



Universidad Miguel Hernández de Elche

**Obtención de combinaciones cuádruples
de alelos mutantes de genes de la familia
CUPULIFORMIS de Arabidopsis**

Alba del Carmen Bonete Lax

Tutores:

José Luis Micol Molina

Lucía Juan Vicente

Área de Genética

Departamento de Biología Aplicada

Grado en Biotecnología

Instituto de Bioingeniería

Curso académico 2023-2024

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

LUCÍA JUAN VICENTE, contratada predoctoral de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR:

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

Lucía Juan Vicente

José Luis Micol Molina

Elche, 20 de junio de 2024

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	III
I.- RESUMEN	1
II.- INTRODUCCIÓN	2
II.1.- Control epigenético del desarrollo en Arabidopsis	2
II.2.- Las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe ²⁺	2
II.3.- Duplicación génica y redundancia funcional	3
II.4.- La tecnología CRISPR/Cas	4
II.5.- Obtención de construcciones para el análisis funcional de genes mediante la tecnología GoldenBraid2.0	5
II.5.1.- Transferencia de genes en Arabidopsis	5
II.5.2.- El sistema GoldenBraid2.0	6
III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	8
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	9
IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria	9
IV.2.- Abreviaturas, acrónimos y fórmulas químicas	9
IV.3.- Gramática y terminología	9
IV.4.- Nomenclatura genética	10
IV.5.- Estirpes empleadas en este trabajo	10
IV.5.1.- Estirpes de Arabidopsis.....	10
IV.5.2.- Estirpes bacterianas.....	10
IV.6.- Cultivos.....	11
IV.6.1.- Condiciones de cultivo de Arabidopsis.....	11
IV.6.1.1.- Cultivo en placa de Petri	11
IV.6.1.2.- Cultivo en maceta.....	12
IV.6.1.3.- Recolección de semillas	13
IV.6.1.4.- Cruzamientos.....	13
IV.6.2.- Condiciones de los cultivos microbianos.....	13
IV.7.- Disoluciones	14
IV.7.1.- Medios de cultivo para Arabidopsis.....	14
IV.7.1.1.- Medios de cultivo líquidos	14
IV.7.1.2.- Medios de cultivo sólidos.....	15
IV.7.2.- Medios de cultivo para microorganismos	15
IV.7.2.1.- Medios de cultivo líquidos	15
IV.7.2.2.- Medios de cultivo sólidos.....	15
IV.7.2.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos.....	16
IV.7.3.- Tampones y otras disoluciones de uso general	16
IV.7.3.1.- Disoluciones para extracción de ADN	16

IV.7.3.2.- Disoluciones para electroforesis.....	16
IV.7.3.3.- Disoluciones para obtener bacterias competentes.....	17
IV.8.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos.....	17
IV.8.1.- Síntesis de ADN.....	17
IV.8.1.1.- Síntesis de oligonucleótidos.....	17
IV.8.1.2.- Amplificaciones mediante PCR.....	18
IV.8.2.- Aislamiento de ácidos nucleicos.....	18
IV.8.2.1.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis para su amplificación por PCR.....	18
IV.8.2.2.- Aislamiento de ADN plasmídico.....	19
IV.8.3.- Restricción y ligación de ADN.....	19
IV.8.4.- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	19
IV.8.5.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN.....	20
IV.9.- Genotipado de mutantes insercionales mediante PCR.....	20
IV.10.- Transformación de células bacterianas.....	21
IV.10.1.- Obtención de bacterias quimiocompetentes.....	21
IV.10.2.- Transformación por choque térmico.....	21
IV.10.3.- Transformación por electroporación.....	21
IV.10.4.- Selección de transformantes.....	22
V.- RESULTADOS.....	23
V.1.- Obtención de combinaciones triples de alelos de insuficiencia de función de genes de la familia CUPULIFORMIS.....	23
V.1.1.- Alelos nulos e hipomorfos de los genes <i>ICU11</i> , <i>CP2</i> , <i>CP3</i> y <i>CP5</i> que hemos usado en este trabajo.....	23
V.1.2.- Triples mutantes <i>icu11-5 cp3-2 cp5-1</i> e <i>icu11-5 cp3-2 cp5-2</i>	24
V.1.3.- Triples mutantes <i>cp2-1 cp3-2 cp5-1</i> y <i>cp2-1 cp3-2 cp5-2</i>	25
V.1.4.- Triples mutantes <i>cp2-3 cp3-2 cp5-1</i> y <i>cp2-3 cp3-2 cp5-1</i>	26
V.2.- Obtención de una construcción GoldenBraid 2.0 para mutagenizar <i>CP4</i> mediante CRISPR.....	26
V.2.1.- Adición del promotor <i>pU6_26</i>	28
V.2.2.- Adición de los genes de la proteína roja fluorescente y la Cas9.....	29
V.2.3.- Transformación de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
VI.- DISCUSIÓN.....	32
VII.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....	33
VIII.- BIBLIOGRAFÍA.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Posibles destinos de los parálogos generados por una duplicación génica	4
Figura 2.- Obtención de construcciones multigénicas mediante el sistema GoldenBraid2.0	7
Figura 3.- Genotipado de inserciones de ADN-T en las líneas de las colecciones SALK y SAIL.....	20
Figura 4.- Estructura de las unidades de transcripción de los genes estudiados en este trabajo	23
Figura 5.- Obtención de triples mutantes <i>icu11-5 cp3-2 cp5-1</i>	25
Figura 6.- Estructura de la unidad de transcripción del gen <i>CP4</i> con indicación de las posiciones correspondientes a las secuencias de los ARNg diseñados para su mutagénesis mediante CRISPR.....	26
Figura 7.- Construcción del vector pDGB3_alpha2_CP4.....	27
Figura 8.- Construcción del vector pDGB3_omega1_CP4.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Abreviaturas empleadas en este trabajo	9
Tabla 2.- Estirpes de <i>Arabidopsis</i> usadas en este trabajo	11
Tabla 3.- Oligonucleótidos usados en este trabajo	17
Tabla 4.- Mezcla para la reacción de digestión con <i>BsaI</i> y ligación con la ligasa de T4.....	28
Tabla 5.- Mezcla para la reacción de digestión con <i>BsmBI</i> y ligación con la ligasa T4	29

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

I.- RESUMEN

La familia *CUPULIFORMIS* (*CP*) incluye cinco genes, dos de los cuales, *INCURVATA11* (*ICU11*) y *CP2*, codifican componentes de la maquinaria epigenética de *Arabidopsis* y son desigualmente redundantes. En este Trabajo de Fin de Grado (TFG) hemos continuado intentos anteriores de establecer si *CP3*, *CP4* y *CP5* presentan redundancia funcional, entre sí y/o con *ICU11* y *CP2*. Aunque se habían generado previamente cuádruples mutantes *icu11-5 cp3-1 cp4-5 cp5-1* y *cp2-3 cp3-1 cp4-5 cp5-1*, los alelos *cp3-1* y *4-5* podrían no ser nulos. Además, *CP4* y *CP5* están ligados, lo que dificulta la obtención de dobles mutantes *cp4 cp5* mediante cruzamientos, por lo que, previamente al inicio de este TFG se diseñaron dos ARN guía para mutagenizar *CP4* mediante la tecnología CRISPR/Cas9. Hemos obtenidos triples mutantes *cp2-1 cp3-2 cp5-1*, *cp2-1 cp3-2 cp5-2* y *cp2-3 cp3-2 cp5-2* y hemos generado una construcción de CRISPR/Cas9 para mutagenizar *CP4* y la hemos empleado para transformar células de *Agrobacterium tumefaciens*.

Palabras clave: *Arabidopsis*, *CUPULIFORMIS*, CRISPR/Cas9, GoldenBraid

The *CUPULIFORMIS* (*CP*) family includes five genes, two of which, *INCURVATA11* (*ICU11*) and *CP2*, encode components of the epigenetic machinery of *Arabidopsis* and are unequally redundant. In this End of Degree Thesis (TFG), we have continued previous attempts to determine whether *CP3*, *CP4*, and *CP5* exhibit functional redundancy, either among themselves and/or with *ICU11* and *CP2*. Although quadruple mutants *icu11 5 cp3-1 cp4-5 cp5-1* and *cp2-3 cp3-1 cp4-5 cp5-1* had been previously generated, the *cp3-1* and *4-5* alleles may not be null. Additionally, *CP4* and *CP5* are linked, which complicates obtaining *cp4 cp5* double mutants through crossings. Therefore, prior to the start of this TFG, two guide RNAs were designed to mutagenize *CP4* using CRISPR/Cas9 technology. We have obtained triple mutants: *cp2-1 cp3-2 cp5-1*, *cp2-1 cp3-2 cp5-2*, and *cp2-3 cp3-2 cp5-2* and we have generated a CRISPR/Cas9 construct to mutagenize *CP4* and used it to transform *Agrobacterium tumefaciens* cells.

Keywords: *Arabidopsis*, *CUPULIFORMIS*, CRISPR, GoldenBraid

II.- INTRODUCCIÓN

II.- INTRODUCCIÓN

II.1.- Control epigenético del desarrollo en Arabidopsis

El desarrollo postembrionario de las plantas es un proceso continuo y especificado por los meristemas; en los animales, por el contrario, se da una especificación fundamentalmente embrionaria de los órganos y tejidos (Pikaard y Mittelsten Scheid, 2014). La maquinaria epigenética de las plantas regula la expresión de muchos genes de forma reversible y heredable mitóticamente, sin alterar la secuencia del ADN y en respuesta a factores ambientales, contribuyendo así a la adaptación a los cambios en el ambiente (Yamamuro *et al.*, 2016). *Arabidopsis thaliana* (en adelante, Arabidopsis) es la planta modelo más empleada para la biología vegetal aplicada, la innovación agronómica y la biotecnología (Yaschenko *et al.*, 2024) y cuenta con más de 130 reguladores epigenéticos, que incluyen enzimas implicadas en la modificación química del ADN y las histonas (Pikaard y Mittelsten Scheid, 2014), que juegan papeles centrales en la función meristemática.

Arabidopsis es una planta anual, cuya reproducción requiere una adecuada regulación de los genes que inducen la floración, que depende de factores ambientales como la duración del día (el fotoperiodo) y una exposición prolongada al frío invernal (la vernalización) (Ibrar *et al.*, 2023). Por ejemplo, el gen inductor de la floración *FLOWERING LOCUS T (FT)* se expresa en condiciones de día largo (Adrian *et al.*, 2010) y es reprimido por *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, cuya expresión se reduce tras la vernalización (Goodrich *et al.*, 1997; Kim y Sung, 2014). *FT* y *FLC* están regulados por marcas epigenéticas activadoras, como la trimetilación de la lisina 36 de la histona H3 (H3K36me3), y represoras, como la H3K27me3 (Shafiq *et al.*, 2014), que es depositada por el Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). Las marcas H3K36me3 y H3K27me3 son antagonistas: cuando está presente la primera, el PRC2 no deposita la segunda (Yang *et al.*, 2014). Durante la vernalización, el PRC2 deposita la marca H3K27me3 en un segmento de la cromatina de *FLC*, conocida como región de nucleación, que con la llegada de las temperaturas primaverales, se extiende por la cromatina de *FLC*, silenciándolo de manera estable (Costa y Dean, 2019).

II.2.- Las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe²⁺

La superfamilia de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe²⁺ (2OGD) es la segunda más numerosa del reino vegetal. Está compuesta por enzimas oxidativas que carecen de grupo hemo y que se localizan en Arabidopsis en el citoplasma, el núcleo y los cloroplastos (Kawai *et al.*, 2014). Las 2OGD requieren 2-oxoglutarato (2OG) y oxígeno molecular como cosustratos, y Fe²⁺ como cofactor, para catalizar diferentes reacciones oxidativas como la hidroxilación, la desmetilación, la desaturación, el cierre y la apertura de

anillos, la epimerización, determinados reordenamientos y la halogenación (Farrow y Facchini, 2014). Esta superfamilia incluye cuatro clases de proteínas, denominadas DOXA, DOXB, DOXC y JMJ (con el dominio JumonjiC) (Kawai *et al.*, 2014; Nadi *et al.*, 2018). Las DOXA participan en la reparación del ADN mediante desmetilación oxidativa de ácido nucleicos e histonas. Las DOXB, que contienen el dominio prolil-4-hidroxilasa (P4Hc, una subclase del dominio 2OGD) (Kawai *et al.*, 2014), participan en la modificación postraducciona de los residuos de prolina de algunas proteínas de la pared celular y fitohormonas peptídicas. Las DOXC están implicadas en el metabolismo de las giberelinas, los flavonoides, el etileno y la auxina (Kawai *et al.*, 2014). Se ha demostrado que algunas JMJ son desmetilasas de histonas y que algunas de ellas participan en la regulación del momento del alzado (Accari y Fisher, 2015).

II.3.- Duplicación génica y redundancia funcional

Se dice que dos genes son funcionalmente redundantes cuando codifican proteínas capaces de ejecutar la misma función. La redundancia funcional es relativamente frecuente entre genes parálogos, cuyo origen es una duplicación génica (Figura 1, en la página 4). Aunque se asume que han sido muchas las duplicaciones génicas que han ocurrido a lo largo de la evolución de los seres vivos, han sido también muchos los casos en los que uno de los dos genes duplicados se ha perdido o pseudogenizado (Panchy *et al.*, 2016). En algunos casos, sin embargo, tras la duplicación ocurre una hipofuncionalización: uno o ambos genes duplicados sufren mutaciones que reducen su función, o uno de los dos adquiere una función antagonista (antimorfa) de la del otro, lo que conlleva que ambos sean necesarios para mantener el nivel de función conjunto por encima de un determinado umbral. También puede ocurrir que uno de los dos genes duplicados mute y adquiera una función nueva, diferente de la de su parálogo y de la del gen ancestral del que ambos proceden (neofuncionalización), o que ambos experimenten mutaciones, de modo que cada uno de los genes duplicados asuma solo una parte de la función del gen parental (subfuncionalización; Lynch y Force, 2000).

