



Universidad Miguel Hernández de Elche

**Obtención de combinaciones múltiples
de alelos mutantes de los genes
que codifican las proteínas ICU11, CP2 y sus
presuntos interactores físicos en Arabidopsis**

Núria Termes Sabater

Tutores:

José Luis Micol Molina

Lucía Juan Vicente

Máster en Biotecnología y Bioingeniería

Instituto de Bioingeniería

Curso académico 2023-2024

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

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

HACEMOS CONSTAR:

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

Lucía Juan Vicente

José Luis Micol Molina

Elche, 2 de septiembre de 2024

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE TABLAS	II
I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	1
II.- INTRODUCCIÓN	2
II.1.- La maquinaria epigenética de las plantas	2
II.1.1.- La epigenética de las plantas	2
II.1.2.- Los complejos represores Polycomb y sus proteínas accesorias.....	2
II.2.- Las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe ²⁺	4
II.3.- Métodos para la detección de interacciones físicas entre proteínas	4
II.4.- Genética directa e inversa	7
II.5.- Las interacciones genéticas evidencian la existencia de genes funcionalmente relacionados.....	7
II.6.- Redundancia funcional entre genes parálogos	8
III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	10
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	12
IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria	12
IV.2.- Abreviaturas, acrónimos y fórmulas químicas	12
IV.3.- Gramática y terminología	12
IV.4.- Nomenclatura genética	13
IV.5.- Estirpes de Arabidopsis empleadas en este trabajo	13
IV.6.- Condiciones de cultivo de Arabidopsis	13
IV.6.1.- Cultivo en placa de Petri	13
IV.6.2.- Cultivo en maceta	15
IV.6.3.- Recolección de semillas.....	16
IV.6.4.- Cruzamientos	16
IV.7.- Disoluciones	16
IV.7.1.- Medios de cultivo para Arabidopsis	17
IV.7.1.1.- Medios de cultivo líquidos	17
IV.7.1.2.- Medios de cultivo sólidos.....	17
IV.7.2.- Tampones y otras disoluciones de uso general	18
IV.7.2.1.- Disoluciones para extracción de ADN.....	18
IV.7.2.2.- Disoluciones para electroforesis.....	18
IV.8.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos.....	18
IV.8.1.- Síntesis de ADN.....	18
IV.8.1.1.- Síntesis de oligonucleótidos	18
IV.8.1.2.- Amplificaciones mediante PCR	18
IV.8.2.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis para su amplificación por PCR .	20
IV.8.3.- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	20

IV.8.4.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN	21
IV.9.- Genotipado de mutantes insercionales mediante PCR	21
IV.10.- Observación microscópica y microfotografía de plantas de Arabidopsis	22
V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
V.1.- Selección de interactores físicos de las proteínas ICU11 y CP2 para su análisis genético.....	23
V.2.- Análisis genético preliminar de los interactores comunes a ICU11 y CP2	23
V.2.1.- ALDEHYDE DEHYDROGENASE 3H1 (ALDH3H1)	23
V.2.1.1.- Información disponible sobre <i>ALDH3H1</i>	23
V.2.1.2.- Verificación de líneas portadoras de alelos insercionales de <i>ALDH3H1</i>	23
V.2.1.3.- Obtención de dobles mutantes <i>icuil1-1 aldh3h1-D</i> , <i>icuil1-5 aldh3h1-D</i> y <i>cp2-3 aldh3h1-D</i>	26
V.2.2.- PHOSPHORYLETHANOLAMINE CYTIDYLTRANSFERASE 1 (PECT1)	26
V.2.2.1.- Información disponible sobre <i>PECT1</i>	26
V.2.2.2.- Verificación de líneas portadoras de alelos insercionales de <i>PECT1</i>	27
V.2.2.3.- Obtención de sesquimutantes <i>icuil1-1/icuil1-1;PECT1/pect1-12</i> , <i>icuil1-5/icuil1-5;PECT1/pect1-12</i> y <i>cp2-3/cp2-3;PECT1/pect1-12</i>	28
V.2.3.- GENERAL CONTROL NON-DEREPRESSIBLE 20 (GCN20)	28
V.2.3.1.- Información disponible sobre <i>GCN20</i>	28
V.2.3.2.- Verificación de líneas portadoras de alelos insercionales de <i>GCN20</i>	28
V.2.3.3.- Obtención de dobles mutantes <i>icuil1-1 gcn20-2</i> , <i>icuil1-5 gcn20-2</i> y <i>cp2-3 gcn20-2</i>	30
V.2.4.- NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 50 (NAC050) y NAC052	30
V.2.4.1.- Información disponible sobre <i>NAC050</i> y <i>NAC052</i>	30
V.2.4.2.- Verificación de plantas dobles mutantes <i>nac050 nac052</i>	31
V.2.4.3.- Obtención de triples mutantes <i>icuil1-1 nac050 nac052</i> , <i>icuil1-5 nac050 nac052</i> y <i>cp2-3 nac050 nac052</i>	31
V.3.- Análisis genético preliminar de los interactores exclusivos de CP2.....	32
V.3.1.- At1g09520	32
V.3.1.1.- Información disponible sobre At1g09520	32
V.3.1.2.- Verificación de líneas portadoras de alelos insercionales de At1g09520	32
V.3.1.3.- Obtención de dobles mutantes <i>icuil1-1 at1g09520-1</i> , <i>icuil1-5 at1g09520-1</i> y <i>cp2-3 at1g09520-1</i>	33
V.3.2.- DEVELOPMENT RELATED MYB-LIKE1 (DRMY1).....	33
V.3.2.1.- Información disponible sobre <i>DRMY1</i>	33
V.3.2.2.- Verificación de líneas portadoras de alelos insercionales de <i>DRMY1</i>	34
V.3.2.3.- Obtención de dobles mutantes <i>icuil1-1 drmy1</i> , <i>icuil1-5 drmy1</i> y <i>cp2-3 drmy1</i>	34
V.3.3.- At1g05860	35
V.3.3.1.- Información disponible sobre At1g05860	35
V.3.3.2.- Homología entre las proteínas INO80 y KANSL2 humanas y la codificada por At1g05860 de Arabidopsis	35
V.3.3.3.- Verificación de líneas portadoras de alelos insercionales de At1g05860	36

V.3.3.4.- Obtención de dobles mutantes <i>icuil-1 at1g05860-1</i> , <i>icuil-5 at1g05860-1</i> y <i>cp2-3 at1g05860-1</i>	36
V.3.4.- At4g37440	36
V.3.4.1.- Información disponible sobre At4g37440	36
V.3.4.2.- Verificación de líneas portadoras de alelos insercionales de At4g37440	37
V.3.4.3.- Obtención de dobles mutantes <i>cu11-1 at4g37440-1</i> , <i>icuil-5 at4g37440-1</i> y <i>cp2-3 at4g37440-1</i>	38
V.3.5.- DEFECTIVE EMBRYO AND MERISTEMS 2 (DEM2)	38
V.3.5.1.- Información disponible sobre <i>DEM2</i>	38
V.3.5.2.- Verificación de líneas portadoras de alelos insercionales de <i>DEM2</i>	39
V.3.5.3.- Obtención de dobles mutantes <i>icuil-1 dem2-3</i> , <i>icuil-5 dem2-3</i> y <i>cp2-3 dem2-3</i>	39
VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	40
VII.- BIBLIOGRAFÍA	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Fenotipo morfológico de los mutantes <i>emf</i>	3
Figura 2.- Esquema de una purificación mediante afinidad en tándem	6
Figura 3.- Tipos de redundancia funcional entre genes parálogos de Arabidopsis	9
Figura 4.- Manifestación fenotípica de la redundancia funcional desigual de <i>ICU11</i> y <i>CP2</i> . 10	
Figura 5.- Genotipado de inserciones de ADN-T en las líneas de las colecciones SALK, SAIL y GK	21
Figura 6.- Genotipado de plantas de la línea SAIL_827_D06	24
Figura 7.- Determinación de la posición de la inserción de ADN-T del alelo <i>aldh3h1-D</i> del gen <i>ALDH3H1</i>	25
Figura 8.- Estructura del gen <i>PECT1</i> , con indicación de la naturaleza molecular y la posición de sus mutaciones mencionadas o estudiadas en este trabajo	27
Figura 9.- Fenotipo morfológico de la línea GK-188G03	29
Figura 10.- Estructura del gen <i>GCN20</i> , con indicación de la naturaleza molecular y la posición de sus mutaciones mencionadas o estudiadas en este trabajo. Se siguen las pautas definidas en la Figura 7, en la página 25	30
Figura 11.- Fenotipo morfológico de los dobles mutantes <i>nac050 nac052</i>	31
Figura 12.- Fenotipo morfológico de las plantas SALK_059601C	32
Figura 13.- Estructura del gen At1g059520, con indicación de la naturaleza molecular y la posición de su mutación estudiada en este trabajo	33
Figura 14.- Estructura del gen <i>DRMY1</i> , con indicación de la naturaleza molecular y la posición de su mutación estudiada en este trabajo	34
Figura 15.- Fenotipo morfológico de la línea insercional SAILseq_623_H05.1	37
Figura 16.- Estructura del gen At4g37440, con indicación de la naturaleza molecular y la posición de su mutación estudiada en este trabajo	38

Figura 17.- Estructura del gen <i>DEM2</i> , con indicación de la naturaleza molecular y la posición de su mutación estudiada en este trabajo	39
Figura 18.- Cronograma de las tareas iniciadas en este TFM y las que deberán concluirse más adelante	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Abreviaturas empleadas en este trabajo	12
Tabla 2.- Estirpes de <i>Arabidopsis</i> usadas en este trabajo.....	14
Tabla 3.- Oligonucleótidos usados en este trabajo	19
Tabla 4.- Genotipado de plantas presuntamente portadoras de alelos mutantes <i>aldh3h1</i>	25
Tabla 5.- Análisis de la cosegregación del fenotipo clorótico de las plantas GK-188G03 y los alelos insercionales de <i>GCN20</i> estudiados en este trabajo	30
Tabla 6.- Análisis de la segregación del fenotipo mutante en líneas presuntamente portadoras de alelos insercionales de <i>At1g09520</i>	33
Tabla 7.- Genotipado de plantas presuntamente portadoras de alelos insercionales de <i>At1g05860</i>	36
Tabla 8.- Análisis de la segregación del fenotipo mutante en líneas presuntamente portadoras de alelos insercionales de <i>At4g37440</i>	37

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

INCURVATA (ICU11) y CUPULIFORMIS2 (CP2) son proteínas de Arabidopsis parálogas, desigualmente redundantes y con funciones epigenéticas. Se ha demostrado que ICU11 es una proteína accesoria del Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). En el laboratorio de J.L Micol se realizaron ensayos de purificación por afinidad en tándem y de complementación de fluorescencia bimolecular, en los que se demostró que ICU11 y CP2 interaccionan físicamente con componentes principales y proteínas accesorias del PRC2, así como con otras proteínas nucleares, incluidos algunos factores de transcripción. En este trabajo hemos iniciado la obtención de combinaciones múltiples de alelos nulos de los genes *ICU11* o *CP2* y mutaciones puntuales o insercionales en diez de los que codifican interactores físicos de las proteínas ICU11 y/o CP2. La eventual aparición de sinergia fenotípica en dichos mutantes múltiples revelaría la existencia de interacciones genéticas entre los genes implicados y confirmaría las interacciones físicas previamente detectadas entre las correspondientes proteínas.

Palabras clave: CUPULIFORMIS2, INCURVATA11, epigenética, líneas insercionales, interacciones genéticas.

Arabidopsis INCURVATA (ICU11) and CUPULIFORMIS2 (CP2) are paralogous proteins, exhibiting unequal functional redundancy and with epigenetic functions. ICU11 has been demonstrated to act as an accessory protein of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). In the laboratory of J.L. Micol, tandem affinity purification and bimolecular fluorescence complementation assays were performed, showing that ICU11 and CP2 physically interact with core components and accessory proteins of PRC2, as well as with other nuclear proteins, including several transcription factors. In this study, we initiated the generation of multiple combinations of null alleles of the *ICU11* or *CP2* genes and point or insertional mutations in ten genes encoding physical interactors of the ICU11 and/or CP2 proteins. The potential emergence of phenotypic synergy in these multiple mutants would reveal the presence of genetic interactions among the implicated genes and confirm the physical interactions previously detected between the corresponding proteins.

Keywords: CUPULIFORMIS2, INCURVATA11, epigenetics, insertional lines, genetic interactions.

II.- INTRODUCCIÓN

II.- INTRODUCCIÓN

II.1.- La maquinaria epigenética de las plantas

II.1.1.- La epigenética de las plantas

Se denomina cromatina (Flemming, 1882) al conjunto de moléculas de ADN, ARN y proteínas que contiene el núcleo de las células eucarióticas, que manifiesta diferentes grados de condensación a lo largo del ciclo celular. La unidad estructural básica de la cromatina es el nucleosoma, en el que el ADN está asociado a un octámero de histonas (Arents y Moudrianakis, 1993). El grado de condensación de la cromatina modula la expresión génica ya que propicia o dificulta el acceso de los factores de transcripción y las polimerasas de ARN a los genes. Las modificaciones químicas del ADN y las histonas regulan epigenéticamente la expresión de los genes sin alterar su secuencia (Pikaard y Mittelsten Scheid, 2014).

Son numerosos los procesos biológicos que están regulados epigenéticamente (Reik *et al.*, 2001; Kiefer, 2007; Harris *et al.*, 2012). Son ejemplos de ello en el reino vegetal el control de las transiciones entre etapas del desarrollo, determinados cambios de identidad celular y las respuesta al estrés (Guo *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015; Birnbaum y Roudier, 2017). *Arabidopsis thaliana* (en adelante, *Arabidopsis*) es un buen modelo para estudiar procesos epigenéticos, ya que no pocos mutantes portadores de alelos de los genes de su maquinaria epigenética son viables, dado que suelen pertenecer a familias génicas cuyos miembros son funcionalmente redundantes. Las mutaciones equivalentes en sus genes ortólogos del reino animal, que son de copia única, suelen ser letales (Pikaard y Mittelsten Scheid, 2014).

II.1.2.- Los complejos represores Polycomb y sus proteínas accesorias

Las proteínas del grupo Polycomb (PcG, por Polycomb group) son componentes de la maquinaria epigenética evolutivamente conservados desde *Drosophila melanogaster* hasta los mamíferos y las plantas (Whitcomb *et al.*, 2007; Schwartz y Pirrotta, 2013). Las proteínas del PcG forman dos complejos heteromultiméricos que modulan el silenciamiento transcripcional en los eucariotas superiores: Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) que ubiquitina la histona H2A (H2Aub) y PRC2, que trimetila la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) (Simon y Kingston, 2009; Sowpati *et al.*, 2015).

Tal como se ha comentado en el apartado II.1.1, no pocos genes de la maquinaria epigenética de *Arabidopsis* son parálogos redundantes. Tal es el caso de la mayor parte de los que codifican los componentes principales del PRC1 y el PRC2. Por ejemplo, la actividad metiltransferasa de histonas del PRC2 puede ser llevada a cabo por las proteínas codificadas por tres genes parálogos: *CURLY LEAF* (*CLF*; Kim *et al.*, 1998), *MEDEA* (*MEA*; Grössniklaus *et al.*, 1998) y *SWINGER* (*SWN*; Chanvivatana *et al.*, 2004). Por otra parte, *MULTICOPY*

SUPPRESOR OF IRA1 (MSI1; Guitton y Berger, 2005), que codifica una proteína implicada en la unión del PRC2 a los nucleosomas, tiene cuatro parálogos, *MSI2* a *MSI5*, aunque no se ha demostrado la interacción de ninguno de ellos con los restantes componentes principales del PRC2 (Derkacheva *et al.*, 2013). Sin embargo, *FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE)* es un gen de copia única que codifica un componente principal del PRC2 implicado en la unión de este complejo a la marca epigenética H3K27me3 (Ohad *et al.*, 1999; Derkacheva y Hennig, 2014).

Las proteínas EMBRYONIC FLOWER 1 (EMF1) y EMF2 son necesarias en la fase vegetativa del desarrollo de *Arabidopsis* (Aubert *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001). EMF1 está implicada en el depósito de la marca H3K27me3 por el PRC2, así como para la monoubiquitinación de la histona H2A por el PRC1 (Kim *et al.*, 2012), mientras que EMF2 es un componente principal del PRC2 (Chanvivattana *et al.*, 2004). Los mutantes *emf* carecen de fase vegetativa y florecen inmediatamente después de la germinación, generando unas estructuras letales denominadas flores embrionarias (Figura 1).

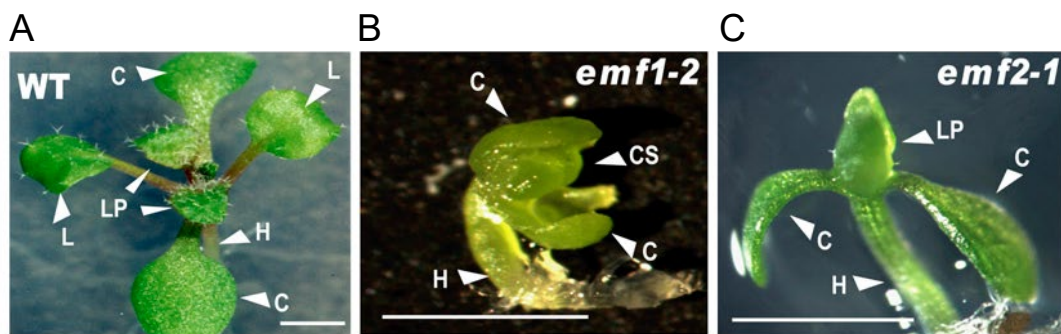


Figura 1.- Fenotipo morfológico de los mutantes *emf*. Se muestran (A) la roseta del tipo silvestre Col-0 y (B, C) flores embrionarias de los mutantes (B) *emf1-2* y (C) *emf2-1*. C: cotiledón. LP: primordio foliar. CS, carpelo. H: hipocótilo. L: hoja. Las barras de escala indican 2 mm. Modificada a partir de Calonje *et al.* (2008).

