



**UNIVERSITAS**  
*Miguel Hernández*

# **Análisis genético de genes de Arabidopsis que codifican presuntos interactores de la proteína ICU11**

**Débora Cerdá Bernad**

Tutores:

José Luis Micol Molina

Eduardo Mateo Bonmatí

Área de Genética

Departamento de Biología Aplicada

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso académico 2017-2018

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

EDUARDO MATEO BONMATÍ, contratado predoctoral del Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte,

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor llevada a cabo por Débora Cerdá Bernad como Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Eduardo Mateo Bonmatí

José Luis Micol Molina

Elche, 28 de junio de 2018.

## ÍNDICE DE MATERIAS

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	III
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	III
<b>I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE</b> .....	1
<b>II.- INTRODUCCIÓN</b> .....	2
II.1.- Arabidopsis: la planta modelo más estudiada.....	2
II.2.- El ensayo del doble híbrido de la levadura.....	2
II.3.- La metilación mediada por la S-adenosil-L-metionina .....	3
II.4.- Obtención de construcciones silenciadoras en Arabidopsis .....	4
II.4.1.- Transferencia de genes.....	4
II.4.2.- Obtención de transgenes productores de amiARN y sin-tasiARN .....	5
<b>III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b> .....	7
<b>IV.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	8
IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria .....	8
IV.2.- Abreviaturas y fórmulas químicas .....	8
IV.3.- Gramática y terminología.....	9
IV.4.- Nomenclatura genética.....	9
IV.5.- Estirpes empleadas en este trabajo.....	10
IV.6.- Cultivos .....	10
IV.6.1.- Condiciones de cultivo de Arabidopsis .....	10
IV.6.1.1.- Cultivo en placa de Petri.....	10
IV.6.1.2.- Cultivo en maceta .....	11
IV.6.1.3.- Recolección de semillas.....	12
IV.6.2.- Condiciones de los cultivos microbianos .....	12
IV.7.- Disoluciones.....	12
IV.7.1.- Medios de cultivo para Arabidopsis .....	13
IV.7.1.1.- Medios de cultivo líquidos .....	13
IV.7.1.2.- Medios de cultivo sólidos .....	13
IV.7.1.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos .....	14
IV.7.2.- Medios de cultivo para microorganismos .....	14
IV.7.2.1.- Medios de cultivo líquidos .....	14
IV.7.2.2.- Medios de cultivo sólidos .....	14
IV.7.2.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos .....	14
IV.7.3.- Tampones y otras disoluciones de uso general .....	15
IV.7.3.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico .....	15
IV.7.3.2.- Disoluciones para electroforesis .....	15
IV.7.3.3.- Disoluciones para la obtención de amiARN y sin-tasiARN.....	15
IV.7.3.4.- Disoluciones para la obtención de bacterias quimiocompetentes.....	15

IV.8.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos .....	16
IV.8.1.- Aislamiento de ácidos nucleicos .....	16
IV.8.1.1.- Aislamiento de ADN plasmídico.....	16
IV.8.1.2.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis .....	16
IV.8.2.- Síntesis de ADN .....	16
IV.8.2.1.- Síntesis de oligonucleótidos .....	16
IV.8.2.2.- Amplificaciones mediante PCR.....	19
IV.8.3.- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	19
IV.8.4.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN .....	20
IV.8.4.1.- Reacciones de secuenciación.....	20
IV.8.4.2.- Electroforesis y lectura automatizada de secuencias.....	20
IV.9.- Obtención de líneas transgénicas <i>amiR</i> y <i>sin-tasiR</i> .....	21
IV.10.- Transformaciones.....	24
IV.10.1.- Transformación de células bacterianas .....	24
IV.10.1.1.- Obtención de células quimiocompetentes .....	24
IV.10.1.2.- Obtención de células electrocompetentes.....	24
IV.10.1.3.- Transformación por choque térmico .....	25
IV.10.1.4.- Transformación por electroporación .....	25
IV.10.2.- Transformación de Arabidopsis .....	25
IV.10.2.1.- Infiltración con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	25
IV.10.2.2.- Selección de transformantes .....	26
IV.11.- Análisis bioinformáticos .....	26
<b>V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>27</b>
V.1.- Análisis genético de los genes <i>ADK</i> .....	27
V.1.1.- Redundancia de <i>ADK1</i> y <i>ADK2</i> .....	27
V.1.2.- Obtención de mutaciones <i>adk1</i> y <i>adk2</i> y estudio de sus interacciones genéticas.....	27
V.1.3.- Cosilenciamiento de <i>ADK1</i> y <i>ADK2</i> .....	29
V.2.- Análisis genético del gen <i>DRE2</i> .....	31
V.2.1.- Obtención de alelos <i>dre2</i> y estudio de sus interacciones genéticas.....	31
V.2.2.- Cosilenciamiento de <i>ICU11</i> y <i>DRE2</i> .....	32
V.3.- Análisis genético del gen <i>CIMS</i> .....	33
V.3.1.- Obtención de alelos <i>cims</i> y estudio de sus interacciones genéticas.....	33
V.3.2.- Cosilenciamiento de <i>ICU11</i> y <i>CIMS</i> .....	35
V.4.- Análisis genético del gen <i>HOG1</i> : obtención de alelos <i>hog1</i> y estudio de sus interacciones genéticas .....	35
<b>VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA .....</b>	<b>37</b>
<b>VII.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>39</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Estructura química de la S-adenosil-L-metionina y la S-adenosil-L-homocisteína .....	3
<b>Figura 2.-</b> Ruta de la metilación mediada por la S-adenosil-L-metionina .....	4
<b>Figura 3.-</b> Mapas de los dos tipos de plásmidos que componen los sistemas binarios basados en los pTi de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	5
<b>Figura 4.-</b> Diagrama de flujo de la construcción de transgenes productores de amiARN y su transferencia a plantas.....	21
<b>Figura 5.-</b> Mapas de los vectores usados para la obtención de transgenes productores de amiARN y sin-tasiARN en este trabajo .....	22
<b>Figura 6.-</b> Construcción de los transgenes productores de amiARN y sin-tasiARN empleados en este trabajo .....	25
<b>Figura 7.-</b> Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas ADK1 y ADK2.....	27
<b>Figura 8.-</b> Estructura de las unidades de transcripción de los genes <i>ADK1</i> y <i>ADK2</i> .....	28
<b>Figura 9.-</b> Posiciones relativas de los cebadores empleados para el genotipado mediante PCR de inserciones de ADN-T en los genes a estudio .....	28
<b>Figura 10.-</b> Morfología foliar de los mutantes <i>adk</i> e <i>icu11-1 adk</i> .....	29
<b>Figura 11.-</b> Estructura de la unidad de transcripción del gen <i>DRE2</i> .....	31
<b>Figura 12.-</b> Embriones aberrantes en silicuas de plantas <i>DRE2/dre2-1</i> y <i>DRE2/dre2-2</i> .....	31
<b>Figura 13.-</b> Morfología foliar de plantas <i>DRE2/dre2</i> e <i>icu11-1/icu11-1;DRE2/dre2</i> .....	32
<b>Figura 14.-</b> Estructura de la unidad de transcripción del gen <i>CIMS</i> .....	33
<b>Figura 15.-</b> Morfología foliar de plantas <i>CIMS/cims</i> e <i>icu11-1/icu11-1;CIMS/cims</i> .....	34
<b>Figura 16.-</b> Embriones aberrantes en silicuas de plantas <i>CIMS/cims-1</i> y <i>CIMS/cims-2</i> .....	34
<b>Figura 17.-</b> Estructura de la unidad de transcripción del gen <i>HOG1</i> .....	35
<b>Figura 18.-</b> Morfología foliar de los mutantes <i>hog1</i> e <i>icu11-1 hog1</i> .....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Abreviaturas usadas en este trabajo .....	8
<b>Tabla 2.-</b> Oligonucleótidos usados en este trabajo .....	17

**I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE**

## I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

El gen *INCURVATA11* (*ICU11*) codifica un componente de la maquinaria epigenética de *Arabidopsis thaliana* cuya función molecular concreta se desconoce. En un escrutinio de interactores de *ICU11*, basado en el ensayo del doble híbrido de la levadura, se identificaron en el laboratorio de José Luis Micol tres proteínas que participan en la ruta de la metilación dependiente de la S-adenosil-L-metionina (SAM): ADENOSINE KINASE 2 (*ADK2*), COBALAMIN-INDEPENDENT METHIONINE SYNTHASE (*CIMS*) y DEREPRESSED FOR RIBOSOMAL PROTEIN S14 EXPRESSION 2 (*DRE2*). Con el fin de confirmar estos resultados, hemos estudiado en este Trabajo de Fin de Grado las interacciones genéticas de *ICU11* con *ADK2*, *DRE2* y *CIMS*, así como con otros dos genes relacionados con el ciclo de la SAM: *S-ADENOSYL-L-HOMOCYSTEINE HYDROLASE 1* (*SAHH1*) y *ADK1*, un parálogo de *ADK2*. Hemos obtenido alelos mutantes de estos genes y sus combinaciones dobles con *icu11-1*, y caracterizado sus fenotipos. También hemos generado transgenes productores de microARN artificiales y pequeños ARN interferentes sintéticos que actúan en *trans*, a fin de determinar los efectos fenotípicos de la pérdida de función parcial de los genes a estudio, en plantas *icu11-1* y del tipo silvestre Col-0.

**Palabras clave:** *Arabidopsis*; *ICU11*; silenciamiento génico; interacciones entre proteínas.

The *INCURVATA11* (*ICU11*) gene encodes a component of the epigenetic machinery of *Arabidopsis thaliana*, whose specific molecular function is unknown. In a screen for *ICU11* interactors, based on the yeast two-hybrid assay, three proteins were identified in the laboratory of José Luis Micol, which participate in the S-adenosyl-L-methionine (SAM)-dependent methylation pathway: ADENOSINE KINASE 2 (*ADK2*), DEREPRESSED FOR RIBOSOMAL PROTEIN S14 EXPRESSION 2 (*DRE2*), and COBALAMIN-INDEPENDENT METHIONINE SYNTHASE (*CIMS*). In this End of Degree Assignment, we studied the genetic interactions of *ICU11* with *ADK2*, *DRE2* and *CIMS*, as well as with two other genes related to the SAM cycle: *S-ADENOSYL-L-HOMOCYSTEINE HYDROLASE 1* (*SAHH1*) and *ADK1*, an *ADK2* paralog. We obtained mutant alleles of these genes and their double mutant combinations with *icu11-1*, and characterized their phenotypes. We also generated transgenes producing artificial microRNAs and synthetic *trans*-acting small interfering RNAs, to ascertain the phenotypic effects of the partial loss of function of the genes under study in *icu11-1* and wild-type genetic backgrounds.

**Keywords:** *Arabidopsis*; *ICU11*; gene silencing; protein-protein interaction.

## **II.- INTRODUCCIÓN**



## II.- INTRODUCCIÓN

### II.1.- Arabidopsis: la planta modelo más estudiada

Se denomina sistema modelo a cualquier organismo experimental estudiado por un colectivo amplio de investigadores con el objetivo de obtener conclusiones potencialmente aplicables a otras especies (Bolker, 1995). *Arabidopsis thaliana* (en adelante, Arabidopsis) es una angiosperma de la familia de las Brassicáceas, que fue propuesta como sistema modelo por Friedrich Laibach hace más de 70 años (Laibach, 1943). Arabidopsis se convirtió en la década de los ochenta del siglo XX en la planta modelo más empleada por sus características singulares, que la hacen idónea para su uso en el laboratorio: es pequeña, autógena, fácil de cruzar y muy prolífica, su ciclo de vida es corto y el mantenimiento de estirpes es sencillo (Meinke *et al.*, 1998; Meyerowitz, 1987; Provart *et al.*, 2016). Su genoma, completamente secuenciado desde el año 2000, es pequeño y contiene poco ADN repetitivo (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Se han desarrollado numerosas herramientas genéticas para Arabidopsis, que incluyen procedimientos de mutagénesis, selección de mutantes y obtención de líneas transgénicas, así como gran cantidad de vectores, transgenes y centenares de miles de mutantes señalizados mediante mutagénesis insercional (Page y Grossniklaus, 2002). Estas herramientas facilitan el estudio de cualquier faceta de su biología, y permiten llegar a conclusiones potencialmente extrapolables a otras plantas, como las de interés agronómico (Ben-Ari, 2012; Rodríguez-Furlán *et al.*, 2016).

### II.2.- El ensayo del doble híbrido de la levadura

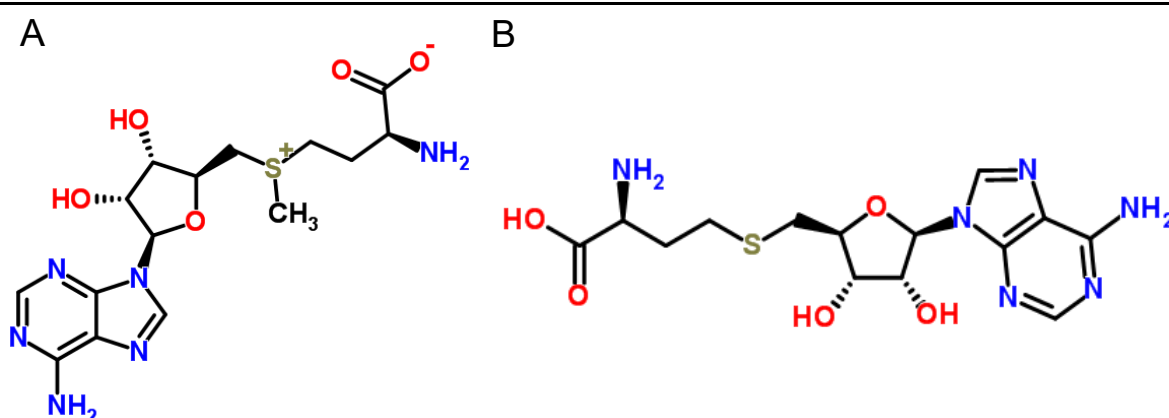
El ensayo del doble híbrido de la levadura (yeast two-hybrid; Y2H) permite detectar las interacciones físicas entre dos proteínas de cualquier especie; se realiza en células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Fields y Song, 1989). La detección de la interacción entre dos proteínas se basa en la unión de un factor de transcripción a una secuencia reguladora (upstream activating sequence; UAS) ubicada aguas arriba del promotor de un gen testigo. El factor de transcripción de uso más común en estos ensayos es GAL4 (galactose metabolism 4), un activador de la transcripción de la levadura, cuya estructura modular permite descomponerlo en dos fragmentos: el extremo amino, con capacidad de unión a ADN (dominio de unión), y el carboxilo (dominio de activación), que actúa como activador de la transcripción en presencia de galactosa.

Sean A y B dos proteínas cuya eventual interacción se desea estudiar. Para realizar un ensayo del doble híbrido de la levadura se obtendrán dos construcciones que produzcan

proteínas de fusión, a las que se denomina cebo y presa, entre A y el dominio de unión de GAL4, y entre B y el de activación, respectivamente. La interacción entre A y B conllevará la de los dos dominios de GAL4 y la consiguiente activación de la transcripción de un gen testigo (Brückner *et al.*, 2009). El método del doble híbrido de la levadura permite realizar escrutinios en los que se ensaya un único cebo contra miles de presas. Estas últimas suelen obtenerse a partir de una genoteca de ADN complementario (ADNc) del organismo cuyas proteínas se desea estudiar (Brückner *et al.*, 2009).