La redundancia funcional entre parálogos puede ser completa o parcial, siendo en algunos casos desigual. En una redundancia desigual, la pérdida de función de uno de los genes tiene un efecto fenotípico mayor que la de su parálogo. La redundancia desigual también puede darse entre más de dos genes (Briggs *et al.*, 2006). La existencia de redundancia funcional puede dificultar el análisis de la función de las familias génicas, haciendo imprescindible obtener mutantes múltiples (Hu *et al.*, 2023).

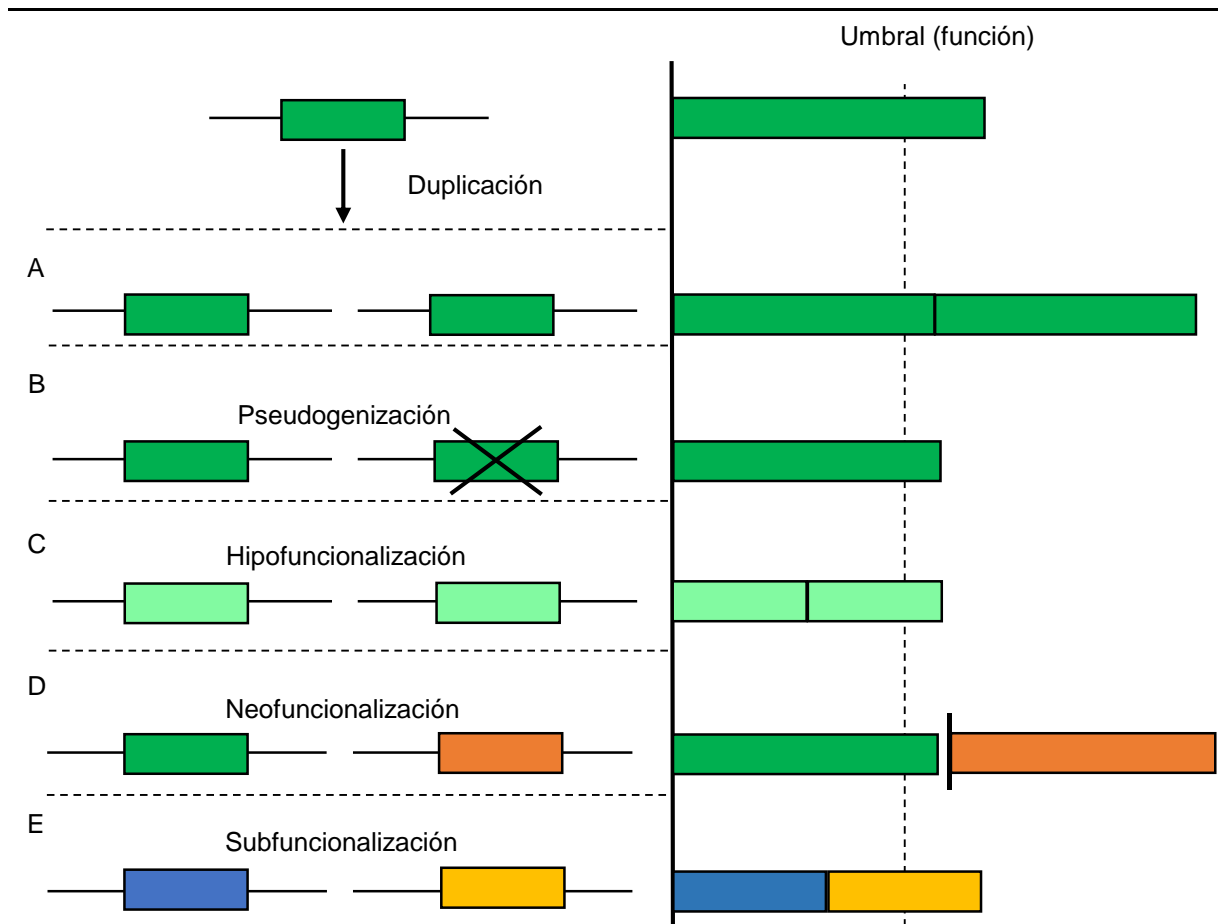


Figura 1.- Posibles destinos de los parálogos generados por una duplicación génica. (A) La duplicación puede rendir dos genes parálogos igualmente funcionales, que inicialmente conlleva un incremento en el nivel de los productos —y, en consecuencia, de la función— del gen ancestral. (B, C) Uno de los parálogos puede perder su función ancestral (B) totalmente (pseudogenización), o (C) parcialmente (hipofuncionalización); este último fenómeno puede afectar a ambos parálogos. (D, E) Un gen duplicado también puede adquirir una función que (D) interfiera la ancestral (antimorfa) o (E) sea nueva, (neofuncionalización). (F) Los dos genes parálogos también pueden asumir dos partes distintas de la función ancestral (subfuncionalización).

II.4.- La tecnología CRISPR/Cas

Las mutagénesis dirigidas permiten inducir mutaciones en posiciones específicas de genes concretos, a fin de analizar sus efectos fenotípicos y deducir de estos últimos la naturaleza de la función de los genes mutados. En las últimas décadas ha adquirido una especial relevancia la tecnología de mutagénesis dirigida denominada CRISPR/Cas, basada en un sistema de defensa adaptativo bacteriano frente a virus y plásmidos. Las Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) son secuencias palindrómicas endógenas de una bacteria y fragmentos de la secuencia del genoma de un virus (Lammoglia-Cobo *et al.*, 2016). Fueron descubiertas en las arqueas *Haloflex volcanii* y *Haloflex mediterranei* (Mojica *et al.*, 2000). Las CRISPR actúan como guías para las

endonucleasas Cas9, que producen cortes endonucleolíticos en las dos cadenas de los segmentos de ADN viral incorporados al genoma bacteriano (Deltcheva et al., 2011; Shah et al., 2013; Makarova et al., 2015).

El desarrollo de la tecnología CRISPR/Cas, basada en el sistema de defensa mencionado en el párrafo anterior, fue el motivo de la concesión del premio Nobel de Química a las investigadoras J. A. Doudna y E. Charpentier en 2020. En esta tecnología se emplea un ARN guía (gARN) de 20 pb, que conduce a la Cas9 a las secuencias de ADN de interés y genera rupturas cuya reparación induce mutaciones en cualquier punto concreto del genoma (Jinek et al., 2012). Esta tecnología se ha diversificado mucho y se emplea en numerosos ámbitos como la terapia génica, el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas, el control de enfermedades infecciosas, la biología sintética, la mejora genética de cultivos, ganado y alimentos o la producción de biocombustibles (Nidhi et al., 2021).

II.5.- Obtención de construcciones para el análisis funcional de genes mediante la tecnología GoldenBraid2.0

II.5.1.- Transferencia de genes en Arabidopsis

El método de transferencia de transgenes más habitual en Arabidopsis es la transformación mediante infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria saprófita integra de manera estable un segmento de uno de sus plásmidos (pTi) denominado ADN-T en el genoma de las células a las que infecta). Las secuencias del ADN-T que son cruciales para su integración en el genoma de la célula infectada se denominan borde izquierdo (LB, por left border) y derecho (RB, por right border) (Bourras et al., 2015).

Para la transferencia génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* se usan plásmidos pTi modificados, que pueden incorporar insertos de diferentes tamaños, flanqueados por las secuencias LB y RB del ADN-T. Para la transformación de Arabidopsis, el gen de interés es clonado en un plásmido en *Escherichia coli* y posteriormente transferido a *Agrobacterium tumefaciens* (Walkerpeach y Velten, 1994). Finalmente, se realiza una infiltración floral de Arabidopsis con las células de *Agrobacterium tumefaciens* portadoras de la construcción de interés. Los transgenes que contiene el ADN-T, tras integrarse en el genoma de Arabidopsis, suelen expresarse de manera estable, aunque en ocasiones se silencian (Clough y Bent, 2008).

II.5.2.- El sistema GoldenBraid2.0

El sistema GoldenBraid2.0 (<https://gbcloning.upv.es/>) genera construcciones multigénicas mediante el ensamblaje de varias moléculas de ADN en un orden predeterminado y su clonación en vectores plasmídicos (Figura 2, en la página 7). Está basado en la tecnología Golden Gate, que utiliza endonucleasas de restricción de tipo IIS, como *BsmBI* y *Bsal*, que cortan el ADN a una distancia de hasta 20 pb de su diana. Se emplean en este sistema las mismas secuencias adyacentes a la diana en distintos vectores para generar extremos complementarios de 4 nt, denominados prefijo y sufijo, que pueden en consecuencia ser ligados covalentemente por la ligasa de T4 (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2013).

La primera etapa de la clonación GoldenBraid es la así denominada domesticación de la molécula de ADN de interés, para su posterior ensamblaje, clonación y expresión. Mediante los vectores de entrada o plásmidos domesticadores universales (pUDP2), se obtienen insertos flanqueados por las secuencias del prefijo y el sufijo, que permiten su posterior ensamblaje en el vector de destino específico de GoldenBraid (pDGB). Cada vector pDGB contiene el gen *LacZ* flanqueado por dos dianas de restricción, para propiciar la selección de las colonias que han incorporado el inserto (apartado IV.10.4, en la página 22). Los plásmidos pDGB pueden ser de dos tipos, alfa y omega, que se diferencian en la posición relativa de las dianas de *Bsal* y *BsmBI*, a fin de que dos insertos de vectores del mismo tipo se puedan clonar en un vector del otro tipo; esto es que, insertos que se encuentran en dos vectores alfas se puedan introducir en un vector omega y viceversa, lo que se conoce como ensamblaje bipartito (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2013).

El sistema GoldenBraid2.0 permite el ensamblaje de varios insertos en un pDGB para formar un solo transcrito primario policistrónico con dos o más ARNg de CRISPR/Cas9. El posterior procesamiento de este transcrito por las ribonucleasas de ARN transferente (ARNt) endógenas de *Arabidopsis* (la RNasa P y la RNasa Z) escinde los ARNt y rinde ARNg maduros (Vazquez-Vilar *et al.*, 2016).

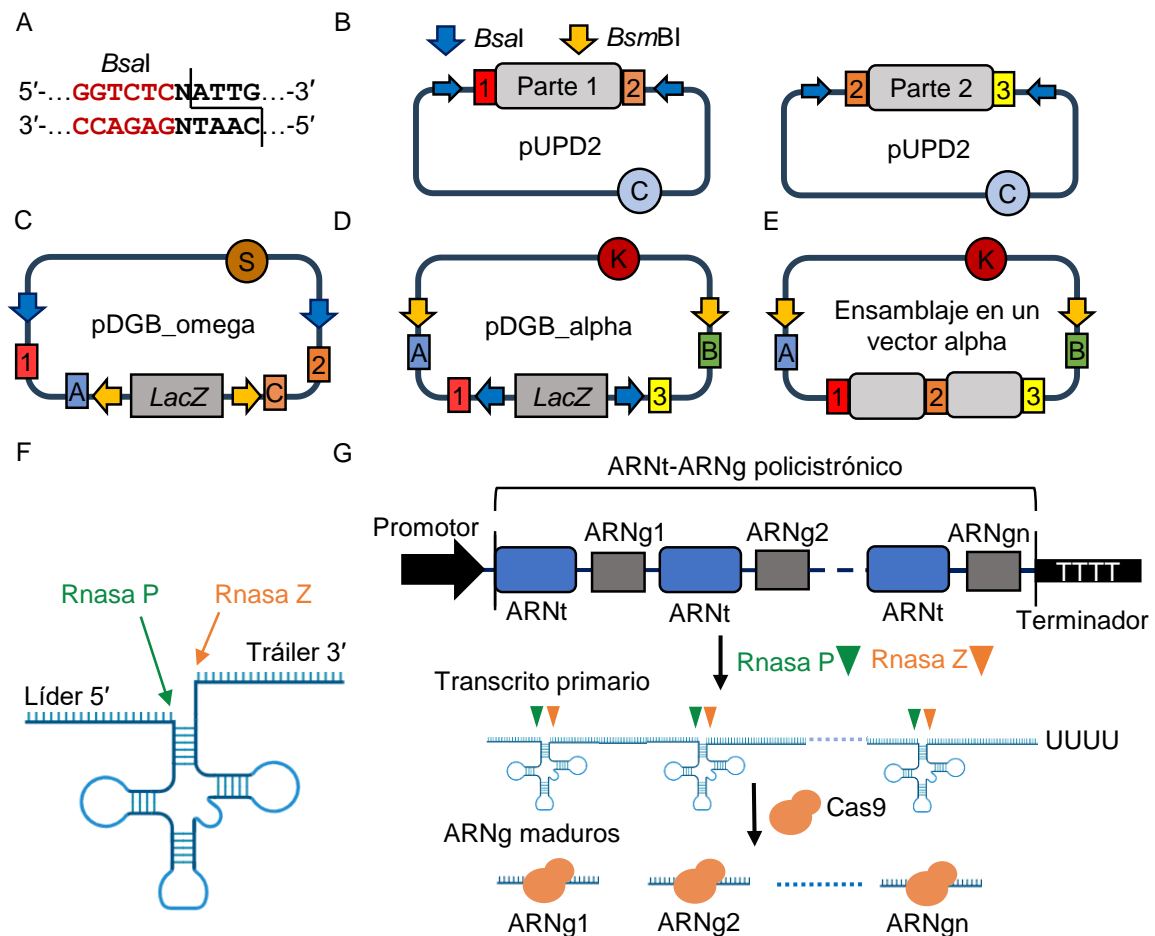


Figura 2.- Obtención de construcciones multigénicas mediante el sistema GoldenBraid2.0. (A) La digestión con *BsaI* genera extremos cohesivos que permiten el ensamblaje multipartito. La diana de *BsaI* se indica en rojo. (B) Vectores pUPD2 con insertos distintos (Parte 1 y Parte 2). Las flechas azul y naranja representan las dianas de *BsaI* y *BsmBI*, respectivamente, cuyas puntas indican la posición del sitio de corte endonucleolítico respecto a la diana. En esta parte de la figura y en las siguientes, los círculos representan los marcadores de resistencia a antibióticos (C, a cloranfenicol; S, a espectinomicina; K, a kanamicina) (C, D) Vectores vacíos (sin inserto) (C) pDGB_omega y (D) pDGB_alpha. (E) Producto de la subclonación simultánea de los insertos representados en (B) en un vector pDGB_alpha, tras su digestión con *BsaI* y ligación con la ligasa T4. Los extremos cohesivos resultantes de la restricción con *BsaI* se destacan en rojo, naranja y amarillo, y se rotulan como 1, 2 y 3, respectivamente; los de *BsmBI*, en azul y verde, y como A y B. Los rectángulos grises representan los insertos denominados Parte 1 y Parte 2 en (B). (F) Un ARNt de Arabidopsis. Se indican sus sitios de corte endonucleolítico por la RNasa P y la RNasa Z. (G) Estructura de una unidad de transcripción policistrónica, en la que se repite la secuencia que codifica un ARNt de Arabidopsis, intercalada con las de varios ARNg distintos (ARNg1, ARNg2...). El procesamiento del transcrito primario del gen por la RNasa P y la RNasa Z libera los ARNt, generando ARNg maduros. Los sitios de corte de la RNasa P y la RNasa Z se representan mediante triángulos verdes y naranjas, respectivamente. Los ARNg maduros son reconocidos por la endonucleasa Cas9 (círculos naranjas). Modificada a partir de Xie *et al.* (2015) y Valdés Penalva (2021), quien a su vez se inspiró en Sarrion-Perdigones *et al.* (2013) Imagen obtenida con Biorender (<https://www.biorender.com/>).

