leaf	33.51 ± 10.25	6.30 ± 4.80**	9.78 ± 3.70**
	3 rd node leaf	52.53 ± 17.53	12.85 ± 4.48**	12.60 ± 6.09**
Vein length/area (mm/mm ²)	Cotyledon	1.56 ± 0.15	1.56 ± 0.12	1.72 ± 0.16*
	1 st node leaf	2.71 ± 0.44	3.58 ± 0.87**	2.93 ± 0.49
	3 rd node leaf	3.40 ± 0.41	3.67 ± 0.47	4.43 ± 0.78**
Bifurcations/area (n/mm ²)	Cotyledon	0.76 ± 0.15	0.75 ± 0.15	1.13 ± 0.29**
	1 st node leaf	3.84 ± 1.34	7.37 ± 3.81**	5.07 ± 1.78
	3 rd node leaf	5.83 ± 1.55	7.34 ± 2.09	11.55 ± 3.79**
Terminal veins /area (n/mm ²)	Cotyledon	0.11 ± 0.12	0.22 ± 0.14*	0.21 ± 0.19
	1 st node leaf	1.16 ± 0.25	3.16 ± 1.60**	2.06 ± 0.72**
	3 rd node leaf	1.41 ± 0.26	2.48 ± 0.64**	2.96 ± 0.57**
Leaf circularity	Cotyledon	1.21 ± 0.12	1.16 ± 0.09	1.21 ± 0.09
	1 st node leaf	1.12 ± 0.09	1.24 ± 0.14*	1.32 ± 0.21**
	3 rd node leaf	1.22 ± 0.07	1.26 ± 0.13	1.40 ± 0.13**

Values are mean ± standard deviation. Asterisks indicate a statistically significant difference from *Ler* in a Student's *t* test (**P* < 0.05; ***P* < 0.01).

Table S9. Nuclear DNA ploidy distribution in the first pair of leaves of the *sea4* mutants

Ploidy level	<i>Ler</i>	<i>den5-1</i>	<i>sea4-1</i>	<i>sea4-2</i>
2C	23.91 ± 1.88	25.89 ± 1.47	19.43 ± 0.40*	18.62 ± 1.01*
4C	31.06 ± 0.60	32.67 ± 1.16	26.82 ± 0.89**	28.29 ± 0.88*
8C	30.39 ± 1.56	20.99 ± 0.62**	23.22 ± 1.14**	26.26 ± 2.27
16C	11.97 ± 1.18	13.40 ± 1.34	18.68 ± 0.23**	17.94 ± 1.09**
32C	2.21 ± 0.74	5.71 ± 0.58**	8.62 ± 0.51**	7.15 ± 2.60*
64C	0.39 ± 0.21	1.15 ± 0.56	2.69 ± 0.54**	1.43 ± 0.84
128C	0.07 ± 0.07	0.19 ± 0.02*	0.55 ± 0.16**	0.31 ± 0.21

Values are mean ± standard deviation. Asterisks indicate a statistically significant difference from *Ler* in a Student's *t* test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

Table S10. Configuration parameters of the Leica Stellaris 8 STED confocal microscope

Transgenic line	Objective	WLL intensity (%)	PMT Trans gain	LUT values for GFP		LUT values for chlorophyll autofluorescence		LUT values for transillumination	
				Max	Min	Max	Min	Max	Min
<i>PIN1_{pro}:PIN1:GFP</i>	20x	50	10.76	255	0	255	0	255	255
	40x	50	13.06	255	0	100	0	255	255
<i>DR5rev_{pro}:GFP</i>	20x	8	14.76	200	0	60	0	255	255
	40x	8	16.76	255	0	100	0	255	255

WLL: white light laser. PMT Trans: photon multiplier tube transillumination. LUT: look-up tables.

Table S11. RNA-seq quality control summary

Sample	Number of clean reads	Q30 quality score* (%)	Mapped reads (%)
<i>Ler</i> replicate #1	28585837	94.11	96.05
<i>Ler</i> replicate #2	31042172	93.68	95.43
<i>Ler</i> replicate #3	27461285	93.92	95.80
<i>sea4-1</i> replicate #1	29491840	94.01	95.08
<i>sea4-1</i> replicate #2	35082779	93.48	95.03
<i>sea4-1</i> replicate #3	27397456	93.85	95.07
<i>sea4-2</i> replicate #1	27252781	93.81	95.16
<i>sea4-2</i> replicate #2	30189575	93.97	95.14
<i>sea4-2</i> replicate #3	29108548	93.99	95.16

*Percentage of bases whose correct base recognition rates are greater than 99.9% in total bases.