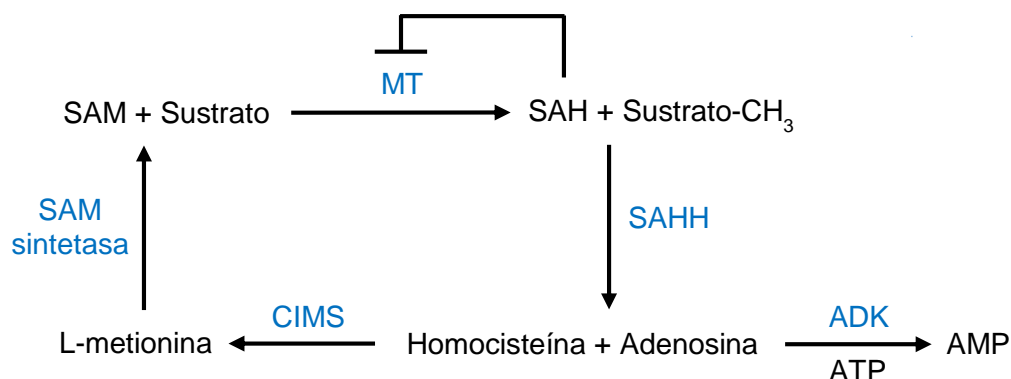
### II.3.- La metilación mediada por la S-adenosil-L-metionina

Las reacciones de metilación son esenciales para las células eucarióticas, ya que juegan importantes papeles en la síntesis, activación y otros aspectos del metabolismo de un gran número de compuestos, y en particular, en la regulación de la expresión génica (Shyh-Chang *et al.*, 2013). El donante de metilo más común es la S-adenosil-L-metionina (SAM; Figura 1; Chiang *et al.*, 1996). La SAM se obtiene a partir del trifosfato de adenosina (ATP) y la metionina, y participa en numerosas rutas metabólicas esenciales (Cantoni, 1952). El grupo metilo químicamente reactivo de la SAM está junto al átomo de azufre de la metionina, permitiendo su transferencia a un sustrato aceptor en las reacciones de transmetilación. Las reacciones que regulan su síntesis, consumo, regeneración y distribución constituyen el ciclo de la SAM, que se ha estudiado fundamentalmente en *Rattus norvegicus* y *Arabidopsis thaliana* y está muy conservado, aunque se conocen variaciones en procariontes como *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* (Cabrero *et al.*, 1987; Ravanel *et al.*, 1998; Rodionov *et al.*, 2004; Chattopadhyay *et al.*, 1991).



**Figura 1.-** Estructura química de la S-adenosil-L-metionina (A) y la S-adenosil-L-homocisteína (B). Tomado de la base de datos ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>).

Las reacciones de transmetilación en las que la molécula donante de metilos es la SAM son catalizadas por metiltransferasas (MT; Figura 2). Además de la metilación del sustrato, en estas reacciones se obtiene S-adenosil-L-homocisteína (SAH; Figura 1B, en la página 3; Finkelstein y Martin, 2000), cuya acumulación inhibe a las metiltransferasas. Para evitar dicha inhibición, la SAH es hidrolizada por la SAH HIDROLASE 1 (SAHH1), rindiendo adenosina y homocisteína (Rocha *et al.*, 2005). La adenosina es a continuación fosforilada por una ADENOSINE KINASE (ADK), transformándola en monofosfato de adenosina (AMP; Moffatt *et al.*, 2000). Por su parte, la COBALAMIN-INDEPENDENT METHIONINE SYNTHASE (CIMS) convierte la homocisteína en L-metionina (Ravanel *et al.*, 2004). Cuatro de cada cinco moléculas de L-metionina así obtenidas serán usadas como sustratos de las SAM sintetazas para rendir nuevamente SAM, empleándose la molécula restante en la traducción (Bottiglieri, 2002).



**Figura 2.-** Ruta de la metilación mediada por la S-adenosil-L-metionina. Se representan las principales etapas de la ruta y se indican en azul las enzimas que las catalizan. SAM: S-adenosil-L-metionina. MT: metiltransferasa. SAHH: SAH hidrolasa. ADK: adenosín quinasa. CIMS: metionina sintetasa independiente de cobalamina. Modificado a partir de Moffatt *et al.* (2000).

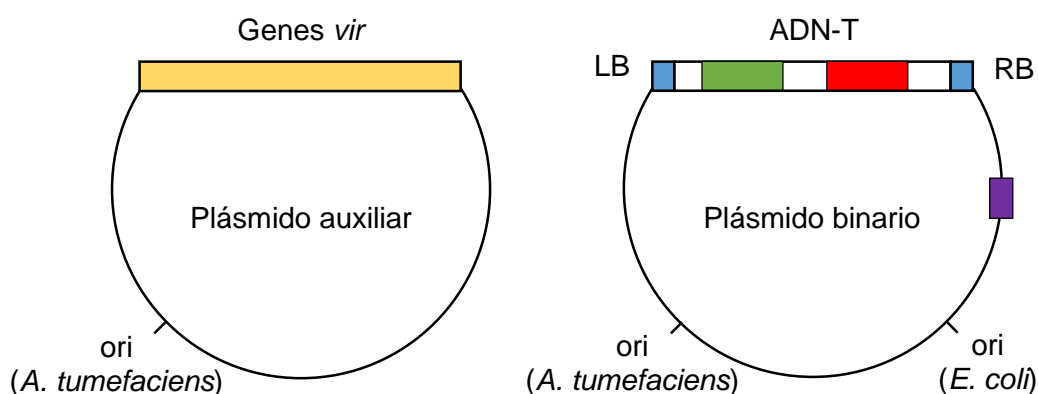
## II.4.- Obtención de construcciones silenciadoras en Arabidopsis

### II.4.1.- Transferencia de genes

La técnica de uso más frecuente para la transferencia de genes a Arabidopsis es la transformación por infección con *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski *et al.*, 1989; Pitzschke y Hirt, 2010; Bourras *et al.*, 2015). Esta bacteria infecta a algunas especies de plantas, en las que causa tumores denominado agallas de la corona. *Agrobacterium tumefaciens* ha resultado especialmente útil para el desarrollo de herramientas genéticas por su capacidad de integrar en el genoma de las células que infecta un segmento de sus plásmidos pTi, denominado ADN transferente (ADN-T), cuyas secuencias flanqueantes, a

las que se llama LB (left border) y RB (right border), son esenciales para la integración (Chilton *et al.*, 1977; Thomashow *et al.*, 1980).

Casi todos los vectores basados en el ADN-T son sistemas binarios, que constan de dos plásmidos, cada uno de los cuales contiene parte de los genes de un plásmido pTi (Figura 3). Uno de los componentes de estos sistemas es el plásmido binario, un vector lanzadera que puede replicarse tanto en *Escherichia coli* como en *Agrobacterium tumefaciens*. El plásmido binario contiene el ADN-T, que a su vez incluye un sitio de clonación múltiple para la inserción del gen que se desea transferir al genoma de una planta. El segundo componente de un sistema binario basado en el ADN-T es el plásmido auxiliar, que contiene los genes de virulencia (*vir*) necesarios para la inserción del ADN-T. Las plantas de interés son infectadas por infiltración con bacterias que contienen el plásmido auxiliar y el binario (Curtis y Grossniklaus, 2003; Brand *et al.*, 2006).



**Figura 3.-** Mapas de los dos tipos de plásmidos que componen los sistemas binarios basados en los pTi de *Agrobacterium tumefaciens*. El proceso de transformación suele comenzar con la inserción del gen de interés (en rojo en la figura) en el sitio de clonación múltiple del ADN-T del plásmido binario, que es clonado en células de *Escherichia coli* para su transferencia posterior a una estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el plásmido auxiliar. Este último incluye los genes *vir* (en amarillo), responsables de la virulencia de la bacteria, que llevan a cabo la transferencia del ADN-T a las células de la planta infectada. El ADN-T incluye las secuencias LB y RB en sus extremos y un marcador (en verde) para la selección de las plantas transformantes. El plásmido binario también contiene dos orígenes de replicación (*ori*), uno para *Escherichia coli* y otro para *Agrobacterium tumefaciens*, así como un marcador seleccionable bacteriano (en violeta). Modificado a partir de Juan Vicente (2017), que a su vez se basó en Lee y Gelvin (2008).

#### II.4.2.- Obtención de transgenes productores de amiARN y sin-tasiARN

Muchos genomas eucarióticos contienen genes reguladores que no codifican proteínas. Sus productos son fundamentalmente de dos tipos, a los que se denomina en conjunto ARN pequeños: los ARN pequeños interferentes (ARNpi) y los microARN (miARN)

(Filipowicz *et al.*, 2005). La transcripción de estos genes por una ARN polimerasa II rinde un transcrito primario que sufre varias modificaciones hasta su maduración. La forma madura de los miARN, de unos 21 nt de longitud, se integra en un RISC (RNA-induced silencing complex), del que forma parte la endorribonucleasa ARGONAUTE1 (AGO1; Stepien *et al.*, 2017). El RISC reconoce al ARN mensajero (ARNm) diana del miARN, del que es total o parcialmente complementario, cuya traducción es inhibida como consecuencia de la acción endonucleolítica de la proteína AGO1, y en algunos casos impidiendo el avance del ribosoma. Una subclase de los ARNpi son los que actúan en trans (tasiARN; trans-acting small interfering RNA; tasiRNA). Los tasiARN también son productos finales de la maduración de precursores que son digeridos por proteínas de la familia AGO unidas a un miARN o un ARNpi. Los precursores de los tasiARN son a continuación usados como molde por la RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 6 (RDR6), que sintetiza una cadena complementaria de ARN. Los cortes endonucleolíticos que finalmente introduce la enzima DICER-LIKE 4 (DCL4) en la molécula bicatenaria resultante rinden los tasiARN, cuya longitud es de 21 nt (Castel y Martienssen, 2013; Fukudome y Fukuhara, 2017).

Se han desarrollado métodos de diseño, construcción y expresión de transgenes productores de miARN artificiales (amiARN) y tasiARN sintéticos (sin-tasiARN) (Alvarez *et al.*, 2006; Niu *et al.*, 2006; Schwab *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010; Zhou y Luo, 2013; Carbonell *et al.*, 2014). Uno de estos métodos usa como precursores los genes *MICRORNA390a* (*MIR390a*) y *TRANS-ACTING SIRNA1c* (*TAS1c*) de *Arabidopsis*, para obtener miARN y sin-tasiARN, respectivamente (Cuperus *et al.*, 2011; Carbonell y Daròs, 2017).

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

### III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La estirpe mutante N242 de *Arabidopsis* fue aislada por Jiřina Relichová, que la denominó *cupuliformis* (*cp*), pero no la estudió, donandola a la colección del Arabidopsis Information Service (AIS; Relichová, 1976; Repkova *et al.*, 2005). Su estudio preliminar se inició en el laboratorio de J.L. Micol a finales de la década de los 90, asignándola a la clase fenotípica *Incurvata* (*lcu*), por la curvatura del limbo de sus hojas hacia el haz, y se le denominó *icu11* (Serrano-Cartagena *et al.*, 1999). El gen *ICU11* fue clonado en una Tesis doctoral anterior a este Trabajo de Fin de Grado (en adelante, TFG), estableciéndose que codifica una presunta dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato y  $Fe^{2+}$  (Esteve Bruna, 2013). Se ha demostrado que la proteína ICU11 es un componente de la maquinaria epigenética de *Arabidopsis* implicado en la modificación química de las histonas, pero no en la metilación del ADN (Mateo-Bonmatí *et al.*, 2018). Sin embargo, se desconoce cuál es su función molecular concreta.

En un escrutinio de interactores de ICU11 basado en el ensayo del doble híbrido de la levadura se identificaron en el laboratorio de J.L. Micol tres enzimas del metabolismo de la SAM (apartado II.3, en la página 3): ADENOSINE KINASE 2 (*ADK2*), COBALAMIN-INDEPENDENT METHIONINE SYNTASE (*CIMS*) (Figura 2, en la página 4) y DEREPRESSED FOR RIBOSOMAL PROTEIN S14 EXPRESSION 2 (*DRE2*). Uno de los objetivos inicialmente definidos para este TFG fue la obtención y caracterización de estirpes portadoras de alelos insercionales de los genes *CIMS*, *DRE2*, *ADK2* y su parólogo *ADK1*. Este objetivo conllevaba la confirmación de la presencia de cada inserción en la posición anotada, el análisis de sus fenotipos individuales y la obtención mediante cruzamientos de todas las combinaciones de alelos mutantes de *CIMS*, *DRE2*, *ADK2* y *ADK1* con *icu11-1*, a fin de inferir del estudio de los fenotipos de los dobles mutantes la eventual existencia de interacciones genéticas. También decidimos estudiar dos alelos puntuales del gen *HOMOLOGY-DEPENDENT GENE SILENCING 1* (*HOG1*), también denominado *S-ADENOSYL-L-HOMOCYSTEIN HYDROLASE 1* (*SAHH1* o *SAH1*). La enzima SAHH1 también participa en la ruta de la metilación mediada por la SAM (Figura 2, en la página 4).

La mayoría de los alelos de ADN-T de los genes de *Arabidopsis* son nulos (Alonso y Ecker, 2006). Es por ello que otro de los objetivos de este trabajo fue obtener plantas transgénicas en las que un miARN o un sin-tasiARN causase una insuficiencia parcial de la función de los genes a estudio. Se pretendía evitar así los inconvenientes derivados de la eventual letalidad de los mutantes múltiples que obtuviesemos.

## **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 previas (Ponce Molet, 1996; Berná Amorós, 1997; Serrano Cartagena, 1998; Quesada Pérez, 1999; Robles Ramos, 1999; Candela Antón, 2001; Pérez Pérez, 2003; Aguilera Díaz, 2009; Ferrández Ayela, 2012; Micol Ponce, 2017), Trabajos de Fin de Máster (Navarro Quiles, 2016; Juan Vicente, 2017) y de Fin de Grado (Navarro Quiles, 2015; Juan Vicente, 2016) realizados en los laboratorios de M.R. Ponce y J.L. Micol. En este apartado de Materiales y métodos se reproducen literalmente párrafos tomados de dichos trabajos.

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

Se ha procurado obedecer la normativa de la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) en lo referente a la formulación química y a las denominaciones de los compuestos usados 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 se basa en ningún argumento que se considere incontestable; ambas opciones son aceptadas por el Diccionario de la lengua española (vigésimotercera edición, 2015) de la Real Academia Española (RAE). En esta memoria se emplean numerosas abreviaturas y acrónimos, la mayoría de los cuales 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 usadas en este trabajo

cm: centímetros.	mg: miligramos.	pm: picomoles.
<i>et al.</i> : <i>et alii</i> (y otros).	min: minutos.	rpm: revoluciones por minuto.
g: gramos.	ml: mililitros.	s: segundos.
g: aceleración de la gravedad.	mm: milímetros.	v/v: volumen/volumen.
h: horas.	mM: milimolar.	V: voltios.
kb: kilobases.	ms: milisegundos.	µg: microgramos.
kg: kilogramos.	m/v: masa/volumen.	µl: microlitros.
l: litros.	nm: nanómetros.	µM: micromolar.
m: metros.	nt: nucleótidos.	µmol: micromoles.
M: molar.	pb: pares de bases.	°C: grados centígrados.

### 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 hemos traducido al español muchos de los nombres de genes y proteínas que se mencionan en esta memoria; en estos casos solo hemos usado la cursiva para los genes.

### 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 del identificador del gen por un guion. Sirva como ejemplo de lo anterior que en este trabajo hemos estudiado el mutante *adenosine kinase 2-1* (*adk2-1*), que es portador del alelo *adk2-1* del gen *ADENOSINE KINASE 2* (*ADK2*), cuyo producto es la proteína *ADENOSINE KINASE 2* (*ADK2*).

No existe una nomenclatura de aceptación general para los genotipos de Arabidopsis. Hemos optado por la más simple, empleando la expresión línea (también planta, individuo, semilla, plántula o cualquier órgano) *icu11-1* para referirnos a cualquier homocigoto para esta mutación. Los genotipos completos, como *icu11-1/icu11-1*, en los que los alelos en cromosomas homólogos se separan con una barra, se han utilizado únicamente cuando fue imprescindible. Salvo que se indique lo contrario, las plantas que se describen en este trabajo son homocigóticas para la mutación que se menciona en cada caso. Hemos utilizado en algunos casos un punto y coma como separador entre cromosomas no homólogos. Por ejemplo, el genotipo *icu11-1/icu11-1;DRE2/dre2-1* es el de un sesquimutante, una planta homocigótica para dos alelos mutantes del gen *ICU11*, del cromosoma 1, y heterocigótica para los alelos silvestre (*DRE2*) y mutante (*dre2-1*) del gen *DRE2*, del cromosoma 5.

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

En este trabajo se ha empleado las estirpes silvestres de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Columbia-0 (Col-0), Landsberg *erecta* (Ler) y S96, cuyos números de catálogo del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC; <http://arabidopsis.info/>) son N1092, N1642 y N914, respectivamente. Las semillas de las líneas SALK\_012274 (*adk2-1*; N512274), SALK\_028066 (*adk2-2*; N528066), SALK\_085309 (*adk2-3*; N585309), SAIL\_597\_D09 (*adk1-1*; N875258), SAIL\_655\_B04 (*cims-1*; N828436), SAIL\_136\_C12 (*cims-2*; N806614), SAIL\_1250\_E05 (*dre2-1*; N846072), SAIL\_1222\_B12 (*dre2-2*; N844732), *hog1-1* (N1892), *hog1-2* (N9392) e *icu11-1* (N242) fueron proporcionadas por el NASC. Las estirpes bacterianas empleadas fueron *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y *Agrobacterium tumefaciens* C58C1.