III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Antes del comienzo de este Trabajo de Fin de Grado (en adelante, TFG), se identificó en el laboratorio de José Luis Micol el gen *INCURVATA11* (*ICU11*), miembro fundador de la familia *CUPULIFORMIS* (*CP*), a la que también pertenecen cuatro de sus parálogos: *CP2*, *CP3*, *CP4* y *CP5* (Mateo-Bonmatí *et al.*, 2018). Las proteínas de la familia CP forman parte de la superfamilia de las 2OGD y comparten un dominio P4Hc. *ICU11* y *CP2* interactúan con componentes del Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) y con algunas de sus proteínas accesorias como TELOMERE REPEAT BINDING FACTOR 1 (TRB1), TRB2 y TRB3. *ICU11* es una presunta desmetilasa de la marca activadora H3K36me₃, que permite que el PRC2 pueda depositar la marca represora H3K27me₃ (Mateo-Bonmatí *et al.*, 2018, Bloomer *et al.*, 2020).

ICU11 y *CP2* presentan redundancia funcional desigual: el fenotipo de los mutantes *cp2* es indistinguible del silvestre y el de los *icu11* es relativamente débil (muestran hojas hiponásticas y floración temprana), pero el de los dobles mutantes *icu11 cp2* es sinérgico y muy severo: forman flores embrionarias letales inmediatamente después de la germinación (Mateo-Bonmatí *et al.*, 2018). Para analizar la posible redundancia funcional entre *ICU11* y *CP2* y sus parálogos *CP3*, *CP4* y *CP5*, se obtuvieron cuádruples mutantes *icu11-5 cp3-1 cp4-5 cp5-1* y *cp2-3 cp3-1 cp4-5 cp5-1* que resultaron fenotípicamente indistinguibles de *icu11-5* y *cp2-3*, respectivamente. Sin embargo, los alelos *cp3-1* y *cp4-5* parecen no ser nulos. Además, *CP4* y *CP5* están ligados, lo que dificulta la obtención de dobles mutantes *cp4 cp5* mediante cruzamientos, dada la extremadamente baja frecuencia de recombinación que puede ocurrir entre ellos, por lo que se consideró necesario mutagenizar uno de estos dos genes en una estirpe portadora de un alelo mutante del otro. Por tanto, antes del comienzo de este TFG se diseñaron dos ARNg para editar mediante CRISPR el dominio P4Hc de *CP4*.

El principal objetivo definido para este TFG fue generar cuádruples mutantes nulos *icu11 cp3 cp4 cp5* y *cp2 cp3 cp4 cp5* para establecer si *CP3*, *CP4* y *CP5* son funcionalmente redundantes con *ICU11* y *CP2*. Nuestros objetivos específicos fueron (1) obtener triples mutantes de los alelos nulos *icu11-5*, *cp3-2* y *cp5-1* o *cp5-2* o *cp2-3*, *cp3-2* y *cp5-1* o *cp5-2* y triples mutantes del alelo hipomorfo *cp2-1* con *cp3-2* y *cp5-1* o *cp5-2*, (2) generar una construcción con el sistema GoldenBraid2.0 para editar *CP4* mediante CRISPR, y (3) mutagenizar los triples mutantes con la construcción de CRISPR para inactivar *CP4* y seleccionar y analizar los correspondientes transformantes.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

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

Para la redacción de esta memoria se han seguido las pautas definidas en varias Tesis doctorales previas (Ponce Molet, 1996; Berná Amorós, 1997; Robles Ramos, 1999; Candela Antón, 2001; Pérez Pérez, 2003; Aguilera Díaz, 2009; Sarmiento Mañús, 2011; Ferrández Ayela, 2012), Trabajos de Fin de Máster (Ortega Menaches, 2020) y de Grado (Pomares Bri, 2020; Valdés Penalva, 2021; Melo Medina, 2022), realizados en los laboratorios de J.L. Micol y M.R. Ponce. En este apartado de Materiales y métodos se reproducen literalmente algunos párrafos procedentes de dichos trabajos anteriores.

IV.2.- Abreviaturas, acrónimos y fórmulas químicas

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

Tabla 1.- Abreviaturas empleadas en este trabajo

cm: centímetros	M: molar.	v/v: volumen/volumen.
g: aceleración de la gravedad.	min: minutos.	V: voltios.
g: gramos.	ml: mililitros.	μl: microlitros.
h: horas.	mm: milímetros.	μM: micromolar.
kb: kilobases.	mM: milimolar.	m/v: masa/volumen.
l: litros.	pb: pares de bases.	s: segundos.

IV.3.- Gramática y terminología

Tal como recomienda la RAE en su Ortografía de la lengua española (2010), en esta memoria no se realiza el plural de las siglas añadiendo al final una s minúscula: se escribe “el ARN” y también “los ARN”. Se emplean aquí algunos extranjerismos de uso común que carecen de una traducción al español generalmente aceptada, como *ependorf*. El carácter

foráneo de estas palabras se ha destacado en cursiva. No se han traducido al español muchos de los nombres de genes y proteínas que se mencionan en esta memoria; en estos casos solo se ha usado la cursiva para los nombres de los genes.

IV.4.- Nomenclatura genética

La nomenclatura que se aplica en esta memoria a genes, mutaciones y fenotipos se atiene estrictamente a las pautas propuestas para *Arabidopsis* por Meinke y Koornneef (1997), cuya versión más reciente puede encontrarse en <http://www.arabidopsis.org>. Los alelos de un gen se indican con abreviaturas en cursiva, empleándose las mayúsculas para el silvestre y las minúsculas para los mutantes. Las proteínas se indican en tipografía normal, con mayúsculas. Si existen diferentes genes que han recibido la misma denominación, se les distingue añadiendo un número al grupo de dos, tres o cuatro letras que les denota. Los diferentes alelos mutantes de un gen reciben un distintivo numérico, separado por un guion del identificador del gen. Sirva como ejemplo de lo anterior que hemos estudiado el mutante *incurvata11-5* (*icu11-5*), portador del alelo *icu11-5* del gen *INCURVATA11* (*ICU11*), cuyo producto es la proteína *INCURVATA11* (*ICU11*).

No existe una nomenclatura de aceptación general para los genotipos de *Arabidopsis*. Hemos empleado la expresión línea (también planta, individuo, semilla, plántula o cualquier órgano) *icu11-5* para referirnos a cualquier homocigoto para esta mutación. Salvo que se indique lo contrario, las plantas que se describen en este trabajo son homocigóticas para las mutaciones que se mencionan en cada caso.

IV.5.- Estirpes empleadas en este trabajo

IV.5.1.- Estirpes de *Arabidopsis*

Hemos empleado las estirpes silvestres y mutantes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. que se recogen en la Tabla 2 (en la página 11). Sus semillas se conservaron en tubos *ependorf* a 4°C.

IV.5.2.- Estirpes bacterianas

Las estirpes de microorganismos usadas en este trabajo son *Escherichia coli* DH5α y *Agrobacterium tumefaciens* C58C1. Para su conservación a -80°C, se realizaron cultivos en medio líquido, en presencia de los antibióticos necesarios (apartado IV.7.2.3, en la página 16), y se tomaron a continuación 500 µl de cada uno de ellos en un tubo *ependorf*, que se mezclaron mediante agitación en un *vortex* con 500 µl de glicerol al 30% esterilizado en autoclave, para congelarlos finalmente por inmersión en nitrógeno líquido.

Tabla 2.- Estirpes de Arabidopsis usadas en este trabajo

Mutante	Código del NASC	Mutágeno y mutación	Gen mutado	Origen
<i>icu11-5</i>	-	CRISPR (inserción)	At1g22950	1
<i>cp2-1</i>	N861581	ADN-T en la UTR 5'	At3g18210	2
<i>cp2-3</i>	N826626	ADN-T en el primer intrón	At3g18210	2
<i>cp3-2</i>	N579470	ADN-T en el quinto exón	At5g43660	2
<i>cp5-1</i>	N541749	ADN-T en el quinto exón	At1g48740	2
<i>cp5-2</i>	N579655	ADN-T en el tercer exón	At1g48700	2

¹Obtenida en el laboratorio de J.L. Micol mediante CRISPR/Cas9 (Meinke y Koornneef, 1997; Nadi *et al.*, 2023). ²Obtenida inicialmente del NASC y replicada varias veces por autofecundación en el laboratorio de J.L. Micol.

IV.6.- Cultivos

IV.6.1.- Condiciones de cultivo de Arabidopsis

Los cultivos de Arabidopsis se realizaron a partir de semillas que habían sido previamente conservadas a 4°C durante al menos un día. Los cultivos se llevaron a cabo en placa de Petri o en maceta.

IV.6.1.1.- Cultivo en placa de Petri

La mayoría de los cultivos se iniciaron en placas de Petri de 14 cm de diámetro, que contenían unos 100 ml de medio sólido GM (apartado IV.7.1.2, en la página 15). La siembra de las semillas de Arabidopsis se llevó a cabo tras su esterilización por inmersión con agitación, durante 8 min, en una disolución acuosa del 40% en lejía comercial (NaClO al 4-5% m/v) y 2 ml/l de Triton X-100 al 1% v/v, realizando a continuación tres lavados sucesivos con agua estéril.

La siembra en placas de Petri se realizó con material estéril, en cabinas de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Se sembraron 60 semillas por placa de Petri, espaciándolas regularmente sobre la superficie del medio con la ayuda de una pipeta Pasteur y una plantilla dispuesta bajo la placa. Tras su siembra, las placas fueron precintadas con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, que constituye una barrera efectiva para cualquier partícula en aerosol sin impedir el intercambio de gases.

Las placas de Petri con las semillas se estratificaron durante 24 h en posición invertida, a 4°C y en la oscuridad, con el fin de sincronizar su germinación, tras lo que fueron cultivadas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50-60% de humedad relativa, bajo iluminación continua de unos $75 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ de luz blanca, suministrada por tubos fluorescentes Sylvania Standard F20W/133-RS Cool White o tubos led ToLEDo T8 10 W 4000 K Cool White en cámaras de cultivo Conviron TC16.

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

IV.6.1.2.- Cultivo en maceta

Los cultivos en maceta se efectuaron en bandejas de plástico de 28 × 50 cm, con 42 alveolos, cada uno de ellos de 5 × 5 cm (diámetro × altura), introducidas en cubetas de unos 7 cm de profundidad. Se introdujo en cada alveolo, previamente a su relleno con el sustrato, una maceta de rejilla de 5 × 5 cm (diámetro × altura). Las macetas de rejilla impiden que el sustrato se adhiera al alveolo, facilitando la extracción de las plantas para la realización de cruzamientos o la recolección de semillas. Se empleó como sustrato una mezcla de perlita (granulometría de 1 a 3 mm; 105-125 kg/m³), vermiculita (granulometría de 1 a 3 mm; 80-100 kg/m³) y turba no fertilizada (turba rubia de musgo *Sphagnum*, de estructura gruesa; Grobmull Neuhaus), en una proporción volumétrica 2:2:1. Cada alveolo se destinó al cultivo de una sola planta, que en la mayoría de los casos fue trasplantada, con pinzas, desde la placa de Petri en la que había permanecido durante las primeras tres semanas de su ciclo de vida.

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

Los cultivos en maceta se mantuvieron en una cámara climática visitable, a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50-60% de humedad relativa, bajo iluminación continua, con luz blanca suministrada por tubos fluorescentes Sylvania 160 W F72T12 CW VHO Cool White, Philips F72T12/D/VHO 160 W 1500 SF, o tubos led ToLEDo T8 20 W 4000 K Cool White, totalizando unos 75 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$.

Las macetas y bandejas de alveolos estuvieron permanentemente subirrigadas, manteniéndose un nivel de unos 2-3 cm de agua en el fondo de las cubetas. El aporte de nutrientes se llevó a cabo dos veces por semana, mediante la adición de medio mínimo ATM (apartado IV.7.1.1, en la página 14). Se suspendió el riego cuando la floración se interrumpió, para propiciar el secado de las plantas, que fueron mantenidas en la cámara al menos dos semanas más, para proceder finalmente a la recolección de sus semillas.