Se desconoce el mecanismo concreto por el que el PRC2 reconoce y actúa específicamente sobre sus genes diana ante una situación de estrés o en una transición entre fases del desarrollo (Mozgova *et al.*, 2015). Se han identificado más de 30 interactores del PRC2 en *Arabidopsis*, conocidos como proteínas accesorias, entre las que se incluyen factores de transcripción y proteínas de unión a ARN (Godwin y Farrona, 2022). Algunas proteínas accesorias del PRC2 de *Drosophila melanogaster* reconocen las secuencias denominadas elementos de respuesta a Polycomb (PRE, por Polycomb Response Elements; Cunningham *et al.*, 2010). Se han encontrado secuencias similares a los PRE en genes diana del PRC2 de *Arabidopsis* (Xiao *et al.*, 2017).

Pueden citarse como ejemplos de proteínas accesorias del PRC2 las parálogas TELOMERE REPEAT BINDING 1 (TRB1), TRB2 y TRB3, que deben sus nombres a su unión a las repeticiones teloméricas para estabilizar los extremos de los cromosomas (Lee y Cho, 2016). La insuficiencia de las funciones de TRB1, TRB2 y TRB3 reduce los niveles de H3K27me3 en algunos de los genes diana del PRC2, razón por la que se ha propuesto que son necesarias para la unión del complejo a dichos genes (Zhou *et al.*, 2018). TRB4 y TRB5 también parecen ser proteínas accesorias del PRC2, ya que interactúan con algunos componentes principales de este complejo y con TRB1, TRB2 y TRB3 (Kusová *et al.*, 2023). No obstante, TRB4 y TRB5 parecen ser también activadores transcripcionales de cientos de genes reprimidos por CLF, actuando en consecuencia como antagonistas del PRC2 (Amiard *et al.*, 2024).

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

La superfamilia de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe²⁺ (2OGD) está compuesta por enzimas oxidativas que catalizan distintos tipos de reacciones como la hidroxilación y la desmetilación (Farrow y Facchini, 2014). Se han descrito más de 150 genes de *Arabidopsis* que codifican proteínas con dominios 2OGD, que se han clasificado en cuatro grupos, denominados DOXA, DOXB, DOXC y JUMONJI (JMJ), que participan en procesos muy diversos, como la reparación de daños en el ADN, la hidroxilación de residuos de prolina, la biosíntesis y/o el catabolismo de lignanos, isoprenoides, flavonoides, glucosinolatos, alcaloides y cumarinas, y la desmetilación de determinadas lisinas de las histonas, respectivamente (Kawai *et al.*, 2014; Nadi *et al.*, 2018).

Los mutantes *jmj* de *Arabidopsis* manifiestan alteraciones del desarrollo reproductivo y la inmunidad (Nadi *et al.*, 2018); por ejemplo, los *jmj14* son de floración temprana (Yang *et al.*, 2010). JMJ14 cataliza la desmetilación de la marca activadora H3K4me3 en el gen *FLOWERING LOCUS T (FT)*, que codifica un corregulador transcripcional que actúa junto al factor de transcripción *FLOWERING LOCUS D (FD)* en la inducción de la floración (Araki *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2010; Andrés y Coupland, 2012). Los factores de transcripción parálogos NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 50 (NAC050) y NAC052 se unen a JMJ14, lo que justifica la floración temprana de los dobles mutantes *nac050 nac052* (Ning *et al.*, 2015).

II.3.- Métodos para la detección de interacciones físicas entre proteínas

Más del 80% de las proteínas actúan tras su integración en complejos estables o transitorios (Alberts, 1998; Berggård *et al.*, 2007). Con el fin de establecer la composición de dichos complejos, se han desarrollado numerosos métodos para el estudio de las

interacciones físicas entre proteínas (Lalonde *et al.*, 2008), como la inmunoprecipitación seguida de espectroscopía de masas (IP-MS), en la que un complejo multiproteico es recuperado en una cromatografía por afinidad, empleando para ello un anticuerpo específico contra una de ellas; se identifican a continuación los restantes componentes del complejo mediante espectroscopía de masas (Mørtz *et al.*, 1994).

Existen métodos que permiten confirmar de forma dirigida una interacción física entre dos proteínas previamente establecida, como la complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC, por Bimolecular Fluorescence Complementation). Se obtienen en este caso dos fusiones traduccionales, cada una de las cuales contiene el gen que codifica una de las proteínas presuntamente interactoras y una de las dos mitades del que codifica una proteína fluorescente. Si las proteínas a estudio interactúan *in vivo*, se restablece la fluorescencia de la fluorescente, visualizándose así las interacciones (Wong y O'Bryan, 2011). La purificación por afinidad en tándem seguida de espectroscopía de masas (TAP-MS) es una técnica que se basa en la antes mencionada IP-MS. A diferencia de esta última, tiene dos etapas de purificación, lo que posibilita la detección de proteínas poco abundantes (Collins y Choudhary, 2008). En la TAP-MS se genera inicialmente una proteína de fusión con una etiqueta que permite realizar dos cromatografías por afinidad sucesivas. La etiqueta denominada GS-TAP es muy eficaz, con gran rendimiento y especificidad en la purificación (Bürkstümmer *et al.*, 2006; Van Leene *et al.*, 2008). Una de sus versiones, la etiqueta GS^{Rhino}, es particularmente adecuada para identificar los componentes de complejos relativamente inestables; incluye dos proteínas G, dos sitios de escisión de la proteasa 3C del rinovirus y un péptido de unión a estreptavidina (SBP, por streptavidin binding peptide; Figura 2, en la página 6; Van Leene *et al.*, 2015).

La TAP-MS conlleva la obtención de un extracto de proteínas de un cultivo usualmente líquido de células vegetales, en las que se expresa la proteína de interés fusionada a la etiqueta GS^{Rhino}. El complejo heteromultimérico en el que se integra la proteína de interés es recuperado tras dos etapas de purificación. En la primera de ellas se usan esferas de agarosa recubiertas de IgG, que interacciona con las proteínas G de la etiqueta GS^{Rhino}. Un primer lavado permite eluir las proteínas que no forman parte del complejo. Una segunda elución con la proteasa 3C del rinovirus, que digiere la etiqueta GS^{Rhino}, libera el complejo de interés. Este segundo eluido se transfiere a una columna con esferas de agarosa conjugadas a estreptavidina, a la que se une la SBP. El complejo de interés se eluye finalmente con destiobiotina, cuya afinidad por la estreptavidina es mayor que la de la SBP, a la que desplaza. Las proteínas del complejo son finalmente identificadas mediante MS (Van Leene *et al.*, 2015; García-León *et al.*, 2018).

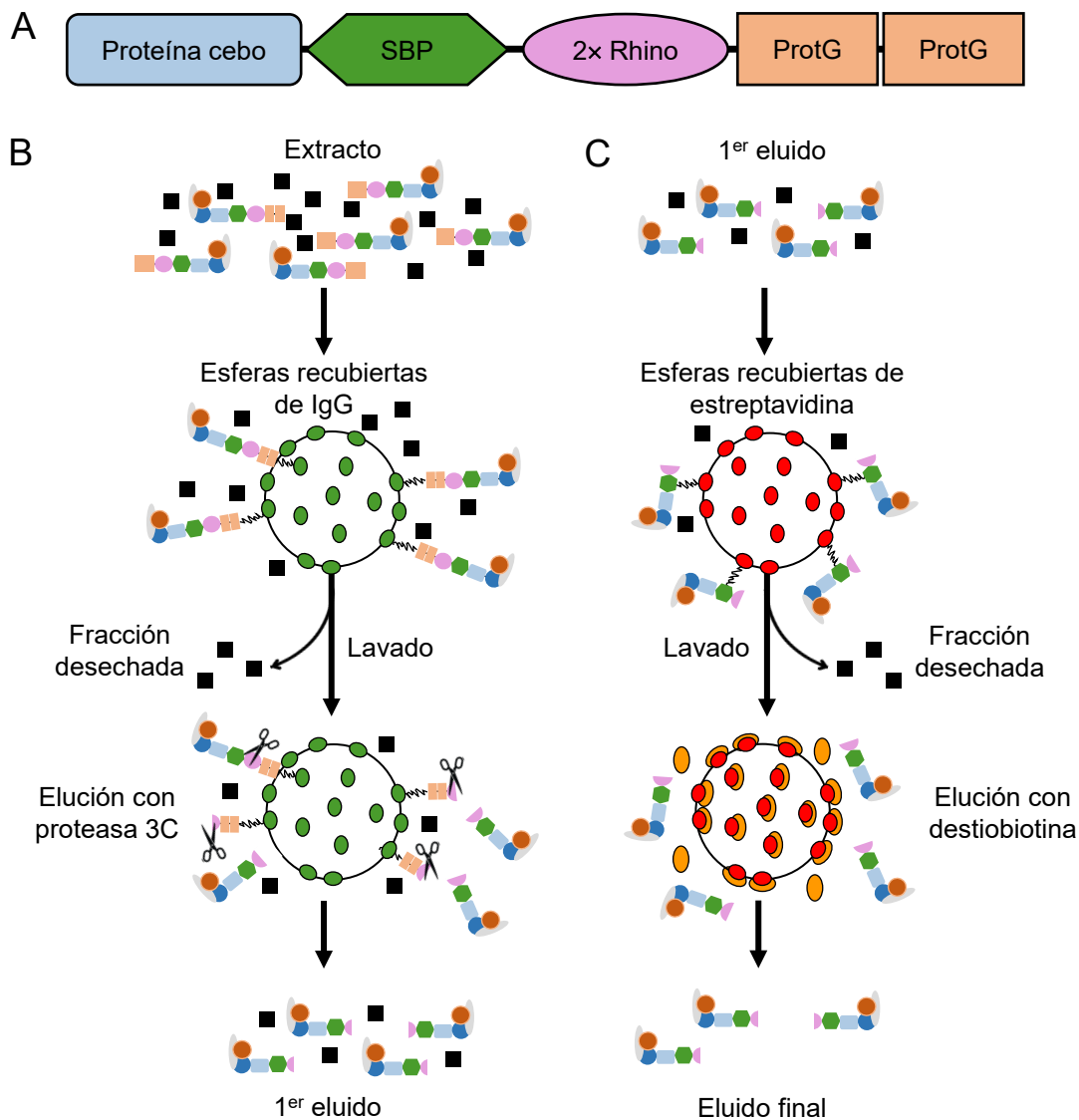


Figura 2.- Esquema de una purificación mediante afinidad en tándem. (A) Estructura de la proteína de fusión entre el cebo a estudio y la etiqueta GS^{Rhino} , que incluye un péptido de unión a estreptavidina (SBP; hexágono verde), dos sitios de corte por la proteasa 3C del rinovirus (2x Rhino; elipses rosas) y dos proteínas G (ProtG; rectángulos naranjas). (B) Las células de estirpes portadoras de la fusión traduccional se cultivan en medio líquido para obtener su extracto proteico. Se realiza un primer paso de purificación por cromatografía de afinidad del extracto, que contiene la proteína de fusión etiquetada, unida a sus interactores (elipses grises y círculos marrones y azules); este extracto también contiene otras proteínas (cuadrados negros). El extracto se incuba con esferas de agarosa (círculo blanco) recubiertas de inmunoglobulina G (IgG; elipses verdes), que se une a las proteínas G de la etiqueta GS^{Rhino} , quedando así retenidos tanto el cebo etiquetado como los restantes componentes del complejo del que forma parte. Las proteínas ajenas a este último son eliminadas mediante un lavado (fracción desechada). El tratamiento con la proteasa 3C del rinovirus, que corta específicamente las dos secuencias Rhino (2x Rhino) de la GS^{Rhino} , rinde el primer eluido, que (C) se incuba en la segunda etapa de purificación con esferas de agarosa recubiertas de estreptavidina (elipses rojas). En un segundo lavado se eluyen las proteínas de fusión mediante destiobiotina (elipses naranjas), que compite con la SBP por la estreptavidina. Se obtiene así un eluido final con el complejo de interés, del que forma parte el cebo etiquetado. Imagen modificada de García-León *et al.* (2018).

II.4.- Genética directa e inversa

El análisis mutacional ha resultado muy útil para dilucidar la función de los genes (Berná *et al.*, 1999). Uno de sus dos enfoques posibles es el de la denominada genética clásica o directa, con la que se han identificado genes implicados en determinados procesos biológicos (Østergaard y Yanofsky, 2004). Su punto de partida es la inducción de mutaciones aleatorias en un organismo experimental, usando mutágenos físicos como las radiaciones ionizantes, químicos como el metanosulfonato de etilo (EMS), o biológicos como determinadas moléculas de ADN con capacidad de inserción aleatoria en los genomas (Alonso y Ecker, 2006). Se altera así la expresión génica para estudiar sus efectos fenotípicos y deducir de estos últimos la función del gen mutado (Østergaard y Yanofsky, 2004).

En la genética inversa se parte del conocimiento previo de la secuencia de un gen de interés para intentar dilucidar su función mediante el estudio de los fenotipos causados tras la inducción de mutaciones dirigidas o el uso de mutantes disponibles en colecciones de dominio público (Alonso y Ecker, 2006; Pérez-Pérez *et al.*, 2009b). Esta aproximación experimental se convirtió en el abordaje de elección preferente para el análisis mutacional en *Arabidopsis* tras la secuenciación del genoma de esta planta (Lloyd y Meinke, 2012). Aunque en la genética directa se va del fenotipo al gen, y en la inversa, del gen al fenotipo, en ambos casos se pretende explicar la relación entre ambos (Østergaard y Yanofsky, 2004).

Con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* se han realizado numerosas mutagénesis insercionales por su capacidad de transferir un segmento, denominado ADN transferente (ADN-T), de sus plásmidos pTi (por Tumor inducing), al genoma de las plantas que infecta (Gelvin, 2009). Mediante el uso del ADN-T como mutágeno se han obtenido colecciones indexadas de centenares de miles de mutantes insercionales de *Arabidopsis* (Sessions *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2003). Destacan por su utilidad y gran número de mutantes las colecciones de semillas SAIL (Syngenta *Arabidopsis* Insertion Library; Sessions *et al.*, 2002) y SALK (Salk Institute for Biological Studies; Alonso *et al.*, 2003). Estas semillas son conservadas y distribuidas por instituciones como la estadounidense *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC; <https://abrc.osu.edu/>) y la europea Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC; <https://arabidopsis.info>). La información sobre las líneas de dichas colecciones se encuentra en sus propias bases de datos de dominio público, y en otras como la T-DNA Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>).

II.5.- Las interacciones genéticas evidencian la existencia de genes funcionalmente relacionados

La combinación de dos mutaciones no alélicas suele rendir el fenotipo correspondiente

a la suma de sus efectos individuales. Se asume en dichos casos que la aditividad del fenotipo doble mutante es consecuencia de la ausencia de relación entre las funciones de sus dos genes mutados (Hill *et al.*, 2008). Un doble mutante también puede manifestar un fenotipo superaditivo o distinto del esperado de la suma de los efectos de sus dos mutaciones. Se denomina interacción genética a este fenómeno, que es muy informativo al respecto de la existencia de funciones génicas relacionadas (Phillips, 1998; Pérez-Pérez *et al.*, 2009a).

La epistasia y la supresión también son interacciones genéticas. Se habla de epistasia cuando el efecto fenotípico de una mutación se superpone al de otra no alélica, manifestando el doble mutante un fenotipo similar al de uno de los dos mutantes simples (Phillips, 2008). La supresión ocurre cuando una mutación anula o reduce el fenotipo de otra, restableciéndose el fenotipo silvestre total o parcialmente en el doble mutante (Hodgkin, 2005). La epistasia suele darse entre genes que codifican componentes de una misma ruta metabólica o de desarrollo (Phillips, 2008; Pérez-Pérez *et al.*, 2009a). La supresión, sin embargo, puede darse tanto entre genes implicados en una misma ruta como en rutas diferentes, pero con funciones relacionadas, o bien, que participan en procesos generales como la transcripción o la traducción (Matsui *et al.*, 2017).

Existen diferentes causas de un fenotipo sinérgico en un doble mutante cuyas mutaciones interaccionan genéticamente, entre las que cabe destacar dos: la disfunción simultánea de dos genes parálogos y funcionalmente redundantes y la pérdida de dos genes que no son parálogos, pero participan en la misma ruta o en rutas convergentes (Pérez-Pérez *et al.*, 2009a). La obtención de dobles mutantes es, por tanto, una herramienta genética particularmente útil para establecer y/o confirmar la existencia de relación funcional entre dos genes a estudio.

II.6.- Redundancia funcional entre genes parálogos

Se dice que dos genes son funcionalmente redundantes si contribuyen a un mismo proceso, de manera tal que la pérdida la función de uno de ellos pueda ser total o parcialmente compensada por el otro (Pickett y Meeks-Wagner, 1995). El mecanismo más habitual por el que dos genes presentan redundancia funcional es su origen común, ya que suelen ser parálogos derivados de la duplicación de un gen ancestral (Briggs *et al.*, 2006).

Se habla de redundancia completa cuando la ausencia de uno de los dos genes parálogos no causa un fenotipo mutante distinguible del silvestre. Se asume en este caso que el producto del gen intacto realiza su propia función y a la vez la de su parálogo ausente. Se entiende que la redundancia es parcial cuando la pérdida de función de cualquiera de los parálogos conlleva una alteración del fenotipo. En ambos casos, la anulación simultánea de

las funciones de los dos genes parálogos rinde un fenotipo sinérgico. Por último, la redundancia desigual se da cuando la aportación de los dos genes parálogos no es equivalente: la ausencia de uno de ellos causa alteraciones fenotípicas visibles, pero no la del otro (Figura 3; Briggs *et al.*, 2006).