## IV.6.- Cultivos

### IV.6.1.- Condiciones de cultivo de Arabidopsis

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

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

La mayoría de los cultivos se iniciaron en placas de Petri de 15 cm de diámetro, que contenían unos 100 ml de medio sólido GM. 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 una cabina de flujo laminar horizontal. Se sembraron de 16 a 104 semillas por placa de Petri, espaciándolas regularmente sobre la superficie del medio con la ayuda de una pipeta Pasteur y una plantilla dispuesta bajo la placa. Tras su siembra, las placas fueron precintadas con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, que constituye una barrera efectiva para cualquier partícula en aerosol sin impedir el intercambio de gases con el exterior.

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 en cámaras de cultivo Conviron TC16 o TC30.

En algunos casos, 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.

Se realizaron algunas siembras en placas que contenían medio suplementado con higromicina B (apartado IV.7.2.3, en la página 14). Se esterilizaron 80 mg de semillas (4.000-5.000), que se suspendieron en 6 ml de agar de cobertera (agar para plantas al 0,5% m/v en agua) previamente disuelto por calentamiento en un autoclave y después mantenido durante al menos 30 min a 55°C en un baño. La suspensión de semillas en agar de cobertera se esparció sobre la superficie del medio de cultivo suplementado con antibiótico de una placa de Petri (apartado IV.7.2.3, en la página 14).

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

Los cultivos ordinarios 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 una maceta de rejilla de 5 x 5 cm (diámetro x altura), previamente rellena con el sustrato. Las macetas de rejilla impiden que el sustrato se adhiera al alveolo, facilitando la extracción de las plantas. Se empleó como sustrato una mezcla de perlita (granulometría de 1 a 3 mm; 105-125 kg/m<sup>3</sup>), vermiculita (granulometría de 1 a 3 mm; 80-100 kg/m<sup>3</sup>) y turba no fertilizada (turba rubia de musgo *Sphagnum*, de estructura gruesa; Grobmull Neuhaus), en una proporción volumétrica 2:2:1. Cada alveolo se destinó al cultivo de una sola planta, que en la mayoría de los casos fue trasplantada, con ayuda de unas pinzas, desde la placa de Petri en la que había permanecido durante las primeras tres semanas de su ciclo de vida.

Estos cultivos permanecieron cubiertos con un plástico transparente, en el que se realizaron algunos agujeros a fin de evitar una excesiva condensación de agua, durante 6 días. Cuando se produce el alzado y la elongación de los entrenudos al término de la etapa vegetativa, se aísla a las plantas trasplantadas, enfundándolas con cilindros de plástico transparente, denominados aracones (aracons; Beta Tech), que impiden el contacto entre individuos adyacentes y facilitan la recolección de las semillas. Para obtener plantas para su infección mediante infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*, se sembraron unas 50 semillas por maceta de 10 x 10 x 10 cm (largo x ancho x alto).

Los cultivos en maceta se mantuvieron en una cámara climatizada visitable, a 20 ± 1°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 o Philips F72T12/D/VHO 160 W 1500 SF, totalizando unos 75 µmol/s·m<sup>2</sup>.

Las 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 2 veces por semana, mediante la adición de medio mínimo ATM. A partir del momento en que la floración se interrumpe, se suspende el riego, propiciándose así el secado de las plantas, que son mantenidas en la cámara de cultivo al menos 2 semanas más, para proceder finalmente a la recolección de sus semillas.

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

Para la recolección de todas las semillas de una planta seca, producto de su autofecundación, se presionó contra un colador que se sujetó sobre un papel de filtro en el que cayeron las semillas. La mezcla de semillas, fragmentos de silicuas y otras partes secas de la planta que se acumuló sobre el papel de filtro fue cribada a través de un colador de malla más fina que la del primero, a fin de eliminar en lo posible todas las partículas cuyo tamaño fuese superior al de las semillas. Las semillas de las estirpes mutantes y silvestres de *Arabidopsis* utilizadas en este trabajo se almacenaron en tubos *ependorf* que se conservaron a 4°C.

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

Los cultivos líquidos se realizaron en recipientes estériles, cuya capacidad excedía al menos 2 veces el volumen de medio utilizado, garantizando así una aireación suficiente durante la incubación. Se empleó una agitación de 225 rpm en un incubador dotado de una plataforma orbital (NBS Innova 44, 4000 o 4260) que se mantuvo a 28 o 37°C para cultivar *Agrobacterium tumefaciens* o *Escherichia coli*, respectivamente.

Los cultivos en placas de Petri se inocularon con una micropipeta con 100 µl de precultivo líquido, que fue esparcido haciendo que 5-8 perlas de vidrio estériles de 3 mm de diámetro rodaran sobre la superficie del medio. Las placas en las que se cultivó *Agrobacterium tumefaciens* se precintaron con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M.

#### **IV.7.- Disoluciones**

Se empleó siempre agua desionizada, con una resistividad media de 15 MΩ/mm<sup>2</sup>·m, y las disoluciones se conservaron a temperatura ambiente, salvo que se indique lo contrario.

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

Los medios de cultivo mencionados en este apartado se prepararon disolviendo sus componentes en agua. Todas las esterilizaciones en autoclave se efectuaron a 1 kg/cm<sup>2</sup> 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 después de que este último fuera estabilizado a 55°C durante 30 min.

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

**Medio mínimo ATM:** KNO<sub>3</sub> 5 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 mM; MgSO<sub>4</sub> 2 mM; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 2 mM; FeNaEDTA 51 µM; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 70 µM; MnCl<sub>2</sub> 14 µM; CuSO<sub>4</sub> 0,5 µM; ZnSO<sub>4</sub> 1 µM; NaMoO<sub>4</sub> 0,2 µM; NaCl 10 µM, y CoCl<sub>2</sub> 0,01 µM (Kranz y Kirchheim, 1987).

Para su preparación se añadieron, a 900 ml de agua, 5 ml de KNO<sub>3</sub> 1 M; 2,5 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M; 2 ml de MgSO<sub>4</sub> 1 M; 2 ml de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1 M; 2 ml de FeNaEDTA 20 mM, y 1 ml de la disolución de micronutrientes, ajustando el volumen final a 1 l. Todas las disoluciones madre se prepararon en las concentraciones indicadas y se esterilizaron por filtración. Las disoluciones madre de las sales deben añadirse a los 900 ml de agua, y no a la inversa, a fin de evitar la precipitación de complejos insolubles de fosfato cálcico.

La composición de la disolución de micronutrientes es la siguiente: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 70 mM; MnCl<sub>2</sub> 14 mM; CuSO<sub>4</sub> 0,5 mM; ZnSO<sub>4</sub> 1 mM; NaMoO<sub>4</sub> 0,2 mM; NaCl 10 mM y CoCl<sub>2</sub> 0,01 mM. Se preparó añadiendo, a 900 ml de agua, 4,32 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2,77 g de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; 124 mg de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; 287 mg de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 48,7 mg de NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 584,4 mg de NaCl, y 2,38 mg de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O. Finalmente, se añadió agua hasta 1 l.

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

Los medios de cultivo sólidos fueron preparados por adición de agar para plantas (Plant Agar; Duchefa), a una concentración final del 0,7% 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 media hora en un baño a 55°C antes de su vertido en placas de Petri, que se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal Telstar BH 100 o MH 100. Las placas de Petri con medio sólido fueron conservadas hasta un mes a 4°C, en posición invertida.

**Medio GM (Germination medium):** NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 10,3 mM; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 50,1 µM; CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,05 µM; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,05 µM; Na<sub>2</sub>EDTA 55,4 µM; MgSO<sub>4</sub> 0,75 mM; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 50 µM; NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,5 µM; KI 2,5 µM; KNO<sub>3</sub> 9,4 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,62 mM;

ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 15 µM; sacarosa 29,2 mM; MES [ácido 2-(N-morfolino)-etano sulfónico] 2,3 mM, y 7 g/l de agar para plantas.

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

#### **IV.7.1.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos**

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

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

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

**LB (Luria - Bertani):** 1% m/v de bacto-triptona; 0,5% m/v de extracto de levadura, y 1% m/v de NaCl. Para preparar un litro de medio se añadieron, a 800 ml de agua, 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Se agitó la suspensión hasta la completa disolución de sus componentes y se ajustó el pH a 7,5 con NaOH 5 M. Se ajustó el volumen a 1 l y se esterilizó en autoclave.

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

Los medios de cultivo sólidos fueron preparados por adición de agar bacteriológico europeo (Pronadisa), tras la disolución del resto de los componentes en agua. La concentración de agar fue de 15 g/l. Una vez finalizada su esterilización en autoclave, los medios de cultivo se mantuvieron durante media hora en un baño a 55°C antes de su vertido en placas de Petri de 90 mm, que se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar horizontal. Las placas de Petri con medio sólido se conservaron hasta un mes a 4°C, en posición invertida.

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

Algunos de los medios anteriormente descritos se suplementaron con antibióticos, a una concentración final de 50 µg/ml (kanamicina) o 25 µg/ml (rifampicina). Se prepararon disoluciones madre de estos antibióticos a concentraciones 1.000 veces superiores a la de trabajo, disolviéndolas en agua en el caso de la kanamicina, o en dimetilsulfóxido (DMSO)

en el caso de la rifampicina, y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , alicuotadas en tubos *ependorf* de 1,5 ml. La disolución de kanamicina se esterilizó por filtración. Los antibióticos se añadieron al medio de cultivo después de que este hubiera sido esterilizado en autoclave.

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

#### **IV.7.3.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico**

**Tampón de extracción:** Tris-HCl 100 mM pH 8,0;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  50 mM, y NaCl 0,5 M. Se preparó a partir de disoluciones madre Tris-HCl 1 M;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,5 M, y NaCl 5 M. Puede conservarse varios meses a  $4^{\circ}\text{C}$ .

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

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

**TAE 50x:** Tris-base [Tris-(hidroximetil)aminometano] 2 M; 5,71% v/v de ácido acético glacial, y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  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 ácido acético glacial y 100 ml de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,5 M pH 8,0.

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

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

#### **IV.7.3.3.- Disoluciones para la obtención de amiARN y sin-tasiARN**

**Tampón de hibridación de oligonucleótidos:** Tris-HCl 60 mM pH 7,5; NaCl 500 mM;  $\text{MgCl}_2$  60 mM, y 1,4-ditiotreitol (DTT) 10 mM. Para preparar 50 ml se mezclaron 3 ml de Tris-HCl pH 7,5 1M; 5 ml de NaCl 5M; 3 ml de  $\text{MgCl}_2$  1M, y 5 mL de DTT 100 mM. Se prepararon alícuotas de 1 ml, que se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **IV.7.3.4.- Disoluciones para la obtención de bacterias quimiocompetentes**

**TFBI:**  $\text{KCH}_3\text{COO}$  30 mM; RbCl 100 mM;  $\text{CaCl}_2$  10 mM;  $\text{MnCl}_2$  50 mM, y 15% en glicerol. Para preparar 100 ml se mezclaron 20 ml de RbCl 0,5 M; 2 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,5 M; 10 ml de  $\text{MnCl}_2$  0,5 M; 294 mg de  $\text{KCH}_3\text{COO}$ , y 11,9 ml de glicerol puro. Se añadió agua hasta



100 ml, se ajustó el pH a 5,8 con CH<sub>3</sub>COOH (ácido acético glacial diluido al 10%) y se esterilizó por filtración. Se conservó a 4°C.

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

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

### **IV.8.1.- Aislamiento de ácidos nucleicos**

#### **IV.8.1.1.- Aislamiento de ADN plasmídico**

Hemos llevado a cabo preparaciones a pequeña escala de ADN o minipreparaciones (*minipreps*), a partir de cultivos bacterianos de 5 ml de medio líquido, empleando un Gene Elute Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **IV.8.1.2.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis**

El ADN genómico utilizado como molde en las mezclas de PCR fue purificado mediante el método de Dellaporta *et al.* (1983), con algunas modificaciones. Se introdujo en un tubo *ependorf* una planta entera recolectada 21 días después de la estratificación (dde) y se le añadieron 500 µl de tampón de extracción (apartado IV.7.3.1, en la página 15), macerándola en un macerador automático (Mixermill 300, Qiagen 85120). 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<sub>3</sub>COO 5 M, incubando en hielo durante 15 min a 4°C, y centrifugando durante 10 min a 13.000 rpm (14.927 g) en una microfuga. El sobrenadante fue transferido a un tubo *ependorf* vacío y precipitado durante 20 min a -20°C con 640 µl de isopropanol y 60 µl de NaCH<sub>3</sub>COO 3 M, y se centrifugó durante otros 10 min a 10.000 rpm. El precipitado fue lavado con 300 µl de etanol del 70% y se centrifugó una vez más durante 5 min, tras lo cual se dejó secar a temperatura ambiente, para resuspenderlo después en 300 µl de agua y almacenar la disolución a 4°C.

### **IV.8.2.- Síntesis de ADN**

#### **IV.8.2.1.- Síntesis de oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados por Sigma-Aldrich (Tabla 2, en la página 17).

**Tabla 2.- Oligonucleótidos usados en este trabajo**

Propósito	Nombres	Secuencias de los oligonucleótidos (5'→3')
Obtención de transgenes productores de amiARN y sin-tasiARN	amiR_ADK1/2-1_F	TGTATGTAAGTGGTTGCCCCAGCATATGATGATCACATTTCGTTATCTATTTTTTATGCTGGGGCCACCAGTTACA
	amiR_ADK1/2-1_R	AATGTGTAAGTGGTGGCCCCAGCATAAAAAATAGATAACGAATGTGATCATCATATGCTGGGGCAACCAGTTACA
	amiR_ADK1/2-2_F	TGTATACCAACTGAATGGATTCCGCATGATGATCACATTTCGTTATCTATTTTTTTCGGAATCCAGTCAGTTGGTA
	amiR_ADK1/2-2_R	AATGTACCAACTGACTGGATTCCGCAAAAAATAGATAACGAATGTGATCATCATGCGGAATCCATTTCAGTTGGTA
	amiR_DRE2-1_F	TGTATGGCTAATACCGCCTCCACACATGATGATCACATTTCGTTATCTATTTTTTGTGTGGAGGCTGTATTAGCCA
	amiR_DRE2-1_R	AATGTGGCTAATACAGCCTCCACACAAAAATAGATAACGAATGTGATCATCATGTGTGGAGGCGGTATTAGCCA
	amiR_DRE2-2_F	TGTATACCGCAGCGGAAGGCATCAGATGATGATCACATTTCGTTATCTATTTTTTCTGATGCCTTACGCTGCGGTA
	amiR_DRE2-2_R	AATGTACCGCAGCGTAAGGCATCAGAAAAATAGATAACGAATGTGATCATCATCTGATGCCTTCCGCTGCGGTA
	amiR_CIMS-1_F	TGTATAGGGATGAACTTAGTCCCACATGATGATCACATTTCGTTATCTATTTTTTGTGGGACTAATTTTCATCCCTA
	amiR_CIMS-1_R	AATGTAGGGATGAAATTAGTCCCACAAAAATAGATAACGAATGTGATCATCATGTGGGACTAAGTTTCATCCCTA
	amiR_CIMS-2_F	TGTATGACCCTGTCTGCGATTTCCAATGATGATCACATTTCGTTATCTATTTTTTGGAAATCGCCGACAGGGTCA
	amiR_CIMS-2_R	AATGTGACCCTGTGCGGATTTCCAAAAAATAGATAACGAATGTGATCATCATTTGGAAATCGCAGACAGGGTCA
	sin-tasiR_ICU11ADK1/2-1_F	ATTATGAACACCTTGTGTTTGCCTGCTGCTCAGGTTGTTTTCCC
	sin-tasiR_ICU11ADK1/2-1_R	GTTCCGGGAAAACAACCTGAGCAGCAGTGCAAACAACAAGGTGTTCA
	sin-tasiR_ICU11ADK1/2-2_F	ATTATGAACACCTTGTGTTTGCCTCCACAGACTTCCGGGAACAC
	sin-tasiR_ICU11ADK1/2-2_R	GTTCCGTGTTCCCGGAAGTCTGTGGAGTGCAAACAACAAGGTGTTCA
	sin-tasiR_ICU11DRE2-1_F	ATTATGCTGCTCAGGTTGTTTTCCCTGGCTAATACCGCCTCCACAC
	sin-tasiR_ICU11DRE2-1_R	GTTCCGTGTTGGAGGCGGTATTAGCCAGGGAAAACAACCTGAGCAGCA
	sin-tasiR_ICU11DRE2-2_F	ATTATCCACAGACTTCCGGGAACACTACCGCAGCGGAAGGCATCAG
	sin-tasiR_ICU11DRE2-2_R	GTTCCCTGATGCCTTCCGCTGCGGTAGTGTCCCGGAAGTCTGTGGA
sin-tasiR_ICU11CIMS-1_F	ATTATTGAGACCACAAGCTTGTCTATCATGAACTAGCTTTATCGT	
sin-tasiR_ICU11CIMS-1_R	GTTCCAGATAAAGCTAGTTTCATGATAGACAAGCTTGTGGTCTCAA	
sin-tasiR_ICU11CIMS-2_F	ATTATCTTGAGTGCAGGCTTGACCATTGCTACAAACATTTTTACTA	
sin-tasiR_ICU11CIMS-2_R	GTTCTAGTAAAAATGTTTGTAGCAATGGTCAAGCCTGCACTCAAGA	