IV.6.1.3.- Recolección de semillas

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

IV.6.1.4.- Cruzamientos

Seguimos el procedimiento de emasculación descrito por Kranz y Kirchheim (1987) para el cruzamiento entre estirpes, una de las cuales se utilizó como donante (parental masculino), y la otra, como receptora de polen (parental femenino). Se eligió un grupo de capullos florales en el ápice de un tallo inflorescente de la planta que se usó como parental femenino, eliminando las flores maduras, presuntamente autofecundadas, y los capullos, a excepción de aquellos cuyos pétalos fueron apenas visibles. A estos se les extirparon los sépalos, pétalos y estambres inmaduros, obteniendo flores con un pistilo no fecundado como única estructura funcional. Estas manipulaciones se realizaron con pinzas de microcirugía esterilizadas por inmersión en etanol al 95% y secadas al aire, a fin de destruir cualquier traza de polen. De la planta donante de polen se extirpó una flor madura, presionándola con las pinzas a la altura de los sépalos, a fin de poner en contacto varias de sus anteras con el pistilo de la flor receptora del polen. El cruzamiento se señaló adheriendo al tallo, junto a la flor fecundada, una etiqueta en la que se indicó el genotipo del parental masculino empleado para la polinización. Finalmente, la planta fecundada por este procedimiento fue devuelta a la cámara de cultivo, en la que permaneció hasta la formación y maduración de la silicua, que fue recogida y depositada en un tubo *ependorf* adecuadamente rotulado. Los cruzamientos y las observaciones de rutina de las plantas se llevaron a cabo con una lupa binocular Olympus SZ30 60TR.

IV.6.2.- Condiciones de los cultivos microbianos

Los cultivos líquidos se realizaron en recipientes estériles, cuya capacidad excedía al menos dos veces el volumen de medio utilizado, garantizando así una aireación suficiente durante la incubación. Se empleó una agitación de 225 rpm en un incubador dotado de una plataforma orbital (NBS Innova 44, 4000 o 4260) que se mantuvo a 28°C para cultivar *Agrobacterium tumefaciens* y a 37°C para *Escherichia coli*.

Los cultivos en placas de Petri se inocularon con una micropipeta con 100 µl de precultivo líquido, que fue esparcido por agitación manual, haciendo que rodaran sobre la superficie del medio 5-8 perlas de vidrio estériles, de 3 mm de diámetro. Se realizaron siembras por estría para la verificación de la presencia y el tamaño esperado de insertos en colonias presuntamente transformantes. Las placas en las que se cultivó *Agrobacterium tumefaciens* se precintaron con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M para ralentizar la deshidratación del medio.

IV.7.- Disoluciones

Se usó siempre agua desionizada, con una resistividad media de 15 MΩ/mm²·m. El agua se esterilizó en autoclave, y las disoluciones se conservaron a temperatura ambiente, salvo que se indique lo contrario.

IV.7.1.- Medios de cultivo para Arabidopsis

Los medios de cultivo mencionados en este apartado se prepararon disolviendo sus componentes en agua. Todas las esterilizaciones en autoclave se efectuaron a 1 kg/cm² y 121°C durante 20 min. Las sustancias termolábiles fueron esterilizadas mediante filtración forzada por aspiración, a través de filtros Millipore de 0,22 o 0,45 µm de diámetro de poro. Su adición a un medio de cultivo esterilizado en autoclave se realizó tras estabilizar a este último a 55°C.

IV.7.1.1.- Medios de cultivo líquidos

Medio mínimo ATM: KNO₃ 5 mM; KH₂PO₄ 2,5 mM; MgSO₄ 2 mM; Ca(NO₃)₂ 2 mM; FeNaEDTA 51 µM; H₃BO₃ 70 µM; MnCl₂ 14 µM; CuSO₄ 0,5 µM; ZnSO₄ 1 µM; NaMoO₄ 0,2 µM; NaCl 10 µM y CoCl₂ 0,01 µM (Kranz y Kirchheim, 1987).

Para su preparación, se añadieron, a 900 ml de agua, 5 ml de KNO₃ 1 M; 2,5 ml de KH₂PO₄ 1 M; 2 ml de MgSO₄ 1 M; 2 ml de Ca(NO₃)₂ 1 M; 2 ml de FeNaEDTA 20 mM, y 1 ml de la disolución de micronutrientes, ajustando el volumen final a 1 l. Todas las disoluciones madre se prepararon en las concentraciones indicadas y se esterilizaron por filtración. Las disoluciones madre de las sales deben añadirse a los 900 ml de agua, y no a la inversa, a fin de evitar la precipitación de complejos insolubles de fosfato cálcico.

La composición de la disolución de micronutrientes es la siguiente: H₃BO₃ 70 mM; MnCl₂ 14 mM; CuSO₄ 0,5 mM; ZnSO₄ 1 mM; NaMoO₄ 0,2 mM; NaCl 10 mM, y CoCl₂ 0,01 mM. Se preparó añadiendo, a 900 ml de agua, 4,32 g de H₃BO₃; 2,77 g de MnCl₂·4H₂O; 124 mg

de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 287 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 48,7 mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 584,4 mg de NaCl, y 2,38 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Finalmente, se añadió agua hasta 1 l.

IV.7.1.2.- Medios de cultivo sólidos

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

Medio GM (Germination Medium): NH_4NO_3 10,3 mM; H_3BO_3 50,1 μM ; CaCl_2 1,5 mM; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,05 μM ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,05 μM ; Na_2EDTA 55,4 μM ; MgSO_4 0,75 mM; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 50 μM ; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 μM ; KI 2,5 μM ; KNO_3 9,4 mM; KH_2PO_4 0,62 mM; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 μM ; sacarosa 29,2 mM; MES [ácido 2-(N-morfolino)-etano sulfónico] 2,3 mM, y 6 g/l de Gelrite.

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

IV.7.2.- Medios de cultivo para microorganismos

IV.7.2.1.- Medios de cultivo líquidos

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

IV.7.2.2.- Medios de cultivo sólidos

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

IV.7.2.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos

Algunos de los medios anteriormente descritos se suplementaron con antibióticos, a una concentración final de 50 mg/l (kanamicina), 100 mg/l (espectinomicina) o 25 mg/l (cloranfenicol y rifampicina). Se prepararon disoluciones madre de estos antibióticos a concentraciones mil veces superiores a la de trabajo, disolviéndolos en agua y esterilizándolos por filtración, y se conservaron a -20°C , alicuotadas en tubos *ependorf* de 1,5 ml. Los antibióticos se añadieron al medio después de la esterilización en autoclave de este último, y tras mantenerlo a 55°C durante 30 min en un baño termostatzado.

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

IV.7.3.1.- Disoluciones para extracción de ADN

Tampón de extracción: Tris-HCl 100 mM pH 8,0; Na_2EDTA 50 mM, y NaCl 0,5 M. Para preparar 50 ml de tampón TE se añadieron 5 ml de Tris-HCl 1 M, 5 ml de Na_2EDTA 0,5 M y 5 ml de NaCl 5M a 35 ml de agua estéril. Puede conservarse varios meses a 4°C .

SDS al 20%: Se preparó disolviendo, a 68°C , 100 g de SDS (dodecilo sulfato de sodio) en 500 ml de agua y ajustando el pH a 7,2 con HCl 1 N.

Acetato de potasio 5 M: Se preparó disolviendo, a 50°C , 49,1 g de KCH_3COO (acetato de potasio) en 50 ml de agua y ajustando el pH a 7,5 con CH_3COOH (ácido acético glacial). Finalmente se enrasó el volumen a 100 ml con agua.

Acetato de sodio 3 M: Se preparó disolviendo 49,1 g de NaKCH_3COO (acetato de sodio) en 300 ml de agua y ajustando el pH a 5,2 con ácido acético glacial. Finalmente se enrasó el volumen a 50 ml con agua.

IV.7.3.2.- Disoluciones para electroforesis

Tampón TAE 50x: Tris-base [Tris-(hidroximetil)aminometano] 2 M; 5,71% v/v de CH_3COOH , y Na_2EDTA 50 mM pH 8,0. El pH final debe ser 7,6. Para preparar un litro se mezclaron 242 g de Tris-base, 57,1 ml de CH_3COOH glacial y 100 ml de Na_2EDTA 0,5 M pH 8,0.

Tampón de carga 6x para electroforesis en geles de agarosa: 20% m/v de Ficoll; 0,25% m/v de xilencianol; 0,25% m/v de azul de bromofenol, y Na_2EDTA 10 mM.

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

IV.7.3.3.- Disoluciones para obtener bacterias competentes

TFBI (transformation buffer I): KCH₃COO 30 mM; RbCl 100 mM; CaCl₂ 10 mM; MnCl₂ 50 mM, y 15% en glicerol. Para preparar 100 ml se mezclan 20 ml de RbCl 0,5 M; 2 ml de CaCl₂ 0,5 M; 10 ml de MnCl₂ 0,5 M; 294 mg de KCH₃COO, y 11,9 ml de glicerol. Se añadió agua hasta 100 ml, se ajustó el pH a 5,8 con CH₃COOH glacial al 10% y se esterilizó por filtración. Se conservó a 4°C.

TFBII (transformation buffer II): MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico] 10 mM; CaCl₂ 75 mM; RbCl 10 mM, y 15% en glicerol. Para preparar 100 ml se mezclaron 5 ml de MOPS 0,5 M; 37,5 ml de CaCl₂ 0,5 M; 5 ml de RbCl 0,5 M, y 29,7 ml de glicerol. Se añadió agua hasta 100 ml, se ajustó el pH a 6,5 con KOH 1 N y se esterilizó por filtración. Se conservó a 4°C.

IV.8.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

IV.8.1.- Síntesis de ADN

IV.8.1.1.- Síntesis de oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos usados en este trabajo (Tabla 3) fueron sintetizados por Merck.

Tabla 3.- Oligonucleótidos usados en este trabajo

Propósito	Nombre	Secuencia (5'→3')
Generación de construcciones para mutagénesis mediante CRISPR	CRISPR_U6_Fw	AGAAGAGAAGCAGGCCATT
	CRISPR_alpha2_Rv	CGCCAATATATCCTGTCAAAGC
	CRISPR_hCas9_Fw	GCCTGCAGCCTTCAAGTACTT
	CRISPR_omega1_Rv	CTGTCAGGATCCGGTCTCATG
Genotipado de las líneas SALK y SAIL	LBb1.3 ^a	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC
	LB1_SAIL ^b	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
icu11-5	ICU11_T1_Seq_CRISPR_For	CCTCTCAAACAAACCATCATCA
	ICU11_T1_Seq_CRISPR_Rev	CGCTCAGTATCAGGGGAATATC
cp2-1 y cp2-3	SALK_18210_LP ^c	CCTGCTCAATTTTGCTACCTG
	SALK_18210_RP ^c	GACATTTTCAAACCATTTCATGC
cp3-2	CP3_F1	CCGGAAATACTCACGGCGAAT
	CP3_R3	ACTGAATATAGGAACGTAAGAGG
cp5-1	SALK_041749_LP ^c	ATGAGTGGTGGATTTGAGACG
	SALK_041749_RP ^c	TTGTACTIONGACGACTTTGGCC
cp5-2	SALK_079663_LP ^c	CTTGCTTCTCAAGTTCTTGCG
	SALK_079663_RP ^c	TGAATCTTCCACATGAAAGCC

^aAlonso *et al.* (2003). ^bSessions *et al.* (2002). ^c<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>.

IV.8.1.2.- Amplificaciones mediante PCR

Se usó la enzima GoTaq Flexi (Promega) para las amplificaciones de ADN genómico de *Arabidopsis* o ADN plasmídico; es una versión recombinante, barata y suficientemente procesiva, de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*.

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

Los programas de PCR que hemos usado incluían una etapa previa de calentamiento a 95°C durante 90 s, seguida de 35 ciclos en los que se repetía una fase de 30 s a 95°C para desnaturalizar los moldes, otra de 15 s a la temperatura de hibridación de los cebadores y una final a 72°C para la polimerización, cuya duración dependió del tamaño del producto de PCR esperado, a razón de 1 min/kb en el caso de la polimerasa GoTaq Flexi.

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

IV.8.2.- Aislamiento de ácidos nucleicos

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

El ADN genómico utilizado como molde en las mezclas de PCR fue purificado según Dellaporta *et al.* (1983), con algunas modificaciones. Se introdujo en un tubo *ependorf* una hoja de una planta recolectada 14 días después de la estratificación (dde) y se le añadieron 500 μ l de tampón de extracción, macerándola en un macerador automático (MixerMill 300, Qiagen). A continuación, se añadieron 35 μ l de SDS al 20%, incubando la mezcla en un baño termostático a 65°C durante 5 min. Finalmente, se añadieron 130 μ l de KCH_3COO 5 M, incubando durante 15 min a 4°C, y centrifugando durante 10 min a 13.000 rpm (14.927 g) en una microfuga. El sobrenadante se transfirió a un tubo *ependorf* vacío, se precipitó durante 20 min a -20°C con 640 μ l de isopropanol y 60 μ l de $NaCH_3COO$ 3 M, y se centrifugó durante otros 10 min a 10.000 rpm. El precipitado se lavó con 300 μ l de etanol del 70% y se centrifugó una vez más durante 5 min, tras lo cual se dejó secar a temperatura ambiente, para resuspenderlo después en 300 μ l de agua y almacenar la disolución a 4°C.