X.- AGRADECIMIENTOS

X.- AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la financiación del trabajo que se realiza en el laboratorio de José Luis Micol por la Generalitat Valenciana (PROMETEO/2019/117, IDIFEDER/2020/019, IDIFEDER/2021/033 y CIPROM/2022/2) y el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (EQC2018-005181-P, EQC2019-006592-P, PGC2018-093445-B-I00 e ID2021-127725NB-I00). Durante mi periodo predoctoral he sido beneficiario de contratos predoctorales de los programas “Mejora de la formación y la empleabilidad de personal técnico y de gestión de la I+D+I” (GJIDI/2018/A/214) e Investigo (INVEST/2022/509) de la Generalitat Valenciana.

Gracias en primer lugar a mis directores de Tesis, José Luis Micol y Raquel Sarmiento. A José Luis por darme la oportunidad de realizar esta Tesis en su laboratorio, por todos los conocimientos que me ha aportado durante estos años y por haber impulsado un poco más mi obsesión por los detalles. A Raquel por haberme guiado en los momentos duros en los que el camino no se veía claro.

A María Rosa Ponce por sus críticas constructivas en los seminarios de trabajo, que me han hecho darme cuenta de cosas que había pasado totalmente por alto.

A los profesores del área de Genética, Pedro Robles, Víctor Quesada, Héctor Candela, José Manuel Pérez y Sara Jover, por haberme preparado tan bien durante la carrera y el máster para afrontar esta tesis.

A las secretarías del Departamento de Biología Aplicada, en especial a Rosana, por toda su ayuda con el papeleo que tan mal se me da.

A los técnicos de laboratorio, José Manuel, María José, Juan y María, que siempre han estado dispuestos a ayudarme en todo lo que he necesitado, y a veces un poco más.

A los doctorandos de la generación anterior del laboratorio, David, Eduardo y Tamara, de los que tanto aprendí sobre cómo desenvolverse dentro del laboratorio y sobre cómo afrontar una tesis. Mención especial para Tamara, que también fue mi tutora durante un verano y me enseñó el poder de las listas de tareas (y de las listas de listas de tareas).

A todos mis compañeros, que me han acompañado durante todos estos años de tesis: Samuel, Sara, Uri, Rossy, Gabriela, Juanfe, Nuria y Carlos. A Riad, por ser un compañero de pasillo estupendo, aunque se riera de mi pronunciación del francés. A Rosa, que fue mi primera tutora y codirectora de mi TFG y TFM, por enseñarme en mis primeros pasos dentro del laboratorio. A Carla, por ese humor ácido que tanto me gusta, aunque un poquito menos cuando es hacia mí. A Lucía, por enseñarme que con esfuerzo se pueden conseguir muchas cosas. A Adrián, por haber compartido tantísimos momentos juntos (e

incluso una cama en Oviedo). A Sergio, por no fallar ni un día a nuestros almuerzos y meriendas. A Àngela, por estar siempre dispuesta a escuchar mis problemas e intentar ayudarme. A Emilio, porque ha sido uno de los últimos en llegar al laboratorio, pero ojalá lo hubiera hecho mucho antes.

A mis alumnos de verano, Ana, Àlvaro, Carolina y Emilio, por todo lo que me habéis ayudado con vuestro esfuerzo y con vuestras preguntas, que me han ayudado a entender mejor cosas que pensaba que ya sabía.

A mis amigos, en especial a Santi, Cynthia, Miriam y Pascual, por haber hecho que me olvidara de los problemas del laboratorio en mis ratos libres.

A mi madre, mi padre y mi abuela, que sin entender demasiado lo que estaba investigando, siempre han estado dispuestos a escucharme y a apoyarme.

A Gema, porque sin ti esta tesis no hubiera sido posible. Me has ayudado desde el primer hasta el último minuto, en los buenos y en los malos momentos, con toda tu alegría y cariño. Muchas gracias.