**Tabla 2 (continuación).- Oligonucleótidos usados en este trabajo**

Propósito	Nombres	Secuencias de los oligonucleótidos (5'→3')	
		Cebador directo (forward; F)	Cebador inverso (reverse; R)
Genotipado de las líneas insercionales	SAIL_597_D09	TCCTAGCGTGCATTTGAATTC	CTGTGCCTGGCTCTCATAAAG
	SALK_012274	CACCAACAACACAGACACCAC	ATGGAATCCTTCTCGGTATGG
	SALK_028066	CAGCCTGCTGAAATTTAGTCG	TTTACTTTCTGGTGGCTGCAG
	SALK_085309	TTTCATCGAAGCCTTCATTG	TGGTCCTCCATTTGATGAGAC
	SAIL_655_B04	TGCTGTTCCACCTAGGTATGG	TTGACCAAATCAAGGGTCTTG
	SAIL_136_C12	GAAACTCCAGGCCTTTACTGG	AAAATGTGTGACGCATAAGCC
	SAIL_1250_E05	TAAGCCCCTGTGTCTAAATGG	AGAATATCCCACAGCATGTCC
	SAIL_1222_B12	GGAATTTGTTTTGTTTTCGG	CGAACAGACGTAAAGCCAGAG
	LBb1.3 <sup>a</sup>	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	
	LB1 <sup>b</sup>	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	
Secuenciación	hog1_F/R	ACGACTCTGTCACCAAGAGC	AAGTAGATCCGAACCTGAACC
	AtTAS1_F/R	AAGTTAGGTTCAATGTCCCGGT	TCGGAGAGAACTACTCAAGCT
	attB_F/R <sup>c</sup>	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

<sup>a-c</sup>Secuencias tomadas de <sup>a</sup>Alonso *et al.* (2003), <sup>b</sup>Sessions *et al.* (2002) y <sup>c</sup>Carbonell *et al.* (2014).

#### **IV.8.2.2.- Amplificaciones mediante PCR**

En este trabajo se han realizado amplificaciones mediante PCR con varios propósitos. Se empleó la polimerasa GoTaq Flexi (Promega) para las amplificaciones a partir de ADN genómico de *Arabidopsis* o ADN plasmídico. La GoTaq Flexi es una versión recombinante de la polimerasa *Taq* de *Thermus aquaticus*, barata y suficientemente procesiva. Los cebadores y los desoxirribonucleótidos se añadieron a una concentración final de 0,4  $\mu$ M y 0,2 mM, respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos *ependorf* de pared fina de 0,2 ml, en termocicladores Applied Biosystems 2700 o Bio-Rad T100. Los volúmenes de reacción oscilaron entre 5 y 20  $\mu$ l, dependiendo del uso posterior de los productos de amplificación.

Los programas usados incluyeron una etapa previa de calentamiento a 94°C durante 3 min, seguida de 35-40 ciclos en los que se repetía una fase de 30 s a 94°C para desnaturalizar los moldes, otra de 30 s a la temperatura de apareamiento deseada para permitir la hibridación de los cebadores y una tercera a 72°C para la polimerización por la enzima GoTaq Flexi, cuya duración depende del tamaño del fragmento a amplificar, asumiéndose que esta polimerasa termoestable sintetiza ADN a razón de una kilobase por minuto. Una etapa final de 10 min a 72°C permitió el rellenado de los extremos de las moléculas imperfectamente bicatenarias.

Las temperaturas de apareamiento se calcularon con la fórmula  $T_m = 4(C + G) + 2(A + T)$ , siendo C, G, A y T el número de las respectivas bases en el oligonucleótido (Suggs et al., 1981). Se programó habitualmente en el termociclador una temperatura entre 5 y 10°C inferior a la calculada. Los oligonucleótidos se diseñaron procurando obtener valores de  $T_m$  similares para los dos miembros de cada pareja de cebadores.

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

Se usaron geles de 1,5 a 2,5% m/v en agarosa, dependiendo de los tamaños de las moléculas de ADN a resolver. Las electroforesis se realizaron en cubetas horizontales, empleando como electrolito TAE 1x (apartado IV.7.3.2, en la página 15). La disolución de la agarosa en el tampón se llevó a cabo mediante calentamiento en un microondas. Una vez enfriada la disolución a 55°C, se añadió bromuro de etidio hasta una concentración de 0,5  $\mu$ g/ml. Las electroforesis en geles de agarosa se llevaron a cabo a voltaje constante (90-120 V), cuyo valor dependió del tamaño de las moléculas de ADN y las dimensiones de la cubeta. La visualización de las moléculas se consiguió iluminando los geles con luz ultravioleta 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**

### **IV.8.4.1.- Reacciones de secuenciación**

Se utilizó en todos los casos la variante del método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) semiautomatizada y fluorescente (Smith *et al.*, 1986). Las reacciones de secuenciación cíclica se llevaron a cabo en tubos *ependorf* de pared fina de 0,2 ml, en mezclas de reacción de 5 µl que incluían 2,5 pm del cebador y 2 µl de la disolución incluida en el kit de secuenciación ABI PRISM BigDye Terminator Cycle v2.0 Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems), que contiene los desoxinucleótidos, los didesoxinucleótidos terminadores marcados con fluorocromos, la ADN polimerasa AmpliTaq FS y su tampón de reacción. Como molde de secuenciación se emplearon 1-3 µl 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).

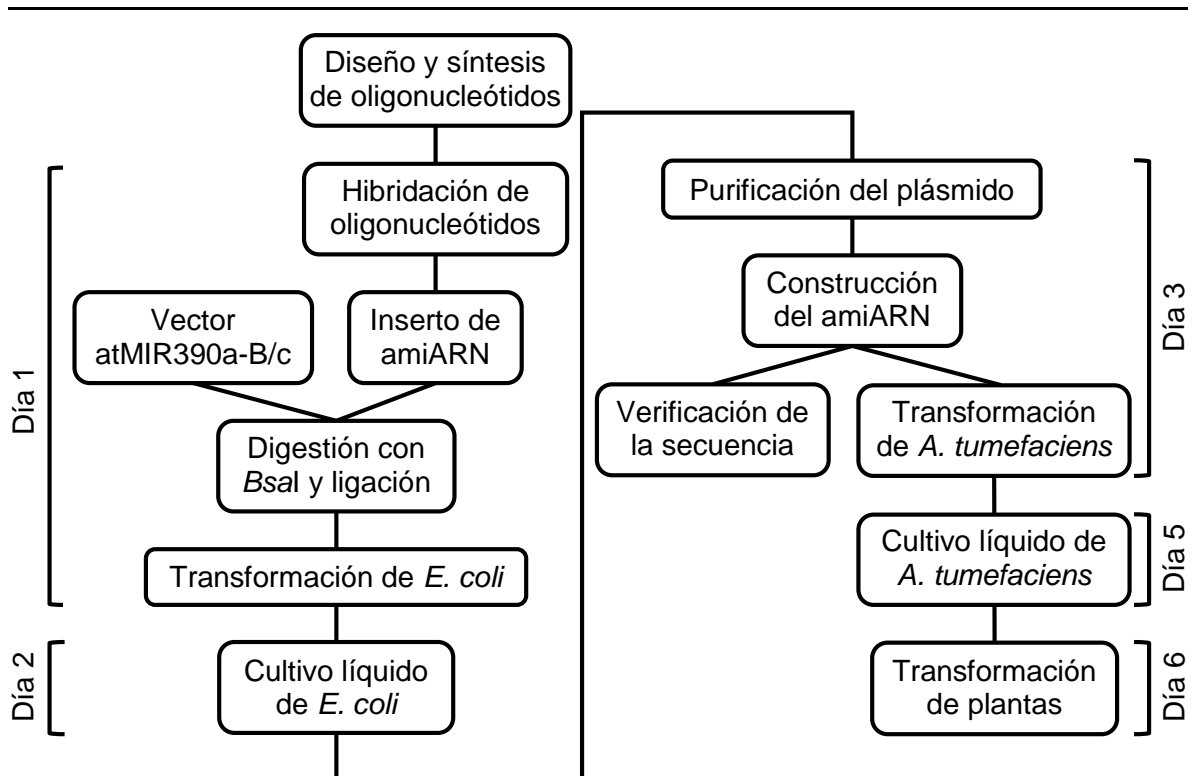
Se empleó un programa de PCR con una etapa inicial de desnaturalización de 2 min a 96°C, seguida de 40 ciclos de 10 s a 96°C, 5 s a 50°C y 4 min a 60°C. Una vez finalizadas las reacciones de secuenciación cíclica se procedió a eliminar los didesoxinucleótidos terminadores no incorporados. Para ello, los productos de las reacciones de secuenciación cíclica fueron precipitados, añadiendo a cada muestra 55 µl de agua y 110 µl de etanol al 95%, e incubando a 4°C durante 15 min. Los tubos fueron centrifugados a continuación a 13.000 rpm durante 15 min. El precipitado fue finalmente lavado con etanol al 70% y secado al aire, conservándose a -20°C hasta su uso.

### **IV.8.4.2.- Electroforesis y lectura automatizada de secuencias**

La electroforesis capilar para obtener secuencias nucleotídicas se llevó a cabo en un analizador genético ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems), empleando capilares de 50 cm de longitud. Los productos de las reacciones de secuenciación fueron resuspendidos en 20 µl de formamida desionizada y desnaturalizados a 96°C durante 2 min, introduciendo seguidamente el tubo en hielo, todo ello antes de la carga de la disolución en la gradilla del secuenciador. La emisión de fluorescencia por los terminadores marcados con distintos fluorocromos, tras su excitación por el láser del analizador genético, fue recogida por un detector, y su interpretación y análisis fueron llevadas a cabo de forma automatizada por el programa que controla el equipo. Algunas posiciones ambiguas en las secuencias obtenidas pudieron esclarecerse mediante la magnificación de los electroferogramas, con el programa FinchTV v1.4.0 (<http://www.geospiza.com>).

#### IV.9.- Obtención de líneas transgénicas *amiR* y *sin-tasiR*

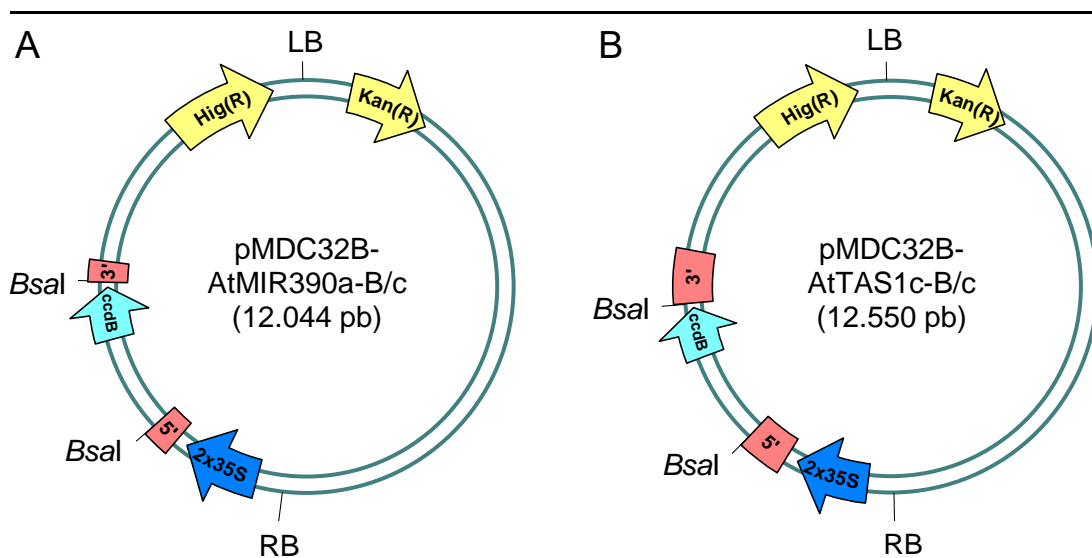
Hemos obtenido construcciones para el silenciamiento parcial de los genes a estudio, empleando para ello el método de Carbonell *et al.* (2014) (Figura 4). En este método se hibridan dos oligonucleótidos sintéticos para obtener una molécula bicatenaria con extremos sobresalientes 5' no complementarios, que contiene las secuencias de los amiARN o sin-tasiARN maduros de interés. Para cada hibridación se preparó una disolución 100  $\mu$ M de cada uno de los dos oligonucleótidos (F y R) sintetizados para obtener cada construcción, y se mezclaron 2  $\mu$ l de cada una de ellas con 46  $\mu$ l del tampón de hibridación descrito en el apartado IV.7.3.3, en la página 15. La hibridación se realizó en un termociclador T100 de Bio-Rad, calentando a 94°C durante 5 min y disminuyendo paulatinamente la temperatura a razón de 0,1°C por segundo hasta alcanzar los 20°C. Se tomaron 3  $\mu$ l de la disolución resultante, a los que se añadieron 37  $\mu$ l de agua.



**Figura 4.-** Diagrama de flujo de la construcción de transgenes productores de amiARN y su transferencia a plantas. Cada recuadro representa una de las etapas del proceso. Se indica a ambos lados la planificación temporal del experimento. Tomado de Ruiz Bayón (2016), que a su vez lo modificó a partir de Carbonell *et al.* (2014).

Las moléculas resultantes de la hibridación de los oligonucleótidos fueron clonadas a continuación en los vectores ilustrados en la Figura 5, en la página 22. Se empleó el vector pMDC32B-AtMIR390a-B/c para la obtención de los amiARN. Este vector permite la

expresión de un gen *MIR* bajo el control de dos promotores 35S en tándem. Contiene el gen *ccdB*, que codifica una proteína tóxica que resulta letal para la mayoría de estirpes de *Escherichia coli* (Bernard y Couturier, 1992) flanqueado por dianas de restricción *Bsal*. Presenta además las secuencias 5' y 3' de *MIR390* requeridas para el correcto procesamiento del transcrito primario de este gen de *Arabidopsis* y permite la selección de bacterias y plantas transformantes en presencia de kanamicina e higromicina, respectivamente (Figura 5A). Para obtener sin-tasiARN, se empleó el vector pMDC32b-AtTAS1c-B/c, que comparte algunas características con pMDC32B-AtMIR390a-B/c, como los dos promotores 35S en tándem, el gen *ccdB* y los de resistencia a antibióticos. En este caso, las secuencias 5' y 3' se han tomado del gen *TAS1c* de *Arabidopsis* (Figura 5B).



**Figura 5.-** Mapas de los vectores usados para la obtención de transgenes productores de amiARN y sin-tasiARN en este trabajo. (A) pMDC32B-AtMIR390a-B/c (para los amiARN) y (B) pMDC32B-AtTAS1c (para los sin-tasiARN). Se señalan las posiciones de los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) del ADN-T. Se destacan las dianas *Bsal* y, en color, las secuencias de los genes de resistencia a higromicina *Hig(R)* y kanamicina *Kan(R)*, los dos promotores 35S dispuestos en tándem, el gen tóxico *ccdB* y las regiones 5' y 3' de (A) *MIR390a* y (B) *TAS1c*. Los mapas se dibujaron con el programa pDRAW32, a partir de la información depositada en <https://www.addgene.org/51776/> y <https://www.addgene.org/51773/>.

La clonación en estos vectores se llevó a cabo mediante restricción con *Bsal*, que corta el vector a 1 nt de distancia de su diana en una cadena, y a 5 nt en la complementaria; se generan así extremos con secuencias no cohesivas, que impiden la recircularización del vector (Figura 6).