IV.8.2.2.- Aislamiento de ADN plasmídico

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

IV.8.3.- Restricción y ligación de ADN

Para las reacciones de restricción y ligación para la obtención de construcciones se emplearon 10 U de las enzimas *Bsa*I o *Bsm*BI y 3 U de la ligasa del bacteriófago T4, el tampón de la ligasa y 75 ng de cada vector. Las reacciones se realizaron en tubos *ependorf* de pared fina de 0,2 ml, en un volumen final de 10 μ l. Las mezclas de reacción se incubaron durante 25 ciclos de 37°C durante 2 min y 16°C durante 5 min en un termociclador.

Para el genotipado del alelo *icu11-5* se restringieron con *Hind*III los productos de amplificación previamente obtenidos. Se obtuvieron mezclas de digestión con 9 μ l de la mezcla de PCR, 1 μ l de tampón R y 0,5 μ l de *Hind*III. La digestión se realizó en un termociclador durante 5 h a 36°C. La inactivación final de la enzima se realizó por calentamiento a 65°C durante 20 min. En el silvestre, cuando digerimos el producto de amplificación con *Hind*III se generan dos productos de digestión de 202 y 187 pb, pero en el mutante *icu11-5* solo se observa la banda original, que tiene un tamaño de 389 pb. Si el individuo es *ICU11/icu11-5* se observan las tres bandas.

IV.8.4.- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Se utilizaron geles del 1% m/v en agarosa para las electroforesis de ADN, excepto para el genotipado de *icu11-5*, en el que se utilizaron geles del 2,5% m/v en agarosa. Las electroforesis se realizaron en cubetas horizontales, empleando como electrolito TAE 1 \times (apartado IV.7.3.2, en la página 16). La disolución de la agarosa en el tampón se llevó a cabo mediante calentamiento en un microondas. Una vez enfriada la disolución a 55°C se añadió bromuro de etidio hasta una concentración de 0,5 μ g/ml. Las electroforesis en geles de agarosa se llevaron a cabo a voltaje constante: se aplicaron 90 V en geles preparados con 50 ml de TAE 1 \times y 120 V para geles preparados con volúmenes mayores (75, 100 y 200 ml). La visualización de las moléculas se consiguió iluminando los geles con luz UV de 312 nm, obteniéndose las correspondientes fotografías en un documentador de geles Vilber E-Box VX5.

IV.8.5.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN

Se utilizó la variante semiautomatizada y fluorescente del método de Sanger, que se basa en el uso de didesoxinucleótidos terminadores (Smith *et al.*, 1986) marcados con fluorocromos. Las secuencias fueron obtenidas en secuenciadores Applied Biosystems International PRISM 3130 y 3730 por STAB VIDA, empresa a la que se enviaron muestras que contenían 1.500 ng del ADN plasmídico obtenido de una minipreparación. También se enviaron a esta empresa 5 μ l de las disoluciones 10 μ M de cada cebador de secuenciación (Tabla 3, en la página 9). Algunas posiciones ambiguas en las secuencias obtenidas pudieron esclarecerse mediante la magnificación de los electroferogramas, usando el programa Snapgene Viewer (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer>).

IV.9.- Genotipado de mutantes insercionales mediante PCR

Se usaron tres oligonucleótidos para verificar la presencia de las inserciones de ADN-T de los mutantes insercionales a estudio (Figura 3, en la página 20). Se realizaron dos amplificaciones: (a) una con dos cebadores específicos de la región genómica que flanquea la inserción (LP y RP), y (b) otra con el cebador RP y otro que hibrida con uno de los extremos del ADN-T (LBb1.3 y LB-1 para las líneas SALK y SAIL, respectivamente). La visualización de los productos de la amplificación en un gel de agarosa permite establecer si las plantas son homocigóticas o heterocigóticas para dicha inserción.

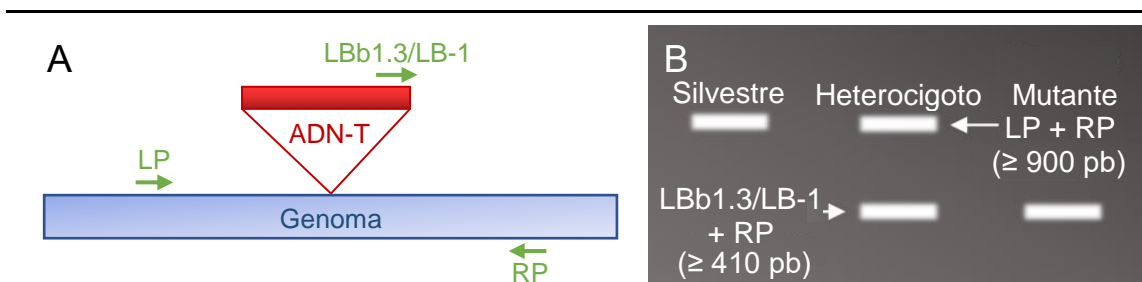


Figura 3.- Genotipado de inserciones de ADN-T en las líneas de las colecciones SALK y SAIL. (A) Representación esquemática de una inserción de ADN-T (rectángulo rojo) en el genoma de Arabidopsis (rectángulo azul), indicando las posiciones de los tres oligonucleótidos usados como cebadores para su genotipado (flechas verdes): LP, RP y LBb1.3 (para las inserciones de la colección SALK) y LP, RP y LB-1 (para las de la colección SAIL). Los elementos de este esquema no están representados a escala. (B) Productos de PCR que se visualizarían en una electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio al genotipar plantas homocigóticas para el alelo silvestre del gen a estudio, heterocigóticas, u homocigóticas para un alelo insercional. Se indican las parejas de cebadores de cada reacción y el tamaño de los productos esperados. Modificado a partir de Ros Sirvent (2020), que a su vez se basó en <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>.

IV.10.- Transformación de células bacterianas

IV.10.1.- Obtención de bacterias quimiocompetentes

La preparación de células de *Escherichia coli* DH5 α quimiocompetentes se llevó a cabo según Sambrook y Russell (2001) con modificaciones. Se inocularon cultivos de 100 ml de medio líquido LB con *Escherichia coli*, y se incubaron a 225 rpm y 37°C hasta que alcanzó una absorbancia a 600 nm (A_{600}) de 0,6-0,8. A continuación, se enfriaron durante 5 min en hielo y se centrifugaron a 4°C y 5.500 rpm (5.445 g) durante otros 5 min. Tras decantar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 10 ml de TFB I (apartado IV.7.3.3, en la página 17). Se centrifugó otra vez, a 4°C y 4.500 rpm (3.645 g) durante 5 min, decantando el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en 4 ml de TFB II (apartado IV.7.3.3, en la página 17). Las células preparadas de este modo se distribuyeron en alícuotas de 200 μ l, que se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

IV.10.2.- Transformación por choque térmico

Se añadieron 10 μ l de una disolución de ADN plasmídico, obtenida según se indica en el apartado IV.8.2.2 (en la página 19) a un tubo *ependorf* que contenía 50 μ l de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α , que se mantuvo en hielo durante 5 min. El tubo se sometió a continuación a un choque térmico, durante 90 s en un baño termostatzado a 42°C, depositándolo después en hielo. Se añadió a continuación 1 ml de medio líquido LB, incubando a 225 rpm durante 1 h a 37°C. El cultivo se centrifugó a 3.200 rpm durante 2 min y se eliminaron 950 μ l del sobrenadante con una micropipeta. Se resuspendió el sedimento en el sobrenadante restante y se esparció el contenido del tubo, empleando bolas de vidrio, sobre el medio de cultivo sólido, suplementado con antibiótico, de una placa de Petri de 90 mm de diámetro. Las placas de Petri se incubaron durante 24 h en una estufa a 37°C.

IV.10.3.- Transformación por electroporación

La electroporación es una técnica en la que se usan descargas eléctricas que alteran la estructura de las envolturas celulares bacterianas para facilitar la incorporación de ADN exógeno. Se añadieron 200 μ l de una suspensión de células de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 electrocompetentes, con una absorbancia a 600 nm (A_{600}) de 0,8, y 0,5 μ l de una disolución de ADN plasmídico (100 ng/ μ l) a las cubetas de electroporación previamente enfriadas en hielo.

La electroporación se llevó a cabo en un Electroporator 2510 (*Eppendorf*), programando un pulso de 5 ms y 1.700 V. Tras la electroporación, se añadió 1 ml de medio líquido LB a las células, que se incubaron a 225 rpm durante 2 h a 28°C. Para la inoculación

de placas con estas células se procedió tal como se indica en el apartado IV.10.2 (en la página 21). Las placas se incubaron a continuación a 28°C durante 48 h.

IV.10.4.- Selección de transformantes

Las bacterias que han incorporado ADN exógeno en un experimento de transformación, a las que se denomina transformantes, deben presentar rasgos fenotípicos que permitan seleccionarlas. Hemos empleado el método denominado selección cromogénica o de colonias azules/blancas. Consiste en la utilización de vectores que incluyen el gen *lacZ*, cuyo producto, la β -galactosidasa, cataliza una reacción colorimétrica en la que el sustrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) rinde un producto azul. Estos vectores se emplean para transformar estirpes de *Escherichia coli* portadoras de un alelo nulo del gen *lacZ*, como el *lacZ* Δ M15 de DH5 α . Estos vectores y estirpes hospedadoras se utilizan para llevar a cabo la selección de colonias azules o blancas: mediante la adición de X-gal e IPTG (tioisopropil- β -D-galactósido, un inductor gratuito de la expresión del gen *lacZ*) al agar de cobertera utilizado para sembrar las cajas de Petri, se obtiene una coloración azul de las colonias en cuyo plásmido el gen *lacZ* no ha sido sustituido por un inserto, y blanca para las que sí lo han hecho. El X-gal se preparó en disoluciones del 5% (m/v) en dimetilformamida, y el IPTG en disolución acuosa al 20% (m/v), conservándolos a -20°C. Se tomaron 1 ml de X-gal y 300 μ l de IPTG para 500 ml de medio LB.

V.- RESULTADOS

V.- RESULTADOS

V.1.- Obtención de combinaciones triples de alelos de insuficiencia de función de genes de la familia CUPULIFORMIS

V.1.1.- Alelos nulos e hipomorfos de los genes *ICU11*, *CP2*, *CP3* y *CP5* que hemos usado en este trabajo

El alelo nulo *icu11-5* del gen *ICU11* de *Arabidopsis* fue obtenido en el laboratorio de José Luis Micol antes del comienzo de este TFG, en una mutagénesis dirigida llevada a cabo con la tecnología CRISPR/Cas9. Presenta una inserción puntual en el primer exón del gen *ICU11*, que causa un desfase de la pauta de lectura principal y genera un codón de terminación prematuro (Nadi *et al.*, 2023). El alelo hipomorfo *cp2-1* y los nulos *cp2-3*, *cp3-2*, *cp5-1* y *cp5-2* son insercionales y pertenecen a la colección SALK (Figura 4, en la página 23). El fondo genético de todos estos mutantes es Col-0. Los genes *CP4* y *CP5* están ligados, lo que dificulta la obtención de dobles mutantes *cp4 cp5* mediante cruzamientos, dada la extremadamente baja frecuencia de recombinación que puede ocurrir entre ellos, por lo que se consideró necesario mutagenizar uno de estos dos genes en una estirpe portadora de un alelo mutante del otro.

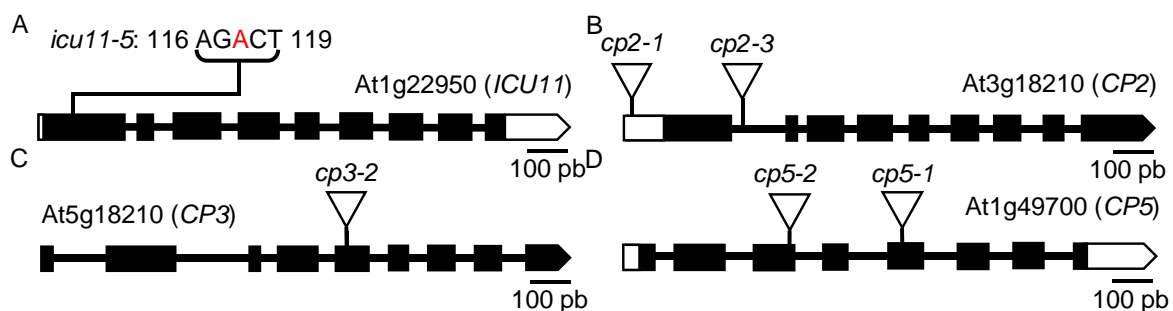


Figura 4.- Estructura de las unidades de transcripción de los genes estudiados en este trabajo. (A) *ICU11*, (B) *CP2*, (C) *CP3* y (D) *CP5*, con indicación de sus alelos mutantes combinados en este trabajo. Los exones e intrones están representados por rectángulos y líneas negras, respectivamente. Las regiones exónicas 5' y 3' no traducidas se destacan en blanco. Los triángulos representan inserciones de ADN-T. Se indican en (A) los nucleótidos 116 a 119 del gen *ICU11*, destacándose en rojo la inserción de su alelo *icu11-5*. Modificada a partir de Nadi *et al.* (2023).

Nos propusimos obtener seis combinaciones triples mutantes de alelos nulos e hipomorfos de *ICU11*, *CP2*, *CP3* y *CP5*: *icu11-5 cp3-2 cp5-1*, *icu11-5 cp3-2 cp5-2*, *cp2-1 cp3-2 cp5-1*, *cp2-1 cp3-2 cp5-2*, *cp2-3 cp3-2 cp5-1* y *cp2-3 cp3-2 cp5-2*. Las mutaciones *icu11-5*, *cp2-3*, *cp3-2*, *cp5-1* y *cp5-2* son muy probablemente nulas, según puede deducirse de la naturaleza molecular del primero y de las posiciones de las inserciones de ADN-T de los otros.

