



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Departamento de Biotecnología

Los péptidos DEVIL: estudio de su papel en el control de la proliferación celular y la morfogénesis de las plantas

Memoria presentada por

ANA ALARCIA GARCÍA

Para optar al grado de

DOCTOR

Por la Universidad Politécnica de Valencia

Directora:

CRISTINA FERRÁNDIZ MAESTRE

Tutora:

MARÍA PURIFICACIÓN LISÓN PÁRRAGA



Valencia, Noviembre 2023

¿Y cuándo veremos el resultado de tanto esfuerzo?

Cuando disfrutes más con el esfuerzo que con los resultados.

72KILOS

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por la Generalitat Valenciana con una Subvención para la Contratación de Personal Investigador Predoctoral (ACIF/2018/260), el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyectos BIO2015-64531-R y RTI2018-099239-B-I00), la Generalitat Valenciana (proyecto PROMETEU/2019/004) y el ExpoSeed H2020-MSCA-RISE-2015-691109.

AGRADECIMIENTOS

Antes de entrar en materia, me gustaría dedicar unas palabras a todas las personas, o al menos intentarlo, gracias a las cuales ha sido posible realizar y sobre todo terminar esta tesis.

En primer lugar, agradecer a Cristina, mi directora, por permitirme formar parte de su equipo y que confió en mi este GRAN trabajo que han sido los DEVIL. Gracias por intentar guiarme de la mejor manera, confiar en mi trabajo y darme la oportunidad de adentrarme en el camino de la ciencia. También agradecer al resto de mis compañeros tanto de mi laboratorio como del de Paco, que tan bien siempre me ha acogido: Irene, Paz, Francisca, Carolina, Vicente, Ludo, Edu, Patri, Ana B, Majo... gracias por la ayuda y acompañamiento dentro del labo pero también fuera en forma de merecidas reuniones alrededor de una mesa llena de cervezas.

Como no acordarme de todas las personas con las que comencé estas andadas y que se han convertido en grandes amigos y sobre todo en mi familia aquí en Valencia: Vero, Clara, Pra, Rubén, M. Ángeles, Flo, Marina y Roser, gracias por hacer que mi vida en esta ciudad haya sido tan buena y divertida.

Pero sobre todo me gustaría dar las GRACIAS a mi familia, que tanto me ha apoyado y ha confiado en mi en este camino de altibajos, sin ellos esto no sería posible. Gracias por estar seguros de que lo iba a conseguir haciendo que mi proyecto sea también y muy merecidamente vuestro. Aun estando lejos de casa, os he sentido aquí conmigo, apoyándome incluso sin palabras o sin preguntar cuando notabais que no era el momento. Y como no, mi último agradecimiento a Sergio que, aunque llegaste a mitad del camino, tan fácil me lo has hecho, sobre todo en la recta final en la que más complicado ha podido ser todo, confiando en mí, tu 100tífica, tan ciegamente. Gracias por ser mi confidente, mi compañero fiel, de risas, amor y llanto.

En definitiva, gracias a todos aquellos que, aunque igual no haya mencionado directamente, me habéis hecho crecer, no solo como científica sino también como persona. Tras ocho años aquí en Valencia, cuando llegué a empezar el máster y me inicié en este trabajo, han sido muchas las personas que me habéis acompañado, así que gracias.

RESÚMENES



RESUMEN

Los péptidos DEVIL/ROTUNDIFOLIA (DVL/RTFL) constituyen una familia de péptidos de pequeño tamaño codificados por la familia génica *DEVIL/ROTUNDIFOLIA (DVL/RTFL)* de 24 miembros en *Arabidopsis thaliana*. Estos genes fueron caracterizados por los fenotipos que confiere su sobreexpresión, que provoca cambios pronunciados en la morfología de la planta con hojas de roseta más redondeadas, plantas de menor estatura, peciolo cortos e inflorescencias compactas. Además, estos fenotipos afectan de un modo fascinante a la morfología de los frutos, que varía según qué miembro de la familia se sobreexpresa, demostrando tener un papel en el desarrollo de múltiples órganos de la planta.

También se ha visto que los péptidos DVL/RTFL se localizan en la membrana plasmática y que comparten homología en sus secuencias, con un dominio conservado en el extremo C-terminal, estando además ampliamente conservados en el mundo vegetal. Tanto su localización como dominio funcional conservado resultan ser esenciales para su actividad. Sin embargo y, a pesar de los fenotipos sorprendentes causados por la sobreexpresión de diferentes genes *DVL/RTFL*, las líneas de pérdida de función no aportan información sobre la función biológica de la familia *DVL/RTFL*.

En el laboratorio donde se ha realizado este trabajo, se ha avanzado en los últimos años en la caracterización de estos péptidos, su modo de interacción con la membrana celular y la determinación de sus patrones de expresión, así como en la identificación de mutantes de pérdida de función. Para continuar en estas direcciones, en este proyecto se generaron combinaciones de mutantes múltiples estables en diferentes genes *DVL/RTFL* combinando mutantes de inserción de T-DNA con mutantes generados por CRISPR/Cas9 (*dvl3 dvl5 dvl6 dvl1 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19*). A pesar de que la pérdida de función de múltiples genes *DVL/RTFL* no mostró fenotipos morfológicos evidentes, análisis transcriptómicos y proteómicos apoyaron la hipótesis de la elevada redundancia génica entre los miembros de esta familia y de que podrían tener un papel en la regulación de procesos como el crecimiento y desarrollo del tubo polínico o el crecimiento distal de la célula.

Sin embargo, experimentos donde analizamos la germinación de polen, el crecimiento de tubo polínico o el desarrollo de pelos radiculares no mostraron que los péptidos DVL/RTFL afectaran de un modo significativo estos procesos, pero sí sugirieron que tienen un rol generalizado aportando estabilidad o robustez al proceso de morfogénesis vía elongación celular.

RESÚMENES

Adicionalmente se llevaron a cabo estudios de topología de membrana que permitieron confirmar su localización en la membrana plasmática, de tal manera que estos péptidos no se integraban en la membrana, sino que estarían asociados a su interfase. La posibilidad de que esta asociación se llevase a cabo a través de otras proteínas hizo que se comprobasen *in planta* interacciones de los péptidos DVL1 y DVL11 con proteínas candidatas identificadas en un escrutinio de doble híbrido de levadura y relacionadas con procesos de tráfico intra e intercelular, división y elongación celular. Su interacción confirmada con proteínas como SRC2, BSK6 o CDC48 llevó a estudiar la posible relación funcional con éstas y en especial con CDC48 por su implicación en procesos de división, expansión y diferenciación celular, sin obtener resultados concluyentes.

Los escasos resultados obtenidos en *Arabidopsis* nos condujo a estudiar el papel del único homólogo *DVL/RTFL* en *Marchantia polymorpha*. Tras generar y caracterizar líneas de pérdida de función y sobreexpresoras *MpDVL*, hemos podido confirmar la conservación funcional de los péptidos *DVL/RTFL* en especies de plantas tan alejadas evolutivamente, así como determinar que no se trata de péptidos esenciales para el desarrollo de la planta pero que sí parecen tener un papel en los procesos de morfogénesis vía elongación celular aportando robustez al sistema.

Este trabajo pone de manifiesto que sigue siendo necesario profundizar en el estudio de los péptidos *DVL/RTFL* para conocer el mecanismo por el cual participan en procesos de desarrollo de la planta y conocer con detalle su verdadera función biológica.

ABSTRACT

DEVIL/ROTUNDIFOLIA (DVL/RTFL) peptides constitute a family of small peptides encoded by the 24-member *DEVIL/ROTUNDIFOLIA (DVL/RTFL)* gene family in *Arabidopsis thaliana*. These genes were characterized by the phenotypes conferred by their overexpression, which causes pronounced changes in plant morphology with round rosette leaves, shorter plants, short petioles, and compact inflorescences. In addition, these phenotypes dramatically affect fruit morphology, which varies depending on which family member is overexpressed, proving to play a role in the development of multiple plant organs.

It has also been shown that DVL/RTFL peptides are located in the plasma membrane, that they share sequence homology, mostly in a conserved C-terminal domain, and that they are also widely conserved among land plants. Both the localization at the membrane and conserved functional domain are essential for proper gene activity. However, despite the surprising overexpression phenotypes observed, the loss-of-function mutants do not provide information on the DVL/RTFL biological function.

In the lab where this work has been carried out, progress has been made in the characterization of these peptides, determining how they interact with the plasma membrane, how they are expressed and accumulated, as well as identifying loss-of-function mutants. To continue in these directions, in this project we have generated combinations of multiple stable *DVL/RTFL* mutants by combining T-DNA insertion mutants with mutants generated by CRISPR/Cas9 (*dvl3 dvl5 dvl6 dvl1 dvl4 rtf9 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19*). Even though the loss of function of multiple *DVL/RTFL* genes did not show evident morphological phenotypes, transcriptomic and proteomic analyzes supported the hypothesis of a high gene redundancy among the members of this family and suggested that they might have a role in the regulation of processes such as pollen tube growth and development or cell tip growth.

However, pollen germination, pollen tube growth or root hair development experiments did not demonstrate that DVL/RTFL peptides had a significant role in these processes, but they suggested that they may have a general role in providing stability or robustness to the morphogenesis process via cell elongation.

Additionally, membrane topology studies were carried out to confirm their location in the plasma membrane, in such a way that these peptides were not integrated but would be associated with the membrane interface. The possibility that this association was carried out through other proteins led to the *in planta* verification of DVL1 and DVL11 peptide interactions with candidate proteins identified in a previous yeast two-hybrid screening and related to

RESÚMENES

intracellular and intercellular trafficking processes cell division and elongation. The confirmed interaction with proteins such as SRC2, BSK6 or CDC48 led us to study the possible functional relationship with these, and especially with CDC48 due to its involvement in cell division, expansion, and differentiation processes, but unfortunately, we did not obtain conclusive results.

The inconclusive results obtained in *Arabidopsis* led us to study the role of the unique *DVL/RTFL* homologue in *Marchantia polymorpha*. After generating and characterizing *MpDVL* loss-of-function and overexpression lines, we have been able to confirm the functional conservation of the *DVL/RTFL* peptides in so evolutionarily distant plant species, as well as to determine that they are not essential for plant development, but they seem to have a role in the morphogenesis processes via cell elongation, providing robustness to the system.

This work highlights the need of furthering the study of *DVL/RTFL* peptides to discover the mechanism by which they participate in plant development processes and to determine their biological function in depth.

RESUM

Els pèptids DEVIL/ROTUNDIFOLIA (DVL/RTFL) constitueixen una família de pèptids de xicoteta grandària codificats per la família gènica *DEVIL/ROTUNDIFOLIA (DVL/RTFL)* de 24 membres en *Arabidopsis thaliana*. Aquests gens van ser caracteritzats pels fenotips que confereix la seua sobreexpressió, que provoca canvis pronunciats en la morfologia de la planta amb fulles de roseta més arrodonides, plantes de menor alçada, pecíols curts i inflorescències compactes. A més, aquests fenotips afecten d'una manera fascinant a la morfologia dels fruits, que varia segons quin membre de la família es sobreexpresse, demostrant tindre un paper en el desenvolupament de múltiples òrgans de la planta.

També s'ha vist que els pèptids DVL/RTFL es localitzen en la membrana plasmàtica i que comparteixen homologia en les seues seqüències, amb un domini conservat en l'extrem C-terminal, estant a més àmpliament conservats en el món vegetal. Tant la seua localització com domini funcional conservat resulten ser essencials per a la seua activitat gènica adequada. No obstant això i, malgrat els fenotips sorprenents observats en la sobreexpressió de diferents gens *DVL/RTFL*, les línies de pèrdua de funció no aporten informació sobre la funció biològica de la família DVL/RTFL.

En el laboratori on s'ha fet aquest treball, s'ha avançat en els últims anys en la caracterització d'aquests pèptids, la seua manera d'interacció amb la membrana cel·lular i la determinació dels seus patrons d'expressió, així com en la identificació de mutants de pèrdua de funció. Per a continuar en aquestes direccions, en aquest projecte es van generar combinacions de mutants múltiples estables en diferents gens *DVL/RTFL* combinant mutants d'inserció de T-DNA amb mutants generats per CRISPR/Cas9 (*dv13 dv15 dv16 dv11 dv14 rtf19 dv18 dv111 rtf111 dv119*). A pesar que la pèrdua de funció de múltiples gens *DVL/RTFL* no va mostrar fenotips morfològics evidents, anàlisis transcriptòmics i proteòmics van donar suport a la hipòtesi de l'elevada redundància gènica entre els membres d'aquesta família i que a més tenen un paper en la regulació de processos com són la morfogènesi, el creixement i desenvolupament del tub pol·línic o el creixement distal de la cèl·lula.

Experiments de germinació de pol·len, creixement de tub pol·línic o desenvolupament de pèls radiculars duts a terme van demostrar que els pèptids DVL/RTFL no tenien un paper significatiu en aquests processos, però sí que van suggerir que tenen un rol generalitzat aportant estabilitat o robustesa al procés de morfogènesi via elongació cel·lular.

Adicionalment es van dur a terme estudis de topologia de membrana que van permetre confirmar la seua localització en la membrana plasmàtica, de tal manera que aquests pèptids no

RESÚMENES

s'integraven en la membrana si no que estarien associats a la seua interfase. La possibilitat que aquesta associació es duiguera a terme a través d'altres proteïnes va fer que es comprovaren *in planta* interaccions dels pèptids DVL1 i DVL11 amb proteïnes candidates extretes d'un escrutini de doble híbrid de llevat i relacionades amb processos de trànsit intra i intercel·lular, divisió i elongació cel·lular. La seua interacció confirmada amb proteïnes com SRC2, BSK6 o CDC48 va portar a estudiar la possible relació funcional amb aquests i especialment amb CDC48 per la seua implicació en processos de divisió, expansió i diferenciació cel·lular, sense obtindre resultats concloents.

Els escassos resultats obtinguts en *Arabidopsis* ens va conduir a estudiar el paper de l'únic homòleg *DVL/RTFL* en *Marchantia polymorpha*. Després de generar i caracteritzar línies de pèrdua de funció i de sobreexpressió *MpDVL*, hem pogut confirmar la conservació funcional dels pèptids *DVL/RTFL* en espècies de plantes tan allunyades evolutivament, així com determinar que no es tracta de pèptids essencials per al desenvolupament de la planta però que sí que semblen tindre un paper en els processos de morfogènesis via elongació cel·lular aportant robustesa al sistema.

Així, aprofundir en l'estudi dels pèptids *DVL/RTFL* per a conèixer el mecanisme pel qual participen en processos de desenvolupament de la planta permetria conèixer amb detall la seua vertadera funció biològica.

ÍNDICE DE CONTENIDOS



ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
RESÚMENES	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	xvi
INTRODUCCIÓN	1
1. Los péptidos pequeños en plantas.....	3
2. Los péptidos DEVIL	8
3. <i>Marchantia polymorpha</i> como organismo modelo	15
OBJETIVOS.....	21
RESULTADOS: CAPITULO 1	25
CAPITULO 1. Caracterización del papel de los péptidos DVL/RTFL determinando el efecto fenotípico de las mutaciones de pérdida de función.	27
Antecedentes y resultados previos.....	27
1.1 Caracterización de los mutantes de pérdida de función disponibles.	29
1.2 Edición genética de nuevos alelos mediante la tecnología CRISPR/Cas9.	33
1.3 Caracterización fenotípica de los mutantes generados.	36
1.4 Edición genética de múltiples genes mediante la tecnología CRISPR/Cas9.....	38
1.5 Análisis transcriptómico de los quintuples mutantes disponibles mediante RNA-seq..	42
1.6 Análisis diferencial de proteínas de los quintuples mutantes disponibles	49
1.7 Implicación de los péptidos DVL/RTFL en el desarrollo y crecimiento del tubo polínico..	54
1.8 Implicación de los péptidos DVL/RTFL en el desarrollo y crecimiento de los pelos radiculares.....	62
RESULTADOS: CAPITULO 2	65
CAPITULO 2. Determinación de la relevancia funcional de las interacciones proteína-proteína observadas y su implicación en el mecanismo de acción de los péptidos DVL/RTFL.....	67
Antecedentes y resultados previos.....	67
2.1 Caracterización del tipo de asociación de los péptidos DVL/RTFL con la membrana plasmática.	70
2.2 Confirmación <i>in vivo</i> de las interacciones proteína-proteína observadas.....	77
2.3 Caracterización de la relevancia funcional de la interacción DVL1-CDC48 observada ..	81
RESULTADOS: CAPITULO 3	93
CAPITULO 3. Caracterización del papel del homólogo <i>DVL/RTFL</i> en <i>Marchantia polymorpha</i> . 95	
3.1. Identificación del homólogo <i>DVL/RTFL</i> en <i>Marchantia polymorpha</i>	95
3.2. Caracterización de la sobreexpresión de <i>MpDVL</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	95

ÍNDICE DE CONTENIDO

3.3. Caracterización de los fenotipos asociados a la pérdida y ganancia de función <i>MpDVL</i> en <i>Marchantia polymorpha</i>	97
3.3.1. Generación de líneas mutantes de pérdida de función <i>MpDVL</i> en <i>Marchantia polymorpha</i>	97
3.3.2. Generación de líneas de sobreexpresión <i>MpDVL</i> en <i>Marchantia polymorpha</i>	99
3.3.3. Caracterización fenotípica de las líneas mutantes y sobreexpresoras <i>MpDVL</i>	100
3.4. Caracterización del papel de <i>MpDVL</i> en el crecimiento de <i>Marchantia</i> vía división celular.....	110
3.5. Caracterización de la localización de <i>MpDVL</i> en <i>Marchantia polymorpha</i>	114
3.6. Estudio de la capacidad de <i>MpDVL</i> de <i>Marchantia polymorpha</i> para formar homodímeros.....	117
DISCUSIÓN.....	119
CONCLUSIONES.....	147
MATERIALES Y MÉTODOS.....	151
1. Material biológico.....	153
1.1. Material vegetal.....	153
1.2. Material bacteriano.....	156
1.3. Líneas celulares de mamífero.....	157
2. Métodos de biología molecular.....	158
2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos.....	158
2.2. Manipulación de ácidos nucleicos.....	159
2.3. Extracción de proteínas.....	162
2.4. Construcciones.....	163
2.5. Secuenciación.....	169
2.6. Generación de organismos transgénicos.....	169
3. Análisis transcriptómico mediante RNA-seq.....	170
3.1. Análisis bioinformático.....	171
3.2. Análisis de enriquecimiento de categorías de ontología génica.....	171
4. Análisis diferencial de proteínas.....	171
4.1. Preparación de las muestras.....	171
4.2. Análisis LC-MS/MS.....	172
4.3. Cuantificación de proteínas y análisis de datos.....	172
5. Estudios de interacción proteína-proteína.....	173
5.1. Ensayo de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC).....	173
6. Análisis fenotípico de las líneas mutantes y transgénicas.....	174
6.1. Observación y fotografía de bajo aumento.....	174
6.2. Técnicas de microscopía.....	174