Esta digestión escinde el gen *ccdB*, que es después sustituido por una molécula con extremos 5' sobresalientes, complementarios de los del fragmento de restricción mayor del vector. Se empleó 1 µl de la disolución 0,15 µM de oligonucleótidos hibridados, 0,5 µl de la del vector (unos 50 ng), 2 µl de ligasa de T4 (400 U) y 1 µl de *Bsal* (10 U) y se ajustó la mezcla de reacción a un volumen final de 10 µl con agua.

## **IV.10.- Transformaciones**

### **IV.10.1.- Transformación de células bacterianas**

#### **IV.10.1.1.- Obtención de células quimiocompetentes**

La preparación de células quimiocompetentes se llevó a cabo según se describe en Sambrook y Russell (2001), con las modificaciones que se indican a continuación. Se inocularon cultivos de 200 ml de medio líquido LB con células de *Escherichia coli* DH5α, y se incubaron a 37°C y 225 rpm. Una vez que los cultivos alcanzaron una absorbancia a 600 nm ( $A_{600}$ ) de 0,6-0,8, se enfriaron 5 min en hielo y se centrifugaron a 4°C y 5.000 rpm (5.445 g) durante 10 min. Tras la eliminación del sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 40 ml de tampón TFBI (apartado IV.7.3.4, en la página 15). A continuación, se centrifugó a 4°C y 4.000 rpm (3.485 g) durante 5 min, se decantó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 4 ml de TFBII (apartado IV.7.3.4, en la página 15). Las células preparadas de este modo se distribuyeron en alícuotas de 50 µl, que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

#### **IV.10.1.2.- Obtención de células electrocompetentes**

Para la obtención de células electrocompetentes de la estirpe C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* se preparó un precultivo de 5 ml de medio LB, que se incubó a 28°C y 225 rpm durante toda la noche. A continuación, se inocularon matraces de 200 ml de medio LB sin NaCl con 20 µl del precultivo, que se incubaron a 28°C y 225 rpm. Se midió la  $A_{600}$  cada hora, hasta que alcanzó un valor de 0,8.

El cultivo así obtenido se mantuvo en hielo durante 20 min y se centrifugó a 3.000 rpm (1.960 g) en una centrífuga Avanti J-20 XP (Beckman Coulter) durante 15 min a 4°C. Se decantó el medio de cultivo y se resuspendieron las células en 250 ml de agua. La suspensión fue nuevamente centrifugada a 3.000 rpm durante 15 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y se realizó un lavado con 125 ml de agua. Tras la decantación del sobrenadante, se resuspendieron las células en 5 ml de glicerol al 10% a 4°C. Se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 min a 4°C. El precipitado se resuspendió finalmente

en 3 ml de glicerol al 10% y se distribuyó en alícuotas de 100  $\mu$ l, que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **IV.10.1.3.- Transformación por choque térmico**

Se añadieron de 2 a 3  $\mu$ l de una disolución de ADN plasmídico obtenida de una minipreparación (apartado IV.8.1.1, en la página 16) a un tubo *ependorf* que contenía 50  $\mu$ l de una suspensión de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , y se mantuvo en hielo durante 20 min. El tubo se sometió a continuación a un choque térmico durante 90 s en un baño termostatzado a  $42^{\circ}\text{C}$ , depositándolo después en hielo. Se añadió a continuación 1 ml de medio líquido LB, incubando a 225 rpm y  $37^{\circ}\text{C}$  durante una hora. Finalmente, se centrifugaron los tubos *ependorf* durante 2 min a 3.000 rpm en una microfuga, se eliminó la mayor parte del sobrenadante y se resuspendieron las células en el medio remanente, esparciéndose la suspensión sobre el medio de cultivo sólido suplementado con antibiótico de una placa de Petri que se incubó durante 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### **IV.10.1.4.- Transformación por electroporación**

En la electroporación se usan descargas eléctricas que alteran la estructura de las envolturas celulares bacterianas para facilitar la incorporación de ADN exógeno. Se añadieron 100  $\mu$ l de una suspensión de células de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 electrocompetentes y 0,5  $\mu$ l de una disolución de ADN plasmídico a las cubetas de electroporación previamente enfriadas en hielo. Se usó un Electroporator 2510 (Eppendorf), en el que se programó un pulso de 5 ms y 1.700 V. Tras la electroporación, se añadió 1 ml de medio líquido LB a la suspensión, que se incubó a  $28^{\circ}\text{C}$  y 225 rpm durante 2 h. Para la inoculación de estas células se procedió tal como se indica en el apartado IV.10.1.3, en la página 25, y se incubaron las placas a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 48 h.

#### **IV.10.2.- Transformación de Arabidopsis**

Para la obtención de plantas transgénicas hemos transformado Arabidopsis por infección con *Agrobacterium tumefaciens*. El protocolo empleado es una modificación del que se recoge en <http://www.bch.msu.edu/pamgreen/vac.txt> (Clough y Bent, 1998), que a su vez deriva del de Bechtold y Pelletier (1998).

##### **IV.10.2.1.- Infiltración con *Agrobacterium tumefaciens***

Se sembraron unas 50 semillas de Arabidopsis en macetas cuadradas de polietileno rígido de 10  $\times$  10  $\times$  10 cm (largo  $\times$  ancho  $\times$  alto), en las que permanecieron las plantas

hasta que sus inflorescencias alcanzaron una altura de al menos 10 cm, estado en el que presentan muchos capullos florales sin abrir y muy pocos frutos. Se realizó un precultivo de *Agrobacterium tumefaciens* en 5 ml de medio líquido LB (apartado IV.7.1.1, en la página 13) suplementado con 50 µg/ml de kanamicina y 25 µg/ml de rifampicina, inoculado con bacterias previamente obtenidas en placas de Petri que se habían conservado a 4°C. Tras una incubación de 24 h a 28°C, se tomaron 150-250 µl del precultivo para inocular 250 ml de medio LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina y 25 µg/ml de rifampicina, en un matraz de 1 l. Este cultivo se incubó a 28°C y 225 rpm hasta que su  $A_{600}$  alcanzó un valor de 1,8-2, momento en el que se añadieron 47 µl del detergente Silwett-L77 (OSi Specialties), con el objetivo de facilitar la adhesión de las bacterias a las flores.

La infiltración de las plantas se realizó durante 30 s, por inmersión de sus partes aéreas en la suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* descrita en el párrafo anterior. Las plantas se mantuvieron durante 15 min sobre un papel de filtro, y a continuación fueron enfundadas con bolsas de plástico transparente y transferidas a una cámara de cultivo, en la que permanecieron hasta la recolección de sus semillas. Un día después de la infiltración, las bolsas fueron cortadas por su parte superior para facilitar la aireación de las plantas. Se limitó el riego de estas plantas, procurando que el nivel del agua de subirrigación no superara los 2 cm de altura dentro de la cubeta, para reducir la humedad en las macetas y minimizar así la contaminación por hongos. Las semillas que estas plantas produjeron fueron recolectadas posteriormente y almacenadas a 4°C.

#### **IV.10.2.2.- Selección de transformantes**

Los cultivos se iniciaron en placas de Petri de 15 cm de diámetro, que contenían 100 ml de medio sólido GM suplementado con 15 µg/ml higromicina (apartado IV.7.1.3, en la página 14). Se tomaron 80 mg de semillas (4.000-5.000) de *Arabidopsis* en tubos de 10 ml, que fueron esterilizadas y sembradas con agar de cobertera (apartado IV.6.1.1, en la página 10). El agar de cobertera se suplementó con 15 µg/ml de higromicina.

#### **IV.11.- Análisis bioinformáticos**

El alineamiento de la Figura 7, en la página 27, se realizó con el programa CLUSTAL OMEGA (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; Larkin *et al.*, 2007) y se sombreó con BOXSHADE 3.21 ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)). Para calcular los porcentajes de identidad y semejanza entre secuencias aminoacídicas se usó la opción Ident and Sim de la Sequence Manipulation Suite ([http://www.bioinformatics.org/sms2/ident\\_sim.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html)).

## **V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1.- Análisis genético de los genes *ADK*

#### V.1.1.- Redundancia de *ADK1* y *ADK2*

Dos genes parálogos de *Arabidopsis* codifican proteínas ADK: *ADK1* (At1g09820) y *ADK2* (At5g03300). Estos dos genes son redundantes: sus patrones de expresión son solapantes (Moffatt *et al.*, 2002) y los dobles mutantes *adk1 adk2* son letales embrionarios (Young *et al.*, 2006). Las secuencias de las proteínas ADK1 y ADK2 de *Arabidopsis* presentan de un 92,5% de identidad y un 96,5% de semejanza (Figura 7).

---

ADK1	1	MA-SSD	FDGILLGMGNPLLDV	SAVVD	QCF	LDKYDIKLNNA	ILAEDKHL	PMYDEMS	SOKFNV
ADK2	1	MAS	SNYDGI	LLGMGNPLLDI	SAVVD	DEF	LTKYDIKLNNA	ILAEDKHL	PMYDEMSSKFNV
ADK1	60	EYIAGGATQNS	IKVAQWMLQV	PGATSYMG	SIGKDKYGEAMK	DATAAGVY	VHYYEDEATP		
ADK2	61	EYIAGGATQNS	IKVAQWMLQV	PGATSYMG	SIGKDKYGEAMK	DATAAGVNV	HYYEDESAP		
ADK1	120	TGTCGVCV	IGGERSLI	ANLSAANCYKVE	HLK	KPENWALVEKAKFY	YIAGFFLTVSPESIQ		
ADK2	121	TGTCGVCV	IGGERSLI	ANLSAANCYKVD	HLK	KPENWALVEKAKFY	YIAGFFLTVSPESIQ		
ADK1	180	LVREHAA	ANNKVF	TMNLSAPFICE	FFKDVQEK	CLPYMDYI	FGNETEARTFSRVHGWETDD		
ADK2	181	LVSEHAA	ANNKVF	TMNLSAPFICE	FFKDVQEK	FLPYMDFV	FGNETEARTFSRVHGWETED		
ADK1	240	VEQIAIK	MSQLPKAS	GTYKR	TTVITQCADPVV	VAEDGKVKKY	PVIPLPKEKLVDTNGAGD		
ADK2	241	VEQIAIK	MSQLPKA	IGTYKR	TTVITQCADPVV	VAEDGKVKKY	PVIPLPKEKLVDTNGAGD		
ADK1	300	AFVGGF	LSQLV	EGK	TEECV	RAGCYASN	VVIQ	RS	GCTYPEKPDFN
ADK2	301	AFVGGF	MSQLV	EGKS	TEECV	RAGCYASN	VVIQ	RS	GCTYPEKPDFN

---

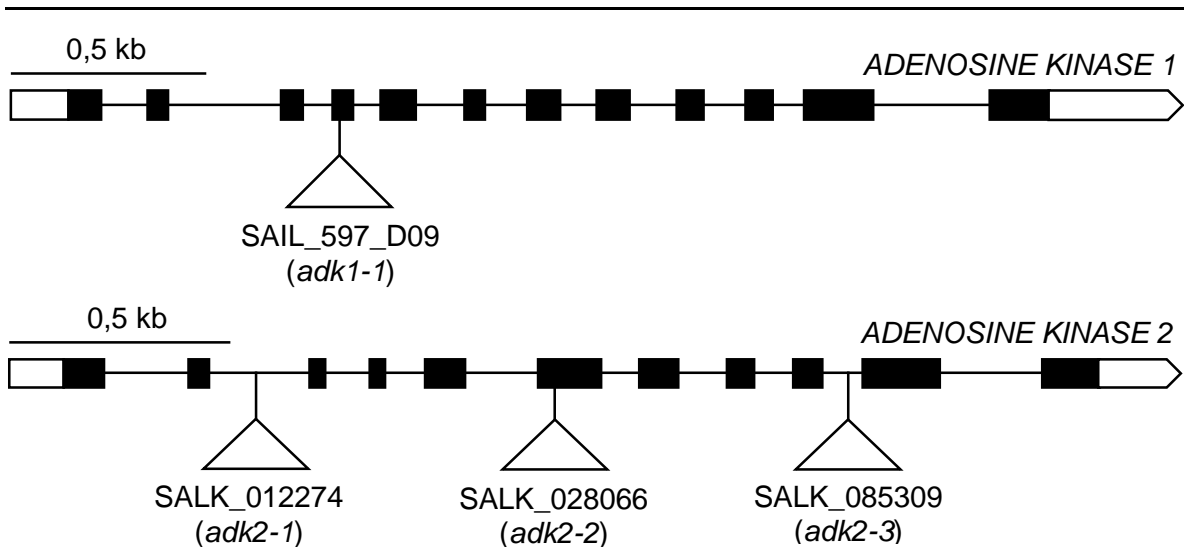
**Figura 7.-** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas ADK1 y ADK2. Los residuos idénticos se han sombreado en negro y los semejantes en gris. Los números indican posiciones en las secuencias. El alineamiento y el sombreado se realizaron según se indica en el apartado IV.11, en la página 26.

---

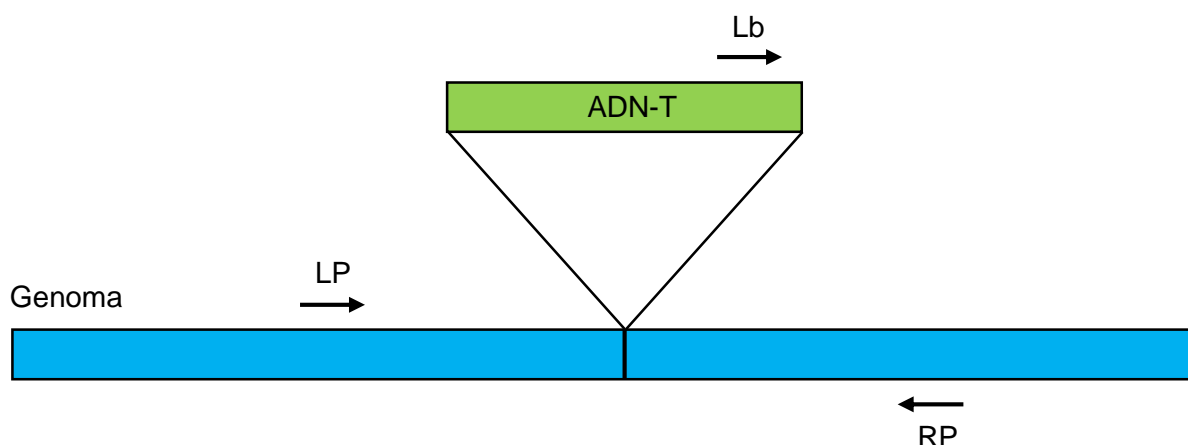
#### V.1.2.- Obtención de mutaciones *adk1* y *adk2* y estudio de sus interacciones genéticas

Hemos obtenido las líneas de dominio público SAIL\_597\_D09, SALK\_012274, SALK\_028066 y SALK\_085309, portadoras de inserciones de ADN-T en los genes *ADK1* y *ADK2*, a las que hemos denominado *adk1-1*, *adk2-1*, *adk2-2* y *adk2-3*, respectivamente (Figura 8, en la página 28). Para confirmar la presencia de las inserciones de ADN-T se emplearon dos cebadores específicos del gen de interés (LP y RP; Figura 9, en la página 28) y otro que hibrida con un extremo del ADN-T (Lb). Se realizaron dos amplificaciones independientes, con las parejas de oligonucleótidos LP + RP y Lb + RP. Con esta estrategia

se estableció si las plantas eran homocigóticas o heterocigóticas para una determinada inserción (Figura 9). El cebador interno Lb empleado fue LbB1.3 o LB1 para las líneas de las colecciones SALK y SAIL, respectivamente (Tabla 2, en la página 17). Todas las plantas homocigóticas para las mutaciones *adk* fueron indistinguibles del tipo silvestre Col-0 (Figura 10, en la página 29).