Además, la insuficiencia de función de *cp2-1* es menor que la de *cp2-3*, tal como indica la observación de que el doble mutante *icu11-5/icu11-5;cp2-1/cp2-1* y el sesquimutante *icu11-5/icu11-5;CP2/cp2-3* presentan el mismo fenotipo (flores embrionarias letales), mientras que el doble mutante *icu11-5/icu11-5;cp2-3/cp2-3* es letal embrionario.

V.1.2.- Triples mutantes *icu11-5 cp3-2 cp5-1* e *icu11-5 cp3-2 cp5-2*

Con el propósito de obtener dobles mutantes *icu11-5 cp3-2*, se realizó un cruzamiento *icu11-5* × *cp3-2* antes del comienzo de este TFG (apartado IV.6.1.4, en la página 13). Hemos recolectado las semillas *ICU11/icu11-5;CP3/cp3-2* de la F₁ de dicho cruzamiento, que esterilizamos y sembramos según se indica en el apartado IV.6.1, en la página 11. Para verificar la presencia de la mutación *icu11-5*, se extrajo ADN de las plantas F₁ (apartado IV.8.2.1, en la página 18) que se sometió a amplificación mediante PCR [94°C, 2 min; 40 × (94°C, 30 s; 59°C, 20 s; 72°C, 45 s); 72°C, 10 min; 4°C, ∞] con la pareja de cebadores ICU11_T1_Seq_CRISPR_For/Rev (Tabla 3, en la página 17). Esta amplificación rindió un producto de 389 pb, cuya presencia se confirmó tomando 5 µl de la mezcla de reacción para una electroforesis en un gel de agarosa (apartado IV.8.4, en la página 19). Dado que la mutación *icu11-5* es una inserción de una adenina que interrumpe una diana de *HindIII*, digerimos con esta restrictasa el producto de la amplificación, tal como se describe en el apartado IV.8.3, en la página 19. Esta digestión rindió dos fragmentos de restricción del ADN del alelo ICU11 silvestre, de 202 y 187 pb, pero solo uno, de 389 pb, del mutante *icu11-5*. Las plantas heterocigóticas *ICU11/icu11-5* rinden tres bandas.

La presencia de la mutación *cp3-2* también se verificó mediante PCR [94°C, 2 min; 40 × (94°C, 30 s; 55°C, 20 s; 72°C, 90 s); 72°C, 10 min; 4°C, ∞], usando los cebadores CP3_F1, CP3_R3 y LBb1.3 (Tabla 3, en la página 17). Un heterocigoto *CP3/cp3-2* rinde así dos productos de amplificación, de 1348 pb y 813 pb, correspondientes al alelo silvestre *CP3* y al mutante *cp3-2*, respectivamente. Para visualizar los productos de amplificación se usaron en este caso y en los siguientes de este apartado V.1.2 los 10 µl de la mezcla de PCR para su electroforesis en un gel de agarosa (apartado IV.8.4, en la página 19).

También se realizaron cruzamientos de *ICU11/icu11-5;CP3/cp3-2* por *cp5-1* y *cp5-2* (Figura 5, en la página 25) y se genotiparon más de 30 plantas de cada una de las progenies F₁ obtenidas, siguiendo en ambos casos el procedimiento hasta aquí descrito para *icu11-5* y *cp3-2*: una amplificación de PCR [94°C, 2 min; 40 × (94°C, 30 s; 59°C, 20 s; 72°C, 90 s); 72°C, 10 min; 4°C, ∞] con los cebadores SALK_041749_LP, SALK_041749_RP y LBb1.3 para verificar la presencia de *cp5-1*, y SALK_079663_LP, SALK_079663_RP y LBb1.3 para la de *cp5-2* (Tabla 3, en la página 17). Una planta heterocigótica *CP5/cp5-1* rinde así un producto

de amplificación de 1174 pb (*CP5*) y otro de 731 pb (*cp5-1*). Una planta *CP5/cp5-2* rinde un producto de 1041 pb (*CP5*) y otro de 653 pb (*cp5-2*).

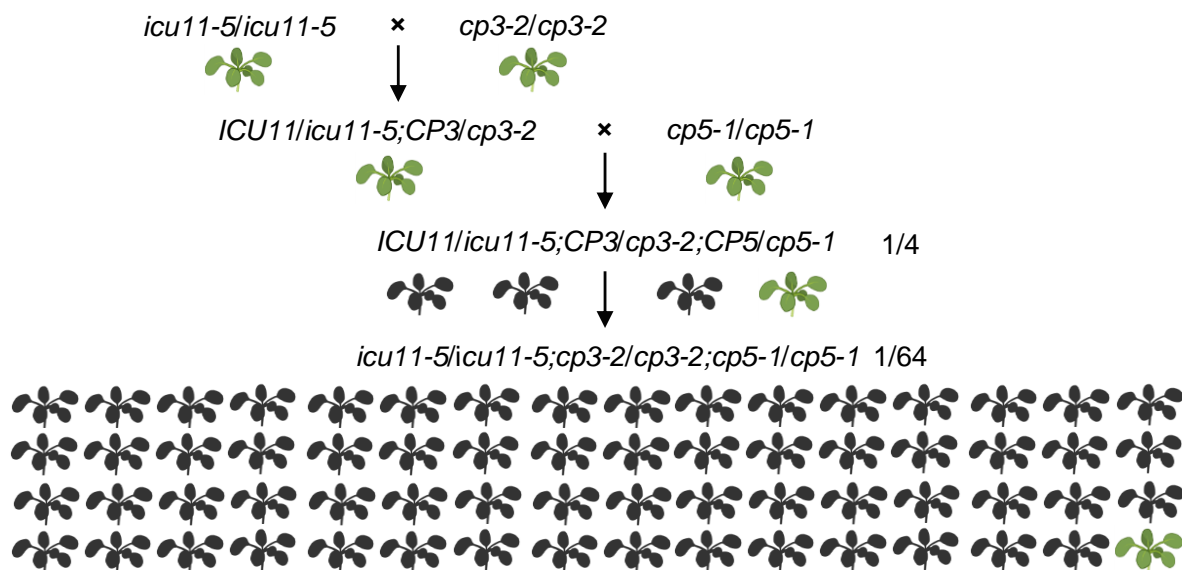


Figura 5.- Obtención de triples mutantes *icu11-5 cp3-2 cp5-1*. Se representan las segregaciones fenotípicas esperadas en cada generación. Las plantas de color verde claro representan el genotipo de interés, y las de color negro, las restantes que también se genotiparon. Imagen obtenida con Biorender.

Se seleccionaron plantas *ICU11/icu11-5;CP3/cp3-2;CP5/cp5-1* e *ICU11/icu11-5;CP3/cp3-2;CP5/cp5-2*, que fueron trasplantadas a bandejas de alveolos, en donde completaron su ciclo de vida (apartado IV.6.1.2, en la página 12). De la autofecundación de estos triheterocigotos esperábamos obtener semillas entre las que se encontrarán los triples mutantes deseados en una proporción 63:1 (Figura 5, página 25).

Sin embargo, la siembra de las semillas producidas por las plantas *ICU11/icu11-5;CP3/cp3-2;CP5/cp5-2* y el genotipado de 36 de las plántulas que rindieron tras su germinación no nos permitió identificar ningún triple mutante *icu11-5 cp3-2 cp5-2*. No obstante, hemos identificado plantas homocigóticas para dos de estas mutaciones y heterocigóticas para la tercera, que hemos trasplantado para el estudio de la progenie de su autofecundación, en la que esperamos encontrar triples mutantes en una proporción 3:1. También hemos recolectado semillas derivadas de la autofecundación de las plantas *ICU11/icu11-5;CP3/cp3-2;CP5/cp5-1*, que aún no hemos sembrado.

V.1.3.- Triples mutantes *cp2-1 cp3-2 cp5-1* y *cp2-1 cp3-2 cp5-2*

Para obtener los triples mutantes *cp2-1 cp3-2 cp5-1* y *cp2-1 cp3-2 cp5-2* se procedió tal como se indica en el apartado V.1.2, en la página 24, partiendo en este caso de semillas

F₁ derivadas de un cruzamiento *cp2-1* × *cp3-2*, que se sembraron y rindieron plántulas entre las que se seleccionaron las de genotipo *CP2/cp2-1;CP3/cp3-2*, para cruzarlas por los mutantes *cp5-1* y *cp5-2*. Para verificar la presencia de la mutación *cp2-1*, se realizó una amplificación mediante PCR [94°C, 2 min; 40 × (94°C, 30 s; 59°C, 20 s; 72°C, 90 s); 72°C, 10 min; 4°C, ∞] usando los cebadores SALK_18210_LP, SALK_18210_RP y LB1_SAIL (Tabla 3, en la página 17). Un heterocigoto *CP2/cp2-1* rinde así un producto de amplificación de 1555 pb (*CP2*) y otro de 913 pb (*cp2-1*). Obtuvimos finalmente algunos triples mutantes *cp2-1 cp3-2 cp5-1* y *cp2-1 cp3-2 cp5-2*, que resultaron ser aparentemente silvestres.

V.1.4.- Triples mutantes *cp2-3 cp3-2 cp5-1* y *cp2-3 cp3-2 cp5-2*

Para obtener triples mutantes *cp2-3 cp3-2 cp5-1* y *cp2-3 cp3-2 cp5-2* también seguimos el procedimiento descrito en el apartado V.1.2, en la página 24. Partimos de semillas *CP2/cp2-3;CP3/cp3-2*, derivadas de un cruzamiento *cp2-3* × *cp3-2*. Las plantas *CP2/cp2-3;CP3/cp3-2* fueron cruzadas por mutantes *cp5-1* y *cp5-2*. Para verificar la presencia de la mutación *cp2-3*, se realizó una amplificación mediante PCR [94°C, 2 min; 40 × (94°C, 30 s; 59°C, 20 s; 72°C, 90 s); 72°C, 10 min; 4°C, ∞] usando los cebadores SALK_18210_LP, SALK_18210_RP y LB1_SAIL (Tabla 3, en la página 17). Un heterocigoto *CP2/cp2-3* rinde así un producto de amplificación de 1555 pb (*CP2*) y otro de 354 pb (*cp2-3*). Obtuvimos solo un triple mutante *cp2-3 cp3-2 cp5-2*, aparentemente silvestre. No hemos llegado a sembrar las semillas F₂ que nos hubiesen permitido identificar plantas *cp2-3 cp3-2 cp5-1*.

V.2.- Obtención de una construcción GoldenBraid 2.0 para mutagenizar *CP4* mediante CRISPR

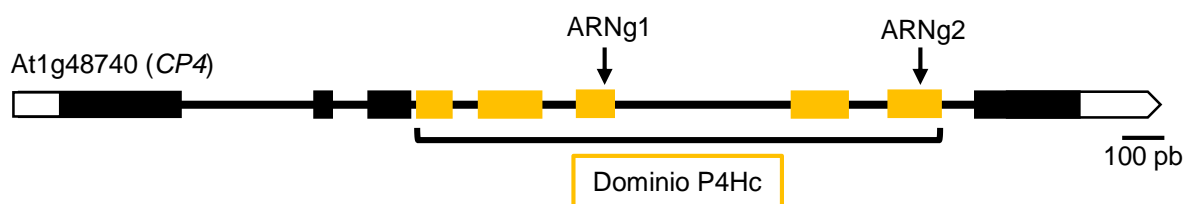


Figura 6.- Estructura de la unidad de transcripción del gen *CP4* con indicación de las posiciones correspondientes a las secuencias de los ARNg diseñados para su mutagénesis mediante CRISPR. Se siguen las pautas definidas para la Figura 4, en la página 23. Se destacan en color amarillo los exones que codifican el dominio P4Hc. Las flechas indican los sitios de corte endonucleolítico de la Cas9.

Hemos empleado el sistema GoldenBraid 2.0 (apartado II.5.2, en la página 6) para generar una construcción para mutagenizar *CP4* mediante CRISPR. Antes del comienzo de

este TFG, se diseñaron en el laboratorio de J.L. Micol dos ARNg (ARNg1 y ARNg2) para inducir mutaciones puntuales y una delección de parte de la secuencia del gen *CP4* que codifica el dominio P4Hc de la proteína CP4 (Figura 6, en la página 26).

También se habían obtenido en el laboratorio de J.L. Micol las construcciones pUPD2_guía1 y pUPD2_guía2, tras clonar en vectores pUPD2 las secuencias que codifican los ARNg1 y ARNg2 mencionados en el párrafo anterior, sus correspondientes esqueletos y secuencias del ARNt, así como un terminador (poliT) (Figura 7, en la página 27).