6.3. Análisis de germinación de polen y crecimiento de tubo polínico en Arabidopsis.....	175
6.4. Análisis de crecimiento de raíz y pelos radiculares.....	176
6.5. Análisis fenotípico de las líneas etanol-inducibles Atcdc48A ^{DN}	176
6.6. Análisis de la morfología del talo de Marchantia.....	177
6.7. Detección de células en fase S de ciclo celular en Marchantia (tinción EdU).....	177
7. Técnicas de histología vegetal	177
7.1. Análisis de la actividad β -glucuronidasa (GUS)	177
8. Análisis estadísticos	178
BIBLIOGRAFÍA.....	183
ANEXOS	195

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. La diversidad de síntesis de los péptidos vegetales.....	4
Figura 2. La diversidad funcional de los péptidos vegetales.....	6
Figura 3. Fenotipos de las plantas <i>dv1-1D</i> (<i>devil1-1 Dominant</i>) asociados a la sobreexpresión del gen <i>DVL1</i>	9
Figura 4. <i>DVL1</i> pertenece a una familia génica.....	10
Figura 5. Fenotipos de <i>rot4-1D</i>	11
Figura 6. Detección de ROT4 etiquetado con GFP.....	12
Figura 7. Fenotipos asociados a la sobreexpresión de los genes <i>DVL</i>	13
Figura 8. Ciclo de vida de <i>Marchantia polymorpha</i>	17
Figura 9. Fase y propagación vegetativa en el ciclo de vida de <i>Marchantia polymorpha</i>	18
Figura 10. Estructuras vegetativas de <i>Marchantia polymorpha</i>	19
Figura 11. Fenotipos asociados a la reducción de la expresión de <i>genes DVL</i> mediada por amiRNA- <i>DVL19clade</i>	28
Figura 12. Patrón de expresión de la construcción reportera del gen <i>DVL8</i>	29
Figura 13. Árbol filogenético de los miembros de la familia DVL/RTFL en <i>A. thaliana</i>	30
Figura 14. Líneas mutantes de inserción de T-DNA analizadas.	31
Figura 15. Representación esquemática de los genes mutados por edición génica dirigida CRISPR/Cas9.....	34
Figura 16. Fenotipos de la línea quintuple mutante <i>rtf19 dv18 dv111 rtf111 dv19</i>	37
Figura 17. Representación esquemática de los genes mutados por edición génica dirigida CRISPR/Cas9.	39
Figura 18. Representación esquemática de las secuencias de los genes mutados por edición genómica dirigida CRISPR/Cas9.....	40
Figura 19. Fenotipos de la línea décuple mutante <i>dv1 dv3 dv5 dv6 dv4 rtf19 dv18 dv111 rtf111 dv19</i>	41
Figura 20. Genes diferencialmente expresados entre los quintuples mutantes <i>dv1 dv18 dv111 rtf111 dv19</i> y <i>rtf19 dv18 dv111 rtf111 dv19</i> y el silvestre analizados mediante RNA-Seq.....	45
Figura 21. Análisis de términos GO más representados relacionados con procesos biológicos de los DEGs regulados a la baja en los quintuples mutantes <i>dv1/rtf1</i> con respecto al silvestre analizados en el RNA-seq	46
Figura 22. Genes diferencialmente expresados entre las líneas sobreexpresoras <i>dv1-1D</i> y 35S: <i>DVL8</i> comparadas con la silvestre analizados mediante RNA-Seq.	48

Figura 23. Análisis de términos GO más representados relacionados con procesos biológicos de los DEGs comunes en los quintuples mutantes *dvl/rtfl* y la línea sobreexpresora 35S:DVL8 analizados en el RNA-seq. 49

Figura 24. Análisis de los términos GO más representados relacionados con procesos biológicos de las proteínas diferencialmente expresadas en el décuple mutante *dvl1 dvl3 dvl5 dvl6 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* con respecto al silvestre extraídos en el análisis diferencial de proteínas 51

Figura 25. Análisis de los términos GO más representados relacionados con procesos biológicos de las proteínas diferencialmente expresadas en la línea sobreexpresora *dvl1-1D* con respecto al silvestre extraídos en el análisis diferencial de proteínas.. 52

Figura 26. Análisis de los términos GO más representados relacionados con procesos biológicos de las proteínas diferencialmente expresadas en la línea sobreexpresora 35S:DVL8 con respecto al silvestre extraídos en el análisis diferencial de proteínas.. 52

Figura 27. Proteínas diferencialmente expresadas en el décuple mutante *dvl1 dvl3 dvl5 dvl6 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19*, la línea sobreexpresora *dvl1-1D* y la línea sobreexpresora 35S:DVL8 comparadas con el silvestre. 53

Figura 28. Germinación de polen y crecimiento del tubo polínico *in vitro*..... 55

Figura 29. Frecuencia de germinación de polen *in vitro*..... 56

Figura 30. Longitud de tubo polínico. 56

Figura 31. Longitud de tubo polínico tras 4 horas de crecimiento. 57

Figura 32. Crecimiento del tubo polínico *in vivo*..... 58

Figura 33. Producción de semillas por silicua.. 59

Figura 34. Producción de semillas por silicua por planta individualizada..... 60

Figura 35. Producción de semillas por silicua por planta individualizada y posición.. 61

Figura 36. Fenotipos asociados al crecimiento de la raíz y los pelos radiculares en el séptuple mutante *dvl1 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19*..... 63

Figura 37. Ensayos de topología de membrana del péptido DVL11 en un sistema Lep *in vitro*..68

Figura 38. Predicción de la estructura de los péptidos DVL1 y DVL11. 72

Figura 39. Esquema de la construcción C_LTM empleada 73

Figura 40. Ensayo de inserción de los péptidos DVL1 y DVL11 en la membrana. 75

Figura 41. Esquema de la construcción C_LTM con un residuo de glicosilación adicional.. 76

Figura 42. Ensayo de inserción de los péptidos DVL1 y DVL11 en la membrana con un tercer sitio de glicosilación adicional..... 76

Figura 43. Análisis de la interacción entre el péptido DVL1 y sus interactores candidatos mediante ensayo de BiFC..... 80

ÍNDICE DE CONTENIDO

Figura 44. Análisis de la interacción entre el péptido DVL11 y sus interactores candidatos mediante ensayo de BiFC.....	81
Figura 45. Representación de los fenotipos asociados a los mutantes de pérdida de función <i>Atcdc48</i>	83
Figura 46. Análisis fenotípico de las líneas mutantes inducibles por etanol <i>Atcdc48ADN</i>	83
Figura 47. Estudio de germinación de semillas.....	84
Figura 48. Ensayo de co-localización subcelular del péptido DVL1 y la proteína CDC48.....	86
Figura 49. Localización de YFP-AtCDC48A.....	89
Figura 50. Niveles de expresión de <i>AtCDC48</i> en las líneas transgénicas <i>Atcdc48^{DN}</i>	91
Figura 51. Alineamiento de secuencias entre MpDVL y DVL17/RTFL6.....	95
Figura 52. Fenotipos de la sobreexpresión de <i>MpDVL</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	96
Figura 53. Vector pMpGE010 empleado para la edición dirigida de <i>MpDVL</i> en <i>Marchantia polymorpha</i>	97
Figura 54. Representación esquemática de las secuencias de los genes mutados por edición genómica dirigida CRISPR/Cas9.....	98
Figura 55. Niveles de expresión de las líneas sobreexpresoras <i>MpDVL</i> de <i>Marchantia polymorpha</i>	100
Figura 56. Morfología y tamaño del talo de las líneas mutantes y sobreexpresoras <i>MpDVL</i> a los 7 días de edad.....	101
Figura 57. Morfología y tamaño del talo de las líneas mutantes y sobreexpresoras <i>MpDVL</i> a los 14 días de edad.....	102
Figura 58. Morfología y tamaño del talo de las líneas mutantes y sobreexpresoras <i>MpDVL</i> a los 28 días de edad.....	103
Figura 59. Fenotipo de las líneas mutantes y sobreexpresoras <i>MpDVL</i> a 28 días de edad....	104
Figura 60. Morfología de los rizoides de línea mutante y sobreexpresoras <i>MpDVL</i> a los 2 días de edad.....	106
Figura 61. Caracterización de los anteridióforos en las líneas mutantes y sobreexpresoras <i>MpDVL</i> a los 28 días de crecimiento.....	107
Figura 62. Caracterización de los anteridióforos en las líneas mutantes y sobreexpresoras <i>MpDVL</i> a los 42 días de crecimiento.....	108
Figura 63. Día de aparición de los anteridióforos completamente formados en las líneas mutantes y sobreexpresoras <i>MpDVL</i>	109
Figura 64. Visualización de los núcleos en fase S de división celular en líneas mutantes y sobreexpresoras <i>MpDVL</i> a los 7 días de edad.....	111

Figura 65. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL* a los 7 días de edad..... 113

Figura 66. Zona de diferenciación en talos de las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL* a los 7 días de edad..... 114

Figura 67. Representación esquemática de la construcción generada para el estudio del patrón de localización de *MpDVL*..... 115

Figura 68. Patrón de localización de *MpDVL* en *Marchantia polymorpha* 116

Figura 69. Niveles de expresión de *MpDVL* en *Marchantia polymorpha* silvestre a los 7, 14 y 21 días de crecimiento. 116

Figura 70. Formación de homodímeros de *MpDVL*..... 118

Figura 71. Morfología y representación esquemática del crecimiento distal y polarizado de un tubo polínico o un pelo radicular.....126

Figura 72. Interacciones de las proteínas de membrana con la bicapa lipídica.....135

Tabla 1. Descripción de los alelos mutantes empleados y generados en este trabajo. 36

Tabla 2. Número de lecturas por gen de los miembros de la familia *DVL/RTFL* en plantas silvestres, mutantes *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* de *Arabidopsis thaliana*. 43

Tabla 3. Genes diferencialmente expresados y regulados a la baja en ambos mutantes *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* con respecto al silvestre y pertenecientes a alguna de las categorías GO más representadas relacionadas con procesos biológicos..... 47

Tabla 4. Posibles interactores de *DVL1* identificados en el rastreo de doble híbrido levadura. 69

Tabla 5. Posibles interactores de *DVL11* identificados en el rastreo de doble híbrido levadura 70

Tabla 6. Posibles interactores de *DVL1* seleccionados del rastreo de doble híbrido levadura para confirmar la interacción *in vivo*..... 77

Tabla 7. Posibles interactores de *DVL11* seleccionados del rastreo de doble híbrido levadura para confirmar la interacción *in vivo*..... 78

Tabla 8. Tamaño del talo de las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL*..... 102

Materiales y métodos

Tabla MM1. Líneas mutantes de *Arabidopsis* empleadas en este trabajo..... 153

Tabla MM2. Líneas mutantes de *Marchantia* generadas en este trabajo..... 154

Tabla MM3. Líneas transgénicas de *Arabidopsis* empleadas en este trabajo..... 154

Tabla MM4. Líneas transgénicas de *Marchantia* generadas en este trabajo..... 154

ÍNDICE DE CONTENIDO

Tabla MM5. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.....	156
Tabla MM6. Condiciones generales empleadas para la amplificación de DNA mediante PCR con la polimerasa de alta fidelidad <i>HF Phusion</i> (Thermofisher).....	160
Tabla MM7. Condiciones generales empleadas para la amplificación de DNA mediante PCR con la polimerasa <i>Ex Taq</i> (TaKaRa).	160
Tabla MM8. Condiciones generales empleadas para la amplificación de DNA mediante PCR con la polimerasa <i>GoTaq</i> (Promega).....	161
Tabla MM9. Vectores plasmídicos empleados en este trabajo.....	163
Tabla MM10. Construcciones plasmídicas empleadas en este trabajo.....	164
Tabla MM11. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.....	178

Anexos

ANEXO I. Secuencia de aminoácidos predicha de los mutantes generados por CRISPR.	197
ANEXO II. Términos GO representativos de los DEGs en los múltiples mutantes <i>dvl1/rtf9 dvl8 dvl11 rtf9 rtf11</i>	198
ANEXO III. Genes diferencialmente expresados y comunes a ambas líneas sobreexpresoras <i>dvl1-1D</i> y 35S:DVL8 con respecto al silvestre analizados mediante RNA-seq.	203
ANEXO IV. Figura suplementaria S1. Genes diferencialmente expresados entre los quintuples mutantes <i>rtf9 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19</i> y <i>dvl1 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19</i> y el silvestre, y entre las líneas sobreexpresoras <i>dvl1-1D</i> y 35S:DVL8 y el silvestre analizados mediante RNA-seq.	204
ANEXO V. Genes diferencialmente expresados comunes a quintuples mutantes <i>dvl1/rtf9 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19</i> y la línea sobreexpresoras 35S:DVL8 analizados mediante RNA-Seq.....	205
ANEXO VI. Términos GO representativos de los DEGs comunes en los múltiples mutantes <i>dvl1/rtf9 dvl8 dvl11 rtf9 rtf11</i> y la línea sobreexpresora 35S:DVL8.....	206
ANEXO VII. Proteínas diferencialmente expresadas en el décuple mutante <i>dvl3 dvl5 dvl6 dvl1 dvl4 rtf9 dvl8 dvl11 rtf9 rtf11</i> con respecto al silvestre Col-0.....	208
ANEXO VIII. Términos GO representativos de las proteínas diferencialmente expresadas en el décuple mutante <i>dvl3 dvl5 dvl6 dvl1 dvl4 rtf9 dvl8 dvl11 rtf9 rtf11</i> con respecto al silvestre.....	210
ANEXO IX. Proteínas diferencialmente expresadas en la línea sobreexpresora <i>dvl1-1D</i> con respecto al silvestre Col-0.	212
ANEXO X. Términos GO representativos de las proteínas diferencialmente expresadas el sobreexpresor <i>dvl1-1D</i> con respecto al silvestre Col-0.	217
ANEXO XI. Proteínas diferencialmente expresadas en la línea sobreexpresora 35S:DVL8 con respecto al silvestre Col-0.	219
ANEXO XII. Términos GO representativos de las proteínas diferencialmente expresadas el sobreexpresor 35S:DVL8 con respecto al silvestre Col-0.	223

ANEXO XIII. Proteínas diferencialmente expresadas y comunes al análisis proteómico del décuple mutante *dvl3 dvl5 dvl6 dvl1 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf19 rtf11*, el sobreexpresor *dvl1-1D* y 35S:DVL8, todas ellas comparadas con el silvestre Col-0..... 225

ANEXO XIV. Figura suplementaria S2. Fenotipos de la sobreexpresión del gen *DVL11* en *Arabidopsis thaliana*..... 228

ANEXO XV. ABREVIATURAS..... 229

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN



1. Los péptidos pequeños en plantas

El proteoma consiste en el conjunto completo de proteínas que se expresan o pueden expresarse a partir del genoma de una célula, tejido u organismo, en un momento y condición determinada. Dentro de este conjunto, los péptidos son las moléculas biológicas más pequeñas del proteoma y están formados por pequeñas cadenas de monómeros de entre 2 y 100 aminoácidos, diferenciándose de las proteínas básicamente por la longitud de dicha cadena (Tavormina et al., 2015; Feng et al., 2023). En las plantas, los péptidos juegan papeles importantes en procesos funcionales claves del crecimiento, el desarrollo y la reproducción, como son la organización del meristemo, el crecimiento y desarrollo de la raíz, la regulación de la forma de las hojas, el crecimiento a partir de callo o el desarrollo de nódulos, así como también en las respuestas de defensa o estrés o las interacciones simbióticas (Matsubayashi and Sakagami, 2006; Matsubayashi, 2014; Tavormina et al., 2015; Feng et al., 2023). El desarrollo de la planta es un proceso complejo que necesita de una comunicación intercelular que coordine el crecimiento y la diferenciación (Matsubayashi, 2014) y en este contexto, los péptidos pequeños pueden actuar como moléculas señalizadoras en esta comunicación célula a célula coordinando y especificando las funciones celulares, participando no solo durante el crecimiento y el desarrollo sino también en respuestas de defensa o simbiosis permitiendo a la planta adaptarse a un medio cambiante (Fukuda and Higashiyama, 2011; Matsubayashi, 2014). Por otro lado, los péptidos pequeños no solo actúan en la transducción de señales, sino que también se les han atribuido otras funciones moleculares como son la inhibición traduccional de un marco abierto de lectura (ORF - *Open Reading Frame*) principal, la promoción de la función de microRNAs (miRNAs) o la interacción con proteínas diana (Feng et al., 2023).

Originalmente los péptidos de plantas se han dividido en dos grandes categorías: secretados y no secretados, en función de la presencia o ausencia de una secuencia de señalización secretora en el extremo N-terminal que guía al péptido al espacio extracelular (Matsubayashi, 2014; Feng et al., 2023). Los péptidos secretados son aquellos que se han relacionado más directamente con la comunicación célula a célula en la planta, aunque también se han atribuido a los péptidos no secretados funciones de señalización celular en procesos de defensa. Los péptidos secretados, a su vez, pueden clasificarse en dos grupos según sus características estructurales: péptidos pequeños modificados postraduccionalmente y péptidos ricos en cisteína (Matsubayashi, 2011, 2014).

Paralelamente, los péptidos de plantas se han clasificado según su síntesis u origen genómico como: (1) aquellos derivados de un precursor, es decir, que derivan del procesamiento

INTRODUCCIÓN

de un polipéptido mayor, y que a su vez pueden subdividirse en (1a) los que derivan de un precursor no funcional (es decir, de un polipéptido que no es activo antes de procesarse) y (1b) aquellos derivados de un precursor funcional (es decir, de un polipéptido que antes de su procesamiento tiene una función biológica diferente a la del péptido derivado); y por último, (2) los que no derivan de una proteína precursora, sino que se traducen directamente a partir de pequeños marcos abiertos de lectura (sORFs - *small Open Reading Frames*) de menos de 100 aminoácidos (**Figura 1**) (Matsubayashi, 2014; Tavormina et al., 2015; Feng et al., 2023).