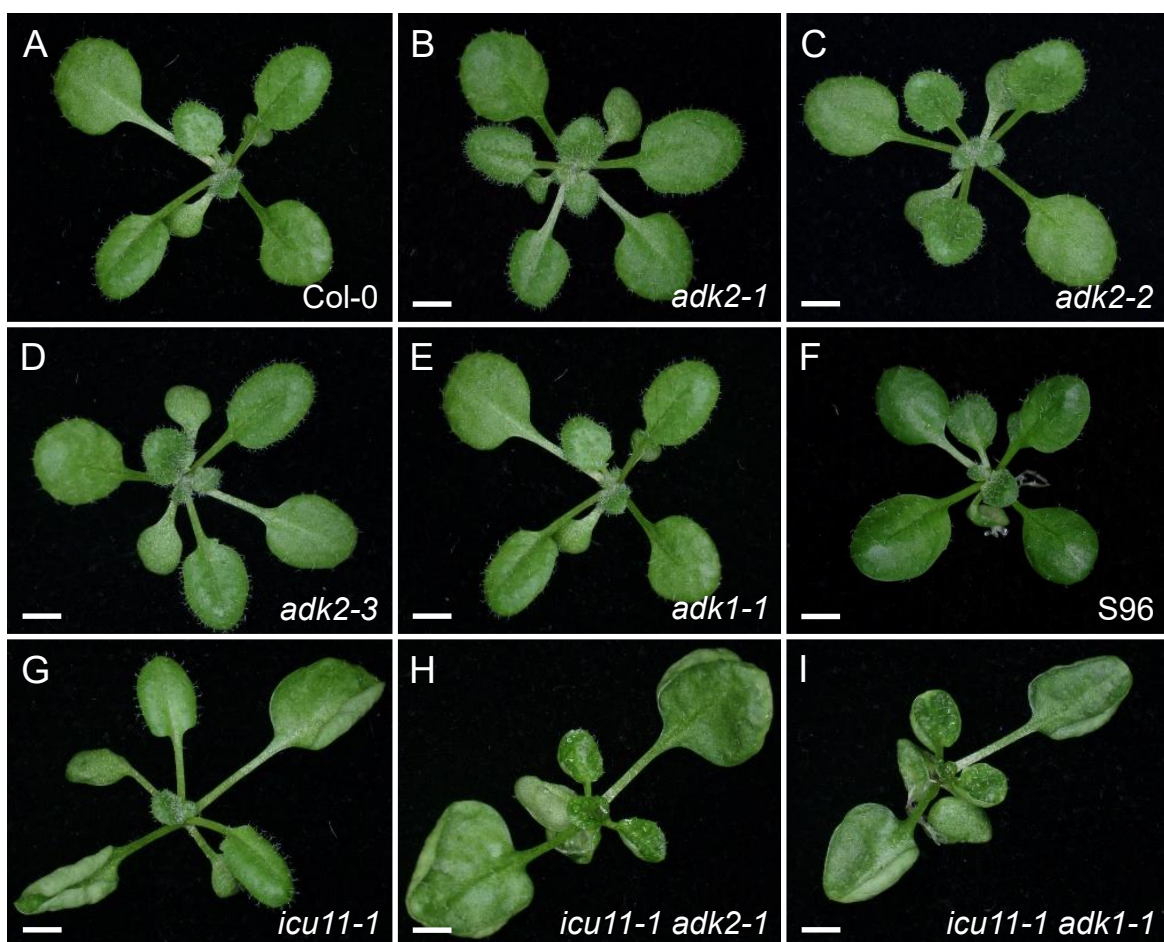


**Figura 8.-** Estructura de las unidades de transcripción de los genes *ADK1* y *ADK2*, con indicación de las inserciones de sus alelos mutantes. Los exones e intrones están representados por rectángulos y líneas, respectivamente. Se destacan en blanco las regiones 5' y 3' no traducidas. Los triángulos indican inserciones de ADN-T.



**Figura 9.-** Posiciones relativas de los cebadores empleados para el genotipado mediante PCR de inserciones de ADN-T en los genes a estudio. El triángulo representa una inserción de ADN-T en el genoma de Arabidopsis, y las flechas, los cebadores empleados para su detección, que no están representados a escala. Modificado a partir de <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>.

Con el fin de estudiar las eventuales interacciones genéticas de *ADK1* y *ADK2* con *ICU11*, realizamos cruzamientos entre plantas portadoras de un alelo nulo del gen *ICU11*, *icu11-1*, y de mutaciones insercionales *adk1* y *adk2*. Se genotiparon mediante PCR 20 plantas de la F<sub>2</sub> de cada cruzamiento, empleando para ello los cebadores indicados en la Tabla 2, en la página 17. Se aislaron 11 plantas *icu11-1 adk1-1*, 5 *icu11-1 adk2-1*, 7 *icu11-1 adk2-2* y 8 *icu11-1 adk2-3*. Estos dobles mutantes fueron en todos los casos indistinguibles de las plantas parentales *icu11-1* (Figura 10).



**Figura 10.-** Morfología foliar de los mutantes *adk* e *icu11-1 adk*. Rosetas de (A, F) las estirpes silvestres (A) Col-0 y (F) S96, (B-E, G) los mutantes simples (B) *adk2-1*, (C) *adk2-2*, (D) *adk2-3*, (E) *adk1-1* y (G) *icu11-1*, y (H, I) los dobles mutantes (H) *icu11-1 adk2-1* e (I) *icu11-1 adk1-1*. Las barras de escala indican 2 mm. Las fotografías se tomaron 14 dde.

### V.1.3.- Cosilenciamiento de *ADK1* y *ADK2*

Existen varios procedimientos para generar plantas transgénicas en las que se inhiba simultáneamente la expresión de varios genes parálogos (Alvarez *et al.*, 2006;

Schwab *et al.*, 2006; Jover-Gil *et al.*, 2014). Estos procedimientos se basan en el uso de ARNpi o miARN y producen una colección de líneas transgénicas que manifiestan diferentes grados de silenciamiento postranscripcional de los genes diana, que resultan especialmente convenientes cuando la ausencia de la función de los genes diana es letal. Hemos usado el método descrito en el apartado IV.9, en la página 21, para estudiar los efectos de la pérdida de función parcial y simultánea de los genes *ADK1* y *ADK2* sobre el fenotipo de *icu11-1*, diseñando y construyendo para ello el transgén *amiR-ADK1/ADK2*.

Hemos utilizado la aplicación informática Plant Small RNA Maker Site (P-SAMS; <http://p-sams.carringtonlab.org/>; Fahlgren *et al.*, 2016), sin modificar sus opciones por defecto, para el diseño de oligonucleótidos que al hibridar formen una molécula bicatenaria con extremos sobresalientes 5', para su clonación en pMDC32B-AtMIR390a-B/c. Tras introducir el código del gen que se desea silenciar y la especie a la que pertenece, P-SAMS genera diferentes oligonucleótidos candidatos, ordenados por su especificidad de unión a su diana. Las secuencias de los oligonucleótidos que hemos seleccionado se indican en la Tabla 2, en la página 17. Dichos oligonucleótidos fueron sintetizados, hibridados y clonados según se explica en los apartados IV.8.2.1 y IV.9, en las páginas 16 y 21, respectivamente.

Se transformaron células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (apartado IV.10.1.1, en la página 24) con los productos de clonación obtenidos según se indica en el párrafo anterior. Se seleccionaron colonias transformantes Kan<sup>R</sup>, presuntamente portadoras del transgén *amiR-ADK1/ADK2*, cuya secuencia se comprobó por el método de Sanger (apartado IV.8.4.1, en la página 20), con los cebadores attB\_F/R (Tabla 2, en la página 17). La construcción *amiR-ADK1/ADK2* fue transferida a células de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1, para infectar por infiltración (apartados IV.10.2 y IV.10.1.4, en la página 25) plantas Col-0 e *icu11-1*. Se seleccionaron 39 y 15 presuntos transformantes T<sub>1</sub> Hig<sup>R</sup>, descendientes de plantas Col-0 e *icu11-1*, respectivamente. El análisis de la progenie T<sub>2</sub> de estas plantas *amiR-ADK1/ADK2* e *icu11-1 amiR-ADK1/ADK2* se realizará más adelante en el laboratorio de J.L. Micol. Esperamos que el cosilenciamiento parcial de *ADK1* y *ADK2* cause un fenotipo viable, que pueda ser estudiado tanto en ausencia como en presencia de la mutación *icu11-1*.

También hemos diseñado, construido y transferido a plantas transgenes productores de sin-tasiARN, para inhibir simultáneamente varios genes no homólogos (Figura 6, en la página 25): se diseñaron, sintetizaron, hibridaron y clonaron oligonucleótidos para la obtención del transgén *sin-tasiR-ICU11/ADK1/ADK2*. Finalmente, se infectaron plantas Col-0 y se seleccionaron 42 plantas transformantes T<sub>1</sub> Hig<sup>R</sup>, presuntamente portadoras del transgén. El análisis de la progenie T<sub>2</sub> de estas líneas *sin-*

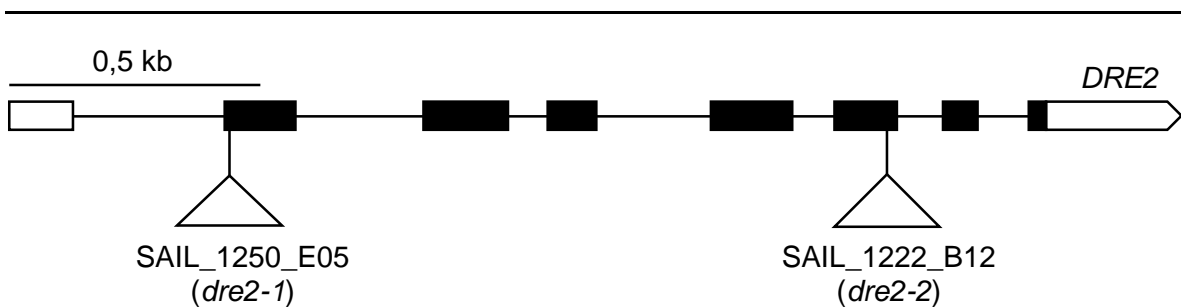


*tasIR-ICU11/ADK1/ADK2*, en las que esperamos que se inhiba parcialmente la expresión de *ICU11*, *ADK1* y *ADK2*, causando un fenotipo viable, se realizará más adelante.

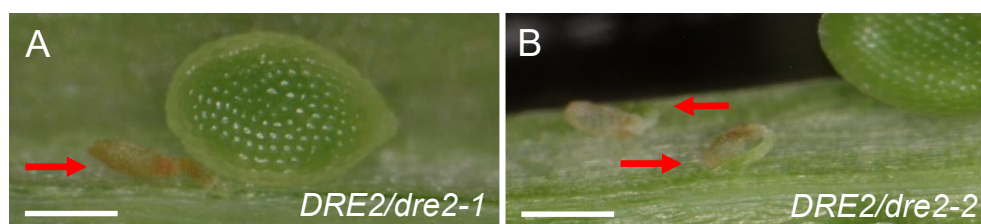
## V.2.- Análisis genético del gen *DRE2*

### V.2.1.- Obtención de alelos *dre2* y estudio de sus interacciones genéticas

El gen *DRE2* (At5g8400) codifica una proteína esencial que contiene grupos hierro-zufre (Fe-S; con grupos sulfuro unidos a 2-4 átomos de hierro en diferentes estados de oxidación). Se ha demostrado en *Arabidopsis* que *DRE2* está relacionado con la metilación del ADN y la regulación de la transcripción durante la embriogénesis (Buzas *et al.*, 2014). Aunque su estructura tridimensional es similar a la de las metiltransferasas dependientes de la SAM, carece de esta actividad: puede unirse a la SAM, pero no la cataboliza (Soler *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2014). Hemos obtenido las líneas de dominio público SAIL\_1250\_E05 y SAIL\_1222\_B12, portadoras de inserciones de ADN-T en el gen *DRE2*, a las que hemos denominado *dre2-1* y *dre2-2*, respectivamente (Figura 11).



**Figura 11.-** Estructura de la unidad de transcripción del gen *DRE2*, con indicación de las inserciones de sus alelos mutantes. Se siguen las pautas definidas para la Figura 8, en la página 28.

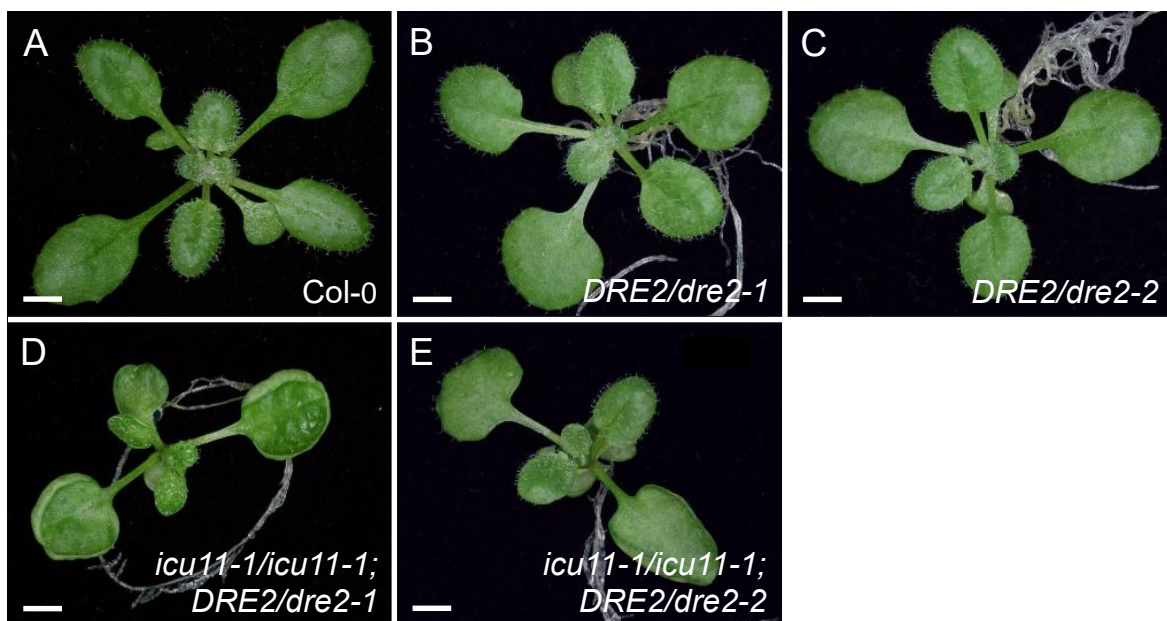


**Figura 12.-** Embriones aberrantes en silicuas de plantas (A) *DRE2/dre2-1* y (B) *DRE2/dre2-2*. Las flechas rojas señalan embriones aberrantes, probablemente homocigóticos para las mutaciones a estudio. Las barras de escala indican 0,2 mm.

Se intentó confirmar la presencia de las inserciones mencionadas en el párrafo anterior según se indica en el apartado V.1.2, en la página 27, no hallándose plantas

homocigóticas, aunque sí heterocigóticas, para ninguna de ellas. Sospechando que estos alelos presuntamente nulos pudieran ser letales embrionarios recesivos, diseccionamos 10 silicuas de 5 plantas *DRE2/dre2-1*, *DRE2/dre2-2* y Col-0, encontrando 20,3, 25,2 y 3,3%, respectivamente, de semillas arrugadas, marrones y mucho menores que las normales (Figura 12, en la página 31). Hemos supuesto que estas semillas con desarrollo aparentemente interrumpido son *dre2-1/dre2-1* o *dre2-2/dre2-2*.

Para estudiar las eventuales interacciones genéticas entre *DRE2* e *ICU11*, realizamos cruzamientos *icu11-1/icu11-1* × *DRE2/dre2*. Se genotiparon mediante PCR 20 plantas F<sub>2</sub> derivadas de estos cruzamientos, empleando los cebadores que se indican en la Tabla 2, en la página 17. Se identificaron así 5 sesquimutantes *icu11-1/icu11-1;DRE2/dre2-1* y 4 *icu11-1/icu11-1;DRE2/dre2-2*, indistinguibles de su línea parental *icu11-1/icu11-1* (Figura 13).



**Figura 13.-** Morfología foliar de plantas *DRE2/dre2* e *icu11-1/icu11-1;DRE2/dre2*. Rosetas de (A) el tipo silvestre Col-0, (B, C) los heterocigotos (B) *DRE2/dre2-1*, (C) *DRE2/dre2-2*, y (D, E) los sesquimutantes (D) *icu11-1/icu11-1;DRE2/dre2-1* y (E) *icu11-1/icu11-1;DRE2/dre2-2*. Las barras de escala indican 2 mm. Las fotografías se tomaron 14 dde.