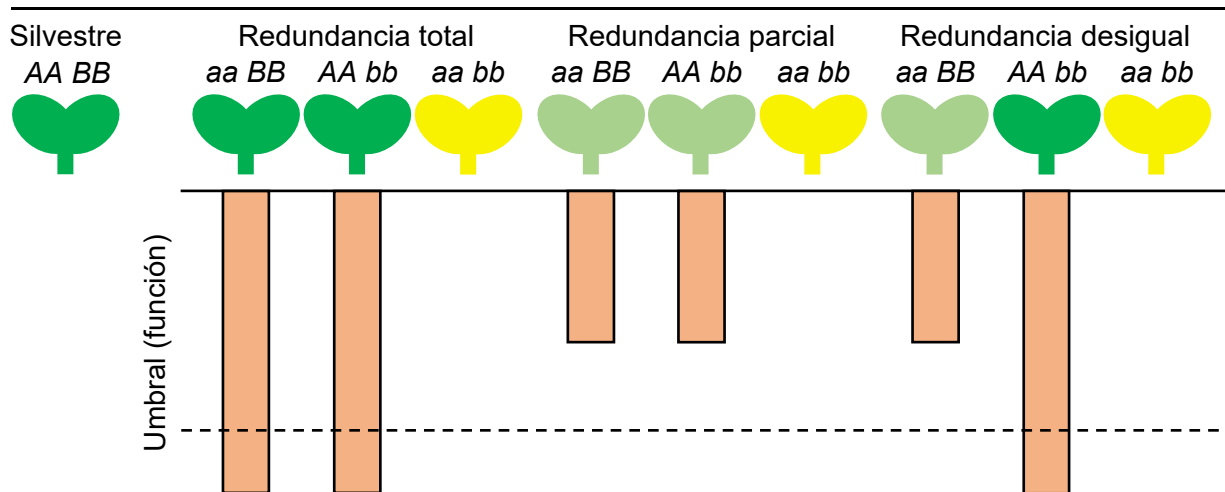


Figura 3.- Tipos de redundancia funcional entre genes parálogos de *Arabidopsis*. En este esquema se representan dos alelos de dos genes implicados en la síntesis de pigmentos foliares: *A* y *B* son silvestres, funcionales y dominantes, y *a* y *b* son nulos y recesivos. Los colores verde oscuro, verde claro y amarillo representan los fenotipos silvestre, mutante débil y mutante extremo. Si los dos genes son completamente redundantes, los mutantes simples $aaBB$ y $AAbb$ son fenotípicamente silvestres. El doble mutante $aabb$ manifiesta un fenotipo sinérgico claramente distinguible del silvestre, que revela la existencia de redundancia funcional. Si la redundancia es parcial pero no desigual, los mutantes simples $aaBB$ y $AAbb$ son fenotípicamente mutantes, aunque su fenotipo es menos severo que el del doble mutante $aabb$. Dos copias del alelo silvestre de cualquiera de los dos genes (AA o BB) permiten alcanzar el umbral de función génica que establece el fenotipo silvestre. En los casos más extremos de redundancia desigual, *A* es capaz de suplir la ausencia de *B*, pero no a la inversa; como consecuencia, los individuos $AAbb$ son fenotípicamente silvestres, pero los $aaBB$ no lo son, manifestando un fenotipo mutante menos severo que el de los dobles mutantes $aabb$. Modificada a partir de Briggs *et al.* (2006).

III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

INCURVATA11 (*ICU11*) y su parálogo más cercano, *CUPULIFORMIS2* (*CP2*), codifican 2OGD nucleares, que son componentes de la maquinaria epigenética de *Arabidopsis*. El mutante simple *icu11-1* manifiesta hiponastia foliar y floración temprana, mientras que los *cp2-1* y *cp2-3* son indistinguibles del tipo silvestre. Sin embargo, el doble mutante *icu11-1/icu11-1;cp2-1/cp2-1* y el sesquimutante *icu11-1/icu11-1;CP2/cp2-3* manifiestan un fenotipo sinérgico muy severo, similar al de los mutantes simples *emf1* y *emf2* (Figura 4; apartado II.1.2, en la página 2). *ICU11* y *CP2* son genes desigualmente redundantes (Mateo-Bonmatí *et al.*, 2018).

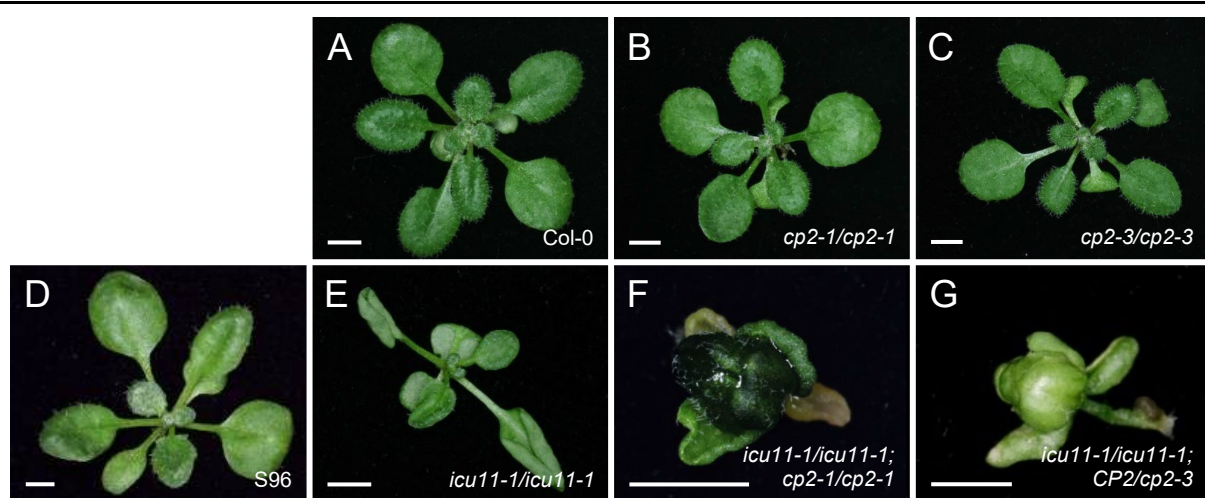


Figura 4.- Manifestación fenotípica de la redundancia funcional desigual de *ICU11* y *CP2*. Se muestran rosetas de los tipos silvestres (A) Col-0 y (D) S96, de los mutantes simples (C) *cp2-1*, (D) *cp2-3* e (E) *icu11-1*, y las flores embrionarias (F) del doble mutante *icu11-1/icu11-1;cp2-1/cp2-1* y (G) el sesquimutante *icu11-1/icu11-1;CP2/cp2-3*. Las fotografías se tomaron 14 días después de la estratificación (dde). Las barras de escala indican 2 mm. Modificada a partir de Mateo-Bonmatí *et al.* (2018).

Se realizó una búsqueda de interactores de *ICU11* en los laboratorios de Caroline Dean (Jonh Innes Centre, Norwich, Reino Unido) y Justin Goodrich (Institute of Molecular Plant Sciences, Edinburgh, Reino Unido) mediante IP-MS (apartado II.3, página 4), que reveló que *ICU11* es una proteína accesoria del PRC2 (Bloomer *et al.*, 2020). Simultáneamente, en el laboratorio de José Luis Micol se identificaron interactores de *ICU11* y/o *CP2* mediante TAP-MS (apartado II.3, en la página 4; Nadi *et al.*, 2024). Se confirmaron así los resultados de Bloomer *et al.* (2020, ya que se identificaron como presuntos interactores de *ICU11* varios componentes principales (CLF, SWN, FIE, MSI1 y EMF2) y proteínas accesorias (EMF1, TRB1, TRB2 y TRB3) del PRC2. También se estableció mediante TAP-MS que *CP2*

interacciona con TRB4 y TRB5. Algunos de estos resultados se validaron mediante ensayos de complementación de fluorescencia bimolecular (apartado II.3, en la página 4), que además indicaron que CP2 también interacciona con SWN, CLF, TRB1 y TRB3 (Nadi *et al.*, 2024). En base a estos resultados, se ha sugerido que ICU11 es una proteína accesoria del PRC2 (Bloomer *et al.*, 2020; Godwin y Farrona, 2022) y que CP2 también podría serlo (Nadi *et al.*, 2024). Otros presuntos interactores de ICU11 y CP2 identificados mediante TAP-MS no se han estudiado aún.

El objetivo general de este Trabajo de Fin de Máster (en adelante, TFM) es contribuir a una mejor comprensión de las funciones de ICU11 y CP2. Para ello, nos hemos propuesto los siguientes objetivos específicos: (1) visitar el listado de presuntos interactores de ICU11 y CP2 identificados previamente mediante TAP-MS a fin de iniciar el estudio de los que no han recibido atención, (2) obtener semillas de líneas de dominio público portadoras de alelos insercionales de los genes que los codifican, y (3) generar sus combinaciones dobles o triples mutantes con alelos nulos de *ICU11* y *CP2* para establecer la eventual existencia de interacciones genéticas que confirmen la relación funcional entre los genes a estudio.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

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

Para la redacción de esta memoria se han seguido las pautas definidas en varias Tesis doctorales previas (Ponce Molet, 1996; Berná Amorós, 1997; Robles Ramos, 1999; Candela Antón, 2001; Pérez Pérez, 2003; Aguilera Díaz, 2009; Sarmiento Mañús, 2011; Ferrández Ayela, 2012), Trabajos de Fin de Máster (Ortega Menaches, 2020) y de Grado (Gutiérrez Nájera, 2018; Pomares Bri, 2020), realizados en los laboratorios de J.L. Micol y M.R. Ponce. En este apartado de Materiales y métodos se reproducen literalmente algunos párrafos procedentes de dichos trabajos anteriores.

IV.2.- Abreviaturas, acrónimos y fórmulas químicas

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

Tabla 1.- Abreviaturas empleadas en este trabajo

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

IV.3.- Gramática y terminología

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

carecen de una traducción al español generalmente aceptada, como *eppendorf*. El carácter foráneo de estas palabras se ha destacado en cursiva. No se han traducido al español muchos de los nombres de genes y proteínas que se mencionan en esta memoria; en estos casos solo se ha usado la cursiva para los nombres de los genes.

IV.4.- Nomenclatura genética

La nomenclatura que se aplica en esta memoria a genes, mutaciones y fenotipos se atiene estrictamente a las pautas propuestas para *Arabidopsis* por Meinke y Koornneef (1997, cuya versión más reciente puede encontrarse en <http://www.arabidopsis.org>). Los alelos de un gen se indican con abreviaturas en cursiva, empleándose las mayúsculas para el silvestre y las minúsculas para los mutantes. Las proteínas se indican en tipografía normal, con mayúsculas. Si existen diferentes genes que han recibido la misma denominación, se les distingue añadiendo un número al grupo de dos, tres o cuatro letras que les denota. Los diferentes alelos mutantes de un gen reciben un distintivo numérico, separado por un guion del identificador del gen. Sirva como ejemplo de lo anterior que hemos estudiado el mutante *incurvata11-1* (*icu11-1*), portador del alelo *icu11-1* del gen *INCURVATA11* (*ICU11*), cuyo producto es la proteína *INCURVATA11* (*ICU11*).

No existe una nomenclatura de aceptación general para los genotipos de *Arabidopsis*. Hemos empleado la expresión línea (también planta, individuo, semilla, plántula o cualquier órgano) *icu11-1* para referirnos a cualquier homocigoto para esta mutación. Salvo que se indique lo contrario, las plantas que se describen en este trabajo son homocigóticas para las mutaciones que se mencionan en cada caso.

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

Hemos empleado las estirpes silvestres y mutantes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. que se recogen en la Tabla 2, en la página 14. Sus semillas se conservaron en tubos *eppendorf* a 4°C.

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

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

IV.6.1.- Cultivo en placa de Petri

La mayoría de los cultivos se iniciaron en placas de Petri de 14 cm de diámetro, que

Tabla 2.- Estirpes de Arabidopsis usadas en este trabajo

Estirpe	Código del NASC	Fondo genético	Mutágeno y mutación	Genes mutados	Origen
S96	N914	S96	Tipo silvestre	-	1
Col-0	N1092	Col-0	Tipo silvestre	-	1
<i>icu11-1</i>	N242	S96	NMU (C→T)	At1g22950	2
<i>icu11-5</i>	-	Col-0	CRISPR/Cas9 (inserción)	At1g22950	3
<i>cp2-3</i>	N826626	Col-0	ADN-T en el 1 ^{er} exón	At3g18210	1
SALK_143292	N643292	Col-0	ADN-T en el 1 ^{er} exón	At1g09520	4
SALK_143286	N643286	Col-0	ADN-T en el 1 ^{er} exón	At1g09520	4
SAIL_827_D06	N836918	Col-0	ADN-T en el 5 ^o intrón	At1g44170	4
SAIL_828_D05	N836975	Col-0	ADN-T en el 5 ^o exón	At1g44170	4
SALK_012746	N512746	Col-0	ADN-T en el 2 ^o exón	At1g58220	4
SALK_085102	N585102	Col-0	ADN-T en el 6 ^o intrón	At2g38670	4
SAILseq_623_H05.1	N923400	Col-0	ADN-T en el 1 ^{er} exón	At4g37440	4
SALKseq_046190	N546190	Col-0	ADN-T en el 2 ^o exón	At4g37440	4
SALK_048708	N548708	Col-0	ADN-T en el 2 ^o intrón	At1g05860	4
SAIL_659_B12C	N867163	Col-0	ADN-T en el 1 ^{er} exón	At3g19240	4
GK-188G03	N418027	Col-0	ADN-T en el 8 ^o exón	At1g64550	4
SALK_135770	N635770	Col-0	ADN-T en el 1 ^{er} exón	At1g64550	4
SAIL_202_C02 ⁶	N809450	<i>quartet1-2</i>	ADN-T en el 1 ^{er} exón	At1g09520	4
SALK_059601	N668353	Col-0	ADN-T en el 1 ^{er} exón	At1g09520	4
<i>nac050 nac052</i>	N69039	Col-0	CRISPR/Cas9 (A→C)	At3g10480 y At3g10490	5

¹Obtenida inicialmente del NASC y replicada varias veces por autofecundación en el laboratorio de J.L. Micol. ²Se aisló tras una mutagénesis con N-nitroso-N-metilurea (NMU) de semillas del acceso silvestre S96 (Relichová, 1976; Serrano-Cartagena *et al.*, 1999). ³Obtenida en el laboratorio de J.L. Micol mediante CRISPR/Cas9 (Nadi *et al.*, 2023). ⁴Se indica el código AGI del gen anotado en la colección SALK, SAIL o GK que contiene una inserción de ADN-T, que no es necesariamente el que causa el fenotipo foliar del mutante a estudio. ⁵Obtenida en Ning *et al.* (2015 mediante CRISPR/Cas9). ⁶Se obtuvo a partir de un mutante *quartet1-2* cuyo fondo genético era Col-3 (Nikonorova *et al.*, 2018).

contenían unos 100 ml de medio sólido Gelrite (apartado IV.7.1.2, en la página 17). La siembra de las semillas de Arabidopsis se llevó a cabo tras su esterilización por inmersión con agitación, durante 8 min, en una disolución acuosa del 40% en lejía comercial (NaClO al 4-5% m/v) y 2 ml/l de Triton X-100 al 1% v/v, realizando a continuación tres lavados sucesivos con agua estéril.

La siembra en placas de Petri se realizó con material estéril, en cabinas de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Se sembraron de 16 a 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.6.2.- Cultivo en maceta

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

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

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

Las macetas y bandejas de alveolos estuvieron permanentemente subirrigadas, manteniéndose un nivel de unos 2-3 cm de agua en el fondo de las cubetas. El aporte de nutrientes se llevó a cabo dos veces por semana, mediante la adición de medio mínimo ATM (apartado IV.7.1.1, en la página 17). Se suspendió el riego cuando la floración se interrumpió, para propiciar el secado de las plantas, que fueron mantenidas en la cámara al menos dos semanas más, para proceder finalmente a la recolección de sus semillas.

IV.6.3.- Recolección de semillas

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

IV.6.4.- 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 adhiriendo 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 *eppendorf* adecuadamente rotulado.

IV.7.- Disoluciones

Se usó siempre agua desionizada, con una resistividad media de 15 M Ω /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 CuSO₄·5H₂O; 287 mg de ZnSO₄·7H₂O; 48,7 mg de NaMoO₄·2H₂O; 584,4 mg de NaCl, y 2,38 mg de CoCl₂·6H₂O. Finalmente, se añadió agua hasta 1 l.

IV.7.1.2.- Medios de cultivo sólidos

Los medios de cultivo sólidos se prepararon por adición de 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.

IV.7.2.- Tampones y otras disoluciones de uso general

IV.7.2.1.- Disoluciones para extracción de ADN

Tampón de extracción: Tris-HCl 100 mM pH 8,0; Na₂EDTA 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 Na₂EDTA 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 KCH₃COO (acetato de potasio) en 50 ml de agua y ajustando el pH a 7,5 con CH₃COOH (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 NaKCH₃COO (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.7.2.2.- Disoluciones para electroforesis

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

Tampón de carga 6x para electroforesis en geles de agarosa: 20% m/v de Ficoll; 0,25% m/v de xilencianol; 0,25% m/v de azul de bromofenol, y Na₂EDTA 10 mM.

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

IV.8.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

IV.8.1.- Síntesis de ADN

IV.8.1.1.- Síntesis de oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos usados en este trabajo (Tabla 3, en la página 19) fueron sintetizados por Merck.