Estos péptidos no derivados de precursores pueden subdividirse a su vez en tres grupos en función de la localización genómica de la sORF que codifica el péptido: aguas arriba de la ORF principal, en la secuencia 5' del gen; en el transcrito primario de un miRNA; o en otro transcrito que no codifique proteínas más largas (>100 aminoácidos) (**Figura 1**) (Tavormina et al., 2015).

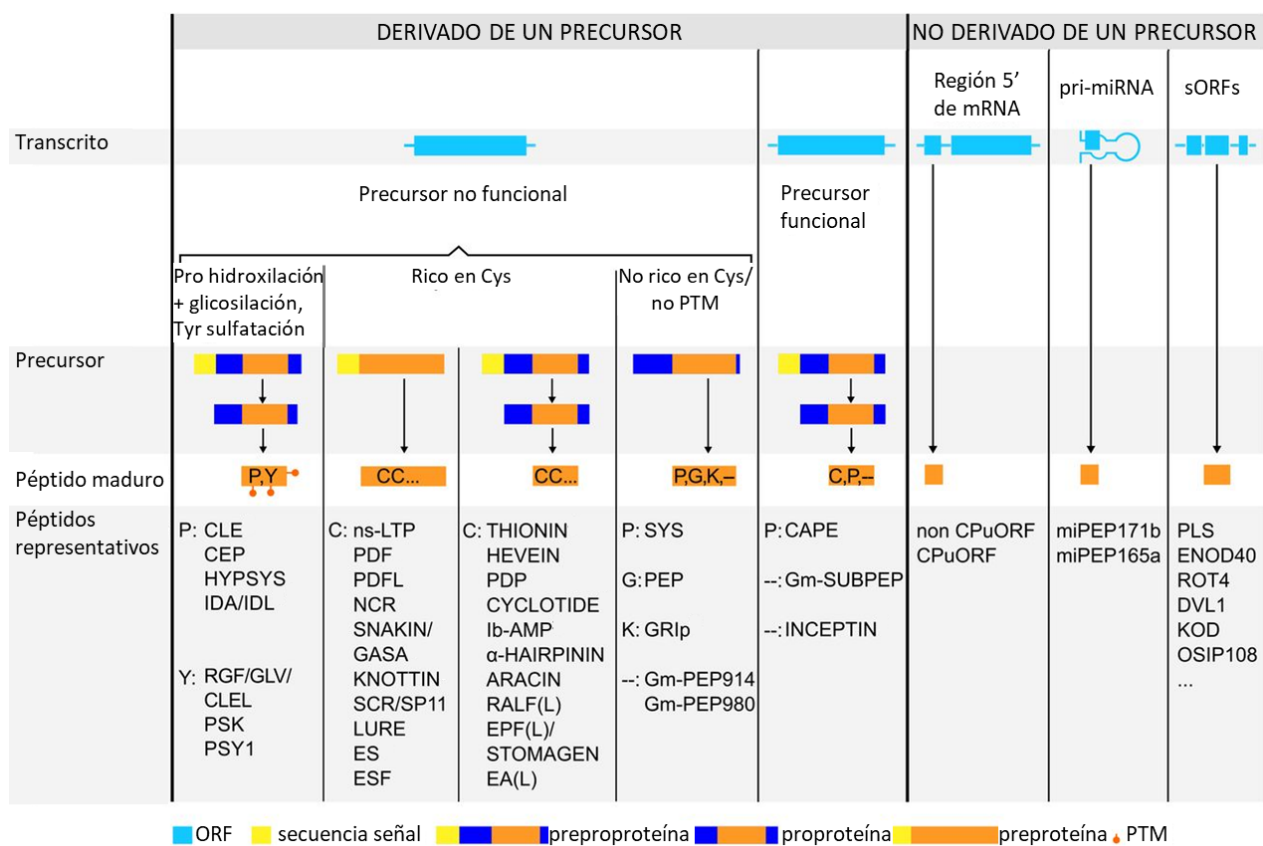


Figura 1. La diversidad de síntesis de los péptidos vegetales. Los péptidos de plantas se sintetizan a partir de proteínas precursoras o se traducen directamente a partir de una sORF. El primer tipo se divide según su precursor sea o no funcional. Dicho precursor puede ser una preproteína que da como resultado el péptido maduro tras la eliminación de una secuencia de señalización (rectángulo amarillo). Los péptidos derivados de precursores no funcionales pueden ser: modificados postraduccionalmente (PTM), ricos en Cys o no ricos en Cys y no modificados postraduccionalmente (no ricos en Cys/no PTM). Los péptidos no derivados de precursores están codificados por sORFs (<100 aminoácidos) ubicadas aguas arriba del ORF principal en la secuencia de un gen, en las transcripciones primarias de miARN (pri-miARN) o en otras transcripciones que no codifican proteínas más largas (>100 aminoácidos), con excepciones. En la parte inferior aparecen los péptidos representativos de cada subgrupo. Imagen adaptada de Tavormina et al., 2015.

Hasta el momento, los péptidos pequeños no han sido fáciles de identificar porque en general, los métodos para anotar los genomas y analizar proteínas están más optimizados para polipéptidos más grandes. Sin embargo, los avances conseguidos en los últimos años con aproximaciones genéticas, análisis bioquímicos y herramientas bioinformáticas como son las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación, la espectrometría de masas y nuevos algoritmos de predicción más potentes, han permitido descubrir muchos péptidos pequeños no solo en *Arabidopsis thaliana*, sino también en otras especies de interés agronómico como son el arroz (*Oryza sativa*), el maíz (*Zea mays*) o la uva (*Vitis vinifera*) (Sudan et al., 2018; Feng et al., 2023).

Se ha destacado anteriormente como estos péptidos pequeños desempeñan funciones importantes en actividades fisiológicas como la respuesta al estrés abiótico, el crecimiento de las plantas, la morfogénesis de los órganos y la reproducción sexual. El primer péptido vegetal funcional que se identificó, la sistemina de tomate, es un péptido no secretado que se descubrió en hojas dañadas de tomate y que actúa promoviendo la expresión rápida de genes de defensa a través de la comunicación celular al inducir la producción de inhibidores de proteinasas frente a ataques de herbívoros y patógenos (Pearce et al., 1991); desde su identificación, muchos otros péptidos han sido identificados y caracterizados (**Figura 2**).

A pesar de que la mayoría de los péptidos vegetales caracterizados funcionalmente son los pertenecientes a la categoría de derivados de un precursor, los péptidos pequeños codificados por una sORF y traducidos directamente son funcionalmente relevantes, puesto que se ha mostrado como sus funciones biológicas van desde la participación en el desarrollo y morfogénesis de la planta hasta la regulación de la expresión génica (Matsubayashi, 2014; Tavormina et al., 2015).

Dentro de los mejor caracterizados se puede destacar a PSK (PHYTOSULFOKINE), un péptido sulfatado de 5 aminoácidos modificado postraduccionalmente, identificado como una señal promotora del crecimiento que regula la proliferación celular. PSK ha demostrado tener un papel en procesos de elongación de la raíz o el hipocótilo, la germinación del polen o la respuesta inmune frente a elicitores liberados por patógenos. Este péptido secretado es reconocido en la superficie celular por un receptor quinasa rico en leucina (LRR-quinasa) unido a la membrana que desencadena una serie de señales y regulación genética que promueven el crecimiento o las respuesta de defensa (Matsubayashi, 2014).

INTRODUCCIÓN

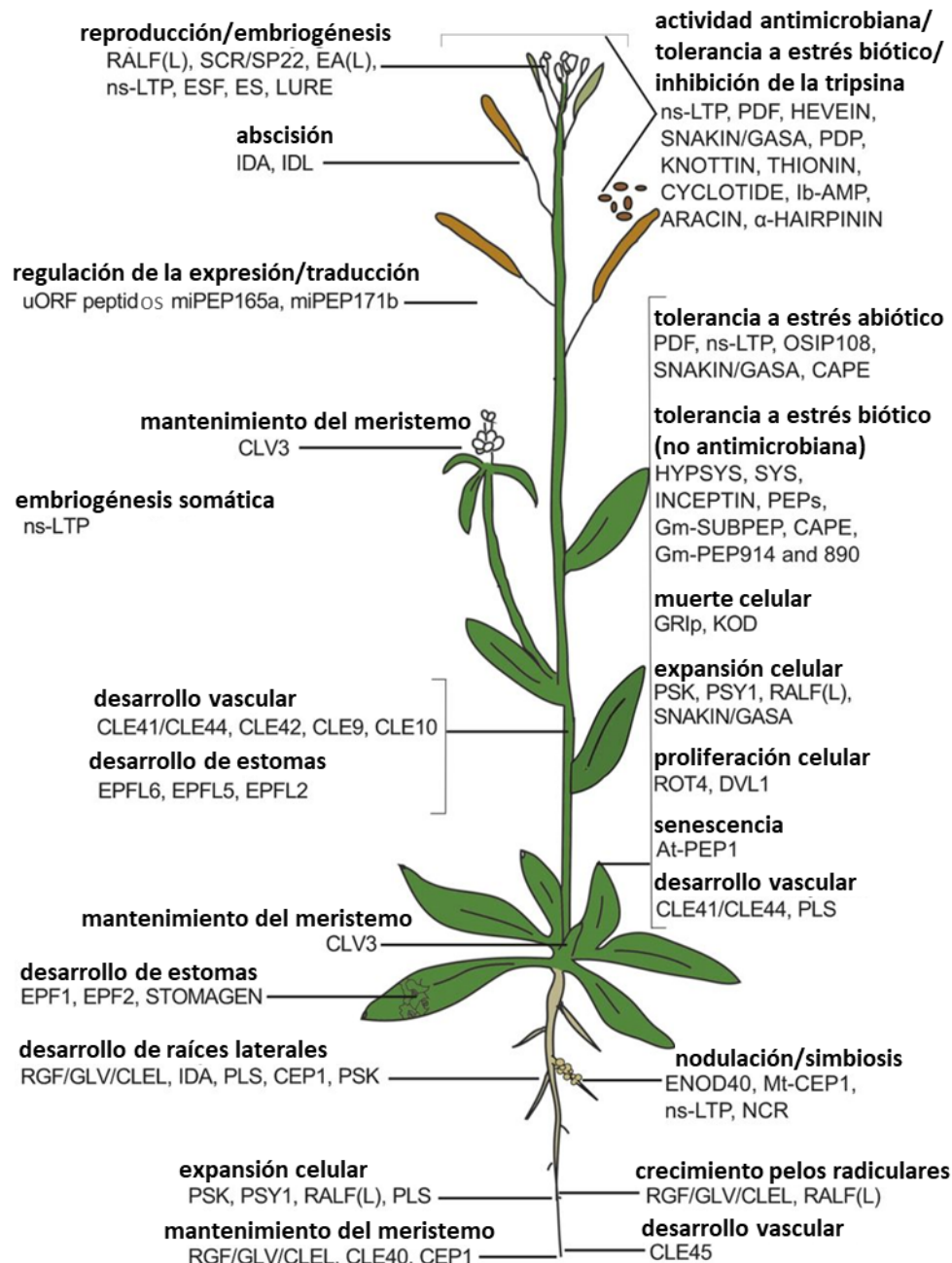


Figura 2. La diversidad funcional de los péptidos vegetales. Los péptidos de plantas tienen un amplio rango de funciones biológicas y actúan en diferentes partes de la planta, como se indica en la ilustración simplificada de una planta. Imagen adaptada de Tavormina et al., 2015.

Por otro lado, encontramos a SCR/SP11 (S-LOCUS CYSTEINE-RICH PROTEIN/S-LOCUS PROTEIN 11), un péptido derivado de un precursor no funcional modificado postraduccionalmente y rico en cisteína que juega un papel clave en la autoincompatibilidad del polen en Brassicaceas y es homólogo a otros 28 péptidos en Arabidopsis. SP11/SCR funciona como determinante de la especificidad del haplotipo masculino en la capa de polen y es percibido por la S-locus receptor-quinasa, que funciona como determinante de la especificidad del haplotipo femenino. Dicho reconocimiento conduce a la inhibición de la germinación de

polen propio y crecimiento del tubo polínico auto-incompatible (Matsubayashi and Sakagami, 2006; Tavormina et al., 2015). En esta misma categoría de péptidos modificados postraduccionalmente encontramos también a los péptidos IDA (INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION) e IDL (IDA-LIKE), péptidos señal que promueven el proceso de abscisión de órganos, entre otros, estimulando la separación de las células tras ser percibidos por un receptor LRR-quinasa extracelular y activando una cascada de señalización que termina regulando la expresión de varios genes remodeladores de la pared celular (Matsubayashi, 2014; Sudan et al., 2018).

Otro péptido muy bien caracterizado es CLV3 (CLAVATA 3), un glicopéptido que posee una señal secretora en el extremo N-terminal y que participa en el equilibrio entre la renovación y diferenciación de células madre en el meristemo apical del tallo. CLV3 pertenece a una extensa familia de pequeños péptidos con más de 30 miembros en *Arabidopsis thaliana*, la familia CLE (CLV3/*embryo-surrounding*), caracterizada por un extremo hidrofóbico, la señal secretora, y un motivo CLE conservado de 14 aminoácidos. Los miembros de esta familia desempeñan funciones en diversas partes de la planta como por ejemplo CLE40, homólogo funcional de CLV3 en la raíz o CLE41 y CLE44 que estimulan la proliferación de las células del cambium e inhiben la diferenciación del xilema. Dentro de la familia CLE, las relaciones péptido-receptor son diversas, ya que un receptor quinasa puede servir como receptor de diferentes péptidos y, por otro lado, un péptido puede ser reconocido por diferentes receptores, lo cual explica la existencia de cierta redundancia génica y funcional entre los diferentes miembros de la familia (Matsubayashi and Sakagami, 2006; Katsir et al., 2011; Matsubayashi, 2014; Tavormina et al., 2015; Gancheva et al., 2019; Rodriguez-Leal et al., 2019).

Otra familia con un elevado número de homólogos en *Arabidopsis thaliana*, que son péptidos derivados de un precursor ricos en cisteína y secretados, son los RALF (RAPID ALKALINIZATION FACTOR), originalmente identificados en tabaco al causar la alcalinización del medio de células en suspensión. Estos péptidos provocan una serie de respuestas a Ca^{2+} , alterando el pH intracelular y activando de este modo una proteína quinasa que regula varios procesos de desarrollo de la raíz, entre los cuales está la iniciación y posicionamiento de las raíces laterales. Además, también participan en la germinación del polen, la capacidad de tolerancia a estrés tanto biótico como abiótico, la formación de frutos de un tamaño adecuado o la producción de semillas (Pearce et al., 2001; Sudan et al., 2018).

Aunque todos los ejemplos mencionados anteriormente corresponden a péptidos derivados de precursores, también encontramos ejemplos de péptidos pequeños no secretados y codificados por sORFs que han sido funcionalmente caracterizados en plantas. Este es el caso

INTRODUCCIÓN

de PLS (POLARIS), el primer péptido identificado en *Arabidopsis thaliana* y que participa en la expansión celular de la raíz y la vascularización de la hoja (Topping and Lindsey, 1997), así como en la correcta homeostasis de etileno, auxinas y citoquininas, y en la regulación del desarrollo de la raíz al actuar regulando negativamente la ruta de señalización del etileno (Matsubayashi and Sakagami, 2006; Mudge, 2016; Sudan et al., 2018). También encontramos a ENOD40 (EARLY NODULIN 40), que fue identificado inicialmente como un lncRNA pero se ha descubierto que codifica dos pequeños péptidos policistrónicos y que está involucrado en la diferenciación y división de las células de la raíz induciendo la formación de nódulos en leguminosas al unirse al factor de transcripción NNC1 (NODULE NUMBER CONTROL1), que regula negativamente la nodulación, y promoviendo la entrada de sacarosa en las células del córtex de la raíz contribuyendo a su división a través de su interacción con la sacarosa sintasa (Matsubayashi and Sakagami, 2006; Gancheva et al., 2019; Feng et al., 2023). En esta categoría también encontramos a los péptidos codificados por la familia génica *DEVIL/ROTUNDIFOLIA (DVL/RTFL)*, los cuales serán objeto de estudio de este trabajo.

Con estos ejemplos se pone de manifiesto que los péptidos pequeños de plantas se encuentran en diferentes especies vegetales estando conservados entre muchas de ellas manteniendo así muchos aspectos estructurales y funcionales que permiten llevar a cabo un mejor estudio de cada uno de ellos (Feng et al., 2023). Además, muchos de estos péptidos están codificados por familias génicas de varios miembros y a menudo se unen a sus correspondientes familias de receptores, lo que provoca que exista, en algunas ocasiones, cierta redundancia génica y funcional entre los diferentes miembros de la familia (Katsir et al., 2011).

La gran cantidad de péptidos pequeños presentes en las plantas, responsables de múltiples funciones, genera la necesidad de profundizar en el conocimiento de los péptidos vegetales no tan caracterizados hasta el momento. Además, la investigación de sus mecanismos moleculares puede contribuir a una mejor comprensión de sus funciones potenciales para mejorar las características de los cultivos o utilizar péptidos en aplicaciones biotecnológicas (Feng et al., 2023).

2. Los péptidos DEVIL

Los péptidos DEVIL (DVL) constituyen una familia de pequeños péptidos codificados por la familia génica *DEVIL (DVL)*, con más de una veintena de miembros en el caso de *Arabidopsis thaliana*. Se trata de péptidos no derivados de un precursor, no secretados y codificados por sORFs cuya función aún sigue siendo desconocida a pesar de que los fenotipos que causan su

sobreexpresión parecen indicar un papel en el desarrollo de múltiples órganos de la planta (Wen et al., 2004; Narita et al., 2004; Ikeuchi et al., 2011; Guo et al., 2015; Tavormina et al., 2015).