### V.2.2.- Cosilenciamiento de *ICU11* y *DRE2*

Con el fin de estudiar los posibles efectos de la pérdida de función parcial del gen *DRE2* sobre el fenotipo de *icu11-1*, construimos transgenes productores de amiARN. Se siguió el procedimiento descrito en el apartado V.1.3, en la página 29, y se usaron los oligonucleótidos indicados en la Tabla 2, en la página 17, para obtener el transgén *amiR-*

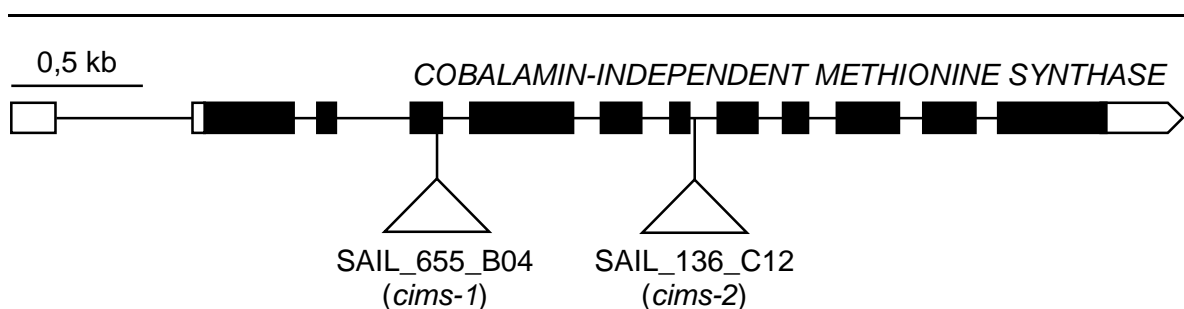
*DRE2*. Se seleccionaron 2 y 3 plantas T<sub>1</sub> Hig<sup>R</sup>, presuntamente portadoras del transgén *amiR-DRE2* en fondos Col-0 e *icu11-1*, respectivamente. El análisis del fenotipo de estas plantas se realizará más adelante. Esperamos que la inhibición parcial de la expresión de *DRE2* y la ausencia de la función de *ICU11* causen un fenotipo viable.

También hemos obtenido transgenes productores de sin-tasiARN, a fin de inhibir simultáneamente varios genes no homólogos. Se diseñaron, sintetizaron, hibridaron y clonaron oligonucleótidos (Tabla 2, en la página 17) para la construcción del transgén *sin-tasiR-ICU11/DRE2*, según se describe en el apartado V.1.3, en la página 29. Se infectaron plantas Col-0 y se seleccionaron 85 descendientes T<sub>1</sub> Hig<sup>R</sup>, presuntamente portadores del transgén *sin-tasiR-ICU11/DRE2*. El análisis del fenotipo de estas plantas se llevará a cabo más adelante. Esperamos que se inhiba parcialmente la expresión de *ICU11* y *DRE2*, causando un fenotipo viable que pueda ser estudiado.

### V.3.- Análisis genético del gen *CIMS*

#### V.3.1.- Obtención de alelos *cims* y estudio de sus interacciones genéticas

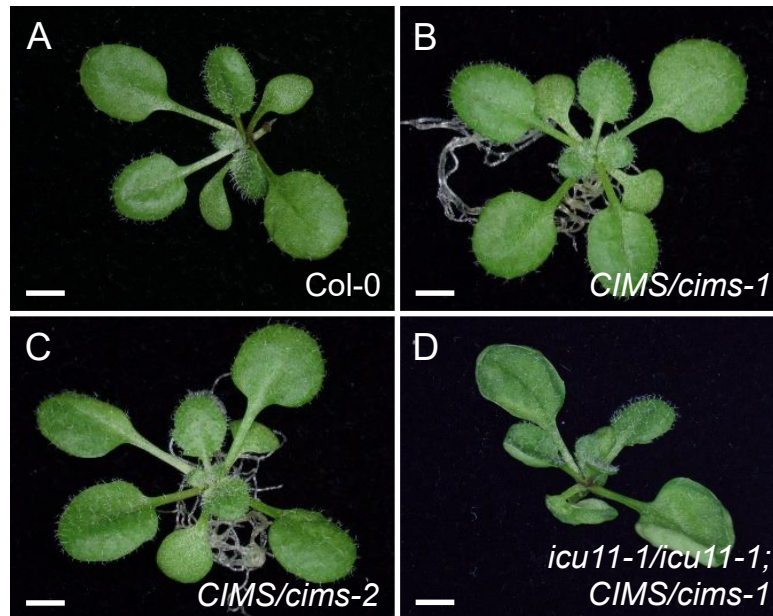
El gen *CIMS* (At5g18400) no ha sido estudiado anteriormente en *Arabidopsis* y codifica una enzima implicada en la regeneración de la L-metionina en el ciclo de la SAM (Figura 2, en la página 4). Hemos obtenido las líneas de dominio público SAIL\_655\_B04 y SAIL\_136\_C12, portadoras de inserciones de ADN-T en el gen *CIMS*, a las que hemos denominado *cims-1* y *cims-2*, respectivamente (Figura 14).



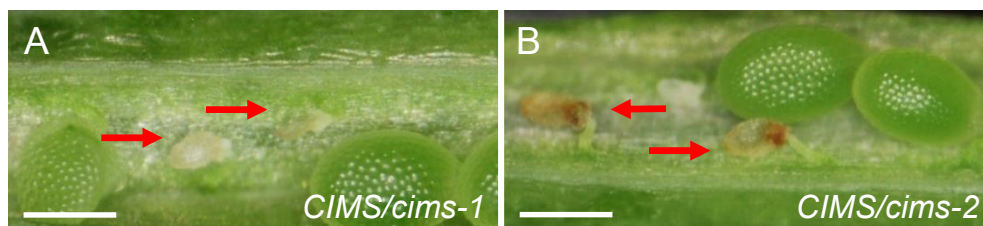
**Figura 14.-** Estructura de la unidad de transcripción del gen *CIMS*, con indicación de las inserciones de sus alelos mutantes. Se siguen las pautas definidas para la Figura 8, en la página 28.

Se intentó verificar la presencia de las inserciones en las líneas SAIL\_655\_B04 y SAIL\_136\_C12, según se indica en el apartado V.1.1, en la página 27, pero no se identificaron homocigotos para *cims-1* o *cims-2*. Las plantas *CIMS/cims-1* y *CIMS/cims-2* resultaron indistinguibles de Col-0 (Figura 15). Para establecer la eventual letalidad embrionaria de las mutaciones a estudio, se diseccionaron 10 silicuas de 5 plantas

*CIMS/cims-1*, *CIMS/cims-2* y Col-0, encontrando 21,4, 17,2 y 3,3%, respectivamente, de semillas arrugadas y más pequeñas que las normales, que son probablemente homocigóticas para las mutaciones *cims* (Figura 16).



**Figura 15.-** Morfología foliar de plantas *CIMS/cims* e *icu11-1/icu11-1;CIMS/cims*. Rosetas de (A) el tipo silvestre Col-0, (B, C) los heterocigotos (B) *CIMS/cims-1*, (C) *CIMS/cims-2*, y (D) el sesquimutante *icu11-1/icu11-1;CIMS/cims-1*. Las barras de escala indican 2 mm. Las fotografías se tomaron 14 dde.



**Figura 16.-** Embriones aberrantes en silicuas de plantas (A) *CIMS/cims-1* y (B) *CIMS/cims-2*. Las flechas rojas señalan embriones aberrantes, probablemente homocigóticos para las mutaciones a estudio. Las barras de escala indican 0,2 mm.

Para establecer la eventual existencia de interacciones genéticas entre *CIMS* e *ICU11*, se identificaron sesquimutantes en la progenie  $F_2$  de cruzamientos *icu11-1/icu11-1*  $\times$  *CIMS/cims*. Se genotiparon mediante PCR 20 plantas  $F_2$ , empleando los cebadores que se indican en la Tabla 2, en la página 17. Se identificaron así 3 sesquimutantes *icu11-*

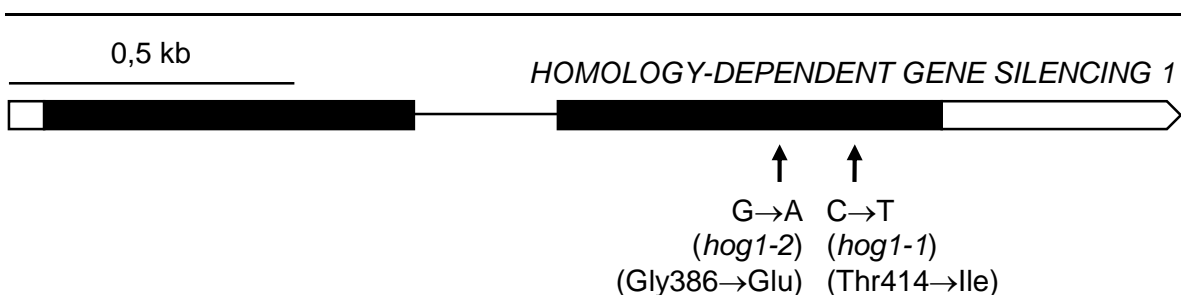
1/*icu11-1*;CIMS/*cims-1* y 4 *icu11-1*/*icu11-1*;CIMS/*cims-2*, todos ellos indistinguibles de su línea parental *icu11-1*/*icu11-1* (Figura 15, en la página 34).

### V.3.2.- Cosilenciamiento de *ICU11* y *CIMS*

Hemos construido el transgén *amiR-CIMS* para estudiar los eventuales efectos de la pérdida de función del gen *CIMS* sobre el fenotipo de *icu11-1*. Se siguió el procedimiento descrito en el apartado V.1.3, en la página 29, y se usaron los oligonucleótidos indicado en la Tabla 2, en la página 17. Se seleccionaron 2 plantas T<sub>1</sub> Hig<sup>R</sup>. El análisis del fenotipo de su progenie T<sub>2</sub> se realizará más adelante. No se obtuvo ningún transformante T<sub>1</sub> derivado de la transformación de *icu11-1* con *amiR-CIMS*.

### V.4.- Análisis genético del gen *HOG1*: obtención de alelos *hog1* y estudio de sus interacciones genéticas

El gen *SAHH1* (At4g13940), también denominado *HOG1*, codifica la SAH HIDROLASE 1, que cataliza la hidrólisis de SAH, una de las etapas del ciclo de la SAM (Figura 2, en la página 4). *SAHH1* no es uno de los interactores de *ICU11* identificados en el escrutinio basado en el ensayo del doble híbrido de la levadura realizado en el laboratorio de J.L. Micol. Sin embargo, hemos estudiado las eventuales interacciones genéticas entre *ICU11* y *SAHH1*, dado que se ha descrito la participación de *HOG1* en la metilación del ADN y las histonas (Rocha *et al.*, 2005; Baubec *et al.*, 2010).



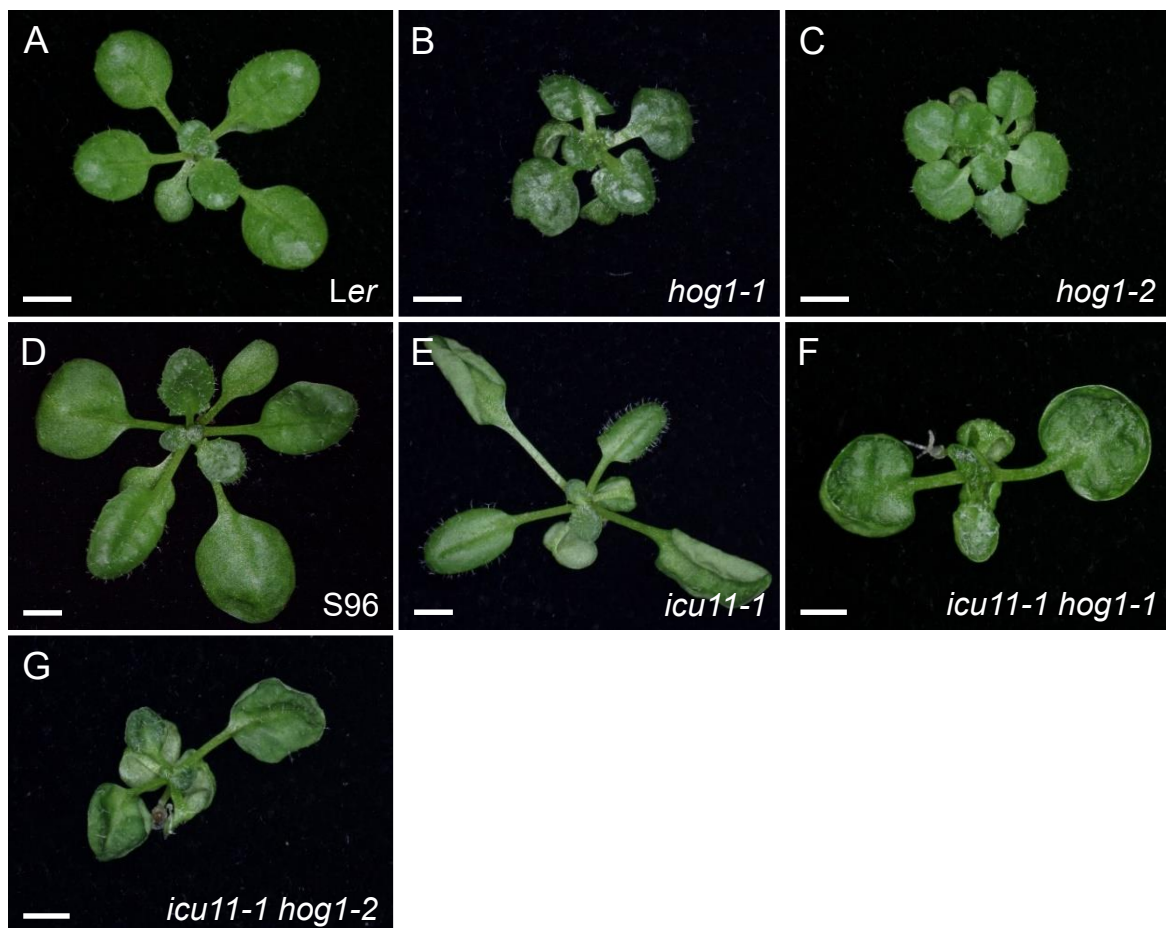
**Figura 17.-** Estructura de la unidad de transcripción del gen *HOG1*, con indicación de las mutaciones puntuales de sus alelos. Se siguen las pautas definidas para la Figura 8, en la página 28.

Hemos obtenido las líneas *hog1-1* y *hog1-2* (Rocha *et al.*, 2005), portadoras de mutaciones puntuales en el gen *HOG1* (Figura 17). La secuenciación del gen *HOG1* de estas líneas, por el método de Sanger y empleando como cebadores los oligonucleóticos indicados en la Tabla 2, en la página 17, confirmó la presencia de sendas transiciones

C→T y G→A en *hog1-1* y *hog1-2*, respectivamente, que presuntamente causan las sustituciones Gly386→Glu y Thr414→Ile.

Todas las plantas homocigóticas para los alelos mutantes de *HOG1* presentaron rasgos fenotípicos similares: peciolo acortados, irregularidades en la superficie del limbo y crecimiento retrasado respecto a su tipo silvestre *Ler* (Figura 18).

Para estudiar las eventuales interacciones genéticas entre *HOG1* e *ICU11*, cruzamos *icu11-1* por *hog1-1* y *hog1-2*. Se genotiparon 18 plantas F<sub>2</sub> derivadas de cada cruzamiento mediante secuenciación y se identificaron 6 plantas *icu11-1 hog1-1* y 2 *icu11-1 hog1-2*. Estos dobles mutantes manifestaron de manera aparentemente aditiva los rasgos fenotípicos de sus líneas parentales, sin apreciarse ningún efecto de supresión o sinergia, lo que sugiere que no existe relación funcional entre *ICU11* y *HOG1* (Figura 18).



**Figura 18.-** Morfología foliar de los mutantes *hog1* e *icu11-1 hog1*. Rosetas de (A, D) los tipos silvestres (A) *Ler* y (D) *S96*, (B, C, E) los mutantes simples (B) *hog1-1*, (C) *hog1-2*, (E) *icu11-1*, y (F, G) los dobles mutantes (F) *icu11-1 hog1-1* y (G) *icu11-1 hog1-2*. Las barras de escala indican 2 mm. Las fotografías se tomaron 14 dde.

## **VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA**



## VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

En este TFG hemos intentado contribuir a la comprensión de la relación funcional entre la proteína ICU11 y algunas enzimas del ciclo de la S-adenosil-L-metionina (SAM). Las proteínas ADK2, CIMS y DRE2 fueron identificadas en una búsqueda de interactores de ICU11, basada en el ensayo del doble híbrido de la levadura, que se realizó previamente en el laboratorio de J.L. Micol; el principal objetivo de este TFG fue verificar, mediante un abordaje genético, algunos de los resultados de dicho escrutinio de interactores físicos. Más concretamente, hemos intentado confirmar en dobles mutantes y plantas transgénicas que *ICU11* está relacionado funcionalmente con *ADK1*, *ADK2*, *HOG1*, *DRE2* y *CIMS*.