IV.8.1.2.- Amplificaciones mediante PCR

Hemos realizado amplificaciones mediante PCR con varios propósitos. Se usó la

Tabla 3.- Oligonucleótidos usados en este trabajo

Propósito	Nombre	Secuencia (5'→3')
Genotipado de líneas insercionales	LBb1.3 ^{a,b}	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
	LB1 ^{a,c}	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
	o8474 ^{a,d}	ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT
	SAIL_828_D05_LP	GAACGAATCACGTCAAAGCTC
	SAIL_828_D05_RP ^a	GATCTCGGCTTGGAACATCC
	SALK_143292_LP	AGGGCACAAAGAGATGTGACAC
	SALK_143292_RP ^a	TGAAGAAGCAGCGATCTTAGC
	SALK_085102_RP ^a	ATATTTCCCTTTCATGCCCTG
	SALK_085102_LP	GCCAATAAGGATATTTGTGGC
	SALK_012746_RP ^a	TTTCACACTCTCCTCCTCTCG
	SALK_012746_LP	CGCAACAGCTTCCGTTACTAC
	SAILseq_623_H05.1_RP ^a	TCGACCACCTAACGATAATGG
	SAILseq_623_H05.1_LP	AACAAGGCTACCAAATCCATG
	NAC050-F ^a	CAACGCGTTTTGGTTTGAGA
	NAC050-R	GCGCATCGATTCTTGACTGG
	NAC052-F	CGCTACGTCCTCACAAGGAA
	NAC052-R ^a	GAGGTAGTTGGTTGGTTCGC
	SALK_048708.AT1_LP	TTCGCATCATATTCTCTCGCA
	SALK_048708.AT1_RP ^a	GCAGGGTCGGTCAAATGGTA
	SALK_048708.AT2_LP	TCTCTAGGGGGTAGTGGATGG
	SALK_048708.AT2_RP	AAGGGATTGTAGTCCATCTTCAAA
	SAIL_659B12C_LP	AAGGGATTGTAGTCCATCTTCAAA
	SAIL_659B12C_RP ^a	CTGGCGCGTTTTTATTTTGGC
	SALK_135770.AT1_RP	GAGCTGAAACAAATGAGGCA
	SALK_135770.AT1_LP	CACGTTTCAGTGAGCAAAGG
	SALK_135770.AT5_RP	CGGATTCGAGCTAGTGAAAC
	SALK_135770.AT5_LP	GTCGTTGCTTTCTAGAATATGC
	GK-188G03_RP ^a	GTTTCACTCCAGAAATGCAGC
	GK-188G03_LP	TATCTGGATCCTCCCCATACC

^aSe emplearon como cebadores en reacciones de secuenciación. ^bAlonso *et al.* (2003). ^cSessions *et al.* (2002). ^d<https://www.gabi-kat.de/faq/confirmation-strategy.html>.

enzima GoTaq Flexi (Promega) para las amplificaciones de ADN genómico de *Arabidopsis*, 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 por parte de la polimerasa GoTaq Flexi. Se programó una etapa final, no cíclica, de 10 min a 72°C, para el rellenado de las moléculas bicatenarias con colas 5' sobresalientes.

Se programaron temperaturas de hibridación entre 5 y 10°C inferiores a las de fusión (T_m), que se calcularon con los programas *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 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* un cotiledón de un individuo a 14 días después de la estratificación (dde) y se le añadieron 500 µl de tampón de extracción, macerándola en un macerador automático (Mixermill 300, Qiagen). A continuación, se añadieron 35 µl de SDS al 20%, incubando la mezcla en un baño termostatzado a 65°C durante 5 min. Finalmente, se añadieron 130 µl 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 µl de isopropanol y 60 µl de $NaCH_3COO$ 3 M, y se centrifugó durante otros 10 min a 10.000 rpm. El precipitado se lavó con 300 µl de etanol del 70% y se centrifugó una vez más durante 5 min, tras lo cual se dejó secar a temperatura ambiente, para resuspenderlo después en 150 µl de agua y almacenar la disolución a 4°C.

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

Se utilizaron geles del 1.5% m/v en agarosa para las electroforesis de ADN. Las electroforesis se realizaron en cubetas horizontales, empleando como electrolito TAE 1× (apartado IV.7.2.2, en la página 18). La disolución de la agarosa en el tampón se llevó a cabo mediante calentamiento en un microondas. Una vez enfriada la disolución a 55°C se añadió bromuro de etidio hasta una concentración de 0,5 µg/ml. Las electroforesis en geles de agarosa se llevaron a cabo a voltaje constante: se aplicaron 90 V en geles preparados con 50 ml de TAE 1× y 120 V para geles preparados con volúmenes mayores (75 y 100 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.8.4.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN

Se utilizó la variante semiautomatizada y fluorescente del método de Sanger, que se basa en el uso de didesoxinucleótidos terminadores (Smith *et al.*, 1986) marcados con fluorocromos. Las secuencias fueron obtenidas en secuenciadores Applied Biosystems International PRISM 3130 y 3730 por STAB VIDA, empresa a la que se enviaron muestras que contenían 15 μ l de la mezcla de la reacción de amplificación, tratada previamente con Exonucleasa I (una nucleasa de cadena sencilla que elimina los cebadores no incorporados) y FastAp (una fosfatasa alcalina que desfosforila los nucleótidos no incorporados; Invitrogen). 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 19). Algunas posiciones ambiguas en las secuencias obtenidas pudieron esclarecerse mediante la magnificación de los electroferogramas, usando el programa Snapgene (<https://www.snapgene.com/>).

IV.9.- Genotipado de mutantes insercionales mediante PCR

Se usaron tres oligonucleótidos para verificar la presencia de las inserciones de ADN-T de los mutantes insercionales a estudio (Figura 5). Se realizaron dos amplificaciones: (a) una

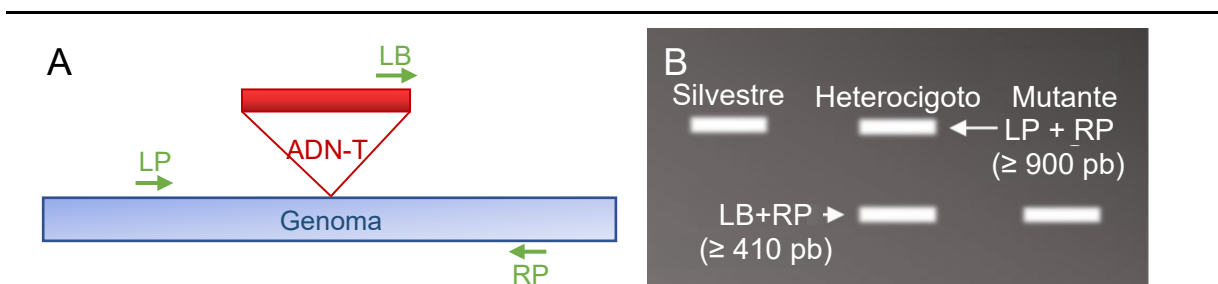


Figura 5.- Genotipado de inserciones de ADN-T en las líneas de las colecciones SALK, SAIL y GK. (A) Representación esquemática de una inserción de ADN-T (rectángulo rojo) en el genoma de Arabidopsis (rectángulo azul), indicando las posiciones de los tres oligonucleótidos usados como cebadores para su genotipado (flechas verdes): LP, RP y LB (LBb1.3 para las inserciones de la colección SALK, LB1 para las de la colección SAIL y o8474 para las de la colección GK). 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>).

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, LB1 y o8474 para las líneas de las colecciones SALK, SAIL y GK, 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.

IV.10.- Observación microscópica y microfotografía de plantas de Arabidopsis

Los cruzamientos y las observaciones de rutina de las plantas se llevaron a cabo con una lupa binocular Olympus SZ30 60TR. Las fotografías de plantas cultivadas en placas de Petri se tomaron con una lupa trinocular Nikon SMZ1500, dotada de una cámara fotográfica Nikon DS-Ri2, con iluminación provista por una fuente de luz led anular de 72 mm de diámetro HAYEAR MSCled72.

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1.- Selección de interactores físicos de las proteínas ICU11 y CP2 para su análisis genético

Hemos revisitado los listados de proteínas que interaccionaron físicamente con ICU11 y/o CP2 en ensayos de TAP-MS realizados en el laboratorio de J.L. Micol (Nadi *et al.*, 2024), seleccionando las que fuesen (1) de localización nuclear, (2) con dominios de unión a ADN y/o ARN, (3) implicadas en la regulación del desarrollo floral, (4) que se coexpresasen o que interaccionasen con histonas o proteínas con dominios de unión a ADN, o (5) cuya depleción causase alteraciones aparentemente epigenéticas. Se redujo la lista inicial de unas 100 proteínas a las 27 que cumplían al menos uno de dichos criterios, iniciando el estudio de 10 de ellas en este TFM. Buena parte de los análisis aquí descritos deberán completarse más adelante, tal como se refleja en el cronograma de la Figura 18, en la página 42. Hemos iniciado el análisis genético de los genes que codifican 5 proteínas detectadas como interactores físicos de ICU11 y CP2 (apartado V.2), y 5 que solo interaccionaron con CP2 (apartado V.3, en la página 32).

V.2.- Análisis genético preliminar de los interactores comunes a ICU11 y CP2

V.2.1.- ALDEHYDE DEHYDROGENASE 3H1 (ALDH3H1)

V.2.1.1.- Información disponible sobre *ALDH3H1*

El gen At1g44170 de *Arabidopsis* codifica la proteína ALDEHYDE DEHYDROGENASE 3H1 (ALDH3H1), que pertenece a la superfamilia de las aldehído deshidrogenasas (ALDH). Las ALDH de las plantas se han clasificado en 13 familias, 7 de las cuales, incluida la ALDH3, tienen ortólogas descritas en los mamíferos y las restantes 6 son específicas del reino vegetal (Stiti *et al.*, 2011). La ALDH3H1 es una proteína nuclear que está relacionada con la respuesta a la sequía y al estrés salino (Missihoun *et al.*, 2012). Según la base de datos ATTED-II (<https://atted.jp/>), se coexpresa con la MULTIFUNCTIONAL PROTEIN 2 (MFP2), que está implicada en la homeostasis de la acetilcolina A en los peroxisomas. El ADN del mutante *mfp2-2* está hipermetilado (Rylott *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2019). Se han descrito tres alelos insercionales de *ALDH3H1*: *aldh3h1-A*, *aldh3h1-B* y *aldh3h1-C*, siendo nulos los dos últimos (Missihoun *et al.*, 2012).

V.2.1.2.- Verificación de líneas portadoras de alelos insercionales de *ALDH3H1*

La presencia de dos o más inserciones de ADN-T en una misma línea insercional puede dificultar su análisis genético (Alonso *et al.*, 2003; Ajjawi *et al.*, 2010). En consecuencia, hemos seleccionado para su estudio las de menor número de inserciones según sus

anotaciones en las bases de datos que se mencionan en el apartado II.4, en la página 7.

Para evaluar los efectos fenotípicos y las interacciones genéticas de los alelos mutantes del gen *ALDH3H1*, se obtuvieron y sembraron semillas de las líneas SAIL_827_D06 y SAIL_828_D05 (*aldh3h1-C*), que contaban con solo una inserción anotada (apartado IV.5, en la página 13, y Tabla 2, en la página 14). Las semillas recibidas del NASC se sembraron y cultivaron en placas de Petri (apartado IV.6.1, en la página 13). Once de las plantas de cada genotipo así obtenidas fueron genotipadas (apartado IV.9, en la página 21) 14 días después de la estratificación (dde), realizando para ello extracciones de su ADN (apartado IV.8.2, en la página 20), que se amplificó mediante PCR (apartado IV.8.1.2, en la página 18), usando como cebadores los oligonucleótidos SAIL_828_D05_LP/RP y LB1 (Tabla 3, en la página 19). Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa (Figura 6), según se detalla en el apartado IV.8.3, en la página 20. Se procedió también de este modo en los experimentos que se describen en los apartados de verificación de líneas insercionales V.2.1.2, V.2.2.2, V.2.3.2, V.2.4.2, V.3.1.2, V.3.2.2, V.3.3.3, V.3.4.2 y V.3.5.2, salvo que se indique lo contrario.



Figura 6.- Genotipado de plantas de la línea SAIL_827_D06. Visualización en un gel del 1,5% en agarosa, teñido con bromuro de etidio, de los productos de las ampliaciones por PCR en las que se usaron las parejas de cebadores (A) SAIL_828_D05_LP + SAIL_828_D05_RP para el alelo silvestre de *ALDH3H1*, y (B) LB1 + SAIL_828_D05_RP para el mutante. Cada calle corresponde a una sola planta. Se usó como control positivo (A) ADN de Col-0, y como controles negativos, (A, B) agua y (B) ADN de Col-0. M: marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). CN: control negativo.

Tal como indica la Tabla 4, en la página 25, ninguna planta SAIL_828_D05 resultó ser portadora de la inserción de ADN-T del alelo *aldh3h1-C*. Esta incidencia es poco frecuente, pero no imposible, en los lotes de semillas que remite el NASC, y suele subsanarse solicitando

su reenvío. Por el contrario, se identificaron 2 plantas SAIL_827_D06 homocigóticas para la inserción anotada, a la que hemos denominado *aldh3h1-D*, y 5 heterocigóticas *ALDH3H1/aldh3h1-D*. Para determinar con precisión la posición de la inserción de *aldh3h1-D*, se extrajo ADN de 2 plantas *aldh3h1-D/aldh3h1-D* (apartado IV.8.2, en la página 20), que se envió a STAB VIDA para su secuenciación por el método de Sanger (apartado IV.8.4, en la página 21; Figura 7). Se confirmó así la presencia de una inserción de ADN-T en el quinto intrón del alelo *aldh3h1-D*, a solo 5 pb del dinucleótido AG invariante del sitio aceptor del

Tabla 4.- Genotipado de plantas presuntamente portadoras de alelos mutantes *aldh3h1*

Línea	Genotipo		
	<i>ALDH3H1/ALDH3H1</i>	<i>ALDH3H1/aldh3h1</i>	<i>aldh3h1/aldh3h1</i>
SAIL_828_D05 (<i>aldh3h1-C</i>)	11	0	0
SAIL_827_D06 (<i>aldh3h1-D</i>)	4	5	2

Se indica el número de plantas de cada genotipo.

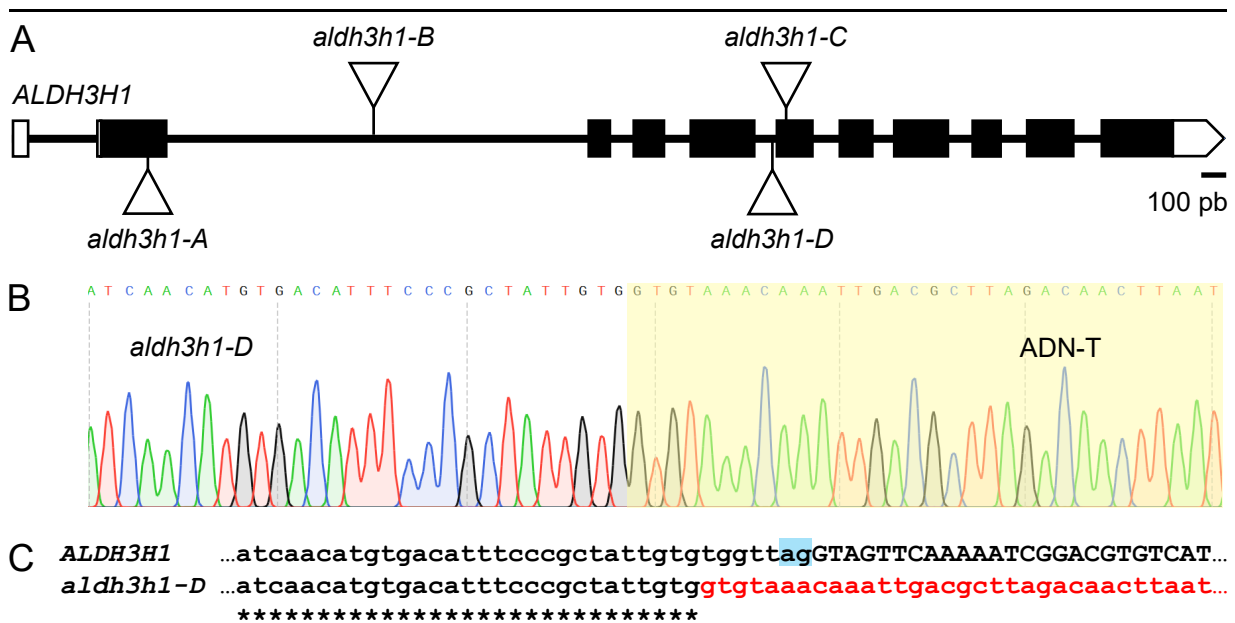


Figura 7.- Determinación de la posición de la inserción de ADN-T del alelo *aldh3h1-D* del gen *ALDH3H1*. (A) Estructura del gen *ALDH3H1*, con indicación de la naturaleza molecular y la posición de sus mutaciones mencionadas o estudiadas en este trabajo. Los exones e intrones están representados por rectángulos y líneas, respectivamente. Se destacan en blanco las regiones 5' y 3' no traducidas. Los triángulos indican inserciones de ADN-T. (B) Electroferograma obtenido mediante la secuenciación por el método de Sanger de un segmento de *aldh3h1-D* que contiene la inserción del ADN-T (destacado en amarillo). (C) Alineamiento de las secuencias de los alelos silvestre (*ALDH3H1*) y mutante (*aldh3h1-D*) del gen *ALDH3H1*. Se representan con letras minúsculas y mayúsculas las secuencias de su quinto intrón y sexto exón, respectivamente, y se destaca en rojo la de uno de los extremos del ADN-T inserto en *aldh3h1-D*. Se sombrea en azul los dos nucleótidos invariantes del sitio aceptor del *splicing*. Los asteriscos destacan la parte de la secuencia del intrón que no difiere entre los alelos silvestre y mutante.

splicing. Esta inserción probablemente impide la eliminación del intrón durante el *splicing* y conlleva la traducción de una proteína truncada con una región aminoterminal aberrante.

V.2.1.3.- Obtención de dobles mutantes *icu11-1 aldh3h1-D*, *icu11-5 aldh3h1-D* y *cp2-3 aldh3h1-D*

Para establecer la eventual existencia de alguna relación funcional entre *ALD3H1*, *ICU11* y *CP2*, hemos iniciado la obtención de los correspondientes dobles mutantes (apartado II.5, en la página 7). Hemos empleado para ello los alelos nulos *icu11-1* (cuyo fondo genético es S96), *icu11-5* (Col-0; Nadi *et al.*, 2023) y *cp2-3* (Col-0). Con el cruzamiento *icu11-5* × SAIL_827_D06 pretendíamos evitar los inconvenientes usualmente derivados de la mezcla de fondos genéticos, ya que el de ambas líneas es Col-0 (Tabla 2, en la página 14). Hemos usado dos mutantes *icu11* dado que el fenotipo de *icu11-5* es más leve que el de *icu11-1*, lo que podría dificultar la manifestación de fenotipos solo ligeramente sinérgicos. Los cruzamientos se realizaron según se indica en el apartado IV.6.4, en la página 16, usando en todos los casos los mutantes *icu11* y *cp2* como parentales femeninos.