Estos genes fueron descubiertos en *Arabidopsis thaliana* a partir del escrutinio de una población mutagenizada por inserciones de T-DNA de *activation tagging*, caracterizados por contener elementos promotores de la transcripción capaces de generar fenotipos de ganancia de función por la expresión ectópica de los genes cercanos al punto de inserción del T-DNA. En este escrutinio se aisló e identificó un nuevo gen, *DEVIL1* (*DVL1*), que codifica un polipéptido de 51 aminoácidos que no guardaba similitud con proteínas identificadas con anterioridad y que está codificado por el ORF más largo del transcrito *DVL1*, que contiene cuatro ORFs en total (Wen et al., 2004; Tavormina et al., 2015). La sobreexpresión del gen *DVL1* provocaba cambios morfológicos pronunciados en el desarrollo de la planta caracterizados por hojas de roseta más redondeadas, plantas de menor estatura, peciolo cortos e inflorescencias compactas con pétalos y sépalos más cortos que resultaban en una exposición del pistilo por fuera de la yema cerrada. Las flores eran completamente fértiles y las semillas no parecían estar alteradas. Además, las valvas de las silicuas presentaban protrusiones astadas en los ápices, característica última por la que se le da nombre al gen y, por ende, a la familia (**Figura 3**) (Wen et al., 2004).

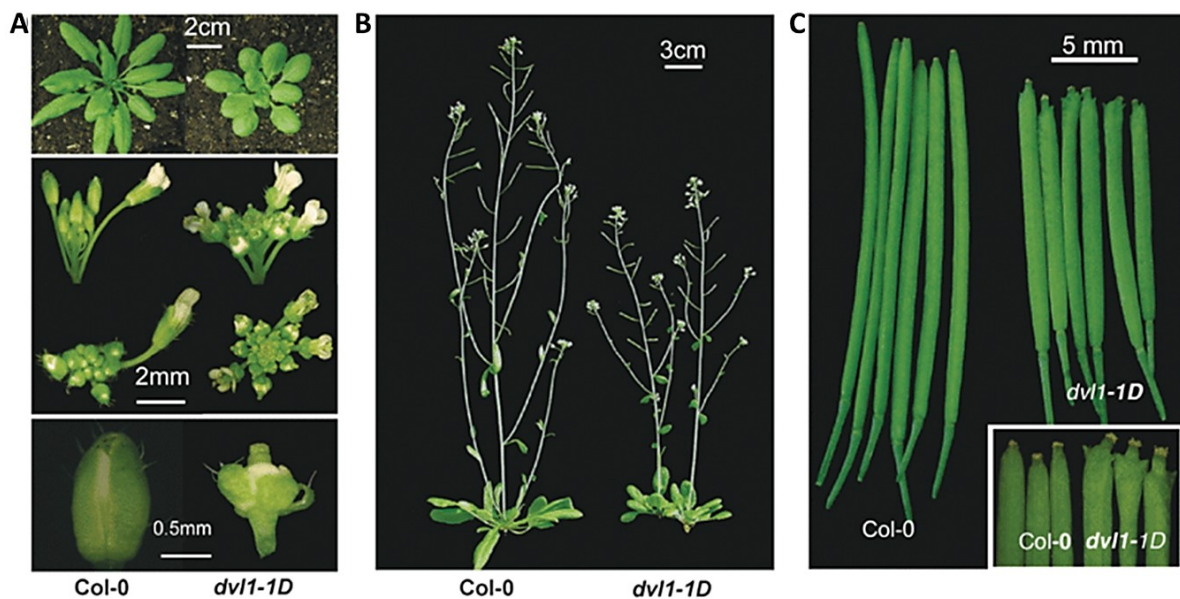


Figura 3. Fenotipos de las plantas *dvl1-1D* (*devil1-1 Dominant*) asociados a la sobreexpresión del gen *DVL1*. A) Comparación de las rosetas (panel superior), inflorescencias (panel intermedio) y capullo de la flor (panel inferior) entre la planta silvestre (Col-0) y la planta *dvl1-1D*. B) Plantas silvestres (Col-0) y *dvl1-1D* a las 6 semanas de crecimiento. C) Silicuas de plantas silvestres (Col-0) y plantas *dvl1-1D*, el recuadro muestra una visión aumentada del ápice de los frutos. Imagen de Wen et al., 2004.

La búsqueda en bases de datos reveló que el gen *DVL1* pertenece a una familia génica de más de 20 miembros en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, la mayoría de ellos genes no anotados en ese momento. Los miembros de la familia DVL comparten homología en su

INTRODUCCIÓN

secuencia, con un dominio conservado de unos 30 aminoácidos en el extremo C-terminal con varios aminoácidos estrictamente conservados, mientras que la parte N-terminal es más diversa. Los miembros de la familia más relacionados están agrupados en el mismo clado compartiendo otros motivos conservados entre sí, generalmente en esta parte N-terminal (**Figura 4**) (Wen et al., 2004; Narita et al., 2004; Guo et al., 2015).

Inicialmente se descubrieron homólogos de *DVL1* sólo en otras plantas angiospermas, creyéndolos específicos de éstas, aunque posteriormente, con la secuenciación de más genomas de plantas de taxones más basales, se ha demostrado que la familia *DVL* se encuentra ampliamente conservada en el mundo vegetal, manteniendo la homología de secuencia en el extremo C-terminal (**Figura 4**) (Wen et al., 2004; Floyd and Bowman, 2011; Guo et al., 2015).

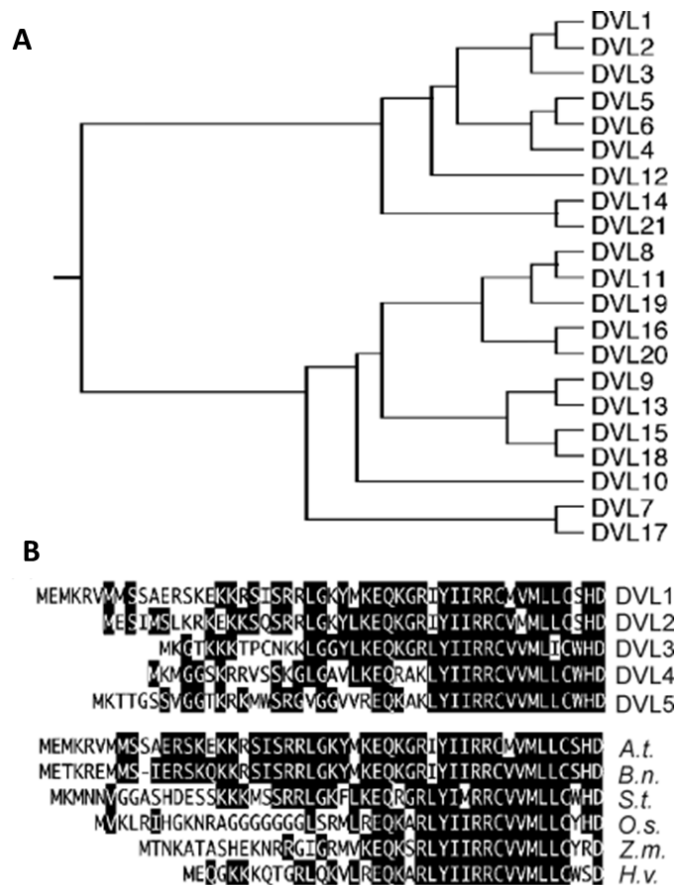


Figura 4. *DVL1* pertenece a una familia génica. A) Árbol filogenético de la familia *DVL* en *Arabidopsis thaliana*. B) Alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondientes a los cinco genes de *Arabidopsis* más cercanos a *DVL1*. Los cinco miembros escogidos de la familia *DVL* comparten una alta homología en su extremo C-terminal. A.t., *Arabidopsis thaliana*; B.n., *Brassica napus*; S.t., *Solanum tuberosum*; O.s., *Oryza sativa*; Z.m., *Zea mays*; H.v., *Hordeum vulgare*. Imagen de Wen et al., 2004.

El segundo gen de la familia que se identificó y que se ha caracterizado con cierta profundidad es *ROTUNDIFOLIA4 (ROT4)*. Fue identificado en un estudio independiente sobre la morfogénesis de la hoja en *Arabidopsis thaliana* a partir del escrutinio de una población mutagenizada de *activation tagging*, al igual que el mutante *dv11-1D*. *ROT4* codifica un péptido

de 53 aminoácidos y en este estudio también se relacionó con otros 23 genes homólogos de *Arabidopsis*, que los autores denominaron *ROTUNDIFOLIA-LIKE (RTFL)*, pero que eran parálogos y equivalentes a los genes *DEVIL* descritos anteriormente. Así, la familia se ha denominado *DEVIL/ROTUNDIFOLIA (DVL/RTFL)*, y con la secuenciación completa del genoma se ha definido como compuesta por 24 miembros en *Arabidopsis thaliana* (Narita et al., 2004; Wen et al., 2004; Guo et al., 2015).

El mutante *rot4-1D* muestra fenotipos pleiotrópicos similares a los de *dv1-1D* durante el desarrollo de la planta, con órganos florales más anchos y cortos, hojas pequeñas y redondeadas y tallos de inflorescencia cortos (**Figura 5**) (Narita et al., 2004). También se ha mostrado que las hojas más cortas se deben a una reducción en el número de células de eje longitudinal, cuyo tamaño sin embrago no está alterado (**Figura 5E**), lo que ha llevado a proponer que *ROT4* controla la proliferación de células de un modo direccional (Narita et al., 2004).

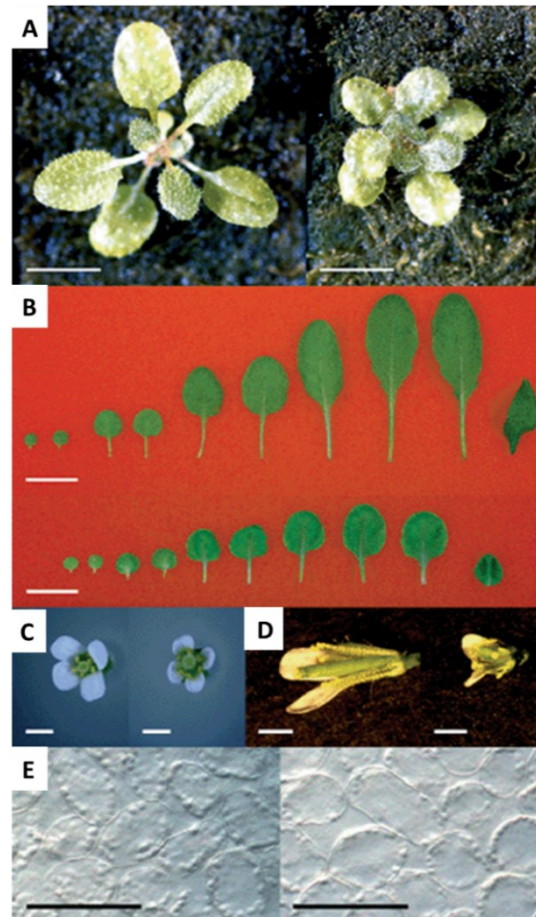


Figura 5. Fenotipos de *rot4-1D*. A) Plantas de 25 días de edad silvestres (izquierda) y *rot4-1D* (derecha). Escala 10 mm. B) Hojas de plantas de 33 días de edad silvestres (arriba) y *rot4-1D* (abajo). De izquierda a derecha se muestra un par de cotiledones, las primeras 7 hojas de follaje y una hoja caulinar. Escala 10 mm. C) Vista superior de flores silvestres (izquierda) y *rot4-1D* (derecha). Escala 1 mm. D) Vista lateral de flores silvestres (izquierda) y *rot4-1D* (derecha). Se han eliminado dos sépalos y pétalos. Escala 1 mm. E) Células en empalizada de la porción media de la tercera hoja de roseta de 38 días de edad de plantas silvestres (izquierda) y *rot4-1D* (derecha). Escala 0,1 mm. Imagen de Narita et al., 2004.

INTRODUCCIÓN

ROT4 parece ser un péptido no móvil sintetizado sin un procesamiento proteolítico, ya que la sobreexpresión de *ROT4* con una proteína fluorescente GFP fusionada tanto en el extremo N-terminal como en el C-terminal (*ROT4*-GFP y GFP-*ROT4*) da lugar a fenotipos similares. Estas líneas también indican su localización en la membrana plasmática, a pesar de que no es posible predecir dominios transmembrana en su secuencia (**Figura 6**) (Narita et al., 2004; Ikeuchi et al., 2011). La localización de *ROT4* en la membrana parece ser necesaria para su función molecular, puesto que si se sobreexpresa la CDS de *ROT4* fusionada a señales de localización intracelular diferentes no se observan los fenotipos característicos de *rot4-1D* (Narita et al., 2004; Wen and Walker, 2006; Yamaguchi and Tsukaya, 2006; Ikeuchi et al., 2011).

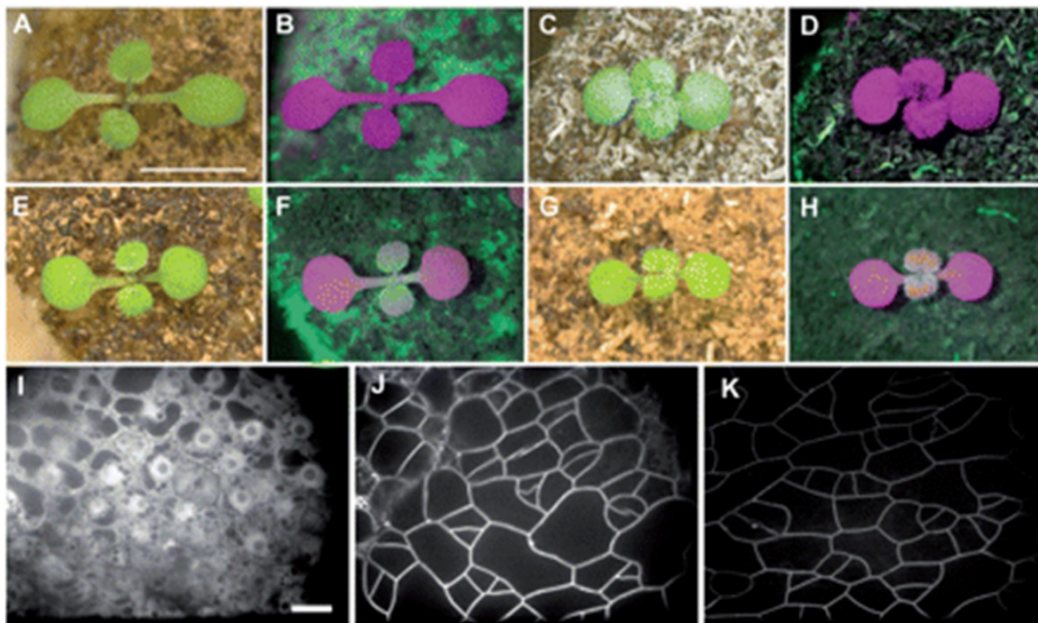


Figura 6. Detección de *ROT4* etiquetado con GFP. Plántulas de 8 días de edad silvestres (A y B), p35S:*ROT4* (C y D), p35S:*ROT4*-GFP (E y F), y p35S:GFP-*ROT4* (G y H). Imágenes de campo claro (A, C, E y G), imágenes de fluorescencia (B, D, F y H): el color magenta muestra la auto fluorescencia y el verde la señal GFP. Localización subcelular de la GFP libre (I), *ROT4*-GFP (J) y GFP-*ROT4* (K). Escala 5 mm (A) y 10 μ m (I). Imagen de Ikeuchi et al., 2011.

También se ha demostrado, mediante la sobreexpresión de diferentes porciones truncadas de la proteína *ROT4*, que el dominio funcional conservado DVL/RTFL parece ser suficiente y necesario para su función, así como para dar lugar a los fenotipos de sobreexpresión tan característicos (Narita et al., 2004; Ikeuchi et al., 2011). El resto de la secuencia de los miembros de la familia DVL/RTFL, especialmente la región N-terminal, se encuentra poco conservada y estudiada (Narita et al., 2004; Wen and Walker, 2006; Ikeuchi et al., 2011). La variabilidad en longitud de las secuencias aminoacídicas de los miembros de la familia DVL/RTFL (40 – 144 aminoácidos en *Arabidopsis*) sugiere que podrían modular su actividad o alguna característica funcional y conferir roles o funciones específicas (Guo et al., 2015).

El conocimiento que se tiene de la posible función biológica de los péptidos DVL/RTFL se debe básicamente a los fenotipos observados en líneas de sobreexpresión. La sobreexpresión de otros miembros de la familia génica *DVL/RTFL* en *Arabidopsis* da lugar a fenotipos pleiotrópicos similares, con hojas de roseta más pequeñas y redondeadas, órganos florales más cortos y compactos, así como estructuras protuberantes en las valvas de los frutos, en la base de los pedicelos y en los tricomas (Wen et al., 2004; Narita et al., 2004; Wen and Walker, 2006; Ikeuchi et al., 2011; Valdivia et al., 2012). Los cambios en la morfología de los frutos resultan ser una de las características más notables de los fenotipos asociados a la sobreexpresión, pues ésta varía, en el caso de *Arabidopsis*, en función del miembro de la familia que se sobreexpresa. Así, nos encontramos tanto silicuas con protrusiones astadas en los ápices de las valvas, como en la base o en dominios centrales, dando lugar a frutos con formas de punta de flecha, de jarra o de flecha invertida, entre otras (**Figura 7**) (Wen et al., 2004; Narita et al., 2004). Se piensa que esta variabilidad en la morfología del fruto puede deberse a la región N-terminal génica no conservada de la familia *DVL/RTFL* (Guo et al., 2015).