Hemos comprobado que los dobles mutantes *icu11-1 adk1-1*, *icu11-1 adk2-1*, *icu11-1 adk2-2* e *icu11-1 adk2-3* son indistinguibles de *icu11-1*. Este resultado no conduce a conclusión alguna, dado que las plantas *adk1* y *adk2* son fenotípicamente silvestres, probablemente por la redundancia entre las mutaciones *adk1* y *adk2*, tal como demuestra la letalidad de los dobles mutantes *adk1 adk2*. Sobre la eventual existencia de relaciones funcionales entre los genes *ICU11*, *ADK1* y *ADK2* se podrán derivar conclusiones del estudio de las líneas *amiR-ADK1/ADK2*, *icu11-1 amiR-ADK1/ADK2* y *sin-tasiR-ICU11/ADK1/ADK2* que hemos obtenido. En efecto, esperamos que estas líneas transgénicas sean viables —y en consecuencia puedan ser estudiadas— al producirse un cosilenciamiento parcial de *ADK1* y *ADK2*, que se combinará con la ausencia total (en las plantas *icu11-1 amiR-ADK1/ADK2*) o parcial (en las *sin-tasiR-ICU11/ADK1/ADK2*) de la función de *ICU11*. La duración del proceso que partiendo del diseño y construcción de los transgenes conduce a la caracterización de la generación T<sub>2</sub> de las líneas transgénicas que los contienen excede los propósitos de un TFG. Estas líneas serán estudiadas más adelante en el laboratorio de J.L. Micol.

Hemos demostrado la letalidad embrionaria de los alelos presuntamente nulos *dre2-1* y *dre2-2* del gen *DRE2*. Como consecuencia de dicha letalidad, nos propusimos dos abordajes experimentales al análisis genético de la relación funcional entre *ICU11* y *DRE2*: el estudio del fenotipo de sesquimutantes *icu11-1/icu11-1;DRE2/dre2* y de plantas transgénicas T<sub>2</sub> *amiR-DRE2*, *icu11-1 amiR-DRE2* y *sin-tasiR-ICU11/DRE2*. Los sesquimutantes que hemos obtenido son indistinguibles del mutante simple *icu11-1*, un resultado poco concluyente. Hemos obtenido plantas transgénicas T<sub>1</sub> de los tres genotipos mencionados, cuya progenie T<sub>2</sub> será estudiada más adelante.

También hemos demostrado la letalidad embrionaria de los alelos presuntamente nulos *cims-1* y *cims-2* del gen *CIMS*, que el fenotipo de las plantas *CIMS/cims* es silvestre



y que los sequimutantes *icu11-1/icu11-1;CIMS/cims* son indistinguibles de los mutantes simples *icu11-1/icu11-1*. Hemos obtenido plantas transgénicas T<sub>1</sub> *amiR-CIMS*, cuya progenie T<sub>2</sub> será estudiada más adelante, a la vez que cruzada por *icu11-1*, a fin de obtener y caracterizar líneas *icu11-1 amiR-CIMS*. También se intentará más adelante la obtención de plantas *sin-tasiR-ICU11/CIMS*.

Por último, hemos obtenido y estudiado los dobles mutantes *icu11-1 hog1-1* e *icu11-1 hog1-2*, cuyos fenotipos resultaron ser aditivos, resultado que sugiere la inexistencia de relación funcional entre *ICU11* y *HOG1*.

En resumen, hemos obtenido evidencias genéticas de la inexistencia de relación funcional entre *ICU11* y *HOG1*; también hemos obtenido líneas transgénicas que permitirán en el plazo de unos meses llegar a conclusiones al respecto de la eventual relación entre la función de *ICU11* y las de *ADK1*, *ADK2*, *DRE2* y *CIMS*.

## **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.
- 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., Risseeuw, 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.
- Alvarez, J.P., Pekker, I., Goldshmidt, A., Blum, E., Amsellem, Z., y Eshed, Y. (2006). Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell* **18**, 1134-1151.
- Baubec, T., Dinh, H.Q., Pecinka, A., Rakic, B., Rozhon, W., Wohlrab, B., von Haeseler, A., y Mittelsten Scheid, O. (2010). Cooperation of multiple chromatin modifications can generate unanticipated stability of epigenetic states in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 34-47.
- Bechtold, N., y Pelletier, G. (1998). *In planta Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods in Molecular Biology* **82**, 259-266.
- Ben-Ari, G. (2012). The ABA signal transduction mechanism in commercial crops: learning from *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* **31**, 1357-1369.
- 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.
- Bernard, P., y Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology* **226**, 735-745.
- Bolker, J.A. (1995). Model systems in developmental biology. *Bioessays* **17**, 451-455.
- Bottiglieri, T. (2002). S-Adenosyl-L-methionine (SAME): from the bench to the bedside—molecular basis of a pleiotrophic molecule. *American Journal of Clinical Nutrition* **76**, 1151-1157.
- Bourras, S., Rouxel, T., y Meyer, M. (2015). *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: how a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. *Phytopathology* **105**, 1288-1301.
- Brand, L., Hörler, M., Nüesch, E., Vassalli, S., Barrell, P., Yang, W., Jefferson, R.A., Grossniklaus, U., y Curtis, M.D. (2006). A versatile and reliable two-component system for tissue-specific gene induction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **141**, 1194-1204.
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., y Schlattner, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International Journal of Molecular Sciences* **10**, 2763-2788.
- Buzas, D.M., Nakamura, M., y Kinoshita, T. (2014). Epigenetic role for the conserved Fe-S cluster biogenesis protein AtDRE2 in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **111**, 13565-13570.
- Cabrero, C., Puerta, J., y Alemany, S. (1987). Purification and comparison of two forms of S-adenosyl-L-methionine synthetase from rat liver. *European Journal of Biochemistry* **170**, 299-304.
- Candela Antón, H. (2001). Análisis genético de la formación del patrón de venación de la hoja en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Cantoni, G. (1952). The nature of the active methyl donor formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate. *Journal of the American Chemical Society* **74**, 2942-2943.

- Carbonell, A., Takeda, A., Fahlgren, N., Johnson, S.C., Cuperus, J.T., y Carrington, J.C. (2014). New generation of artificial MicroRNA and synthetic trans-acting small interfering RNA vectors for efficient gene silencing in Arabidopsis. *Plant Physiology* **165**, 15-29.
- Carbonell, A., y Daròs, J.A. (2017). Artificial microRNAs and synthetic *trans*-acting small interfering RNAs interfere with viroid infection. *Molecular Plant Pathology* **18**, 746-753.
- Castel, S.E., y Martienssen, R.A. (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews Genetics* **14**, 100-112.
- Clough, S.J., y Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**, 735-743.
- Cuperus, J.T., Fahlgren, N., y Carrington, J.C. (2011). Evolution and functional diversification of *MIRNA* genes. *Plant Cell* **23**, 431-442.
- Curtis, M.D., y Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* **133**, 462-469.
- Chattopadhyay, M.K., Ghosh, A.K., y Sengupta, S. (1991). Control of methionine biosynthesis in *Escherichia coli* K12: a closer study with analogue-resistant mutants. *Journal of General Microbiology* **137**, 685-691.
- Chiang, P.K., Gordon, R.K., Tal, J., Zeng, G.C., Doctor, B.P., Pardhasaradhi, K., y McCann, P.P. (1996). S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB Journal* **10**, 471-480.
- Chilton, M.D., Drummond, M.H., Merio, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P., y Nester, E.W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* **11**, 263-271.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B. (1983). A plant miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **4**, 19-21.
- Esteve Bruna, D. (2013). Caracterización de mutantes que manifiestan perturbaciones locales en el desarrollo de los tejidos internos de la hoja de Arabidopsis. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Fahlgren, N., Hill, S.T., Carrington, J.C., y Carbonell, A. (2016). P-SAMS: a web site for plant artificial microRNA and synthetic trans-acting small interfering RNA design. *Bioinformatics* **32**, 157-158.
- Ferrández Ayela, A. (2012). Caracterización genética y molecular de los mutantes *transcurvata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Fields, S., y Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F.A., y Pillai, R.S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current Opinion in Structural Biology* **15**, 331-341.
- Finkelstein, J.D., y Martin, J.J. (2000). Homocysteine. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **32**, 385-389.
- Fukudome, A., y Fukuhara, T. (2017). Plant dicer-like proteins: double-stranded RNA-cleaving enzymes for small RNA biogenesis. *Journal of Plant Research* **130**, 33-44.
- Jover-Gil, S., Paz-Ares, J., Micol, J.L., y Ponce, M.R. (2014). Multi-gene silencing in Arabidopsis: a collection of artificial microRNAs targeting groups of paralogs encoding transcription factors. *Plant Journal* **80**, 149-160.
- Juan Vicente, L. (2016). Obtención de transgenes para el análisis funcional de los genes *CP3* (*CUPULIFORMIS3*), *CP4* y *CP5* en Arabidopsis. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Juan Vicente, L. (2017). Caracterización funcional de los genes *CP3*, *CP4* y *CP5* de Arabidopsis. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1987). Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service* **24**.

- Laibach, F. (1943). *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Als Objekt für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen. *Botanisches Archiv* **44**.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., y Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Lee, L.Y., y Gelvin, S.B. (2008). T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiology* **146**, 325-332.
- Mateo-Bonmatí, E., Esteve-Bruna, D., Juan-Vicente, L., Nadi, R., Candela, H., Lozano, F.M., Pone, 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* doi: 10.1105/tpc.18.00300
- Meinke, D., y Koornneef, M. (1997). Community standards for *Arabidopsis* genetics. *Plant Journal* **12**, 247-253.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D., y Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* **282**, 679-682.
- Meyerowitz, E.M. (1987). *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Genetics* **21**, 93-111.
- Micol Ponce, R. (2017). Análisis de la contribución de los genes *MAS2*, *SMO4* y *RRP7* al metabolismo del ARN ribosómico en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Moffatt, B.A., Wang, L., Allen, M.S., Stevens, Y.Y., Qin, W., Snider, J., y von Schwartzberg, K. (2000). Adenosine kinase of *Arabidopsis*. Kinetic properties and gene expression. *Plant Physiology* **124**, 1775-1785.
- Moffatt, B.A., Stevens, Y.Y., Allen, M.S., Snider, J.D., Pereira, L.A., Todorova, M.I., Summers, P.S., Weretilnyk, E.A., Martin-McCaffrey, L., y Wagner, C. (2002). Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. *Plant Physiology* **128**, 812-821.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Navarro Quiles, C. (2015). Obtención de transgenes para el análisis funcional de los genes *DEN3*, *DEN7* y *DEN9* en *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Navarro Quiles, C. (2016). El gen *APICULATA7* contribuye a la dorsoventralidad foliar en *Arabidopsis*. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Niu, Q.W., Lin, S.S., Reyes, J.L., Chen, K.C., Wu, H.W., Yeh, S.D., y Chua, N.H. (2006). Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nature Biotechnology* **24**, 1420-1428.
- Page, D.R., y Grossniklaus, U. (2002). The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* **3**, 124-136.
- Pérez Pérez, J.M. (2003). Caracterización genética y molecular de los mutantes *ultracurvata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Pitzschke, A., y Hirt, H. (2010). New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *EMBO Journal* **29**, 1021-1032.
- Ponce Molet, M.R. (1996). Aislamiento y caracterización molecular de genes de la superfamilia del TGF-beta que se expresan en el embrión de *Strogylocentrotus purpuratus*. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante.
- Provart, N.J., Alonso, J., Assmann, S.M., Bergmann, D., Brady, S.M., Brkljacic, J., Browse, J., Chapple, C., Colot, V., Cutler, S., Dangl, J., Ehrhardt, D., Friesner, J.D., Frommer, W.B., Grotewold, E., Meyerowitz, E., Nemhauser, J., Nordborg, M., Pikaard, C., Shanklin, J., Somerville, C., Stitt, M., Torii, K.U., Waese, J., Wagner, D., y McCourt, P. (2016). 50 years of *Arabidopsis* research: highlights and future directions. *New Phytologist* **209**, 921-944.

- Quesada Pérez, V.M. (1999). Aislamiento y caracterización molecular de mutantes halotolerantes en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Ravanel, S., Gakiere, B., Job, D., y Douce, R. (1998). The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 7805-7812.
- Ravanel, S., Block, M.A., Rippert, P., Jabrin, S., Curien, G., Rebeille, F., y Douce, R. (2004). Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 22548-22557.
- Relichová, J. (1976). Some new mutants. *Arabidopsis Information Service* **13**, 25-28.
- Repková, J., Hlaváčová, S., Lízal, P., Kyjovská, Z., y Relichová, J. (2005). Molecular mapping of some *Arabidopsis thaliana* genes determining leaf shape and chlorophyll defects. *Biologia* **60**, 443-449.
- Robles Ramos, P. (1999). Análisis genético de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología de la hoja. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Rocha, P.S., Sheikh, M., Melchiorre, R., Fagard, M., Boutet, S., Loach, R., Moffatt, B., Wagner, C., Vaucheret, H., y Furner, I. (2005). The *Arabidopsis* *HOMOLOGY-DEPENDENT GENE SILENCING1* gene codes for an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase required for DNA methylation-dependent gene silencing. *Plant Cell* **17**, 404-417.
- Rodionov, D.A., Vitreschak, A.G., Mironov, A.A., y Gelfand, M.S. (2004). Comparative genomics of the methionine metabolism in Gram-positive bacteria: a variety of regulatory systems. *Nucleic Acids Research* **32**, 3340-3353.
- Rodriguez-Furlán, C., Miranda, G., Reggiardo, M., Hicks, G.R., y Norambuena, L. (2016). High throughput selection of novel plant growth regulators: Assessing the translatability of small bioactive molecules from *Arabidopsis* to crops. *Plant Science* **245**, 50-60.
- Ruiz Bayón, A. (2016). Análisis funcional de los interactores de MAS2 de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **74**, 5463-5467.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., y Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1121-1133.
- 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. (1998). Diseción genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*: estudio de ecotipos y estirpes mutantes de la colección del *Arabidopsis* Information Service. Tesis Doctoral. Univeridad de Alicante.
- 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.
- Shyh-Chang, N., Locasale, J.W., Lyssiotis, C.A., Zheng, Y., Teo, R.Y., Ratanasirintrao, S., Zhang, J., Onder, T., Unternaehrer, J.J., Zhu, H., Asara, J.M., Daley, G.Q., y Cantley, L.C. (2013). Influence of threonine metabolism on S-adenosylmethionine and histone methylation. *Science* **339**, 222-226.
- 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.

- Soler, N., Craescu, C.T., Gallay, J., Frapart, Y.M., Mansuy, D., Raynal, B., Baldacci, G., Pastore, A., Huang, M.E., y Vernis, L. (2012). A S-adenosylmethionine methyltransferase-like domain within the essential, Fe-S-containing yeast protein Dre2. *FEBS Journal* **279**, 2108-2119.
- Song, G., Cheng, C., Li, Y., Shaw, N., Xiao, Z.C., y Liu, Z.J. (2014). Crystal structure of the N-terminal methyltransferase-like domain of anamorsin. *Proteins* **82**, 1066-1071.
- Stepien, A., Knop, K., Dolata, J., Taube, M., Bajczyk, M., Barciszewska-Pacak, M., Pacak, A., Jarmolowski, A., y Szweykowska-Kulinska, Z. (2017). Posttranscriptional coordination of splicing and miRNA biogenesis in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **8**, 1403.
- Suggs, S.V., Wallace, R.B., Hirose, T., Kawashima, E.H., y Itakura, K. (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **78**, 6613-6617.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Thomashow, M.F., Nutter, R., Montoya, A.L., Gordon, M.P., y Nester, E.W. (1980). Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell* **19**, 729-739.
- Wang, X., Yang, Y., Yu, C., Zhou, J., Cheng, Y., Yan, C., y Chen, J. (2010). A highly efficient method for construction of rice artificial MicroRNA vectors. *Molecular Biotechnology* **46**, 211-218.
- Young, L.S., Harrison, B.R., Narayana Murthy, U.M., Moffatt, B.A., Gilroy, S., y Masson, P.H. (2006). Adenosine kinase modulates root gravitropism and cap morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* **142**, 564-573.
- Zambryski, P., Tempe, J., y Schell, J. (1989). Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* **56**, 193-201.
- Zhou, M., y Luo, H. (2013). MicroRNA-mediated gene regulation: potential applications for plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* **83**, 59-75.