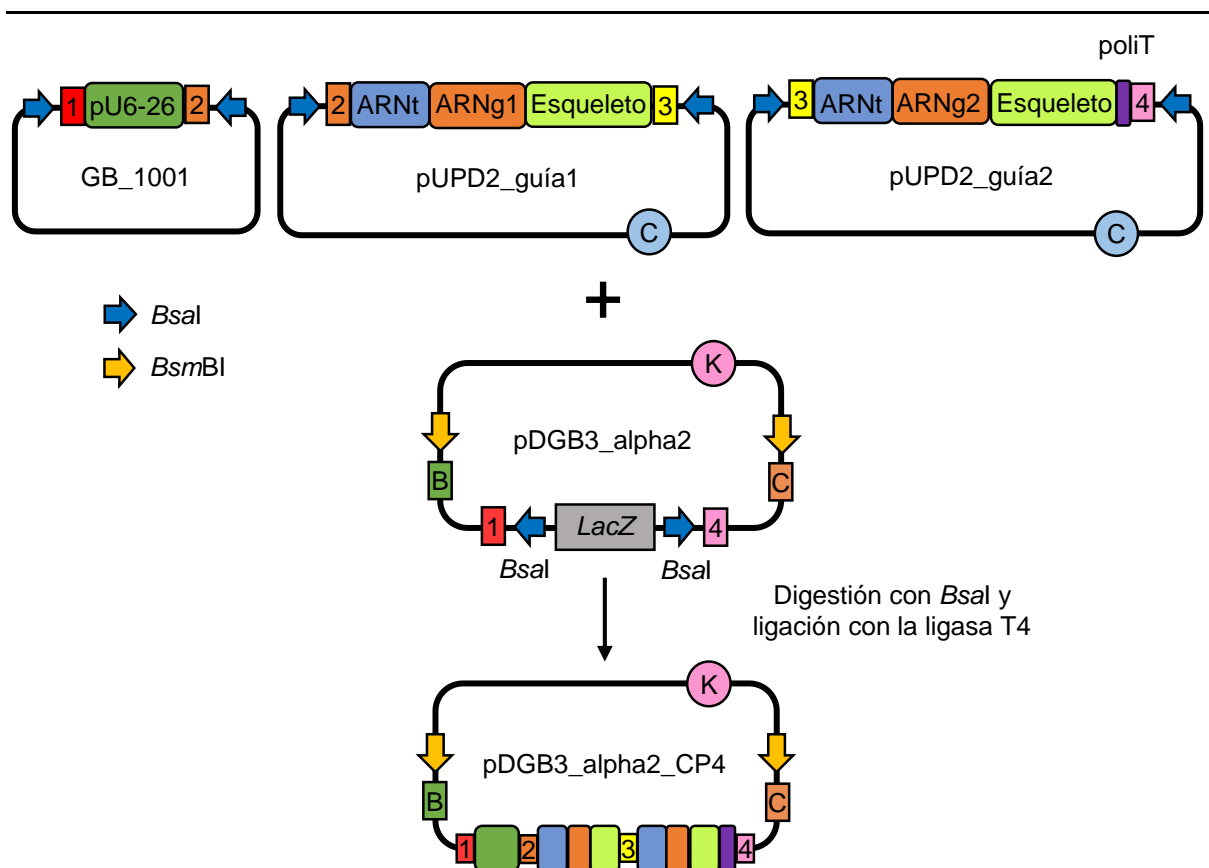


Figura 7.- Construcción del vector pDGB3_alpha2_CP4. Se representa el ensamblaje del promotor *pU6-26* (*pU6-26*), presente en el vector GB_1001; y los insertos que contienen las secuencias de los ARNg1 y ARNg2 con sus correspondientes esqueletos y ARNt, presentes en los vectores pUPD2_guía1 y pUPD2_guía2. Se siguen las pautas definidas para la Figura 2, en la página 7. Tras su digestión con *BsaI* y ligación con la ligasa T4, se obtiene finalmente el vector pDGB3_alpha2_CP4, que contiene los tres módulos requeridos y adecuadamente ordenados para la mutagénesis de CP4 mediante CRISPR/Cas9. Los colores de los recuadros de este último se corresponden con los que se indican en la parte superior de la figura: el promotor *pU6-26* (verde oscuro), los esqueletos (verde claro), los ARNt (azul), los ARNg (naranja) y un poliT (violeta). Imagen modificada a partir de Valdés Penalva (2021).

V.2.1.- Adición del promotor *pU6_26*

Generamos en primer lugar el módulo que incluye la secuencia que rinde el transcrito policistrónico con los ARNg1 y ARNg2 bajo el control de *pU6_26*, el promotor de la ARN polimerasa III, en el vector de destino *pDGB3_alpha2*, que hemos denominado *pDGB3_alpha2_CP4* (Figura 7, en la página 27).

Se verificó la integridad de las construcciones *pUPD2_guía1* y *pUPD2_guía2* mediante su secuenciación por el método de Sanger (apartado IV.8.5, en la página 20). A continuación, se realizó la reacción de digestión y ligación (Figura 7, en la página 27, y Tabla 4, en la página 28). La restrictasa *Bsal* genera extremos cohesivos en el vector *pDGB3_alpha2* y en los insertos de *GB_1001* (*pU6_26*), *pUPD2_guía1* y *pUPD2_guía2*. Tras la digestión, la ligasa T4 incorpora unidireccionalmente a *pDGB3_alpha2* los tres fragmentos de restricción con extremos compatibles generados por *Bsal*. Esta digestión escinde del vector *pDGB3_alpha2* al gen *lacZ*, que es reemplazado por la construcción de interés, lo que a su vez permite la selección cromogénica posterior de las colonias transformantes resultantes (apartado IV.10.4, en la página 22). La reacción de digestión y ligación se llevó a cabo en un termociclador durante 25 ciclos, cada uno de ellos con dos etapas: una de 2 min a 37°C para la digestión, seguida de otra de 5 min a 16°C para la ligación.

Tabla 4.- Mezcla para la reacción de digestión con *Bsal* y ligación con la ligasa de T4

Componentes de la mezcla de reacción	Concentración inicial	Volumen (μ l)	Concentración final
Promotor <i>pU6_26</i> (Vector GB1001)	75 ng/ μ l	1	7,5 ng/ μ l
<i>pUPD2_guía1</i>	75 ng/ μ l	1	7,5 ng/ μ l
<i>pUPD2_guía2</i>	75 ng/ μ l	1	7,5 ng/ μ l
Vector de destino <i>pDGB3_alpha2</i>	75 ng/ μ l	1	7,5 ng/ μ l
<i>Bsal</i>	10 U/ μ l	1	1 U/ μ l
Ligasa T4	5 U/ μ l	0,6	0,3 U/ μ l
Tampón de la ligasa T4	10x	1	1x
H ₂ O		3,4	

Con los productos de la reacción de digestión y ligación se transformaron células quimiocompetentes *DH5 α* de *Escherichia coli* mediante choque térmico, que fueron incubadas a 37°C durante toda una noche en placas de Petri que contenían medio de cultivo LB suplementado con kanamicina, IPTG y X-Gal (apartado IV.10.4, en la página 22). Las bacterias portadoras de *pDGB3_alpha2_CP4* son resistentes a kanamicina, y generan colonias blancas, como consecuencia de su carencia del gen *lacZ*. Se seleccionaron células de dichas colonias y se sembraron por estría. Se verificó mediante PCR [94°C, 2 min; 40 x

(94°C, 30 s; 60°C, 20 s; 72°C, 45 s); 72°C, 10 min; 4°C, ∞], con los cebadores CRISPR_U6_Fw y CRISPR_alpha2_Rv (Tabla 3, en la página 17), que hibridan con *pU6_26* y el vector *pDGB3_alpha2*, respectivamente, la obtención de un producto de amplificación de 574 pb. Con las estrías positivas se inocularon precultivos en medio líquido LB suplementado con kanamicina, que se incubaron a 37°C y una agitación de 225 rpm durante toda la noche. Se realizaron finalmente minipreparaciones (apartado IV.8.2.2, en la página 19) para aislar ADN plasmídico, cuya integridad se verificó mediante amplificación por PCR y secuenciación por el método de Sanger (apartado IV.8.5, en la página 20).

V.2.2.- Adición de los genes de la proteína roja fluorescente y la Cas9

Se adicionaron a continuación los genes que codifican el marcador dsRed (una proteína fluorescente roja que se expresa en la semilla) y la endonucleasa Cas9, a partir del vector *pDGB_alpha1* (EGM005), que pretendíamos ensamblar con el módulo presente en el vector *pDGB3_alpha2_CP4*, para obtener la construcción *pDGB3_omega1_CP4*. Empleamos la restrictasa *BsmBI*, cuya diana está presente en los tres vectores y permite escindir las secuencias codificantes de dsRed y Cas9 de EGM005 y el módulo de *pDGB3_alpha2_CP4*. A su vez, la ligasa de T4 incorpora a *pDGB3_omega1* los fragmentos de restricción generados por *BsmBI*. La reacción se realizó en un termociclador según se ha indicado en el apartado V.2.1, en la página 28, usando la mezcla de reacción que se detalla en la Tabla 5. Con los productos de digestión y ligación, transformamos células quimiocompetentes *DH5α* de *Escherichia coli*, tal como se indica en el apartado V.2.1, aunque en este caso se seleccionaron las bacterias resistentes a espectinomicina.

Tabla 5.- Mezcla para la reacción de digestión con *BsmBI* y ligación con la ligasa T4

Componentes de la mezcla de reacción	Concentración inicial	Volumen (μl)	Concentración final
EGM005 (alpha 1 con DsRed y Cas9)	75 ng/μl	1	7,5 ng/μl
<i>pDGB3_alpha2_CP4</i>	75 ng/μl	1	7,5 ng/μl
Vector de destino <i>pDGB3_omega1</i>	75 ng/μl	1	7,5 ng/μl
<i>BsmBI</i>	10 U/μl	1	1 U/μl
Ligasa T4	5 U/μl	0,6	0,5 U/μl
Tampón de la ligasa T4	10x	1	1x
H ₂ O		4,4	

Realizamos cultivos por estría partir de las colonias blancas, portadoras de *pDGB3_omega1_CP4* y se verificó la presencia del inserto de interés mediante PCR [94°C, 2 min; 40 × (94°C, 30 s; 63,5°C, 20 s; 72°C, 105 s); 72°C, 10 min; 4°C, ∞], usando los cebadores CRISPR_hCas9_Fw y CRISPR_omega1_Rv (Tabla 3, en la página 17), que hibridan con la

secuencia codificante de la Cas9 y el esqueleto de pDGB3_omega1, respectivamente, y rinden un producto de 1471 pb. Preparamos precultivos en medio líquido LB suplementado con espectinomicina a partir de los cuales obtuvimos ADN plasmídico (apartado IV.8.2.2, en la página 19). Comprobamos la integridad estructural de pDGB3_omega1_CP4 mediante una PCR y secuenciación por el método de Sanger (apartado IV.8.5, en la página 20).

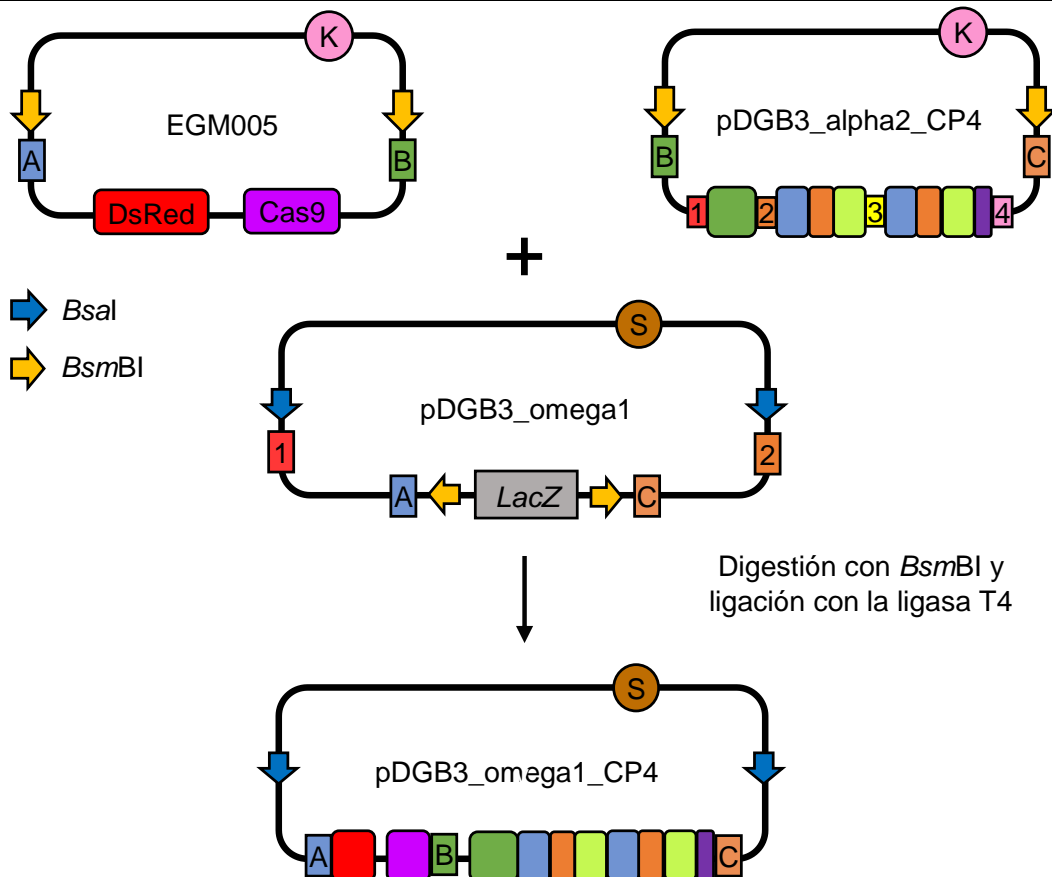


Figura 8.- Construcción del vector pDGB3_omega1_CP4. Se representa el ensamblaje de las secuencias que codifican el marcador DsRed y la nucleasa Cas9, presentes en EGM005 (un vector alpha1) y el inserto del vector pDGB3_alpha2_CP4, que incluye el promotor *pU6-26* y las secuencias que rinden el transcrito policistrónico. Se siguen las pautas definidas para la Figura 2 (en la página 7). Tras la reacción de digestión con *BsmBI* y de ligación con la ligasa T4, se obtiene pDGB3_omega1_CP4. Imagen modificada a partir de Valdés Penalva (2021).

V.2.3.- Transformación de células de *Agrobacterium tumefaciens*

Transformamos mediante electroporación células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (apartado IV.10.3, en la página 21) con pDGB3_omega1_CP4. Seleccionamos las células transformadas en placas que contenían medio LB suplementado con rifampicina y espectinomicina. Realizamos cultivos por estrías de las colonias resistentes a rifampicina y espectinomicina y verificamos que eran portadoras de pDGB3_omega1_CP4

mediante amplificación por PCR con las mismas condiciones que en el apartado V.2.2, en la página 29). Estas células portadoras de la construcción pDGB3_omega1_CP4 se emplearán para transformar los triples mutantes descritos en el apartado V.1, en la página 23, una vez que se haya completa su obtención y genotipado inequívoco.