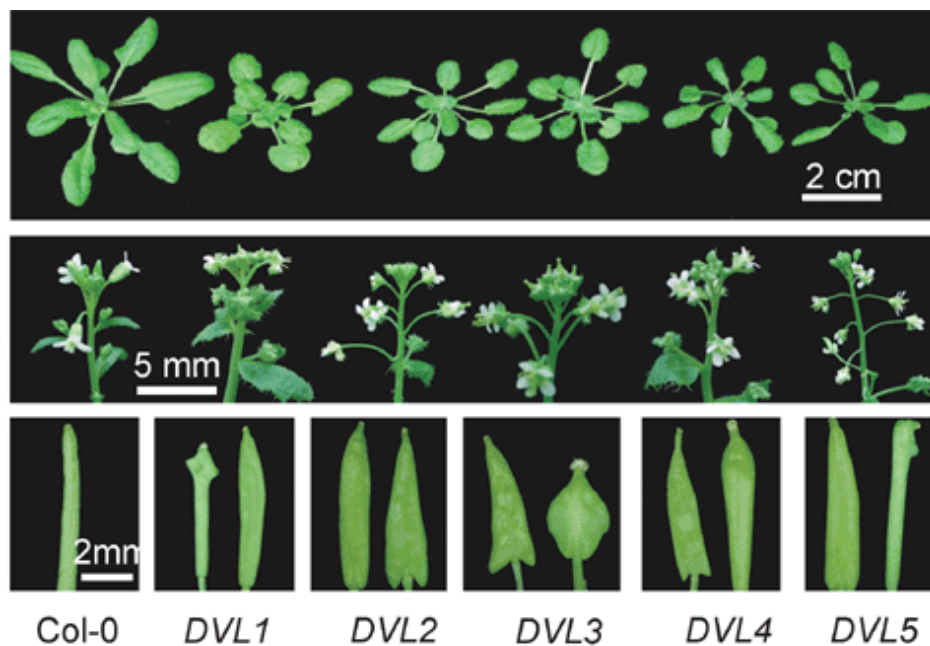


Figura 7. Fenotipos asociados a la sobreexpresión de los genes *DVL*. Comparación de los fenotipos de roseta (panel superior), inflorescencias (panel intermedio) y silicuas (panel inferior) en líneas de sobreexpresión de diferentes genes *DVL*. Las plantas del panel superior tienen tres semanas de edad. En el panel inferior se muestran dos silicuas para observar la variación fenotípica en líneas transgénicas desde *DVL1* hasta *DVL5*. Imagen de Wen et al., 2004.

Sin embargo y, a pesar de los fenotipos tan sorprendentes causados por la sobreexpresión de diferentes genes *DVL/RTFL*, las líneas de pérdida de función caracterizadas hasta ahora no aportan información alguna sobre la función biológica de la familia *DVL/RTFL*. Los mutantes simples de pérdida de función descritos en la literatura, como son los mutantes generados por

INTRODUCCIÓN

RNA de interferencia de *DVL1/RTFL18* y *DVL3/RTFL21* (Wen et al., 2004) o el mutante de inserción *DVL15/RTFL4* (Narita et al., 2004), no producen ningún fenotipo de pérdida de función evidente. Estos resultados sugieren una posible redundancia génica y funcional entre los diferentes miembros de la familia *DVL/RTFL* con una secuencia aminoacídica similar (Wen et al., 2004; Narita et al., 2004; Guo et al., 2015). Como consecuencia, su verdadera función biológica en la planta se desconoce hasta el momento.

Como ya se ha dicho, la familia génica *DVL/RTFL* no es exclusiva de *Arabidopsis thaliana*, donde se han llevado a cabo la mayoría de los estudios hasta el momento, sino que se encuentra ampliamente conservada entre las plantas terrestres (Floyd and Bowman, 2011; Guo et al., 2015). Sin embargo, los estudios llevados a cabo en otras especies son escasos.

Uno de estos estudios, realizado en arroz (*Oryza sativa*), ha identificado dos mutantes de inserción en los genes parálogos nombrados como *OsRTFL1* y *OsRTFL2*. Estos dos mutantes de arroz, *osrtfl1-1* y *osrtfl2-1*, no muestran ningún fenotipo evidente, ni en términos de forma de órganos ni cualquier otro carácter morfológico en general (Narita et al., 2004). Un análisis posterior ha estudiado el papel de otro miembro de la familia *DVL/RTFL* en arroz, *OsRTFL3*, determinando que tiene una función similar y conservada a *ROT4* en el desarrollo y control de la organogénesis a partir de la caracterización del efecto de la sobreexpresión de este gen de arroz en *Arabidopsis*, que da lugar a fenotipos similares y característicos de la sobreexpresión de los genes *DVL/RTFL* (Guo et al., 2015).

Por otra parte, un estudio realizado en *Medicago truncatula* ha identificado un gen de esta familia, *MtDVL1*, que se activa durante los estadios iniciales de la nodulación, y que parece actuar como regulador negativo de ésta, puesto que la sobreexpresión de *MtDVL1* reduce la nodulación (Combier et al., 2008). Es posible que esta función esté también relacionada con la regulación de la proliferación celular, ya que la reactivación del ciclo celular en respuesta a la infección es un paso clave en el proceso de nodulación (Valdivia et al., 2012).

Un estudio filogenético utilizando las secuencias aminoacídicas predichas completas de 188 miembros *DVL/RTFL* de 22 especies de plantas terrestres, desde hepáticas hasta angiospermas, ha permitido explorar un poco más la evolución de esta familia. En este análisis comparativo se han identificado 73 motivos aminoacídicos específicos que permiten agrupar a todos los miembros *DVL/RTFL* en cuatro clados con patrones de motivos concretos (Guo et al., 2015).

Este estudio comparativo sugiere también un rasgo evolutivo de la familia *DVL/RTFL*, revelando patrones de motivos de secuencias aminoacídicas específicas entre las diferentes

especies. Así, los genes de especies que comparten posiciones evolutivas tempranas entre las plantas terrestres como pueden ser *Marchantia polymorpha*, *Physcomitrella patens* o *Picea sitchensis*, se agrupan en el mismo clado, de manera que el patrón de motivos de dicho clado puede representar la estructura ancestral de la familia *DVL/RTFL*. Lo mismo ocurre con otros clados y motivos que se encuentran en los genes de las plantas con flor, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, lo que podría estar relacionado con la diversificación de las angiospermas, y que la familia *DVL/RTFL* podría haber ganado motivos adicionales después de la divergencia de sus antepasados. Así mismo, también se encuentran motivos conservados específicamente entre eudicotiledóneas o entre monocotiledóneas. Por tanto, según estos patrones de motivos, se deduce que la familia *DVL/RTFL* podría haberse originado a partir de secuencias ancestrales presentes en briófitas tempranas y habría experimentado una expansión amplia durante la transición a las plantas con flores. Este tipo de trayectorias evolutivas sugiere un cierto grado de diversificación funcional, que podría depender de los nuevos motivos adquiridos, y también la relevancia biológica de estos péptidos, que podrían estar adquiriendo nuevas funciones en distintos taxones (Guo et al., 2015).

El probablemente elevado nivel de redundancia entre los diferentes miembros de la familia *DVL/RTFL* en una misma especie (Wen et al., 2004; Narita et al., 2004; Guo et al., 2015), sumado al hecho de que en *Arabidopsis thaliana* encontramos un número muy alto de parálogos (Guo et al., 2015), dificulta los estudios sobre la familia *DVL/RTFL* basados en la caracterización fenotípica de mutantes de pérdida de función. Así, las especies con un menor número de parálogos podrían emplearse para realizar este tipo de estudios, como es el caso de las briofitas, con un solo gen en *Marchantia polymorpha* y dos genes en *Physcomitrella patens*, que pueden ayudar a dilucidar la función y a estudiar la evolución de los genes *DVL/RTFL* (Guo et al., 2015).

3. *Marchantia polymorpha* como organismo modelo

La hepática *Marchantia polymorpha* se ha convertido en uno de los organismos modelos experimentales por excelencia, debido a su baja redundancia génica y la disponibilidad de herramientas moleculares versátiles que incluye una edición eficiente del genoma. Es posible así proporcionar pistas sobre los mecanismos subyacentes a la biología eco-evo-devo en las plantas (Kohchi et al., 2021). *Marchantia polymorpha* es una especie hepática común, con un ciclo de vida corto, dioica, fácil de cultivar, propagar y cruzar, con una alta frecuencia de transformación, haploide y un tamaño de genoma pequeño (Ishizaki et al., 2016; Shimamura, 2016).

INTRODUCCIÓN

El cuerpo plano taloide básico de las hepáticas difiere mucho de las plantas con flores, lo que refleja la divergencia evolutiva entre estos dos grupos (Shimamura, 2016), hecho que puede parecer una desventaja a la hora de extrapolar las funciones de una y otras especies. Sin embargo, su pequeño genoma, baja redundancia génica y muchos fenómenos biológicos conservados de una manera mucho más simple que en otras plantas terrestres, sumado al cada vez más amplio conocimiento experimental, sí convierte a *Marchantia polymorpha* en un sistema modelo muy útil para abordar cuestiones fundamentales de genética molecular y procesos de desarrollo de las plantas terrestres (Shimamura, 2016; Bowman, 2016; Ishizaki et al., 2016; Kohchi et al., 2021)

Marchantia polymorpha se caracteriza por un ciclo de vida con una alternancia de generaciones entre una fase multicelular haploide gametofítica y dominante, caracterizada por la presencia del cuerpo principal de la planta o talo; y una fase multicelular diploide esporofítica (**Figura 8**) (Shimamura, 2016; Kohchi et al., 2021).

La generación del gametofito haploide comienza con una espora unicelular que germina y forma un protonema filamentosamente corto inicial con rizoides. La organización del cuerpo vegetal taloide complejo se origina a través de la división celular activa y altamente regulada de una célula apical, que aparece en el protonema o protalo en desarrollo. Los conceptáculos de gemas o copas de gemas, contienen numerosas gemas multicelulares y se forman en la parte dorsal del talo maduro. A través de la producción de gemas, el talo es capaz de reproducirse asexualmente (**Figura 8**) (Shimamura, 2016; Kohchi et al., 2021).

Marchantia polymorpha es una especie dioica que posee órganos sexuales masculinos y femeninos erguidos, que aparecen como ramas modificadas en el talo, denominados gametóforos. En éstos se desarrollan los gametos: en los anteridios, formados en los anteridióforos, órganos masculinos pedunculados terminados en una cabeza discoidal; y en los arquegonios, formados en los arquegonióforos, órganos femeninos terminados en una cabeza en forma de paraguas con 7-10 lóbulos radiales. Esta especie transita de la fase vegetativa a la reproductiva bajo condiciones de día largo suplementadas con luz roja lejana. En la cavidad central del arquegonio se forma la célula huevo y cada anteridio produce numerosos gametos masculinos móviles o células espermáticas. Cuando estas células espermáticas alcanzan la célula huevo con ayuda mecánica del agua, la fertilizan. El cigoto, tras múltiples divisiones mitóticas, se desarrolla en un esporofito multicelular diploide dentro del arquegonio. Tras múltiples divisiones meióticas, dependientes de las condiciones de luz, dentro del arquegonio primero y fuera de éste después, se forman esporas que darán lugar al protalo y al siguiente talo maduro haploide (**Figura 8**) (Ishizaki et al., 2016; Shimamura, 2016; Kohchi et al., 2021).

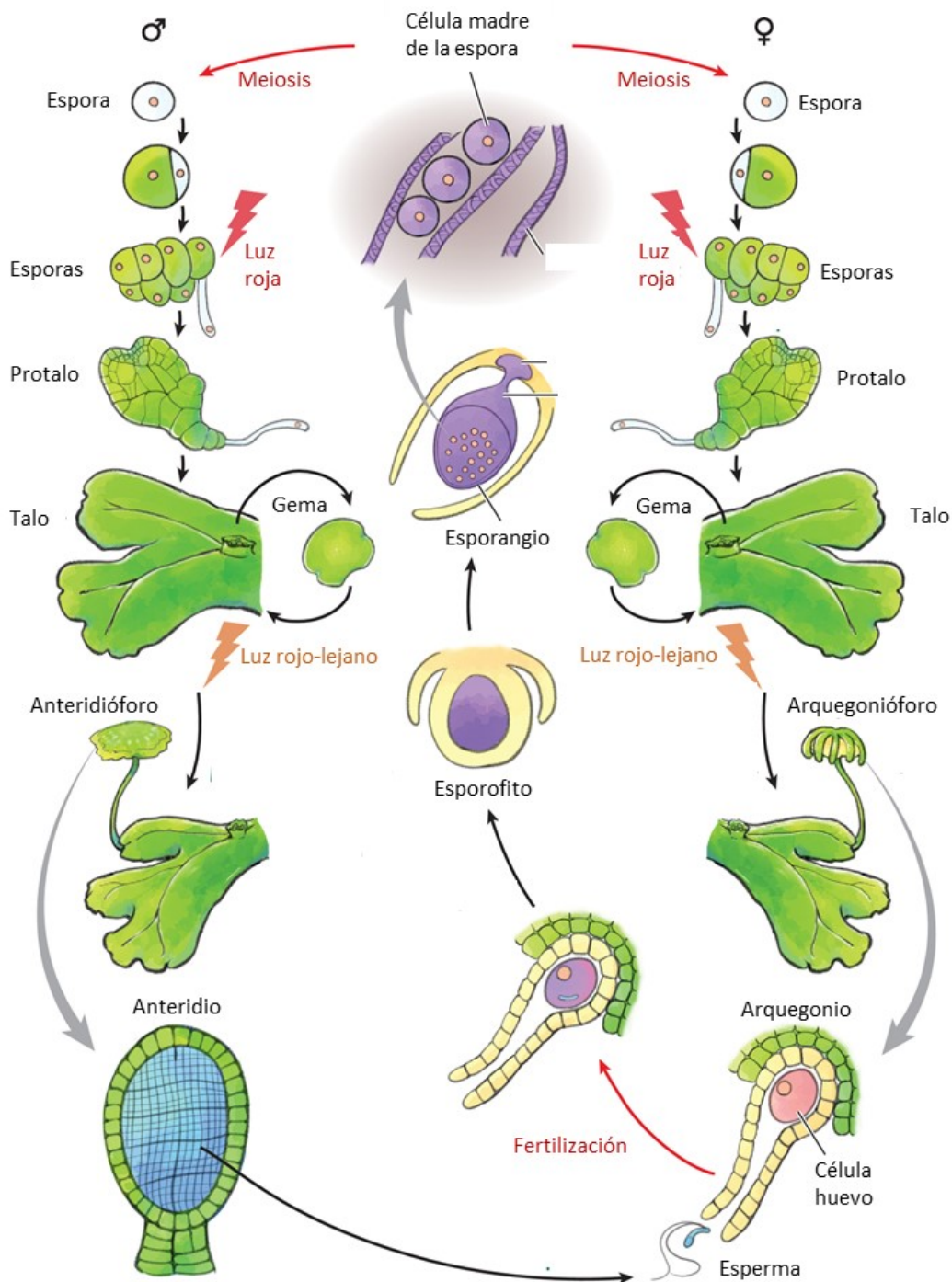


Figura 8. Ciclo de vida de *Marchantia polymorpha*. El desarrollo del gametofito se ilustra para el tipo masculino (izquierda) y femenino (derecha). El desarrollo del esporofito se muestra en la parte central morada. La meiosis y fertilización se resaltan en rojo. Imagen adaptada de Kohchi et al., 2021.

Volviendo a la fase vegetativa, dominante en el ciclo de vida de *Marchantia polymorpha*, el talo es un cuerpo gametofítico de varias capas con polaridad dorsoventral, que posee un punto de crecimiento en los nichos apicales de cada lóbulo, que sufre bifurcaciones periódicas. Durante esta fase haploide, docenas de progenies clonales o gemas se forman en las copas o conceptáculos, que se originan repetidamente en la parte dorsal del talo. Una gema madura tiene dos puntos de crecimientos diferenciados que permanecen en estado de dormancia hasta

INTRODUCCIÓN

que se dispersan fuera de las copas por acción mecánica, de manera que cada gema se desarrollará en un talo individual (**Figura 9**) (Ishizaki et al., 2016).

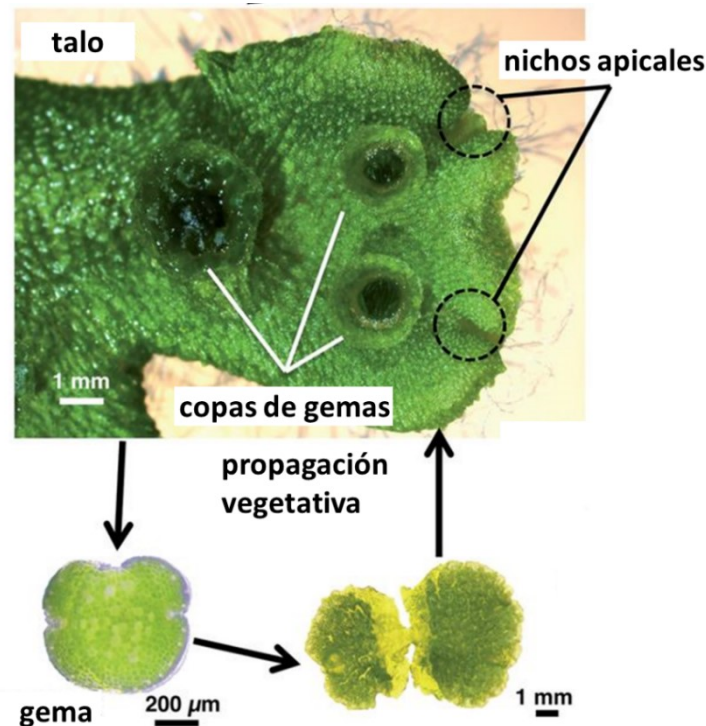


Figura 9. Fase y propagación vegetativa en el ciclo de vida de *Marchantia polymorpha*. Desarrollo del talo a partir del crecimiento de las células meristemáticas de los nichos apicales y propagación asexual a partir de gemas formadas en las copas de gemas. Imagen adaptada de Ishizaki et al., 2016.

El talo maduro se trata de un cuerpo de planta complejo con un crecimiento plano indeterminado y que forma diferentes órganos y tejidos. En el eje dorsoventral se pueden encontrar tres capas diferenciadas: una capa de asimilación en la parte superior formada por cámaras aeríferas, una región de almacenamiento intermedia con células parenquimáticas, y una epidermis ventral con estructuras tipo escamas y células tubulares (**Figura 10**) (Ishizaki et al., 2016; Shimamura, 2016; Kohchi et al., 2021) .

Las cámaras aeríferas, separadas entre sí por una única capa de células se abren al exterior a través del poro aerífero, un espacio intracelular rodeado circularmente por cuatro niveles de células que forman un barril (**Figura 10**) (Shimamura, 2016). Estas cámaras, equipadas con poros y filamentos asimiladores, facilitan el intercambio de gases para la fotosíntesis, la transpiración y la respiración (Shimamura, 2016; Kohchi et al., 2021).