Recolectamos las semillas F₁ de los cruzamientos *icu11-1* × *aldh3h1-D*, *icu11-5* × *aldh3h1-D* y *cp2-3* × *aldh3h1-D*, que tras su siembra rindieron plantas diheterocigóticas para los alelos mutantes parentales, tal como confirmamos tras su genotipado (apartado V.2.1.2, en la página 23); la presencia del alelo *aldh3h1-D* en estas plantas nos permitió descartar la eventual autofecundación del parental femenino. Todas las plantas F₁ fueron fenotípicamente silvestres y *ALDH3H1/aldh3h1-D*. Se trasplantaron 7 plantas genotipadas a macetas, en las que completaron su ciclo de vida. Las semillas F₂ resultantes de la autofecundación de estas plantas F₁ fueron recolectadas, constatándose una disminución significativa del número de semillas: se encontraron 16-18 óvulos abortivos por silicua, mientras que las plantas Col-0 presentan 2-6 (Nadi *et al.*, 2023), lo que sugiere que los dobles mutantes son letales. Para contrastar esta hipótesis se deberán sembrar las semillas F₂ obtenidas y genotipar las plantas que produzcan.

V.2.2.- PHOSPHORYLETHANOLAMINE CYTIDYLYLTRANSFERASE 1 (PECT1)

V.2.2.1.- Información disponible sobre *PECT1*

La proteína FT promueve la floración interaccionando con la fosfatidilcolina, que deriva de la fosfoetanolamina, una precursora de la fosfotidiletanolamina. El gen At2g38670 codifica la PHOSPHORYLETHANOLAMINE CYTIDYLYLTRANSFERASE 1 (*PECT1*), enzima que modula la ratio fosfatidilcolina/fosfoetanolamina. La insuficiencia de función de *PECT1*

incrementa los niveles de fosfatidilcolina, lo que a su vez causa floración temprana (Nakamura *et al.*, 2014).

La proteína SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) reprime al gen *FT* durante la fase vegetativa del ciclo de vida de *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2008). *PECT1* reprime a nivel transcripcional a *SVP* en el meristemo apical del tallo (SAM; Stem Apical Meristem), por lo que la sobreexpresión de *PECT1* también causa floración temprana (Susila *et al.*, 2021). Dos alelos puntuales de *PECT1* manifiestan una reducción significativa de la actividad *PECT1*: el nulo *pect1-6* es letal embrionario, y *pect1-4* conserva un 25,9% de la actividad silvestre y muestra fertilidad reducida. Las plantas *PECT1/pect1-6* conservan un 50% de la actividad silvestre y son fenotípicamente silvestres (Mizoi *et al.*, 2006). Estos últimos autores obtuvieron otros alelos de *PECT1*, que denominaron *pect1-1* a *pect1-11*.

V.2.2.2.- Verificación de líneas portadoras de alelos insercionales de *PECT1*

Se genotiparon 11 plantas de la línea SALK_085102, que solo tiene una inserción anotada. Se procedió según se indica en el apartado V.2.1.2, en la página 23, usando en este caso los cebadores SALK_85102_LP/RP y LBb1.3 (Tabla 3, en la página 19). Solo se identificó una planta portadora del alelo mutante, al que hemos denominado *pect1-12* (*PECT1/pect1-12*), cuyo ADN se secuenció según se indica en el apartado V.2.1.2, en la página 23, para determinar la posición concreta de la inserción (Figura 8).

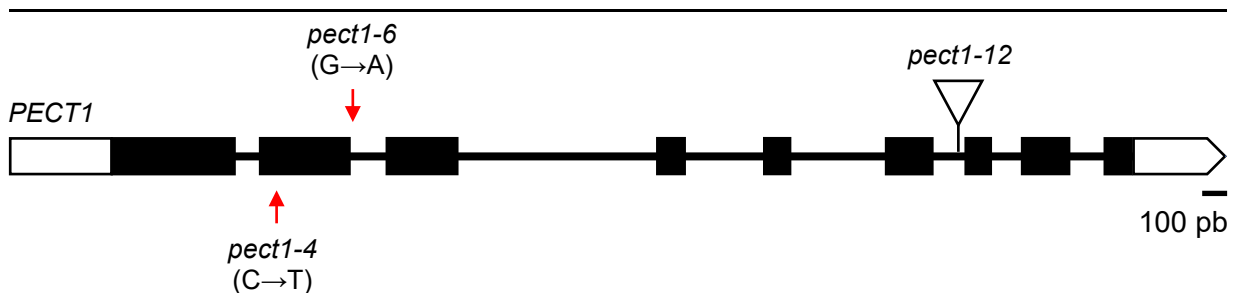


Figura 8.- Estructura del gen *PECT1*, con indicación de la naturaleza molecular y la posición de sus mutaciones mencionadas o estudiadas en este trabajo. Se siguen las pautas definidas en la Figura 7, en la página 25. Las flechas rojas indican mutaciones puntuales.

Se sembraron 20 semillas resultantes de la autofecundación de la planta *PECT1/pect1-12*. De las 8 plantas genotipadas, 2 resultaron ser *PECT1/PECT1*, y 6, *PECT1/pect1-12*. La ausencia de plantas *pect1-12/pect1-12* sugiere que *pect1-12* es letal y nulo. La demostración de esta hipótesis requerirá el análisis de un número de plantas sustancialmente mayor.

V.2.2.3.- Obtención de sesquimutantes *icu11-1/icu11-1;PECT1/pect1-12*, *icu11-5/icu11-5;PECT1/pect1-12* y *cp2-3/cp2-3;PECT1/pect1-12*

Hemos realizado, tal como se indica en el apartado IV.6.4, en la página 16, los cruzamientos *icu11-1/icu11-1* × *PECT1/pect1-12*, *icu11-5/icu11-5* × *PECT1/pect1-12* y *cp2-3/cp2-3* × *PECT1/pect1-12*. Se usó en todos los casos una planta *icu11* o *cp2* como parental femenino. Las semillas F₁ se recolectaron y conservaron para su futura siembra.

V.2.3.- GENERAL CONTROL NON-DEREPRESSIBLE 20 (GCN20)

V.2.3.1.- Información disponible sobre GCN20

La familia ATP Binding Cassette (ABC) está compuesta por 130 proteínas clasificadas en ocho subfamilias (ABCA a ABCH) en *Arabidopsis*. Todas ellas, a excepción de las ABCE y ABCF, tienen dominios de unión a nucleótidos (NBD) y transmembrana (TMD) (Hopfner, 2016). GENERAL CONTROL NON-REPRESSIBLE 20 (GCN20) es una ABCF nuclear implicada en la reparación de ADN dañado. El mutante *gcn20-1* (SALK_135770) tiene la raíz primaria corta y manifiesta hipersensibilidad a varios mutágenos (Han *et al.*, 2018).

La quinasa WEE1 y el factor de transcripción SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1 (SOG1) son necesarios para la respuesta al estrés replicativo (Chen *et al.*, 2023). De hecho, SOG1 activa la transcripción de genes de respuesta a los daños en el ADN (Han *et al.*, 2018). Para regular esta vía en ausencia de daños de ADN, GCN20 forma un complejo con GCN1 que impide la traducción del ARNm de SOG1. En respuesta al estrés replicativo, WEE1 inhibe a GCN20 para elevar los niveles de SOG1 (Chen *et al.*, 2023). Además, según la base de datos BioGrid (<https://thebiogrid.org>; Stark *et al.*, 2006), GCN20 interacciona con DEK-DOMAIN CONTAINING PROTEIN 3, una proteína que se une a las histonas H3 y H4 (Waidmann *et al.*, 2014; Ding *et al.*, 2022).

V.2.3.2.- Verificación de líneas portadoras de alelos insercionales de GCN20

Se seleccionaron líneas insercionales tal como se ha indicado anteriormente, en el apartado V.2.1.2, en la página 23. Se obtuvieron y sembraron semillas GK-188G03 y SALK_135770, con una y dos inserciones anotadas, respectivamente (apartado IV.5, en la página 13). Algunas plantas GK-188G03 mostraron hojas vegetativas y caulinares cloróticas y dentadas (Figura 9, en la página 29).

Las hojas apuntadas y/o dentadas son un rasgo fenotípico común de los alelos mutantes de genes de la maquinaria de la traducción (Moschopoulos *et al.*, 2012; Muñoz-Nortes *et al.*, 2017; Micol-Ponce *et al.*, 2020; Navarro-Quiles *et al.*, 2022). Según la base de datos ATTED-II, GCN20 se coexpresa con *EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION*

FACTOR 3E (EIF3E) y *EIF3A*. La región aminoterminal del EIF3E interacciona con la proteína ribosómica RPS9, que es un componente de la subunidad ribosómica 40S, y la carboxiterminal, con la subunidad 12 de la partícula reguladora 19S del proteasoma (Paz-Aviram *et al.*, 2008). El EIF3A es una subunidad del complejo requerido para la unión del ARNm a la subunidad 40S, la estabilización de la unión de esta última con el complejo ternario y la disociación de las subunidades 40S y 60S (Szamecz *et al.*, 2008; Valášek *et al.*, 2017).

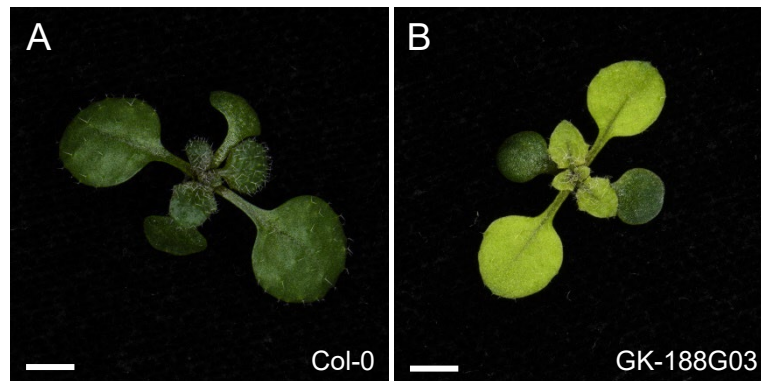


Figura 9.- Fenotipo morfológico de la línea GK-188G03. Se muestran rosetas (A) del tipo silvestre Col-0 y (B) de las plantas fenotípicamente mutantes de la línea GK-188G03, que son cloróticas y con hojas dentadas. Las fotografías se tomaron 14 dde. Las barras de escala indican 2 mm.

Se seleccionaron y genotiparon 7 plantas fenotípicamente mutantes y 2 fenotípicamente silvestres de la línea GK-188G03, y las tres únicas de la SALK_135770 que germinaron, tal como se indica en el apartado V.2.2.2, en la página 23. Para genotipar las plantas SALK_135770 mediante PCR se usaron los cebadores SALK_135770.AT1_LP/RP y LBb1.3 (Tabla 3, en la página 19). Dado que esta línea también es portadora de una inserción en el gen At5g05850, se realizaron dos amplificaciones adicionales para identificar plantas homocigóticas para el alelo silvestre de este último, usando los cebadores SALK_135770.AT5_LP/RP y LBb1.3. Para las plantas GK-188G03 se usaron los cebadores GK-188G03_LP /RP y o8474 (Tabla 3, en la página 19). Los resultados del genotipado se indican en la Tabla 5, en la página 30.

Ninguna planta SALK_135770 resultó ser portadora de los alelos insercionales de At1g64550 (*gcn20-1*) o At5g05850. Sin embargo, 7 plantas GK-188G03 fenotípicamente mutantes resultaron homocigóticas para el alelo de At1g64550 al que hemos llamado *gcn20-2*. Dado que hemos estudiado pocas plantas, nuestros resultados sugieren, pero no demuestran, que el fenotipo mutante observado cosegrega con *gcn20-2*. Sin embargo, no se ha descrito que el mutante *gcn20-1* muestre fenotipo foliar alguno, ello a pesar de su significativa reducción de la expresión de *GCN20* (Han *et al.*, 2018). Esta discrepancia puede deberse a

que *gcn20-2* sea nulo, tal como sugiere la posición de su inserción de ADN-T (Figura 10). Para confirmar que la mutación de *gcn20-2* es la causante del fenotipo observado, sería necesario construir un transgén que contuviese el alelo silvestre de *GCN20* bajo el control de su promotor endógeno, transferirlo a plantas *gcn20-2* y comprobar si en las plantas transgénicas así obtenidas se restablece el fenotipo silvestre. Para determinar con precisión la posición de la inserción de *gcn20-2*, se obtuvo ADN de este mutante y se secuenció, tal como se indica en el apartado V.2.2.2, en la página 23.

Tabla 5.- Análisis de la cosegregación del fenotipo clorótico de las plantas GK-188G03 y los alelos insercionales de *GCN20* estudiados en este trabajo

Línea	Gen	Fenotipo mutante			Fenotipo silvestre		
		AA	Aa	aa	AA	Aa	aa
SALK_135770 (<i>gcn20-1</i>)	At1g64550	0	0	0	3	0	0
	At5g05850	0	0	0	3	0	0
GK-188G03 (<i>gcn20-2</i>)	At1g64550	0	0	7	1	1	0

Se indica el número de plantas con cada fenotipo y genotipo. Se denomina en esta tabla alelos mutantes *a* y silvestres *A* a los portadores o no de la inserción de ADN-T, respectivamente.

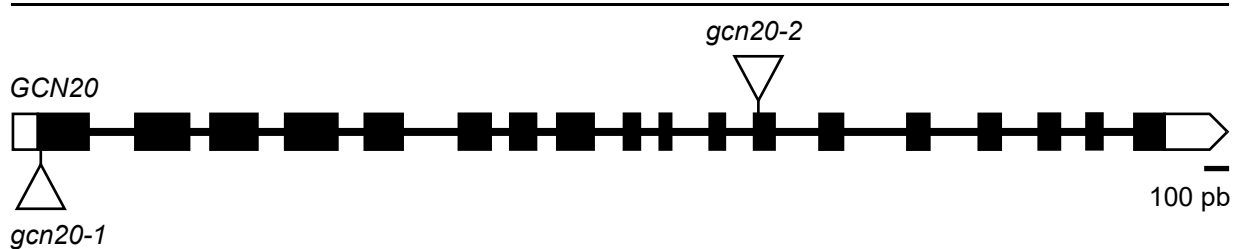


Figura 10.- Estructura del gen *GCN20*, con indicación de la naturaleza molecular y la posición de sus mutaciones mencionadas o estudiadas en este trabajo. Se siguen las pautas definidas en la Figura 7, en la página 25.

V.2.3.3.- Obtención de dobles mutantes *icu11-1 gcn20-2*, *icu11-5 gcn20-2* y *cp2-3 gcn20-2*

Hemos realizado los cruzamientos *icu11-1* × *gcn20-2*, *icu11-5* × *gcn20-2* y *cp2-3* × *gcn20-2*, tal como se indica en el apartado IV.6.4, en la página 16. Se usó en todos los casos el mutante *gcn20-2* como parental masculino. Las semillas F_1 fueron recolectadas y conservadas para su futura siembra.

V.2.4.- NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 50 (NAC050) y NAC052

V.2.4.1.- Información disponible sobre *NAC050* y *NAC052*

Los genes At3g10480 y At3g10490 codifican los factores de transcripción NAC050 y

NAC052, respectivamente (apartado II.2, en la página 4). El doble mutante *nac050 nac052*, generado mediante la tecnología CRISPR/Cas9, presenta mutaciones puntuales en ambos genes, que desfasan sus pautas de lectura e introducen un codón de terminación prematuro (Ning *et al.*, 2015). Manifiesta una floración temprana similar a la de *jmj14*.

JMJ14 forma un complejo con NAC050 y NAC052 para reprimir transcripcionalmente sus genes diana (Ning *et al.*, 2015). TRB1, TRB2 y TRB3 reclutan a MJM14 para la desmetilación de la marca epigenética H3K4me3 (Wang *et al.*, 2023). NAC052 y NAC050 se detectaron en la cuarta y sexta posición de la lista de interactores de ICU11 identificados mediante TAP, respectivamente (apartado III, en la página 10).

V.2.4.2.- Verificación de plantas dobles mutantes *nac050 nac052*

Obtuvimos las semillas *nac050 nac052* del NASC. La mayoría de las plantas que produjeron estas semillas mostraron cotiledones epinásticos (recurvados hacia el envés) y desarrollaron un tallo de menor grosor que el de Col-0 y ligeramente clorótico (Figura 11), rasgos fenotípicos que no se mencionan en Ning *et al.* (2015). Los mutantes *icu11* también presentan cotiledones epinásticos (Relichová, 1976; Serrano-Cartagena *et al.*, 2000).

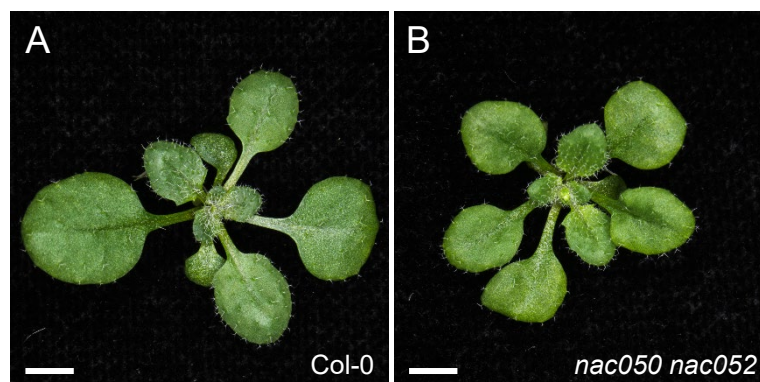


Figura 11.- Fenotipo morfológico de los dobles mutantes *nac050 nac052*. Se muestran rosetas (A) del tipo silvestre Col-0 y (B) de las plantas *nac050 nac052*. Las fotografías se tomaron 17 dde. Las barras de escala indican 2 mm.