VI.- DISCUSIÓN

VI.- DISCUSIÓN

En este TFG hemos contribuido a la obtención de cuádruples mutantes de alelos de insuficiencia de función de *ICU11* o *CP2* con los de *CP3*, *CP4* y *CP5*, en un fondo genético Col-0. Con este fin, hemos iniciado la obtención de triples mutantes mediante cruzamientos. El abordaje habitual para obtener combinaciones múltiples de mutaciones consiste en la obtención inicial de dobles mutantes, para luego generar el triple. Si los mutantes simples tienen un fenotipo morfológico visible, esta estrategia supone poco esfuerzo, ya que se pueden seleccionar los mutantes múltiples por sus alteraciones fenotípicas y comprobar el genotipo de solo algunas. En nuestro caso hemos optado por una estrategia diferente, al cruzar directamente plantas diheterocigóticas de la F₁ de un cruzamiento por un tercer mutante. Esta estrategia ha supuesto un mayor esfuerzo, tanto en el número de cruzamientos realizados como en el de plantas que debíamos genotipar. Sin embargo, nos ha permitido reducir la duración del proceso, ya que en vez de tener que esperar cuatro generaciones, hemos obtenido los triples mutantes *cp2-1 cp3-2 cp5-1*, *cp2-1 cp3-2 cp5-2* y *cp2-3 cp3-2 cp5-2* en tan solo tres generaciones. Solo ha sido necesario esperar otra generación para *icu11-5 cp3-2 cp5-2*, lo que demuestra que nuestro abordaje agiliza el proceso de obtención de mutantes múltiples en comparación con las estrategias tradicionales. Cabe resaltar que en las progenies F₂ en las que hemos logrado encontrar triples mutantes, hemos genotipado menos de 40 plantas.

Dado que *CP4* y *CP5* están ligados, para obtener los cuádruples mutantes es necesario inducir alelos de *CP4* mediante CRISPR/Cas9 en un fondo mutante para otros tres genes de la familia CUPULIFORMIS. El sistema GoldenBraid2.0 tiene módulos disponibles para obtener transcritos policistrónicos que faciliten la edición simultánea mediante CRISPR/Cas9 de múltiples dianas. Aprovechando este sistema, hemos clonado dos ARNg para editar el dominio P4Hc del gen *CP4* e inducir mutaciones nulas *cp4*. Esta estrategia nos permitirá obtener diferentes alelos como pequeñas inserciones y deleciones en los sitios de corte de Cas9, que causarán diferentes grados de insuficiencia de función, incluida su ausencia.

VII.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

VII.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

En este TFG hemos contribuido al estudio de la eventual redundancia funcional entre los genes de la familia CUPULIFORMIS de Arabidopsis. Antes del inicio de este TFG se obtuvieron en el laboratorio de J.L Micol combinaciones cuádruples de alelos de *ICU11*, *CP3*, *CP4* y *CP5* o de *CP2*, *CP3*, *CP4* y *CP5*, pero algunos de los alelos empleados podían no ser nulos. La ausencia de fenotipo morfológico en estos cuádruples mutantes, en consecuencia, no permite descartar la existencia de redundancia funcional. Además, *CP4* y *CP5* están ligados, lo que dificulta la obtención de dobles mutantes *cp4 cp5* mediante cruzamientos, por lo que también se inició la obtención de dos ARNg de CRISPR/Cas9 para mutagenizar el dominio P4Hc del gen *CP4*. El objetivo definido para este TFG fue generar cuádruples mutantes *icu11 cp3 cp4 cp5* y *cp2 cp3 cp4 cp5*.

Nos propusimos obtener triples mutantes para *ICU11*, *CP3* y *CP5* o *CP2*, *CP3* y *CP5* mediante cruzamientos. Debido a la limitación de tiempo, solamente hemos obtenido tres de las seis combinaciones de triples mutantes propuestas inicialmente: *cp2-1 cp3-2 cp5-1*, *cp2-1 cp3-2 cp5-2* y *cp2-3 cp3-2 cp5-2*. Más adelante se continuará con la obtención de *cp2-3 cp3-2 cp5-1*, *icu11-5 cp3-2 cp5-1* e *icu11-5 cp3-2 cp5-2*.

Hemos generado una construcción mediante la tecnología GoldenBraid2.0 para realizar mutagénesis dirigida del dominio P4Hc de *CP4* mediante CRISPR/Cas9. Primero generamos pDGB3_alpha2_CP4, con el promotor pU6_26 y la secuencia cuya transcripción por la ARN polimerasa III rinde el transcrito policistrónico que, tras ser procesado, dará lugar a las dos ARNg contra *CP4*. Posteriormente, hemos obtenido el vector de expresión pDGB3_omega1_CP4, con las secuencias codificantes de la dsRed y la Cas9. Hemos transformado células de *Agrobacterium tumefaciens* con pDGB3_omega1_CP4, que permitirán transferir la construcción a los triples mutantes.

Una vez transformados los triples mutantes, se seleccionarán las semillas T₁ rojas, ya que serán portadoras de la construcción. Se hará un escrutinio de las plantas T₁ para comprobar la presencia de alelos mutantes *cp4*. Dado que la edición puede ocurrir en cualquier momento, esperamos que se generen mosaicos, es decir, que haya diferentes mutaciones en partes diferentes de la planta. Solo las mutaciones que pasen a la línea germinal se transferirán a la siguiente generación. Se escogerán a continuación semillas T₂ marrones, que ya no porten la construcción pDGB3_omega1_CP4, y se comprobará mediante secuenciación Sanger si las plantas T₂ son homocigóticas para un determinado alelo *cp4*. Finalmente, se analizará la morfología foliar, el tiempo de floración y la fertilidad, ya que este tipo de alteraciones están presentes en los mutantes simples *icu11*.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

- Accari, S.L., y Fisher, P.R. (2015). Emerging roles of JmjC domain-containing proteins. *International Review of Cell and Molecular Biology* **319**, 165-220.
- Adrian, J., Farrona, S., Reimer, J.J., Albani, M.C., Coupland, G., y Turck, F. (2010). *cis*-Regulatory elements and chromatin state coordinately control temporal and spatial expression of *FLOWERING LOCUS T* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 1425-1440.
- Aguilera Díaz, V. (2009). Búsqueda de modificadores del fenotipo morfológico de un mutante *argonaute1* viable. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Lisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., y Ecker, J.R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Berná Amorós, G. (1997). Disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*: aislamiento y caracterización de mutantes inducidos mediante metanosulfonato de etilo. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante.
- Bloomer, R.H., Hutchison, C.E., Bäurle, I., Walker, J., Fang, X., Perera, P., Velanis, C.N., Gümüs, S., Spanos, C., Rappsilber, J., Feng, X., Goodrich, J., y Dean, C. (2020). The *Arabidopsis* epigenetic regulator ICU11 as an accessory protein of Polycomb Repressive Complex 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **117**, 16660-16666.
- Bourras, S., Rouxel, T., y Meyer, M. (2015). *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: how a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. *Phytopathology* **105**, 1288-1301.
- Briggs, G.C., Osmont, K.S., Shindo, C., Sibout, R., y Hardtke, C.S. (2006). Unequal genetic redundancies in *Arabidopsis*—a neglected phenomenon? *Trends in Plant Science* **11**, 492-498.
- Candela Antón, H. (2001). Análisis genético de la formación del patrón de venación de la hoja en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Clough, S., y Bent, A. (2008). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**, 735-743.
- Costa, S., y Dean, C. (2019). Storing memories: the distinct phases of Polycomb-mediated silencing of *Arabidopsis FLC*. *Biochemical Society Transactions* **47**, 1187-1196.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B. (1983). A plant miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **4**, 19-21.
- Farrow, S.C., y Facchini, P.J. (2014). Functional diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases in plant metabolism. *Frontiers in Plant Science* **5**, 524.
- Ferrández Ayela, A. (2012). Caracterización genética y molecular de los mutantes *transcurvata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E.M., y Coupland, G. (1997). A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* **386**, 44-51.
- Hu, Y., Patra, P., Pisanty, O., Shafir, A., Belew, Z.M., Binenbaum, J., Ben Yaakov, S., Shi, B., Charrier, L., Hyams, G., Zhang, Y., Trubulsky, M., Caldaru, O., Weiss, D., Crocoll, C., Avni, A., Vernoux, T., Geisler, M., Nour-Eldin, H.H., Mayrose, I., y Shani, E. (2023). Multi-Knock – a multi-targeted genome-scale CRISPR toolbox to overcome functional redundancy in plants. *Nature Plants* **9**, 572-587.
- Ibrar, H., Ahmad, R., Hasnain, Z., Gul, S., Rais, A., y Khan, S. (2023). Epigenetic-based control of flowering and seed development in plants: a review. *Plant Breeding* **142**, 732-744.
- Kawai, Y., Ono, E., y Mizutani, M. (2014). Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *Plant Journal* **78**, 328-343.

- Kim, D.H., y Sung, S. (2014). Genetic and epigenetic mechanisms underlying vernalization. *The Arabidopsis Book* **12**, e0171.
- Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1987). Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service* **24**.
- Lammoglia-Cobo, M.F., Lozano-Reyes, R., García-Sandoval, C.D., Avilez-Bahena, C.M., Trejo-Reveles, V., Muñoz-Soto, R.B., y López-Camacho, C. (2016). La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. *Investigación en Discapacidad* **5**, 116-128.
- Lynch, M., y Force, A. (2000). The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* **154**, 459-473.
- Mateo-Bonmatí, E., Esteve-Bruna, D., Juan-Vicente, L., Nadi, R., Candela, H., Lozano, F., Ponce, M., Pérez-Pérez, J., y Micol, J. (2018). *INCURVATA11* and *CUPULIFORMIS2* are redundant genes that encode epigenetic machinery components in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **30**, 1596-1616.
- Meinke, D., y Koornneef, M. (1997). Community standards for *Arabidopsis* genetics. *Plant Journal* **12**, 247-253.
- Melo Medina, M. (2022). Una contribución a la mejora en la edición CRISPR/Cas9 y la selección de plantas editadas en *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Mojica, F.J., Diez-Villasenor, C., Soria, E., y Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology* **36**, 244-246.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Nadi, R., Mateo-Bonmatí, E., Juan-Vicente, L., y Micol, J.L. (2018). The 2OGD superfamily: emerging functions in plant epigenetics and hormone metabolism. *Molecular Plant* **11**, 1222-1224.
- Nadi, R., Juan-Vicente, L., Mateo-Bonmatí, E., y Micol, J. (2023). The unequal functional redundancy of *Arabidopsis INCURVATA11* and *CUPULIFORMIS2* is not dependent on genetic background. *Frontiers in Plant Science* **14**.
- Ortega Menaches, À. (2020). Identificación y caracterización de nuevos genes *DENTICULATA* en *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández.
- Panchy, N., Lehti-Shiu, M., y Shiu, S.H. (2016). Evolution of gene duplication in plants. *Plant Physiology* **171**, 2294-2316.
- Pérez Pérez, J.M. (2003). Caracterización genética y molecular de los mutantes *ultracurvata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Pikaard, C.S., y Mittelsten Scheid, O. (2014). Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6**, a019315.
- Pomares Bri, I.C. (2020). El gen *APICULATA7* en *Arabidopsis* participa en el reciclaje del ribosoma citoplasmático. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Ponce Molet, M.R. (1996). Aislamiento y caracterización molecular de genes de la superfamilia del TGF-beta que se expresan en el embrión de *Strogylocentrotus purpuratus*. Tesis doctoral. Universidad de Alicante.
- Robles Ramos, P. (1999). Análisis genético de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología de la hoja. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* **1**.
- Sarmiento Mañús, R. (2011). Análisis genético de mutantes variegados en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Sarrion-Perdigones, A., Vazquez-Vilar, M., Palací, J., Castelijn, B., Forment, J., Ziarsolo, P., Blanca, J., Granell, A., y Orzaez, D. (2013). GoldenBraid 2.0: a comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology. *Plant Physiology* **162**, 1618-1631.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B.,

- Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M., y Goff, S.A. (2002). A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *Plant Cell* **14**, 2985-2994.
- Shafiq, S., Berr, A., y Shen, W.H. (2014). Combinatorial functions of diverse histone methylations in *Arabidopsis thaliana* flowering time regulation. *New Phytologist* **201**, 312-322.
- Smith, L., Sanders, J., Kaiser, R., Hughes, P., Dodd, C., Connell, R., Heiner, C., Kent, S., y Hood, L. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**, 674-679.
- Valdés Penalva, Á. (2021). Mutagénesis mediante CRISPR/Cas de genes de las familias de factores de transcripción CCAAT-HAP5, C2H2, NAC y C2C2-CO-like de Arabidopsis. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Vazquez-Vilar, M., Bernabé-Orts, J.M., Fernandez-del-Carmen, A., Ziarsolo, P., Blanca, J., Granell, A., y Orzaez, D. (2016). A modular toolbox for gRNA-Cas9 genome engineering in plants based on the GoldenBraid standard. *Plant Methods* **12**, 10.
- Walkerpeach, C., y Velten, J. (1994). *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. *Plant Molecular Biology Manual* **B1**, 33-51.
- Xie, K., Minkenberg, B., y Yang, Y. (2015). Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **112**, 3570-3575.
- Yamamuro, C., Zhu, J.K., y Yang, Z. (2016). Epigenetic modifications and plant hormone action. *Molecular Plant* **9**, 57-70.
- Yang, H., Howard, M., y Dean, C. (2014). Antagonistic roles for H3K36me3 and H3K27me3 in the cold-induced epigenetic switch at *Arabidopsis FLC*. *Current Biology* **24**, 1793-1797.
- Yaschenko, A.E., Alonso, J.M., y Stepanova, A.N. (2024). Arabidopsis as a model for translational research. *Plant Cell* koae065.