La superficie ventral del talo de *Marchantia polymorpha* se encuentra cubierta por muchas escamas en forma de hojas y células tubulares o rizoides. Las escamas ventrales, de una célula de grosor, se desarrollan en los lados izquierdo y derecho del talo dispuestas en hileras. Por su parte, los rizoides son protuberancias unicelulares formadas a partir de células ventrales

que se desarrollan rápidamente mediante un crecimiento polarizado y pueden ser lisos, penetrando en el suelo, o tuberculados, que se extienden horizontalmente (**Figura 10**). Estos órganos ventrales permiten el anclaje de la planta al suelo y el transporte de agua y nutrientes (Shimamura, 2016; Kohchi et al., 2021).

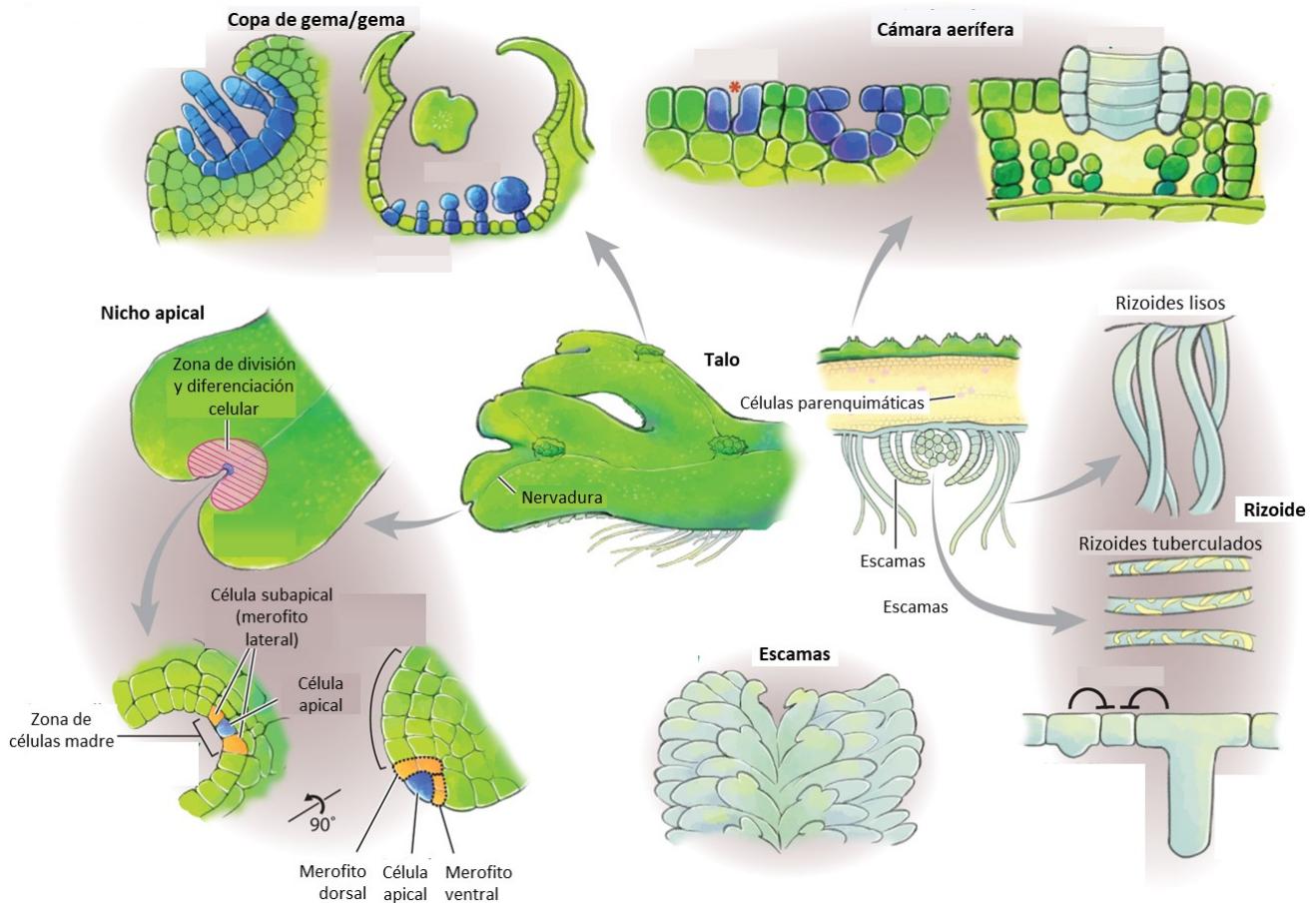


Figura 10. Estructuras vegetativas de *Marchantia polymorpha*. Ilustración esquemática del talo (centro) y sus estructuras, incluyendo las cámaras aeríferas, las copas de gemas y gemas, nervadura, nicho apical, estructura tipo escama y rizoides. Las células que están participando de forma activa en el desarrollo están coloreadas de azul y naranja. Imagen adaptada de Kohchi et al., 2021.

Anteriormente se ha comentado que el talo crece a partir de bifurcaciones de los nichos apicales. Los nichos apicales son estructuras cóncavas en el centro de las cuales se encuentra una célula apical en continua división y que sirve de unidad de organogénesis en *Marchantia polymorpha*. El conjunto de células originadas de una única división de la célula apical, también llamado merofito (**Figura 10**), funciona como células amplificadoras de tránsito para la proliferación de futuras células de diferenciación. Así, las divisiones activas de esta zona de células madre y su diferenciación dan lugar a los diferentes órganos dorsales y ventrales como son los poros aeríferos o el rizoide (Kohchi et al., 2021). De esta manera, además, el talo crece a través de ramificaciones dicotómicas periódicas mediante nichos apicales bifurcados (Solly et

INTRODUCCIÓN

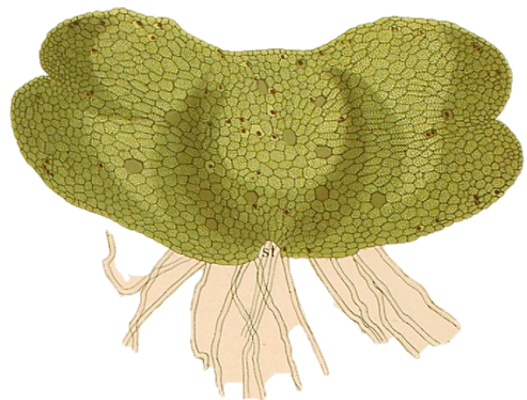
al., 2017), que se acompaña de replicaciones de la célula apical durante la fase vegetativa (Kohchi et al., 2021).

Con todo esto, *Marchantia polymorpha* tiene el potencial para ser un modelo clave de estudio de cualquier proceso eucariota básico. Así, todos los métodos comúnmente usados en modelos eucariotas han sido implementados en esta especie y técnicas moleculares como la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*, estrategias de genética molecular como la introducción de construcciones reporteras, sobreexpresión, silenciamiento génico o modificaciones dirigidas, disponen de protocolos eficientes (Berger et al., 2016; Ishizaki et al., 2016).

Adicionalmente, la reproducción asexual a través de gemas producidas clonalmente permite mantener las líneas con un costo de mantenimiento menor al de otros organismos modelo. Por otra parte, la transición de la reproducción vegetativa a la sexual es fácilmente controlable, lo que permite realizar estudios genéticos avanzados, y características morfológicas como tipos celulares transparentes o polarizadas hacen que sea adecuada para estudios de biología celular (Berger et al., 2016; Ishizaki et al., 2016).

Estas características, junto con su pequeño genoma y su estilo de vida predominantemente haploide, hacen de *Marchantia polymorpha* un modelo tremendamente eficiente para estudios funcionales (Berger et al., 2016; Ishizaki et al., 2016) convirtiéndose por todo ello en un organismo modelo por excelencia para el estudio del reino vegetal.

OBJETIVOS



El **objetivo principal** de esta tesis doctoral consiste en estudiar el papel de los péptidos DEVIL/ROTUNDIFOLIA en el control de la proliferación celular y la morfogénesis de las plantas.

Para ello se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. Caracterizar el papel de los péptidos DEVIL/ROTUNDIFOLIA mediante la determinación del efecto fenotípico de su pérdida de función en mutantes estables.
2. Determinar la relevancia funcional de las interacciones proteína-proteína observadas y su implicación en los mecanismos de acción de DEVIL/ROTUNDIFOLIA.
3. Caracterizar el papel del homólogo DEVIL/ROTUNDIFOLIA en la especie basal *Marchantia polymorpha*.

RESULTADOS: CAPITULO 1



CAPITULO 1. Caracterización del papel de los péptidos DVL/RTFL determinando el efecto fenotípico de las mutaciones de pérdida de función.

Antecedentes y resultados previos

Los genes *DVL/RTFL* fueron identificados en *Arabidopsis* por los fenotipos que confiere su sobreexpresión, que causa cambios morfológicos pronunciados a lo largo del desarrollo, caracterizados por la estatura pequeña de las plantas, hojas de roseta redondeadas, inflorescencias compactas, peciolo cortos y silicuas con formas alteradas. Estos fenotipos de sobreexpresión afectan de un modo fascinante a la morfología de los frutos, que varía, en el caso de *Arabidopsis*, desde formas similares a la de la silicua silvestre hasta formas en punta de flecha, jarra o flecha invertida, entre otras, según el miembro de la familia que se sobreexpresen (Wen et al., 2004). Sin embargo, y en contraste con los fenotipos asociados a la sobreexpresión, los mutantes de pérdida de función caracterizados hasta ahora no presentan fenotipos morfológicos evidentes, por lo que la función biológica de estos péptidos es esencialmente desconocida.

Así, y con anterioridad a este trabajo, en el laboratorio donde se ha realizado esta tesis, se generaron líneas transgénicas con actividad DVL/RTFL reducida mediante una estrategia de silenciamiento múltiple por microRNAs artificiales (amiRNAs, Schwab et al., 2006) diseñados para silenciar los genes *DVL8*, *DVL11*, *DVL19* y *RTFL9* (genes más cercanos filogenéticamente – amiR-*DVL19clade*), con una misma secuencia consenso, complementaria al mRNA de los 4 genes a la vez. Estas líneas sí presentaban fenotipos evidentes en la inflorescencia, más concretamente en estambres, pétalos y sépalos, así como alteraciones morfológicas en el desarrollo foliar (**Figura 11**). Sin embargo, no se observó ningún cambio en la forma de pistilos o frutos, como sí ocurría en las líneas sobrepresoras (Perpiñán, 2013).

El análisis de los niveles de transcrito de los cuatro genes diana silenciados mediante amiRNAs (*DVL8*, *DVL11*, *DVL19* y *RTFL9*) mostró una disminución para el gen *DVL19*, mientras que la expresión del gen *DVL11* permaneció prácticamente inalterada. No se pudo concluir el efecto de los microRNAs artificiales en la expresión de los genes *RTFL9* y *DVL8*, y tampoco se analizó la expresión de otros genes *RTFL/DVL* que hubieran podido ser dianas secundarias del amiRNA. En cualquier caso, se interpretó la reducción de la expresión de *DVL19* junto con la de algún miembro más de la familia como una posible explicación a los defectos severos en la

formación de los órganos florales, que parecían relacionados con defectos en la división y proliferación celular, procesos en cuyo control se ha sugerido la participación de los péptidos DVL (Narita et al., 2004; Ikeuchi et al., 2011; Perpiñán, 2013).

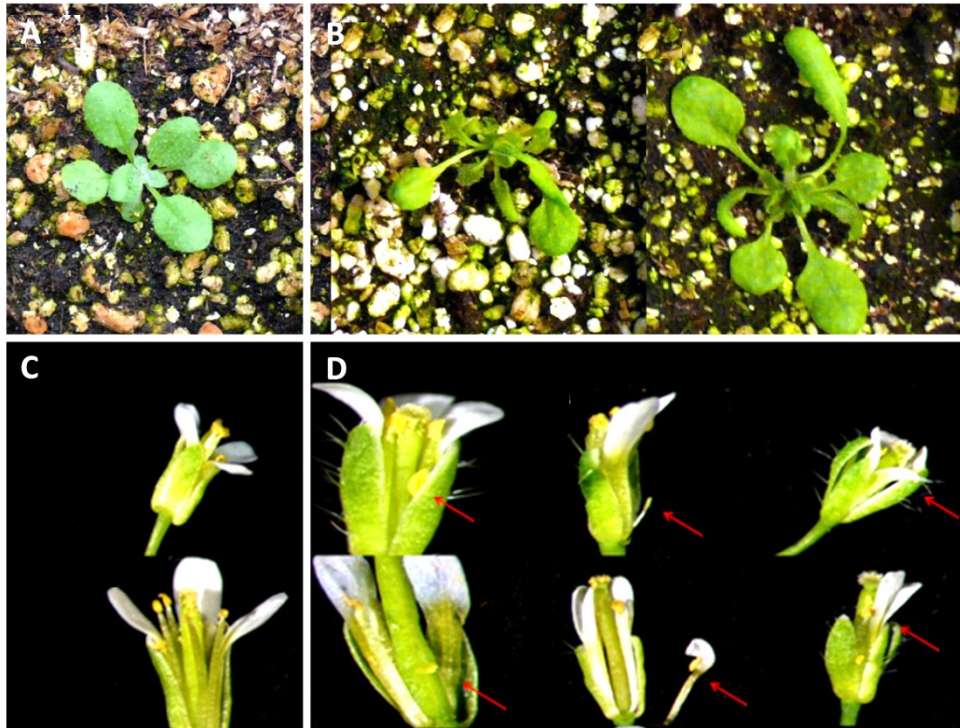


Figura 11. Fenotipos asociados a la reducción de la expresión de genes *DVL* mediada por amiRNA-*DVL19clade*. A y B) Fenotipos asociados a las hojas de roseta en plantas silvestres (A) y líneas amiR-*DVL19clade* (B). C y D) Fenotipos asociados a los órganos florales en plantas silvestres (C) y líneas amiR-*DVL19clade* (D). Las flechas rojas indican los defectos en los estambres y las fusiones entre órganos florales. Imagen adaptada de Perpiñán, 2013.

Adicionalmente, en otro trabajo llevado a cabo en el laboratorio, se generaron líneas reporteras *DVL*promotor::*GUS* y *DVL*promotor::*DVL*cds::*GUS* con el fin de caracterizar el patrón de expresión de los genes *DVL/RTFL* y de localización de los péptidos correspondientes (Primo, 2013). Así, se vio que los promotores de los genes *DVL8* y *DVL11*, concretamente, son activos en determinados dominios espaciales de la inflorescencia, pero que la distribución de los correspondientes péptidos es muy diferente, prácticamente complementaria, a la esperada según la actividad de los promotores (**Figura 12**, Primo, 2013).

Estos resultados sugerían que los péptidos *DVL/RTFL* pudiesen estar experimentando un transporte intercelular activo, de manera que una vez se han expresado en la zona apical del carpelo se puedan transportar hacia los tejidos medios-basales del carpelo donde se localiza la proteína (**Figura 12**), indicando su posible función como péptidos señal, aunque también podría estar teniendo algún proceso de degradación selectiva del péptido en la planta (Primo, 2013).

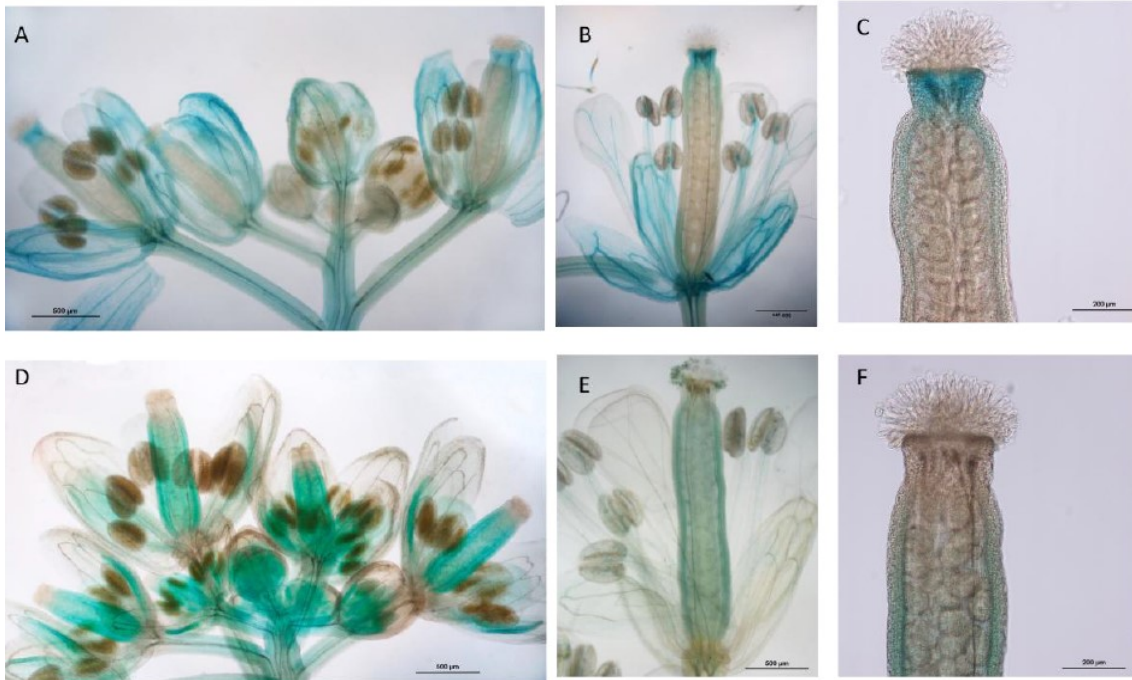


Figura 12. Patrón de expresión de la construcción reportera del gen *DVL8*. A-C) Patrón de expresión de la línea reportera *DVL8*_{pro}::GUS en inflorescencia (A), en flor en post antesis (B) y en detalle del estilo (C). D-F) Patrón de expresión de la línea reportera *DVL8*_{pro}::*DVL8*cds-GUS en inflorescencia (D), en flor en post antesis (E) y en detalle del estilo (F). Imagen de Primo, 2013.

Con estos antecedentes se sugería que los genes de la familia *DVL/RTFL* podían ser importantes en diversos procesos de desarrollo y, por ello, en este trabajo se quiso profundizar en la caracterización de la posible función de los péptidos *DVL/RTFL* en el desarrollo de la planta.