V.2.4.3.- Obtención de triples mutantes *icu11-1 nac050 nac052*, *icu11-5 nac050 nac052* y *cp2-3 nac050 nac052*

Para establecer la eventual existencia de interacciones genéticas de *NAC050* y *NAC052* con *ICU11* o *CP2*, hemos iniciado la obtención de los correspondientes triples mutantes (apartado II.5, en la página 7), llevando a cabo los siguientes cruzamientos, tal como se indica en el apartado IV.6.4, en la página 16: *icu11-1* × *nac050 nac052*, *icu11-5* × *nac050 nac052* y *cp2-3* × *nac050 nac052*. Se usó en todos los cruzamientos el doble mutante *nac050*

nac052 como parental masculino. Las semillas F₁ fueron recolectadas y conservadas para su futura siembra.

V.3.- Análisis genético preliminar de los interactores exclusivos de CP2

V.3.1.- At1g09520

V.3.1.1.- Información disponible sobre At1g09520

At1g09520 codifica una proteína nuclear hipotética que se coexpresa, según ATTED-II, con RING-H2 finger C1A (RHC1A), que presuntamente se une a ácidos nucleicos, y con RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1 (RDM1), una metiltransferasa de ADN dependiente de ARN. Según UniProt (<https://www.uniprot.org>; The UniProt Consortium, 2008) At1g09520 codifica una proteína con un homeodominio de las plantas (PHD, por Plant HomeoDomain). Los PHD se unen a las modificaciones químicas de las histonas y contribuyen a la activación y represión de los genes (Mouriz *et al.*, 2015). Esta proteína fue la más representada entre los interactores de CP2 identificados mediante TAP (apartado III, en la página 10).

V.3.1.2.- Verificación de líneas portadoras de alelos insercionales de At1g059520

Tal como se indicó en el apartado V.2.1.2, en la página 23, se seleccionaron las líneas SALK_143286, SALK_143292 y SALK_059601C, todas ellas con solo una inserción anotada (apartado IV.5, en la página 13). Todas las plantas SALK_059601C mostraron peciolo alargados de ángulo cerrado respecto al tallo y rosetas poco compactas (Figura 12).

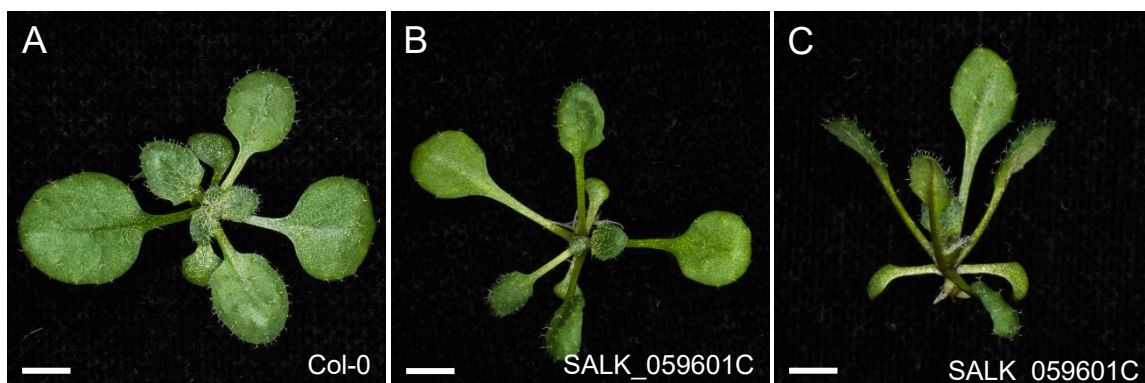


Figura 12.- Fenotipo morfológico de las plantas SALK_059601C. Se muestran rosetas (A) de Col-0 (la misma que en la Figura 11A, en la página 32) y (B, C) de las plantas SALK_059601C fenotípicamente mutantes. Las fotografías se tomaron 17 dde. Las barras de escala indican 2 mm.

Se genotiparon 20 plantas SALK_143286, las producidas por las dos únicas semillas SALK_143292 que germinaron, y 13 SALK_059601C fenotípicamente mutantes (apartado V.2.1.2, en la página 23), usando los cebadores SALK_143292_RP/LP y LBb1.3 (Tabla 3, en

la página 19). La Tabla 6 recoge los resultados del genotipado de estas plantas.

Tabla 6.- Análisis de la segregación del fenotipo mutante en líneas presuntamente portadoras de alelos insercionales de At1g09520

Línea	Fenotipo mutante			Fenotipo silvestre		
	AA	Aa	aa	AA	Aa	aa
SALK_143286	0	0	0	20	0	0
SALK_143292	0	0	0	2	0	0
SALK_059601C	0	0	13	0	0	0

Se indica el número de plantas con cada fenotipo y genotipo. Se siguen las pautas definidas para la Tabla 5, en la página 30.

Ninguna planta SALK_143286 o SALK_143292 resultó ser portadora de alelos insercionales de At1g09520. Por su parte, las 13 plantas SALK_05601C fueron fenotípicamente mutantes y homocigóticas para la inserción anotada, al que hemos denominado provisionalmente *at1g09520-1*, asumiendo que causa fenotipo observado. Se secuenció este alelo mutante según se describe en el apartado V.2.1.2, en la página 23, para determinar la posición concreta de su inserción de ADN-T (Figura 13).

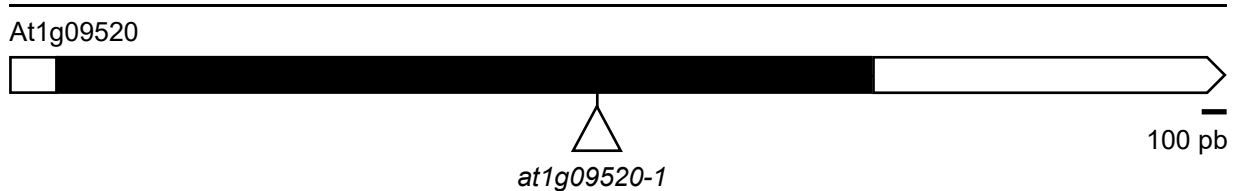


Figura 13.- Estructura del gen At1g09520, con indicación de la naturaleza molecular y la posición de su mutación estudiada en este trabajo. Se siguen las pautas definidas en la Figura 7, en la página 25.

V.3.1.3.- Obtención de dobles mutantes *icu11-1 at1g09520-1*, *icu11-5 at1g09520-1* y *cp2-3 at1g09520-1*

Hemos realizado los siguientes cruzamientos, tal como se indica en el apartado IV.6.4, en la página 16: *icu11-1* × *at1g09520-1*, *icu11-5* × *at1g09520-1* y *cp2-3* × *at1g09520-1*. Se usó en todos ellos el mutante *at1g09520-1* como parental masculino. Las semillas F₁ fueron recolectadas y conservadas para su futura siembra.

V.3.2.- DEVELOPMENT RELATED MYB-LIKE1 (DRMY1)

V.3.2.1.- Información disponible sobre *DRMY1*

Las proteínas de la familia MYB son factores de transcripción que contribuyen al desarrollo, el metabolismo secundario, la transducción de señales hormonales, la resistencia

V.3.3.- At1g05860

V.3.3.1.- Información disponible sobre At1g05860

At1g05860 codifica una proteína nuclear de función desconocida. Según las bases de datos TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) y Phylogenesis (<https://phylogenesis.arabidopsis.org/>), esta proteína podría ser ortóloga de la subunidad D del complejo INO80 de los metazoos, que está implicado en la remodelación de la cromatina (Conaway y Conaway, 2008) y regula el nivel y la localización de la marca epigenética H3K27me3 (Zander *et al.*, 2019).

Según las bases de datos Uniprot e Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>; Apweiler *et al.*, 2001), At1g05860 es parálogo del gen KAT8 regulatory nonspecific lethal (NSL) complex 2 (KANSL2) humano. El complejo NSL promueve el reclutamiento de la ARN polimerasa II a los genes que transcribe (Lam *et al.*, 2019).

V.3.3.2.- Homología entre las proteínas INO80 y KANSL2 humanas y la codificada por At1g05860 de Arabidopsis

Dada la gran diferencia entre los tamaños de INO80 y KANSL2 de *Homo sapiens* y la proteína de Arabidopsis codificada por At1g05860 (1556, 492 y 280 aminoácidos, respectivamente), hemos realizado un alineamiento múltiple para establecer cuál de las dos primeras es la ortóloga más verosímil de la última. Se tomaron del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) las secuencias de la INO80 complex subunit D-like protein de Arabidopsis (AEE27905.1) y las de la subunidad D del complejo INO80 (NP_060023.1) y KANSL2 de *Homo sapiens* (NP_060292.3), que se alinearon con Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>; Edgar, 2004) con sus parámetros por defecto. Se obtuvieron los correspondientes valores porcentuales de identidad y semejanza con la herramienta Ident and Sim de la Sequence Manipulation Suite (http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html; Stothard, 2000). La proteína codificada por At1g05860 de Arabidopsis mostró valores de semejanza e identidad con la subunidad D del complejo INO80 humana de 6,48% y 3,66%, y con KANSL2 de un 18,15% de y un 11,58%. A pesar de que apenas comparte homología con estas proteínas consideradas globalmente, tiene un dominio de presunta unión al ADN según la base de datos InterPro. Según Biogrid (<https://thebiogrid.org/>), interacciona con los factores de transcripción BREVIPEDICELLUS (BP), que está implicado en el mantenimiento del meristemo apical del tallo, el desarrollo de las fibras del xilema y la abscisión del fruto (Xie *et al.*, 2022), y MYB DOMAIN PROTEIN 70 (MYB70), que participa en la regulación del crecimiento y el desarrollo vegetal (Wan *et al.*, 2021).

V.3.3.3.- Verificación de líneas portadoras de alelos insercionales de At1g05860

Procediendo tal como se indica en el apartado V.2.1.2, en la página 23, se eligió la línea SALK_048708, que contiene 2 inserciones anotadas, en At1g05860 y At2g17043 (apartado IV.5, en la página 13). Se sembraron sus semillas y se genotiparon 10 plantas usando los cebadores SALK_048708.AT1_RP/LP y LBb1.3 (Tabla 3, en la página 19) para At1g05860 y SALK_048708.AT2_RP/LP y LBb1.3 para At2g17043 (Tabla 7).

Tabla 7.- Genotipado de plantas presuntamente portadoras de alelos insercionales de At1g05860

Línea	Gen	AA	Aa	aa
SALK_048708	At1g05860	5	2	3
	At2g17043	3	1	6

Se indica el número de plantas con cada genotipo. Se siguen las pautas definidas para la Tabla 4, en la página 25.

Se identificaron 2 plantas heterocigóticas para el alelo mutante de At1g05860, al que hemos denominado provisionalmente *at1g05860-1*, y 3 homocigóticas, que también lo fueron para el alelo insercional de At2g17043, ello a pesar de que estos dos genes no están ligados.

V.3.3.4.- Obtención de dobles mutantes *icu11-1 at1g05860-1*, *icu11-5 at1g05860-1* y *cp2-3 at1g05860-1*

Hemos realizado los siguientes cruzamientos, tal como se indica en el apartado IV.6.4, en la página 16: *icu11-1/icu11-1* × *At1g05860/at1g05860-1*, *icu11-5/icu11-5* × *At1g05860/at1g05860-1* y *cp2-3/cp2-3* × *At1g05860/at1g05860-1*. Se usaron en todos los cruzamientos plantas heterocigóticas *At1g05860/at1g05860-1* como parentales masculinos. Las semillas F₁ fueron recolectadas y conservadas para su futura siembra.

V.3.4.- At4g37440

V.3.4.1.- Información disponible sobre At4g37440

At4g37440 codifica una proteína nuclear hipotética que se coexpresa, según ATTED-II, con algunas subunidades del factor de transcripción básico IIIIC, con la proteína de unión a ADN codificada por el gen At1g17520, que pertenece a la familia génica Single Myb Histone (SMH), cuyo ortólogo en el maíz codifica una proteína que se une a las repeticiones de ADN de los telómeros (Marian *et al.*, 2003) y con la proteína con dedos de cinc codificada por el gen At1g01930, entre otras.

V.3.4.2.-Verificación de líneas portadoras de alelos insercionales de At4g37440

Tal como se indica en el apartado V.2.1.2, en la página 23, se eligieron las líneas SAILseq_623_H05.1 y SALKseq_046190, con 1 y 2 inserciones anotadas, respectivamente (apartado IV.5, en la página 13). Algunas plantas SAILseq_623_H05.1 mostraron hojas vegetativas extremadamente recurvadas hacia el haz (Figura 15).

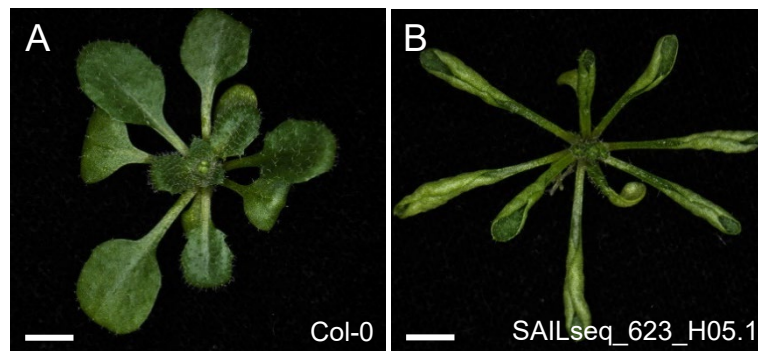


Figura 15.- Fenotipo morfológico de la línea insercional SAILseq_623_H05.1. Se muestran rosetas (A) del tipo silvestre Col-0 y (B) de las plantas SAILseq_623_H05.1 fenotípicamente mutantes. Las fotografías se tomaron 21 dde. Las barras de escala indican 2 mm.

Según se indica en el apartado V.2.1.2, en la página 23, se genotiparon 10 plantas SALKseq_046190 con los cebadores SALK_046190_RP/LP y LBb1.3 (Tabla 3, en la página 19), y 11 SAILseq_623_H05.1 con los SAILseq_623_H05.1_RP/LP y LB1, con los resultados de la Tabla 8. Ninguna planta SALKseq_046190 resultó ser portadora de una inserción de ADN-T en At4g37440, razón por la que no fueron genotipadas para su segundo gen presuntamente mutado.

Tabla 8.- Análisis de la segregación del fenotipo mutante en líneas presuntamente portadoras de alelos insercionales de At4g37440

Línea	Fenotipo mutante			Fenotipo silvestre		
	AA	Aa	aa	AA	Aa	aa
SALKseq_046190	-	-	-	10	0	0
SAILseq_623_H05.1	2	1	4	1	1	2

Se indica el número de plantas con cada fenotipo y genotipo. Se siguen las pautas definidas para la Tabla 5, en la página 30.

Se identificaron plantas SAILseq_623_H05.1 fenotípicamente mutantes pero homocigóticas para el alelo silvestre de At4g37440, y otras fenotípicamente silvestres pero homocigóticas para el alelo insercional, al que hemos denominado provisionalmente *at4g37440-1*. Concluimos que este último no causa fenotipo morfológico alguno y que el que

manifiestan algunas plantas SAILseq_623_H05.1 se debe a un gen no identificado. Para determinar con precisión la posición de la inserción del alelo *at4g37440-1* (Figura 16) se procedió según se indica en el apartado V.2.1.2, en la página 23.

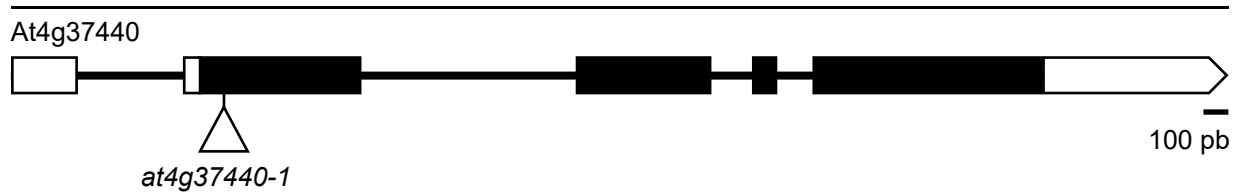


Figura 16.- Estructura del gen At4g37440, con indicación de la naturaleza molecular y la posición de su mutación estudiada en este trabajo. Se siguen las pautas definidas en la Figura 7, en la página 25.

V.3.4.3.- Obtención de dobles mutantes *cu11-1 at4g37440-1*, *icu11-5 at4g37440-1* y *cp2-3 at4g37440-1*

Hemos realizado los siguientes cruzamientos, según se indica en el apartado IV.6.4, en la página 16: *icu11-1* × *at4g37440-1*, *icu11-5* × *at4g37440-1* y *cp2-3* × *at4g37440-1*. En todos ellos se usaron plantas homocigóticas *at4g37440-1* fenotípicamente silvestres como parentales masculinos. Las semillas F₁ fueron recolectadas y conservadas para su futura siembra.

V.3.5.- DEFECTIVE EMBRYO AND MERISTEMS 2 (DEM2)

V.3.5.1.- Información disponible sobre DEM2

DEFECTIVE EMBRYO AND MERISTEMS 1 (DEM1) y *DEM2* codifican dos proteínas nucleares requeridas para la división celular de *Arabidopsis*. *DEM2* interacciona con *DEM1*, y probablemente con RAS-RELATED NUCLEAR PROTEIN 1 (*RAN1*; Lee *et al.*, 2021). *RAN1* pertenece a la superfamilia de pequeñas GTPasas relacionadas con Ras (*RAN*, por Ras-related nuclear), altamente conservadas entre los eucariotas y que controlan procesos como el transporte nucleocitoplásmico, el ensamblaje del huso mitótico, la formación de la envoltura nuclear y la regulación del ciclo celular (Qin *et al.*, 2022). Se han descrito los mutantes insercionales *dem1-1* y *dem2-1* en fondo Wassilewskija (*Ws-0*), y *dem1-2* y *dem2-2*, en *Col-0*. No se encontraron plantas sesquimutantes *dem1/dem1;DEM2/dem2* en fondo *Ws-0*, aunque en fondo *Col-0* sí fueron viables. El sesquimutante *DEM1/dem1-2;dem2-2/dem2-2* tiene un desarrollo vegetativo normal pero el reproductivo masculino se interrumpe. El sesquimutante *dem1-2/dem1-2;DEM2/dem2-2* posee una fertilidad normal, por lo que se concluyó que *DEM1* y *DEM2* presentan redundancia funcional desigual y que *DEM2* juega un papel más importante para la fertilidad que *DEM1* (Lee *et al.*, 2021).