1.1 Caracterización de los mutantes de pérdida de función disponibles.

Con el fin de determinar la función de los péptidos *DVL/RTFL* durante el desarrollo se quiso caracterizar su papel determinando el efecto fenotípico de mutaciones estables de pérdida de función. A pesar de los fenotipos severos observados en líneas que sobreexpresan miembros de la familia de los genes *DVL/RTFL* (Wen et al., 2004; Narita et al., 2004), no se han descrito hasta el momento defectos producidos por su falta de función en mutantes estables (Wen et al., 2004; Narita et al., 2004), lo que se ha atribuido a su probable y extensa redundancia génica (Narita et al., 2004; Guo et al., 2015), por lo que esta tarea constituye uno de los principales objetivos del trabajo.

Partiendo de una colección de líneas mutantes de inserción de T-DNA del *Salk Institute*, se identificaron mutantes para los genes *DVL8*, *DVL11*, *RTFL9*, *RTFL11* y *DVL19*, todos ellos pertenecientes al mismo clado de la familia génica *DVL/RTFL* (**Figura 13**). Estos mutantes se encontraban disponibles en el laboratorio donde se ha realizado el trabajo y tras un análisis fenotípico somero, ninguno de ellos presentó defectos morfológicos evidentes, así como

tampoco lo hicieron los dobles mutantes *dv/8 dv/11* (Primo, 2013). Como paso previo a la generación de líneas múltiples mutantes de mayor orden mediante cruzamiento de mutantes de menor orden, se llevó a cabo un análisis de los niveles de expresión de cada uno de los genes *DVL/RTFL* en su correspondiente mutante simple para comprobar si realmente se trataba de líneas de pérdida de función mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) (Alarcia, 2017).

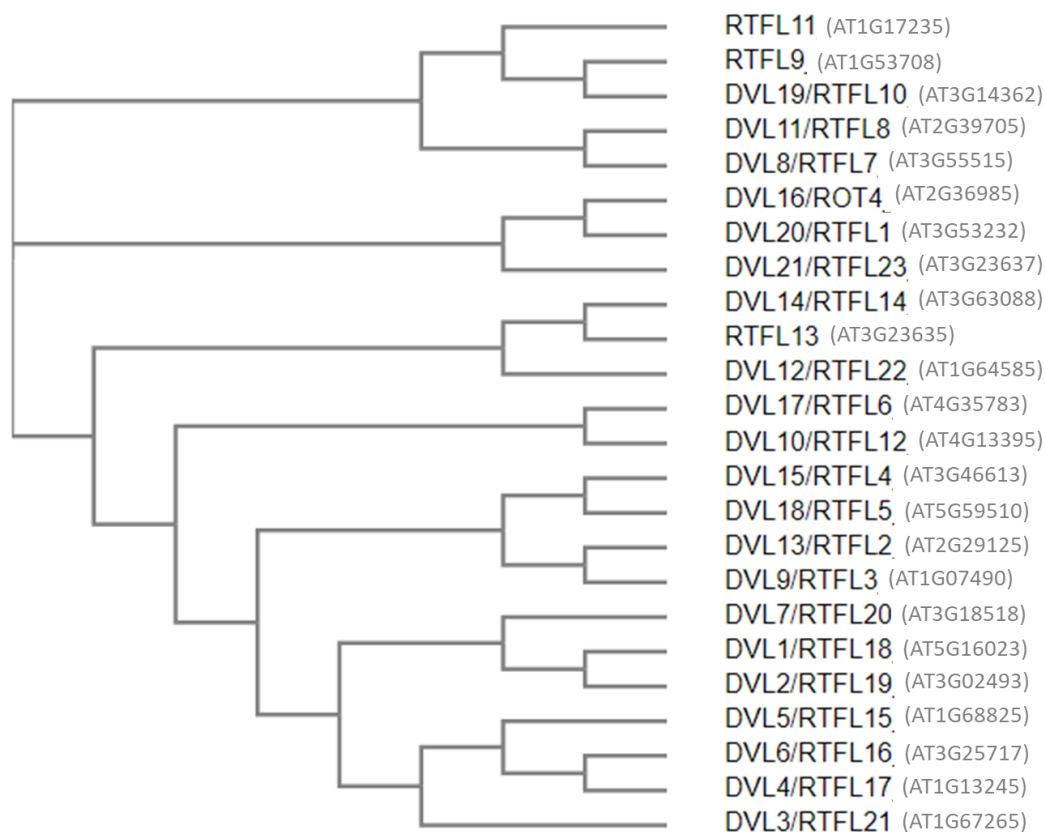


Figura 13. Árbol filogenético de los miembros de la familia *DVL/RTFL* en *Arabidopsis thaliana*. La secuencia completa de aminoácidos de los 24 miembros fue alineada empleando la herramienta web de alineamiento de múltiples secuencias de proteínas de Clustal Omega de EMBL-EBI y el árbol filogenético fue generado empleando el método de *clustering* por el programa Neighbour-Joining (<https://www.ebi.ac.uk/Tools>). Aparece la abreviatura del gen *DEVIL* (DVL) con su equivalente *ROTUNDIFOLIA* (RTFL) y su correspondiente anotación entre paréntesis.

El mutante simple *dv/8* (SALK_093633C) presentaba una inserción de T-DNA dentro del dominio conservado *DVL/RTFL* en la región codificante (**Figura 14A**). Puesto que la inserción se encuentra dentro del dominio conservado e interrumpe la pauta de lectura, es de esperar que cualquier transcrito producido no sea funcional. Además, el análisis de los niveles de expresión del gen *DVL8* mostraba una reducción de entorno a un 80% en el mutante con respecto a las plantas silvestres Col-0 (**Figura 14B**), por lo que se podría decir que nos encontrábamos ante un alelo fuerte de pérdida de función (Alarcia, 2017).

En el caso del alelo mutante empleado para el gen *DVL11* (SALK_204467), la inserción de T-DNA se encontraba dentro de la región codificante a 90 pb del inicio de la CDS, por delante del

dominio conservado (**Figura 14A**) y, además, el análisis del mutante *dv11* no mostraba expresión alguna del gen *DVL11* con respecto a los niveles en plantas silvestres Col-0 (**Figura 14B**). Se disponía, por tanto, de un mutante nulo con una pérdida total de función del gen *DVL11* (Alarcia, 2017). Sin embargo, estudios previos no mostraron ningún fenotipo morfológico evidente en dicho mutante simple (Primo, 2013).

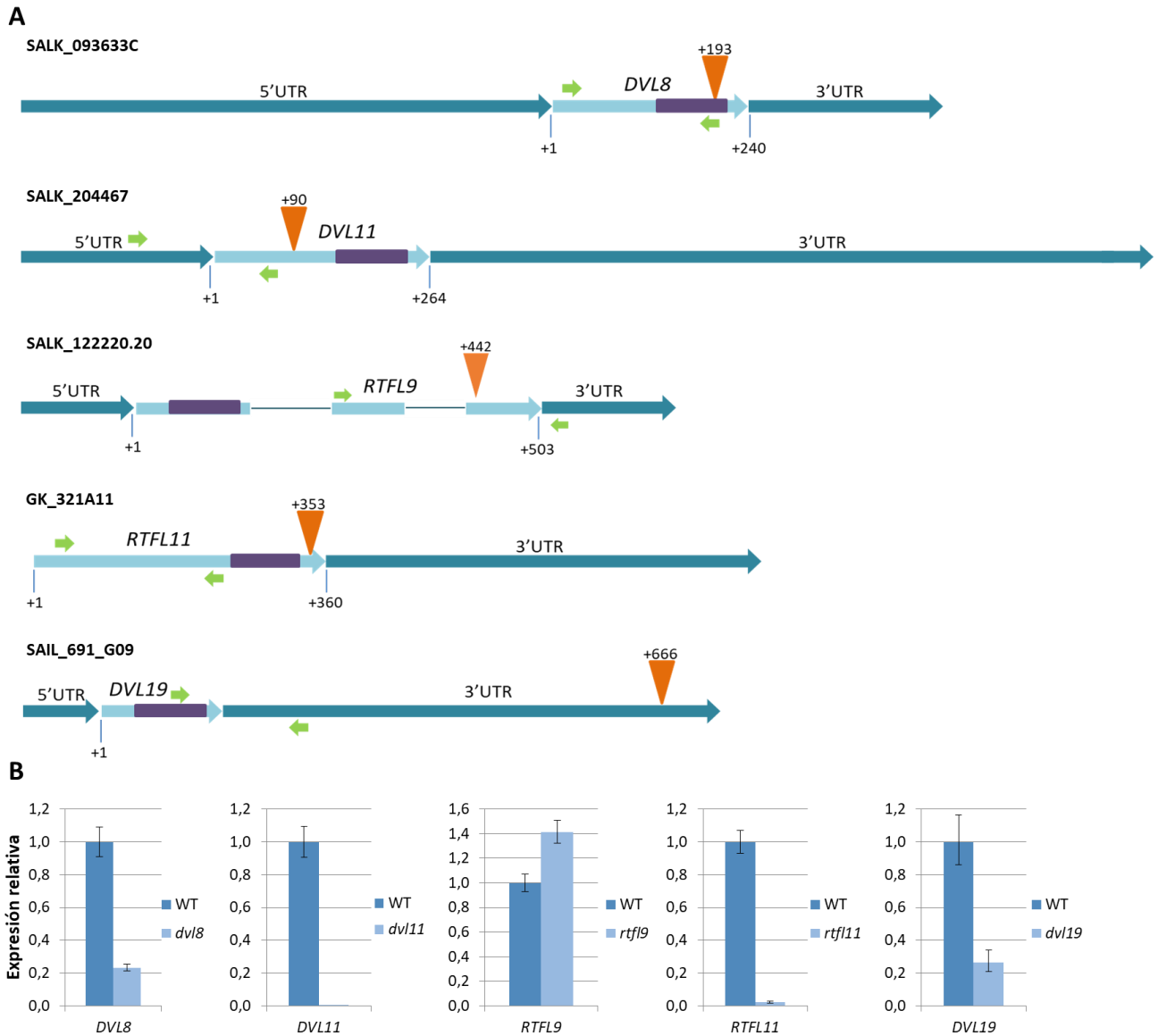


Figura 14. Líneas mutantes de inserción de T-DNA analizadas. A) Representación esquemática de los genes y las inserciones de cada una de las líneas mutantes de T-DNA con su nombre correspondiente. Las flechas naranjas indican la posición de cada una de las inserciones de T-DNA en cada uno de los genes según la información disponible en el *Salk Institute* reflejando la posición en la que se encuentran con respecto al inicio de la CDS, también se indica el inicio y final de la CDS. Las flechas verdes indican las parejas de oligonucleótidos empleados en la cuantificación por RT-qPCR de los niveles de expresión. El motivo conservado *DVL/RTFL* se muestra en morado. B) Niveles de expresión de las líneas mutantes por inserción de T-DNA de cada uno de los genes en el mutante correspondiente. Se muestra el nivel de expresión relativo con respecto a la expresión del gen en el silvestre Col-0. Las barras de error indican el error estándar de las tres réplicas técnicas.

El alelo mutante para el gen *RTFL9* (SALK_122220.20) presentaba la inserción de T-DNA dentro del gen, en el último exón de los tres que componen la región codificante y por detrás del dominio conservado (**Figura 14A**). Sin embargo, el análisis de los niveles de transcrito no mostraba una reducción en la expresión del gen *RTFL9*, sino que estos aumentaban, observándose cierta sobreexpresión (**Figura 14B**). Con estos datos se concluyó que el alelo *rtfl9-1* no era un mutante de pérdida de función del gen *RTFL9* (Alarcia, 2017).

Por último, el mutante disponible para el gen *RTFL11* (GK_321A11) contenía la inserción de T-DNA casi al final de la región codificante, tras el dominio conservado *DVL/RTFL* (**Figura 14A**). Sin embargo, el análisis de expresión indicaba que se trataba de un alelo nulo al no detectarse nivel alguno de expresión del gen *RTFL11* en el mutante *rtfl11* (**Figura 14B**) (Alarcia, 2017).

En el mutante de inserción de T-DNA disponible para el gen *DVL19* (SAIL_691_G09) la inserción de T-DNA se encontraba al final de la región 3'UTR del gen (**Figura 14A**). La cuantificación correspondiente mostró que, aunque no se elimina por completo la expresión, sí se reduce alrededor de un 80% con respecto al silvestre Col-0 (**Figura 14B**). Aunque no se trate de un mutante nulo de pérdida de función, sí disminuye significativamente la expresión de *DVL19* lo que permite suponer que será un alelo fuerte de pérdida de función.

Una vez señalados los efectos de las inserciones de T-DNA sobre la expresión de cada uno de los genes implicados y partiendo del doble mutante *dv18 dv11* previamente caracterizado en el que no se observaba ningún efecto morfológico (Primo, 2013), se procedió a generar y caracterizar mutantes de mayor orden por cruzamiento entre las líneas doble y simples mutantes antes descritas. Así se obtuvieron e identificaron, en primer lugar, el triple mutante homocigoto *dv18 dv11 rtfl11*, y tras cruzar éste con el simple *dv19*, se obtuvo el cuádruple mutante homocigoto *dv18 dv11 rtfl11 dv19*. Tras sembrar las semillas, se recogió material vegetal de hojas de roseta para la extracción de DNA genómico y llevar a cabo las reacciones de PCR para comprobar el genotipo y seleccionar las plantas mutantes.

Tras la identificación de las líneas cuádruples mutantes homocigotas se procedió a la caracterización fenotípica de éstas. Dicha caracterización consistió en el análisis de la morfología de las hojas de roseta en fase vegetativa, formada aproximadamente 15 días después de la germinación de las semillas. Durante la fase reproductiva, se observó el desarrollo de la inflorescencia, flores en antesis, así como el desarrollo del gineceo y del fruto.

Así, en este análisis morfológico no se pudo observar ningún fenotipo evidente en las hojas de roseta, pero tampoco se observó fenotipo alguno en las inflorescencias o flores, así como en los frutos ya formados de las plantas mutantes con respecto a las plantas silvestres, tal

y como ya se observó en el doble mutante *dv18 dv11* (Primo, 2013) o en el triple mutante *dv18 dv11 rtf11* (Alarcia, 2017) previamente analizados.

La falta de fenotipo en estos mutantes de mayor orden apoya la hipótesis de que podría existir una elevada redundancia génica entre los miembros de la familia *DVL/RTFL* (Narita et al., 2004; Guo et al., 2015) o bien que su función no se traduzca en un fenotipo visible en nuestras condiciones de crecimiento. Con la idea de seguir estudiando los genes *DVL/RTFL* en profundidad, así como de disponer de un mutante nulo para el gen *RTFL9* y añadir nuevos miembros a la lista de genes de la familia mutados, se decidió generar mutantes múltiples de mayor orden empleando la técnica de edición genómica dirigida CRISPR/Cas9.

1.2 Edición genética de nuevos alelos mediante la tecnología CRISPR/Cas9.

Al no disponer de más mutantes de inserción T-DNA para el resto de los genes *DVL/RTFL* se decidió generar alelos mutantes de otros miembros de la familia utilizando un método de edición dirigida del genoma. El pequeño tamaño de los genes *DVL/RTFL* dificultaba que existiesen mutantes de inserción de T-DNA en esas regiones del genoma y por ello la edición dirigida podía permitir seguir generando mutantes. Además, conocer el papel de una familia génica con tantos miembros entre los que existe una posible redundancia funcional necesita de plantas que contengan mutaciones en múltiples genes.

Para ello se empleó un sistema de edición génica CRISPR/Cas9 que permite no solo producir cortes en sitios específicos del genoma gracias a guías de RNA (sgRNAs), sino también generar mutantes homocigotos para múltiples genes diana en la primera generación de plantas transformantes (Wang et al., 2015).

Los genes seleccionados en primer lugar para llevar a cabo esta edición fueron: *RTFL9*, cuyo mutante de T-DNA no era óptimo y perteneciente al clado del resto de genes cuyos mutantes por inserción de T-DNA habían sido descritos con anterioridad (Alarcia, 2017); y los genes *DVL1* y *DVL4*, que se encuentran en clados diferentes, y quizá pudieran contribuir de un modo diferente a la función conjunta *DVL/RTFL*. El primer paso fue diseñar las sgRNAs específicas para una región concreta de los genes seleccionados. Como el sistema que utilizamos permitía incorporar varias guías en una misma construcción, se decidió diseñar dos sgRNA que aparearan con dos regiones limítrofes de cada uno de los genes *RTFL9*, *DVL1* y *DVL4*, de manera que, cuando la endonucleasa Cas9 produjera el corte en la doble hebra de DNA, el sistema de reparación de la célula generara una deleción de toda la región del gen contenida entre las dos sgRNAs. Ambos sgRNAs se clonaron en el vector binario pHEE401e bajo el control del promotor U6. Este vector contiene además las secuencias necesarias para el correcto plegamiento del

sgRNA, y la secuencia codificante de la endonucleasa Cas9, cuya expresión está dirigida por un promotor específico de célula huevo, *EC1.2*, que dirige la expresión al óvulo y embriones unicelulares, permitiendo crear de manera eficiente mutantes homocigotos en la primera generación de plantas transformantes (Wang et al., 2015).

En el caso del gen *RTFL9* las sgRNAs se diseñaron con el fin de deletar una amplia región del gen, desde la primera guía, que se encontraba al final del primer exón que contiene el dominio conservado *DVL/RTFL*, hasta la segunda guía al inicio de la región 3'UTR (**Figura 15A**). De esta manera esperábamos que se deletara prácticamente la totalidad del gen, unos 400 pares de bases de las 503 que componen exones e intrones y, por tanto, que no se produjese la proteína funcional RTFL9.

El diseño de guías en el gen *DVL1* se hizo dentro de la CDS, con una separación de unos 75 pares de bases pero que incluía parte del dominio conservado *DVL/RTFL* (**Figura 15B**). Aunque lo ideal hubiese sido deletar toda la CDS, los criterios para optimizar el diseño de guías no lo permitían, puesto que se tienen que cumplir unas condiciones bastante restrictivas (Lei et al., 2014; Wang et al., 2015) que hacen que la cantidad de guías disponibles a lo largo de estos genes de tan poco tamaño, 505 pares de bases en el caso de *DVL1*, sea mínima.