V.3.5.2.- Verificación de líneas portadoras de alelos insercionales de *DEM2*

Se eligió la línea SAIL_659_B12, que contenía solo una inserción anotada (apartado IV.5, en la página 13), cuyas semillas se sembraron y se genotiparon 10 de las plantas que produjeron (apartado V.2.1.2, en la página 23), usando los cebadores SAIL_659B12C_LP/RP y LBb1.3 (Tabla 3, en la página 19). Se identificaron 6 plantas SAIL_659_B12 homocigóticas para el alelo insercional al que hemos denominado *dem2-3*, y 4 heterocigóticas *DEM2/dem2-3*. Para determinar la posición de la inserción del alelo *dem2-3*, se extrajo ADN de este mutante y se secuenció tal como se indica en el apartado V.2.2.2, en la página 23 (Figura 17).

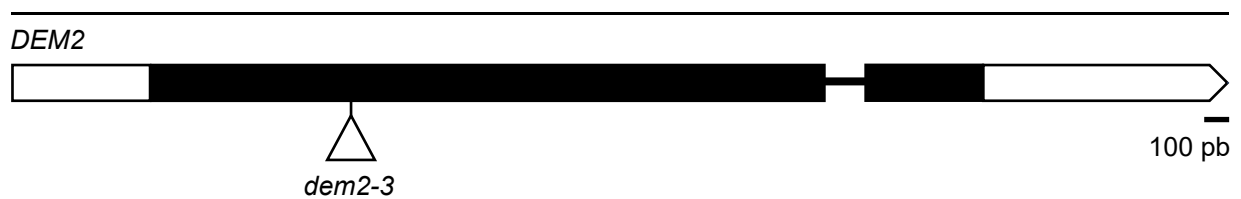


Figura 17.- Estructura del gen *DEM2*, con indicación de la naturaleza molecular y la posición de su mutación estudiada en este trabajo. Se siguen las pautas definidas en la Figura 7, en la página 25.

V.3.5.3.- Obtención de dobles mutantes *icu11-1 dem2-3*, *icu11-5 dem2-3* y *cp2-3 dem2-3*

Hemos realizado los siguientes cruzamientos, tal como se indica en el apartado IV.6.4, en la página 16: *icu11-1* × *dem2-3*, *icu11-5* × *dem2-3* y *cp2-3* × *dem2-3*. Se usó en todos los casos el mutante *dem2-3* como parental masculino. Las semillas F_1 fueron recolectadas y conservadas para su futura siembra.

VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

En este TFM hemos contribuido a la caracterización de la función de ICU11 y CP2, dos componentes de la maquinaria epigenética de *Arabidopsis*. Existen indicios de que ICU11 y CP2 son proteínas accesorias del PRC2 que participan en la desmetilación de histonas. Antes del comienzo de este TFM, se realizó en el laboratorio de José Luis Micol una búsqueda de interactores de ICU11 y CP2 mediante TAP-MS, en la que se identificaron componentes principales y proteínas accesorias del PRC2, así como otras proteínas que no se estudiaron. Hemos revisitado el listado de dichos interactores físicos, eligiendo los 27 que presentaban alguna de las siguientes características: que fueran proteínas nucleares, tuvieran dominios de unión a ADN o ARN, regularan de alguna forma la floración, se coexpresaran o interaccionaran con proteínas con dominios de unión a ADN o histonas, o cuya insuficiencia de función produjera alteraciones aparentemente epigenéticas. Hemos iniciado en este TFM el análisis genético de 10 de estas proteínas, con el fin de establecer la eventual existencia de interacciones genéticas entre los genes que las codifican e *ICU11* o *CP2*. La demostración de tales interacciones genéticas confirmaría las interacciones físicas previamente detectadas mediante TAP-MS.

Hemos seleccionado preferentemente líneas de ADN-T de dominio público que contuvieran una sola inserción. Así se logró para los genes *ALDH3H1*, *PECT1*, *GCN20*, *At1g09520*, *DRMY1*, *At1g05860*, *At4g37440* y *DEM2*. En casi todos los casos hemos confirmado mediante secuenciación por el método de Sanger la presencia del ADN-T y su posición exacta; constituye una excepción la línea portadora del alelo mutante que hemos denominado provisionalmente *at1g05860-1*, que deberá ser secuenciada más adelante. Para estudiar los genes *NAC050* y *NAC052* hemos usado un doble mutante previamente obtenido mediante CRISPR/Cas9 (Ning *et al.*, 2015).

Cuatro de los mutantes que hemos analizado manifestaron un fenotipo morfológico en su roseta basal: *gcn20-2*, *nac050 nac052*, *at1g09520-1* y *at1g37440-1*. Hemos confirmado la cosegregación de este fenotipo y las mutaciones recesivas *gcn20-2*, *nac050 nac052* y *at1g09520-1*.

Las plantas *gcn20-2* son cloróticas y sus hojas de la roseta y caulinares son dentadas. Este fenotipo es característico de las mutaciones en genes que codifican componentes de la maquinaria de la traducción. Según la base de datos ATTED-II, *GCN20* se coexpresa con *EIF3E* y *EIF3A*, que codifican proteínas de dicha maquinaria. Sin embargo, el mutante *gcn20-1* previamente descrito carece de fenotipo mutante, a pesar de que sufre una reducción significativa de la expresión de *GCN20*. Consideramos razonable suponer que *gcn20-1* es un alelo hipomorfo y que *gcn20-2* es nulo. Para confirmar esta hipótesis, se generará más

adelante un transgén que contenga al alelo silvestre de *GCN20* bajo el control de su propio promotor, y se transferirá a plantas *gcn20-2* para establecer si restaura el fenotipo silvestre.

El doble mutante *nac050 nac052* presenta cotiledones recurvados hacia el envés y su tallo es clorótico y más fino que el silvestre. Estos rasgos fenotípicos no se mencionaron en Ning *et al.* (2015), artículo en el que se describió por primera vez el doble mutante *nac050 nac052*. Sería necesario repetir nuestro genotipado con un mayor número de plantas, a fin de confirmar la cosegregación de dicho fenotipo y las mutaciones *nac050* y *nac052*.

La insuficiencia de la función del gen *At1g09520* causa una roseta poco compacta y hojas con peciolos alargados, cuyo ángulo respecto al tallo es cerrado. Este gen codifica una proteína hipotética que contiene un dominio PHD, por lo que podría tener una función epigenética. Sería interesante realizar un estudio más detallado de este mutante y la causa molecular de su fenotipo.

Algunas plantas de la línea *SALK_05601C* resultaron ser fenotípicamente silvestres y portadoras de una inserción de ADN-T en *At1g37440*; sin embargo, otras fueron fenotípicamente mutantes y carentes de la inserción. El fenotipo mutante observado, no obstante, es similar al de *icu11-1*, aunque mucho más extremo. Dado que el gen causante de este fenotipo no es *At1g37440*, sería interesante identificarlo y establecer su eventual relación funcional con *ICU11* y *CP2*.

Para la obtención de los dobles y triples mutantes que constituían el objetivo general inicialmente definido para este TFM, hemos cruzado los mutantes que hemos estudiado por *icu11-1*, *icu11-5* y *cp2-3*. El cronograma de la Figura 18, en la página 42, detalla las tareas finalizadas en este TFM y las aún inconclusas, que se completarán más adelante en el laboratorio de J.L. Micol. Hemos recolectado las semillas de la F_1 de dichos cruzamientos para todos los genes estudiados. Para *ALDH3H1* hemos sembrado y genotipado plantas F_1 , obteniendo todos los diheterocigotos posibles, y hemos recolectado y sembrado sus semillas F_2 , que rendirán plantas que se genotiparán para identificar dobles mutantes. Estos últimos podrían manifestar fenotipos sinérgicos reveladores de la existencia de interacción genética, y en consecuencia, relación funcional, entre *ALDH3H1* e *ICU11* y/o *CP2*. Cuando se recolectaron estas semillas F_2 se encontró una disminución significativa del número de semillas por silicua, lo que sugiere la letalidad de los dobles mutantes. También se obtendrán los restantes dobles mutantes mencionados en la Figura 18, con el objetivo de confirmar o descartar la existencia de relación entre las funciones de *ICU11* y *CP2* y las de sus interactores físicos.

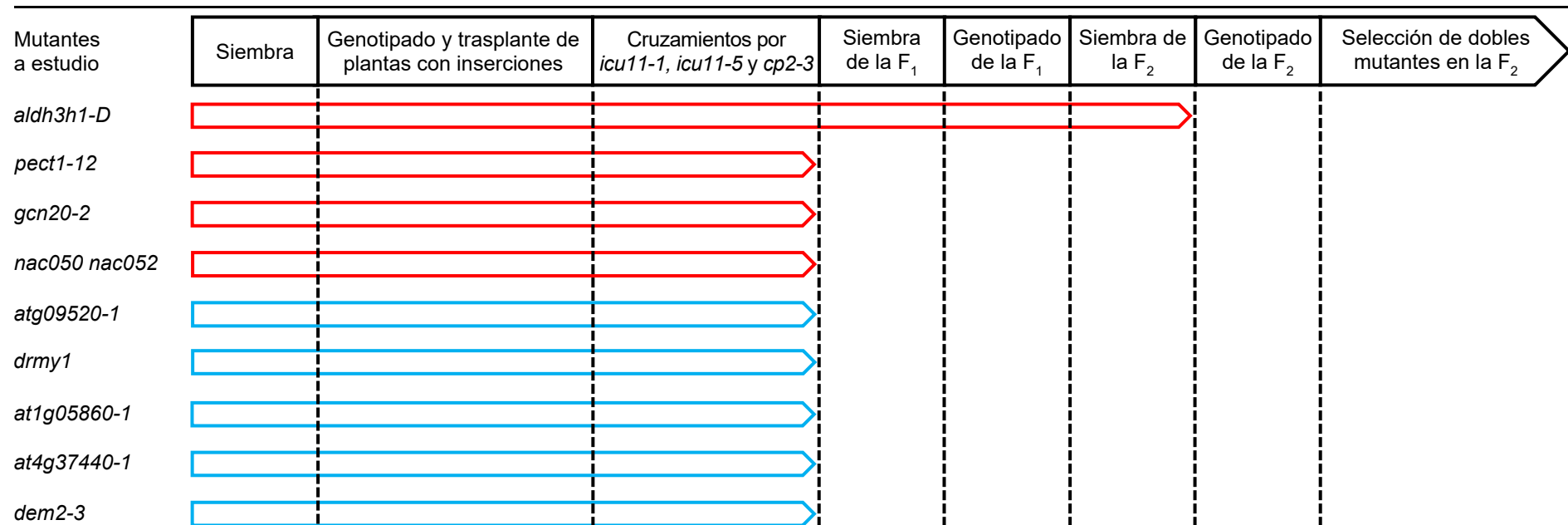


Figura 18.- Cronograma de las tareas iniciadas en este TFM y las que deberán concluirse más adelante. Se representan en rojo los interactores comunes a ICU11 y CP2, y en azul los que interactuaron únicamente con CP2. La primera fila indica las etapas de la obtención de los dobles mutantes.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera Díaz, V. (2009). Búsqueda de modificadores del fenotipo morfológico de un mutante *argonaute1* viable. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Ajjawi, I., Lu, Y., Savage, L.J., Bell, S.M., y Last, R.L. (2010). Large-scale reverse genetics in *Arabidopsis*: case studies from the Chloroplast 2010 Project. *Plant Physiology* **152**, 529-540.
- Alberts, B. (1998). The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* **92**, 291-294.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, 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.
- Alonso, J.M., y Ecker, J.R. (2006). Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in *Arabidopsis*. *Nature Reviews Genetics* **7**, 524-536.
- Amiard, S., Feit, L., Vanrobays, E., Simon, L., Le Goff, S., Loizeau, L., Wolff, L., Butter, F., Bourbousse, C., Barneche, F., Tatout, C., y Probst, A.V. (2024). The TELOMERE REPEAT BINDING proteins TRB4 and TRB5 function as transcriptional activators of PRC2-controlled genes to regulate plant development. *Plant Communications* **5**, 100890.
- Andrés, F., y Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics* **13**, 627-639.
- Apweiler, R., Attwood, T.K., Bairoch, A., Bateman, A., Birney, E., Biswas, M., Bucher, P., Cerutti, L., Corpet, F., Croning, M.D., Durbin, R., Falquet, L., Fleischmann, W., Gouzy, J., Hermjakob, H., Hulo, N., Jonassen, I., Kahn, D., Kanapin, A., Karavidopoulou, Y., Lopez, R., Marx, B., Mulder, N.J., Oinn, T.M., Pagni, M., Servant, F., Sigrist, C.J., y Zdobnov, E.M. (2001). The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Nucleic Acids Research* **29**, 37-40.
- Araki, T., Kobayashi, Y., Kaya, H., y Iwabuchi, M. (1998). The flowering-time gene *FT* and regulation of flowering in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Research* **111**, 277-281.
- Arents, G., y Moudrianakis, E.N. (1993). Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10489-10493.
- Aubert, D., Chen, L., Moon, Y.H., Martin, D., Castle, L.A., Yang, C.H., y Sung, Z.R. (2001). EMF1, a novel protein involved in the control of shoot architecture and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1865-1875.
- Berggård, T., Linse, S., y James, P. (2007). Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* **7**, 2833-2842.
- 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.
- Berná, G., Robles, P., y Micol, J.L. (1999). A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics Society of America* **152**, 729-742.
- Birnbaum, K.D., y Roudier, F. (2017). Epigenetic memory and cell fate reprogramming in plants. *Regeneration (Oxf)* **4**, 15-20.
- 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.

- 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.
- Bürckstümmer, T., Bennett, K.L., Preradovic, A., Schütze, G., Hantschel, O., Superti-Furga, G., y Bauch, A. (2006). An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nature Methods* **3**, 1013-1019.
- Calonje, M., Sánchez, R., Chen, L., y Sung, Z.R. (2008). EMBRYONIC FLOWER1 participates in Polycomb Group-mediated *AG* gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 277-291.
- Candela Antón, H. (2001). Análisis genético de la formación del patrón de venación de la hoja en *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Collins, M.O., y Choudhary, J.S. (2008). Mapping multiprotein complexes by affinity purification and mass spectrometry. *Current Opinion in Biotechnology* **19**, 324-330.
- Conaway, R.C., y Conaway, J.W. (2008). The INO80 chromatin remodeling complex in transcription, replication and repair. *Trends in Biochemical Sciences* **34**, 71-77.
- Cunningham, M.D., Brown, J.L., y Kassis, J.A. (2010). Characterization of the Polycomb group response elements of the *Drosophila melanogaster* *invected* locus. *Molecular and Cellular Biology* **30**, 820-828.
- Chanvivattana, Y., Bishopp, A., Schubert, D., Stock, C., Moon, Y.H., Sung, Z.R., y Goodrich, J. (2004). Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development* **131**, 5263-5276.
- Chen, H., Pan, T., Zheng, X., Huang, Y., Wu, C., Yang, T., Gao, S., Wang, L., y Yan, S. (2023). The ATR-WEE1 kinase module promotes SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1 translation to activate replication stress responses. *Plant Cell* **35**, 3021-3034.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B. (1983). A plant miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **4**, 19-21.
- Derkacheva, M., Steinbach, Y., Wildhaber, T., Mozgová, I., Mahrez, W., Nanni, P., Bischof, S., Gruissem, W., y Hennig, L. (2013). Arabidopsis MSI1 connects LHP1 to PRC2 complexes. *EMBO Journal* **32**, 2073-2085.
- Derkacheva, M., y Hennig, L. (2014). Variations on a theme: Polycomb group proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* **65**, 2769-2784.
- Ding, F., Zhang, B.L., Li, F., Li, Y.R., Li, J.H., y Lu, Y.T. (2022). General control non-repressible 20 functions in the salt stress response of Arabidopsis seedling by modulating ABA accumulation. *Environmental and Experimental Botany* **198**, 104856.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**, 1792-1797.
- 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**, 1-15.
- Ferrández Ayela, A. (2012). Caracterización genética y molecular de los mutantes *transcurvata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Flemming, W. (1882). *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*. F.C.W. Vogel. Leipzig.
- García-León, M., Iniesto, E., y Rubio, V. (2018). Tandem affinity purification of protein complexes from Arabidopsis cell cultures. *Methods in Molecular Biology* **1794**, 297-309.
- Gelvin, S.B. (2009). *Agrobacterium* in the genomics age. *Plant Physiology* **150**, 1665-1676.
- Godwin, J., y Farrona, S. (2022). The importance of networking: plant Polycomb Repressive Complex 2 and its interactors. *Epigenomes* **6**, 8.
- Grössniklaus, U., Vielle-Calzada, J.P., Hoepfner, M.A., y Gagliano, W.B. (1998). Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a Polycomb group gene in *Arabidopsis*. *Science* **280**, 446-450.
- Guitton, A.E., y Berger, F. (2005). Loss of function of MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1 produces nonviable parthenogenetic embryos in *Arabidopsis*. *Current Biology* **15**, 750-754.

- Guo, S., Sun, B., Looi, L.S., Xu, Y., Gan, E.S., Huang, J., e Ito, T. (2015). Co-ordination of flower development through epigenetic regulation in two model species: rice and Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **56**, 830-842.
- Gutiérrez Nájera, N. (2018). *DENTICULATA10* codifica FTSH14, una proteína del cloroplasto implicada en la dorsoventralidad foliar en Arabidopsis. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Han, T.T., Liu, W.C., y Lu, Y.T. (2018). General control non-repressible 20 (GCN20) functions in root growth by modulating DNA damage repair in Arabidopsis. *BMC Plant Biology* **18**, 274.
- Harris, K.D., Bartlett, N., J, y Lloyd, V.K. (2012). Daphnia as an emerging epigenetic model organism. *Genetics Research International* **2012**, 147892.
- Hill, W.G., Goddard, M.E., y Visscher, P.M. (2008). Data and theory point to mainly additive genetic variance for complex traits. *PLoS Genetics* **4**, e1000008.
- Hodgkin, J. (2005). Genetic suppression. *WormBook*, doi: 10.1895/wormbook.1.59.1
- Hopfner, K.P. (2016). Invited review: architectures and mechanisms of ATP binding cassette proteins. *Biopolymers* **105**, 492-504.
- Katiyar, A., Smita, S., Lenka, S.K., Rajwanshi, R., Chinnusamy, V., y Bansal, K.C. (2012). Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics* **13**, 13:544.
- 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.
- Kiefer, J.C. (2007). Epigenetics in development. *Developmental Dynamics* **236**, 1144-1156.
- Kim, J.M., Sasaki, T., Ueda, M., Sako, K., y Seki, M. (2015). Chromatin changes in response to drought, salinity, heat, and cold stresses in plants. *Frontiers in Plant Science* **6**, 114.
- Kim, S.Y., Lee, J., Eshed-Williams, L., Zilberman, D., y Sung, Z.R. (2012). EMF1 and PRC2 cooperate to repress key regulators of Arabidopsis development. *PLoS Genetics* **8**, e1002512.
- Kim, T.G., Tsukaya, H., y Uchimiya, H. (1998). The *CURLY LEAF* gene controls both division and elongation of cells during the expansion of the leaf blade in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **206**, 175-183.
- Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1987). Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service* **24**.
- Kusová, A., Steinbachová, L., Přerovská, T., Drábková, L.Z., Paleček, J., Khan, A., Rigóová, G., Gadiou, Z., Jourdain, C., Stricker, T., Schubert, D., Honys, D., y Schrupfová, P.P. (2023). Completing the TRB family: newly characterized members show ancient evolutionary origins and distinct localization, yet similar interactions. *Plant Molecular Biology* **112**, 61-83.
- Lalonde, S., Ehrhardt, D.W., Loqué, D., Chen, J., Rhee, S.Y., y Frommer, W.B. (2008). Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: latest techniques and current limitations. *Plant Journal* **53**, 610-635.
- Lam, K.C., Chung, H.R., Semplicio, G., Iyer, S.S., Gaub, A., Bhardwaj, V., Holz, H., Georgiev, P., y Akhtar, A. (2019). The NSL complex-mediated nucleosome landscape is required to maintain transcription fidelity and suppression of transcription noise. *Genes and Development* **33**, 452-465.
- Lee, C.H., Hawker, N.P., Peters, J.R., Lonhienne, T.G.A., Gursansky, N.R., Matthew, L., Brosnan, C.A., Mann, C.W.G., Cromer, L., Taochy, C., Ngo, Q.A., Sundaesan, V., Schenk, P.M., Kobe, B., Borges, F., Mercier, R., Bowman, J.L., y Carroll, B.J. (2021). *DEFECTIVE EMBRYO AND MERISTEMS* genes are required for cell division and gamete viability in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* **17**, e1009561.
- Lee, W.K., y Cho, M.H. (2016). Telomere-binding protein regulates the chromosome ends through the interaction with histone deacetylases in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* **44**, 4610-4624.

- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C.A., Ito, T., Meyerowitz, E., y Yu, H. (2008). A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* **15**, 110-120.
- Lloyd, J., y Meinke, D. (2012). A comprehensive dataset of genes with a loss-of-function mutant phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **158**, 1115-1129.
- Marian, C.O., Bordoli, S.J., Goltz, M., Santarella, R.A., Jackson, L.P., Danilevskaya, O., Beckstette, M., Meeley, R., y Bass, H.W. (2003). The maize *Single myb histone 1* gene, *Smh1*, belongs to a novel gene family and encodes a protein that binds telomere DNA repeats in vitro. *Plant Physiology* **133**, 1336-1350.
- Mateo-Bonmatí, E., Esteve-Bruna, D., Juan-Vicente, L., Nadi, R., Candela, H., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Pérez-Pérez, J.M., y Micol, J.L. (2018). *INCURVATA11* and *CUPULIFORMIS2* are redundant genes that encode epigenetic machinery components in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **30**, 1596-1616.
- Matsui, T., Lee, J.T., y Ehrenreich, I.M. (2017). Genetic suppression: extending our knowledge from lab experiments to natural populations. *Bioessays* **39**, 1700023.
- Meinke, D., y Koornneef, M. (1997). Community standards for *Arabidopsis* genetics. *Plant Journal* **12**, 247-253.
- Micol-Ponce, R., Sarmiento-Mañús, R., Fontcuberta-Cervera, S., Cabezas-Fuster, A., de Bures, A., Sáez-Vásquez, J., y Ponce, M.R. (2020). SMALL ORGAN4 is a ribosome biogenesis factor involved in 5.8S ribosomal RNA maturation. *Plant Physiology* **184**, 2022-2039.
- Missihoun, T.D., Kirch, H.H., y Bartels, D. (2012). T-DNA insertion mutants reveal complex expression patterns of the *aldehyde dehydrogenase 3H1* locus in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3887-3898.
- Mizoi, J., Nakamura, M., y Nishida, I. (2006). Defects in CTP:PHOSPHORYLETHANOLAMINE CYTIDYLTRANSFERASE affect embryonic and postembryonic development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 3370-3385.
- Mørtz, E., Vorm, O., Mann, M., y Roepstorff, P. (1994). Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search. *Biological Mass Spectrometry* **23**, 249-261.
- Moschopoulos, A., Derbyshire, P., y Byrne, M.E. (2012). The *Arabidopsis* organelle-localized glycyl-tRNA synthetase encoded by *EMBRYO DEFECTIVE DEVELOPMENT1* is required for organ patterning. *Journal of Experimental Botany* **63**, 5233-5243.
- Mouriz, A., López-González, L., Jarillo, J.A., y Piñeiro, M. (2015). PHDs govern plant development. *Plant Signaling and Behavior* **10**, e993253.
- Mozgova, I., Köhler, C., y Hennig, L. (2015). Keeping the gate closed: functions of the polycomb repressive complex PRC2 in development. *Plant Journal* **83**, 121-132.
- Muñoz-Nortes, T., Pérez-Pérez, J.M., Sarmiento-Mañús, R., Candela, H., y Micol, J.L. (2017). Deficient glutamate biosynthesis triggers a concerted upregulation of ribosomal protein genes in *Arabidopsis*. *Scientific Reports* **7**, 6164.
- 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.L. (2023). The unequal functional redundancy of *Arabidopsis* *INCURVATA11* and *CUPULIFORMIS2* is not dependent on genetic background. *Frontiers in Plant Science* **14**, 1239093.
- Nadi, R., Juan-Vicente, L., Lup, S.D., Fernández, Y., Rubio, V., y Micol, J.L. (2024). Overlapping roles of *Arabidopsis* *INCURVATA11* and *CUPULIFORMIS2* as Polycomb Repressive Complex 2 accessory proteins. *bioRxiv*, doi: 10.1101/2024.03.15.585069
- Nakamura, Y., Andrés, F., Kanehara, K., Liu, Y.C., Dörmann, P., y Coupland, G. (2014). *Arabidopsis* florigen FT binds to diurnally oscillating phospholipids that accelerate flowering. *Nature Communications* **5**, 5:3553.

- Navarro-Quiles, C., Mateo-Bonmatí, E., Candela, H., Robles, P., Martínez-Laborda, A., Fernández, Y., Šimura, J., Ljung, K., Rubio, V., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (2022). The Arabidopsis ATP-Binding Cassette E protein ABCE2 is a conserved component of the translation machinery. *Frontiers in Plant Science* **13**, 1009895.
- Navarro-Quiles, C., Lup, S.D., Muñoz-Nortes, T., Candela, H., y Micol, J.L. (2024). The genetic and molecular basis of haploinsufficiency in flowering plants. *Trends in Plant Science* **29**, 72-85.
- Nikonorova, N., Yue, K., Beeckman, T., y De Smet, I. (2018). Arabidopsis research requires a critical re-evaluation of genetic tools. *Journal of Experimental Botany* **69**, 3541-3544.
- Ning, Y.Q., Ma, Z.Y., Huang, H.W., Mo, H., Zhao, T.T., Li, L., Cai, T., Chen, S., Ma, L., y He, X.J. (2015). Two novel NAC transcription factors regulate gene expression and flowering time by associating with the histone demethylase JMJ14. *Nucleic Acids Research* **43**, 1469-1484.
- Ohad, N., Yadegari, R., Margossian, L., Hannon, M., Michaeli, D., Harada, J.J., Goldberg, R.B., y Fischer, R.L. (1999). Mutations in *FIE*, a WD Polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *Plant Cell* **11**, 407-416.
- Ortega Menaches, À. (2020). Identificación y caracterización de nuevos genes *DENTICULATA* en Arabidopsis. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Østergaard, L., y Yanofsky, M.F. (2004). Establishing gene function by mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **39**, 682-696.
- Paz-Aviram, T., Yahalom, A., y Chamovitz, D.A. (2008). Arabidopsis eIF3e interacts with subunits of the ribosome, Cop9 signalosome and proteasome. *Plant Signaling and Behavior* **3**, 409-411.
- Pérez-Pérez, J.M., Candela, H., y Micol, J.L. (2009a). Understanding synergy in genetic interactions. *Trends in Genetics* **25**, 368-376.
- Pérez-Pérez, J.M., Candela, H., Robles, P., Quesada, V., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (2009b). Lessons from a search for leaf mutants in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Developmental Biology* **53**, 1623-1634.
- Pérez Pérez, J.M. (2003). Caracterización genética y molecular de los mutantes *ultracurvata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Phillips, P.C. (1998). The language of gene interaction. *Genetics Society of America* **149**, 1167-1171.
- Phillips, P.C. (2008). Epistasis—the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature Reviews Genetics* **9**, 855-867.
- Pickett, F.B., y Meeks-Wagner, D.R. (1995). Seeing double: appreciating genetic redundancy. *Plant Cell* **7**, 1347-1356.
- 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* de Arabidopsis participa en el reciclaje del ribosoma citoplásmico. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Ponce Molet, M.R. (1996). Aislamiento y caracterización molecular de genes de la superfamilia del TGF-beta que se expresan en el embrión de *Stroglyocentrotus purpuratus*. Tesis doctoral. Universidad de Alicante.
- Qin, Z., Wu, Y.N., Sun, T.T., Ma, T., Xu, M., Pang, C., Li, S.W., y Li, S. (2022). Arabidopsis RAN GTPases are critical for mitosis during male and female gametogenesis. *FEBS Letters* **596**, 1892-1903.
- Reik, W., Dean, W., y Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089-1093.
- Relichová, J. (1976). Some new mutants. *Arabidopsis Information Service* **13**, 25-28.
- Robles Ramos, P. (1999). Análisis genético de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología de la hoja. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Ros Sirvent, M. (2020). Identificación de genes implicados en la morfogénesis del margen foliar en Arabidopsis. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elc.

- Rylott, E.L., Jackson, R.G., Edwards, J., Womack, G.L., Seth-Smith, H.M., Rathbone, D.A., Strand, S.E., y Bruce, N.C. (2006). An explosive-degrading cytochrome P450 activity and its targeted application for the phytoremediation of RDX. *Nature Biotechnology* **24**, 216-219.
- Sarmiento Mañús, R. (2011). Análisis genético de mutantes variegados de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Schwartz, Y.B., y Pirrotta, V. (2013). A new world of Polycombs: unexpected partnerships and emerging functions. *Nature Reviews Genetics* **14**, 853-864.
- Serrano-Cartagena, J., Robles, P., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (1999). Genetic analysis of leaf form mutants from the *Arabidopsis* Information Service collection. *Molecular and General Genetics* **261**, 725-739.
- Serrano-Cartagena, J., Candela, H., Robles, P., Ponce, M.R., Pérez-Pérez, J.M., Piqueras, P., y Micol, J.L. (2000). Genetic analysis of *incurvata* mutants reveals three independent genetic operations at work in *Arabidopsis* leaf morphogenesis. *Genetics Society of America* **156**, 1363-1377.
- 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.
- Simon, J.A., y Kingston, R.E. (2009). Mechanisms of Polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 697-708.
- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B., y Hood, L.E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**, 674-679.
- Sowpati, D.T., Ramamoorthy, S., y Mishra, R.K. (2015). Expansion of the polycomb system and evolution of complexity. *Mechanisms of Development* **138** 97-112.
- Stark, C., Breikreutz, B.J., Reguly, T., Boucher, L., Breikreutz, A., y Tyers, M. (2006). BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Research* **34**, D535-D539.
- Stiti, N., Missihoun, T.D., Kotchoni, S.O., Kirch, H.H., y Bartels, D. (2011). Aldehyde dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana*: biochemical requirements, metabolic pathways, and functional analysis. *Frontiers in Plant Science* **2**, 65.
- Stothard, P. (2000). The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques* **28**, 1102-1104.
- Susila, H., Nasim, Z., Gawarecka, K., Jung, J.Y., Jin, S., Youn, G., y Ahn, J.H. (2021). PHOSPHORYLETHANOLAMINE CYTIDYLYLTRANSFERASE 1 modulates flowering in a florigen-independent manner by regulating *SVP*. *Development* **148**, 193870.
- Szamecz, B., Rutkai, E., Cuchalová, L., Munzarová, V., Herrmannová, A., Nielsen, K.H., Burela, L., Hinnebusch, A.G., y Valášek, L. (2008). eIF3a cooperates with sequences 5' of uORF1 to promote resumption of scanning by post-termination ribosomes for reinitiation on *GCN4* mRNA. *Genes and Development* **22**, 2414-2425.
- The UniProt Consortium (2008). The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research* **36**.
- Valášek, L.S., Zeman, J., Wagner, S., Beznosková, P., Pavlíková, Z., Mohammad, M.P., Hronová, V., Herrmannová, A., Hashem, Y., y Gunišová, S. (2017). Embraced by eIF3: structural and functional insights into the roles of eIF3 across the translation cycle. *Nucleic Acids Research* **45**, 10948-10968.
- Van Leene, J., Witters, E., Inzé, D., y De Jaeger, G. (2008). Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. *Trends in Plant Science* **13**, 517-520.
- Van Leene, J., Eeckhout, D., Cannoot, B., De Winne, N., Persiau, G., Van De Slijke, E., Vercruyse, L., Dedecker, M., Verkest, A., Vandepoele, K., Martens, L., Witters, E., Gevaert, K., y De Jaeger, G. (2015). An improved toolbox to unravel the plant cellular machinery by tandem affinity purification of *Arabidopsis* protein complexes. *Nature Protocols* **10**, 169-187.

- Waidmann, S., Kusenda, B., Mayerhofer, J., Mechtler, K., y Jonak, C. (2014). A DEK domain-containing protein modulates chromatin structure and function in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**, 4328-4344.
- Wan, J., Wang, R., Zhang, P., Sun, L., Ju, Q., Huang, H., Lü, S., Tran, L.S., y Xu, J. (2021). MYB70 modulates seed germination and root system development in *Arabidopsis*. *iScience* **24**, 103228.
- Wang, L., Wang, C., Liu, X., Cheng, J., Li, S., Zhu, J.K., y Gong, Z. (2019). Peroxisomal β -oxidation regulates histone acetylation and DNA methylation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **116**, 10576-10585.
- Wang, M., Zhong, Z., Gallego-Bartolomé, J., Feng, S., Shih, Y.H., Liu, M., Zhou, J., Richey, J.C., Ng, C., Jami-Alahmadi, Y., Wohlschlegel, J., Wu, K., y Jacobsen, S.E. (2023). Arabidopsis TRB proteins function in H3K4me3 demethylation by recruiting JM14. *Nature Communications* **14**, 1736.
- Whitcomb, S.J., Basu, A., Allis, C.D., y Bernstein, E. (2007). Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. *Trends in Genetics* **23**, 494-502.
- Wong, K.A., y O'Bryan, J.P. (2011). Bimolecular fluorescence complementation. *Journal of Visualized Experiments* **50**, e2643.
- Wu, P., Peng, M., Li, Z., Yuan, N., Hu, Q., Foster, C.E., Saski, C., Wu, G., Sun, D., y Luo, H. (2019). DRM1, a Myb-Like protein, regulates cell expansion and seed production in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **60**, 285-302.
- Xiao, J., Jin, R., Yu, X., Shen, M., Wagner, J.D., Pai, A., Song, C., Zhuang, M., Klasfeld, S., He, C., Santos, A.M., Helliwell, C., Pruneda-Paz, J.L., Kay, S.A., Lin, X., Cui, S., Garcia, M.F., Clarenz, O., Goodrich, J., Zhang, X., Austin, R.S., Bonasio, R., y Wagner, D. (2017). *Cis* and *trans* determinants of epigenetic silencing by Polycomb repressive complex 2 in *Arabidopsis*. *Nature Genetics* **49**, 1546-1552.
- Xie, J., Qi, B., Mou, C., Wang, L., Jiao, Y., Dou, Y., y Zheng, H. (2022). *BREVIPEDECELLUS* and *ERECTA* control the expression of *AtPRX17* to prevent Arabidopsis callus browning. *Journal of Experimental Botany* **73**, 1516-1532.
- Yang, W., Jiang, D., Jiang, J., y He, Y. (2010). A plant-specific histone H3 lysine 4 demethylase represses the floral transition in Arabidopsis. *Plant Journal* **62**, 663-673.
- Yoshida, N., Yanai, Y., Chen, L., Kato, Y., Hiratsuka, J., Miwa, T., Sung, Z.R., y Takahashi, S. (2001). EMBRYONIC FLOWER2, a novel Polycomb Group protein homolog, mediates shoot development and flowering in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 2471-2481.
- Zander, M., Willige, B.C., He, Y., Nguyen, T.A., Langford, A.E., Nehring, R., Howell, E., McGrath, R., Bartlett, A., Castanon, R., Nery, J.R., Chen, H., Zhang, Z., Jupe, F., Stepanova, A., Schmitz, R.J., Lewsey, M.G., Chory, J., y Ecker, J.R. (2019). Epigenetic silencing of a multifunctional plant stress regulator. *Elife* **8**, e47835.
- Zhou, Y., Wang, Y., Krause, K., Yang, T., Dongus, J.A., Zhang, Y., y Turck, F. (2018). Telobox motifs recruit CLF/SWN-PRC2 for H3K27me3 deposition via TRB factors in *Arabidopsis*. *Nature Genetics* **50**, 638-644.