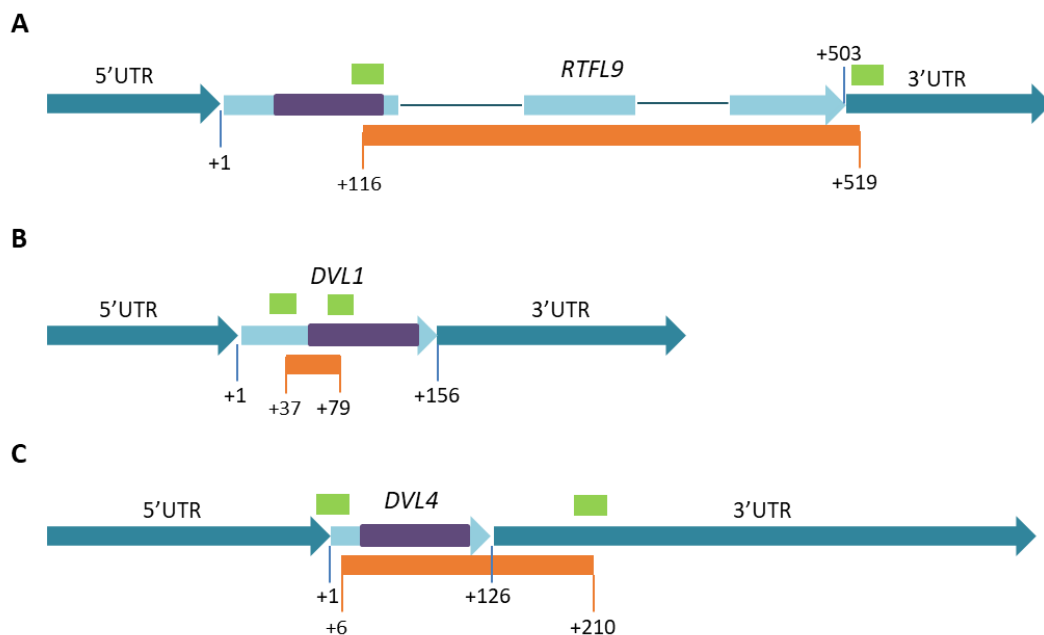


Figura 15. Representación esquemática de los genes mutados por edición génica dirigida CRISPR/Cas9. A) Representación esquemática del gen *RTFL9*. B) Representación esquemática del gen *DVL1*. C) Representación esquemática del gen *DVL4*. Se indica la posición de inicio y final de la CDS. El motivo conservado *DVL/RTFL* se muestra en morado. Las sgRNAs se indican como rectángulos verdes. La región naranja entre las sgRNAs representa la deleción producida en el gen indicando las posiciones de inicio y fin de la deleción con respecto a la CDS.

Por último, en el caso de *DVL4* sí que se pudieron diseñar guías en regiones que flanqueaban la CDS. De hecho, la primera se encontraba al inicio de la CDS, mientras que la segunda llegaba más allá, abarcando parte de la región 3'UTR. Así la región deletionada por la endonucleasa Cas9 comprendería toda la región codificante del gen *DVL4* (**Figura 15C**).

Los vectores pHEE401 que contenían las sgRNAs correspondientes a cada uno de los genes a editar, así como la Cas9, se agroinfiltraron en plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y en el fondo cuádruple mutante *dv18 dv111 rtfl11 dv119* generado con anterioridad. Las semillas transformantes T1 se seleccionaron primariamente por su resistencia a higromicina, para a continuación seleccionar aquellas en las que se hubiese producido la delección esperada mediante PCR con oligonucleótidos específicos que flanqueaban las sgRNAs. En el caso de *RTFL9* se obtuvieron un total de 3 plantas T1 que mostraban la delección esperada en el fondo mutante *dv18 dv111 rtfl11 dv119*. Para *DVL1* se obtuvo 1 línea heterocigota mutante que portaba la delección en la T1 en el fondo cuádruple mutante. En el caso de *DVL4* fue identificada 1 planta T1 con la delección en homocigosis en el fondo *dv18 dv111 rtfl11 dv119*. Las secuencias de aminoácidos obtenidas tras las delecciones de los genes por CRISPR se pueden ver en el **Anexo I**.

En la siguiente generación se seleccionaron plantas resistentes a higromicina y se comprobó su genotipo mediante PCR, seleccionando aquellas que mantenían la misma delección que el parental. Por último, en la generación de plantas T3, se seleccionaron individuos que hubieran perdido la Cas9 por segregación de la inserción del T-DNA, de tal manera que no estuviese presente y así dispondríamos de mutantes estables homocigotos. Esto se llevó a cabo seleccionando las plantas que no presentaban resistencia a higromicina pero que seguían manteniendo la misma delección para el gen *RTFL9*, *DVL1* o *DVL4*.

Disponíamos de varios alelos independientes para cada uno de los genes, pero todos tenían la misma mutación por lo que se continuó generando mutantes de mayor orden con uno de los alelos mutantes para cada gen (**Tabla 1**).

Puesto que las delecciones de los genes *RTFL9*, *DVL1* y *DVL4* se habían obtenido tras transformar plantas con fondo cuádruple mutante *dv18 dv111 rtfl11 dv119*, disponíamos de tres combinaciones de quintuples mutantes: *rtfl9 dv18 dv111 rtfl11 dv119*, con todos los genes mutados pertenecientes al mismo clado de la familia *DVL/RTFL*; *dv1 dv18 dv111 rtfl11 dv119*, y *dv14 dv18 dv111 rtfl11 dv119* que combinan genes de diferentes clados.

Tabla 1. Descripción de los alelos mutantes empleados y generados en este trabajo. Líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 empleadas y generadas.

ALELO MUTANTE	MUTÁGENO	COLECCIÓN / CÓDIGO/ ORIGEN	DESCRIPCIÓN
<i>dvl8-1</i>	Inserción T-DNA	SALK_093633C	Alelo fuerte pérdida de función
<i>dvl11-1</i>	Inserción T-DNA	SALK_204467	Alelo nulo de pérdida de función
<i>rtfl11-1</i>	Inserción T-DNA	GK_321A11	Alelo nulo de pérdida de función
<i>dvl19-1</i>	Inserción T-DNA	SAIL_691_G09	Alelo fuerte pérdida de función
<i>dvl1</i>	CRISPR/Cas9	Este trabajo	Mutante de delección: Delección de 42 pb de la CDS (156 pb) incluyendo parte del dominio conservado
<i>dvl4</i>	CRISPR/Cas9	Este trabajo	Mutante de delección: Delección casi completa de la CDS + 87 pb de 3'UTR
<i>rtfl9</i>	CRISPR/Cas9	Este trabajo	Mutante de delección: Delección de 230 pb de la CDS (330 pb) incluyendo parte del dominio conservado

1.3 Caracterización fenotípica de los mutantes generados.

Con el fin de comprobar si generar un mutante de mayor orden producía algún efecto en la morfología general de la planta, se analizó el fenotipo de las diferentes combinaciones de mutantes de inserción de T-DNA y CRISPR/Cas9: *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19, dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19*, y *dvl4 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19*.

Lo primero que se observó fue la morfología de las hojas de la roseta durante la fase vegetativa de la planta, en concreto, en plantas de unos 15 días de edad. Como se puede observar en la **Figura 16**, no se ven diferencias en la forma ni el tamaño de las hojas de la línea mutante *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* con respecto a las plantas silvestres Col-0 (**Figura 16A y 16D**). En el caso de la inflorescencia y las flores en antesis, al contrario de como ocurría en las líneas de sobreexpresión *DVL/RTFL*, cuyo fenotipo en estas partes era evidente (Wen et al., 2004; Narita et al., 2004), las plantas quintuples mutantes no presentaban diferencias con plantas Col-0 (**Figura 16B y 16E**). Por último, se prestó atención a la morfología del fruto de las plantas mutantes, que presentaban silicuas delgadas y alargadas de igual aspecto al de las plantas silvestres (**Figura 16C y 16F**).

En el caso de los quintuples mutantes *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y *dvl4 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* se observaron fenotipos exactamente iguales a los del mutante *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y por ende a los de las plantas Col-0 (**Figura 16**).

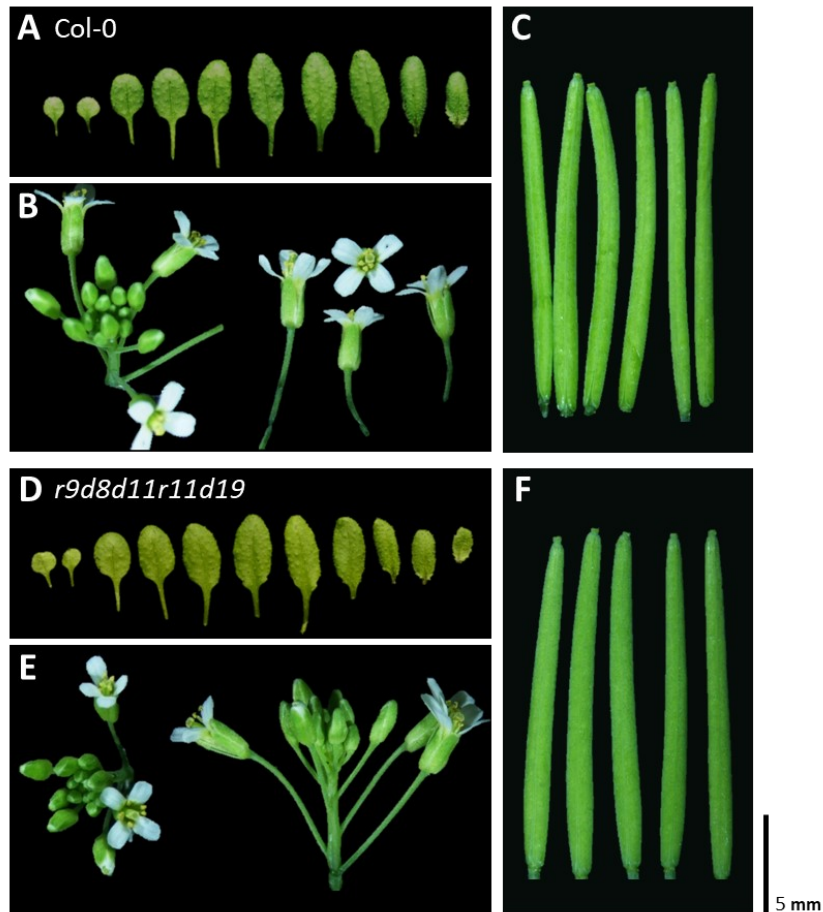


Figura 16. Fenotipos de la línea quintuple mutante *rtf9 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19*. Se muestran los fenotipos correspondientes a las plantas silvestres Col-0 (A, B y C) y a las plantas quintuples mutantes *rtf9 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* (*r9d8d11r11d19*) (D, E y F) en hojas de roseta de 15 días (A y D), en inflorescencias y flores en antesis (B y E) y en frutos formados (C y F). Escala 5 mm.

La ausencia de un fenotipo morfológico evidente asociado a la pérdida de función en estos mutantes de mayor orden, que combinaban mutaciones en genes no solo pertenecientes a un mismo clado (*rtf9 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19*), sino también genes pertenecientes a diferentes clados (*dvl1* y *dvl4*) (**Figura 13**), era consistente con la hipótesis de una elevada redundancia génica existente entre los diferentes miembros de la familia *DVL/RTFL* (Narita et al., 2004; Guo et al., 2015).

Por esta razón se decidió seguir generando mutantes de mayor orden y para ello se cruzaron los quintuples mutantes homocigotos de los que ya se disponía. En primer lugar, se cruzó el quintuple *dvl1 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* con *rtf9 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* y en paralelo, *dvl4 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* con *rtf9 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19*. En la segunda generación de plantas tras los cruces se identificó una línea mutante homocigota para cada uno de los genes en cada una de las combinaciones teniendo por tanto los séxtuples mutantes *dvl1 rtf9 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* y *dvl4 rtf9 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19*. Estas combinaciones de mutantes tampoco presentaban

ningún fenotipo morfológico evidente, siendo los fenotipos de hoja, inflorescencia, flores y frutos igual que los mutantes de menor orden y el silvestre (**Figura 16**).

1.4 Edición genética de múltiples genes mediante la tecnología CRISPR/Cas9.

El tamaño de la familia génica *DVL/RTFL*, así como la ausencia de fenotipo en los múltiples mutantes disponibles asociada a una posible redundancia génica, generó la necesidad de mutar un mayor número de genes. Además, y debido al coste temporal de generar mutantes estables, se decidió intentar mutar varios genes en una única transformación.

Para lograr este fin, se volvió a emplear la metodología de CRISPR/Cas9 descrita en el apartado 1.2 de Resultados, pero en esta ocasión en vez de diseñar dos sgRNAs que flanquearan la mayor parte posible de la región codificante de gen, se clonaron tres sgRNAs en una misma construcción en el mismo vector binario pHEE401e bajo el control del mismo promotor U6 (Wang et al., 2015). Así cada una de estas guías reconoce un gen diferente, de manera que con una misma construcción podrían mutarse 3 genes a la vez, aunque se traten de mutaciones puntuales en lugar de deleciones más extensas.

Los nuevos genes diana seleccionados fueron *DVL3*, *DVL5* y *DVL6*, puesto que pertenecían al mismo clado que *DVL4* y, además tenían una mayor expresión en plantas silvestres Col-0, según los datos transcriptómicos obtenidos en este trabajo y descritos más adelante (apartado 1.5 de Resultados y **Tabla 2**- resaltado en naranja).

La primera guía de la construcción generada alineaba con 20 nucleótidos de la CDS del gen *DVL3* incluyendo 11 bases del dominio conservado *DVL/RTFL* (**Figura 17A**) mientras que las guías correspondientes a los genes *DVL5* y *DVL6* también dirigían la actividad de la endonucleasa a la CDS, pero esta vez por delante del dominio conservado (**Figura 17B y 17C**).

Una vez generada la construcción que llevaba las tres sgRNAs, se transformó el séxtuple mutante *dv14 rtf19 dv18 dv111 rtf11 dv119*, pues de las dos combinaciones de séxtuples mutantes de las que se disponía en ese momento, la que incluía la mutación *dv14* en vez de *dv1* parecía más indicada puesto que el gen *DVL4* forma parte del mismo clado que *DVL3*, *DVL5* y *DVL6*. De las plantas transformantes seleccionadas primariamente por su resistencia a higromicina, se identificaron aquellas plantas que portaban alguna mutación en torno a la sgRNA y sitio de corte predicho de la Cas9. Para ello se amplificó la región genómica que abarcaba la CDS de cada uno de los genes para después secuenciar estos fragmentos amplificados con oligonucleótidos que flanqueaban la sgRNA.

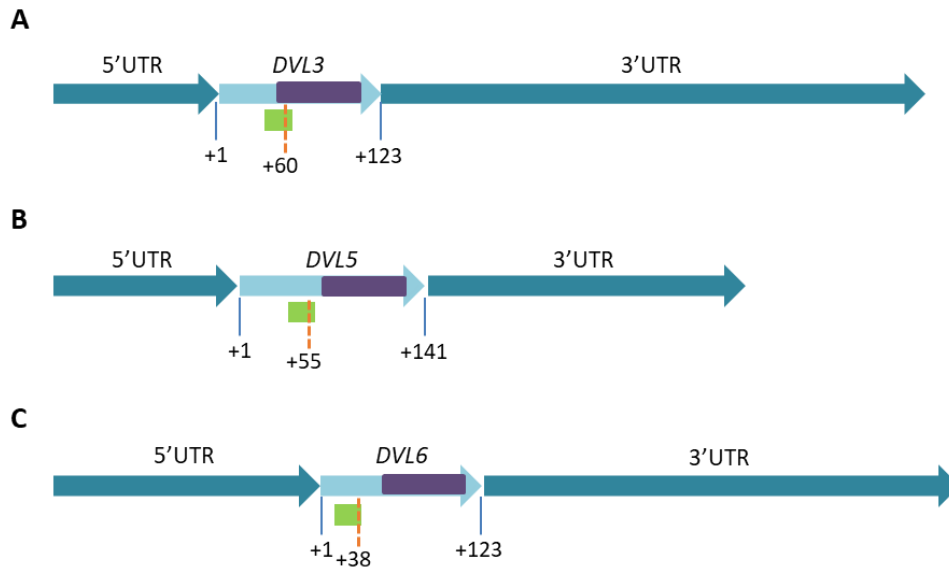


Figura 17. Representación esquemática de los genes mutados por edición génica dirigida CRISPR/Cas9. A) Representación esquemática del gen *DVL3*. B) Representación esquemática del gen *DVL5*. C) Representación esquemática del gen *DVL6*. Se indica la posición de inicio y final de la CDS. El motivo conservado *DVL/RTFL* se muestra en morado. Las sgRNAs se indican como rectángulos verdes. La posición con la línea naranja indica la posición donde se ha producido la mutación puntual con respecto a la CDS.

En la primera generación de plantas transformantes se identificó un mutante homocigoto para el gen *DVL3* que consistía en una deleción de un nucleótido en el sitio de corte de la Cas9, que cambiaba el marco de lectura y la secuencia aminoacídica predicha (**Figura 18A - Anexo I**). En la segunda generación de transformantes, T2, se encontraron plantas que, aparte de mantener la mutación para *DVL3*, tenían un cambio en la secuencia de *DVL5* de una inserción de un nucleótido en la secuencia de la CDS que provocaba un cambio en el patrón de lectura produciéndose un codón de parada prematuro (**Figura 18B - Anexo I**). Ya en la tercera generación de plantas transformantes, se pudieron identificar plantas triples homocigotas que portaban las dos mutaciones antes descritas para *DVL3* y *DVL5* y, además una mutación en *DVL6* muy similar a la de *dv5*, en la que la inserción de un nucleótido provoca un cambio en la pauta de lectura y un codón de parada prematuro (**Figura 18C - Anexo I**).

Por tanto, se generó una línea mutante homocigota *dv3 dv5 dv6 dv4 rtf9 dv8 dv11 rtf11 dv19* en la que se encontraban mutados 9 de los 24 miembros de la familia génica. Sin embargo, no se observó ningún fenotipo morfológico en la planta. Por último, y con el fin de seguir añadiendo mutaciones, se transformó esta línea nóuple mutante con la construcción diseñada para delecionar el gen *DVL1* descrita con anterioridad (apartado 1.2., **Figura 15B**). Tras seleccionar aquellas plantas que portaban la deleción y eliminar la Cas9 por segregación en las siguientes generaciones, fue posible disponer de un décuple mutante homocigoto y estable *dv1 dv3 dv5 dv6 dv4 rtf9 dv8 dv11 rtf11 dv19*.

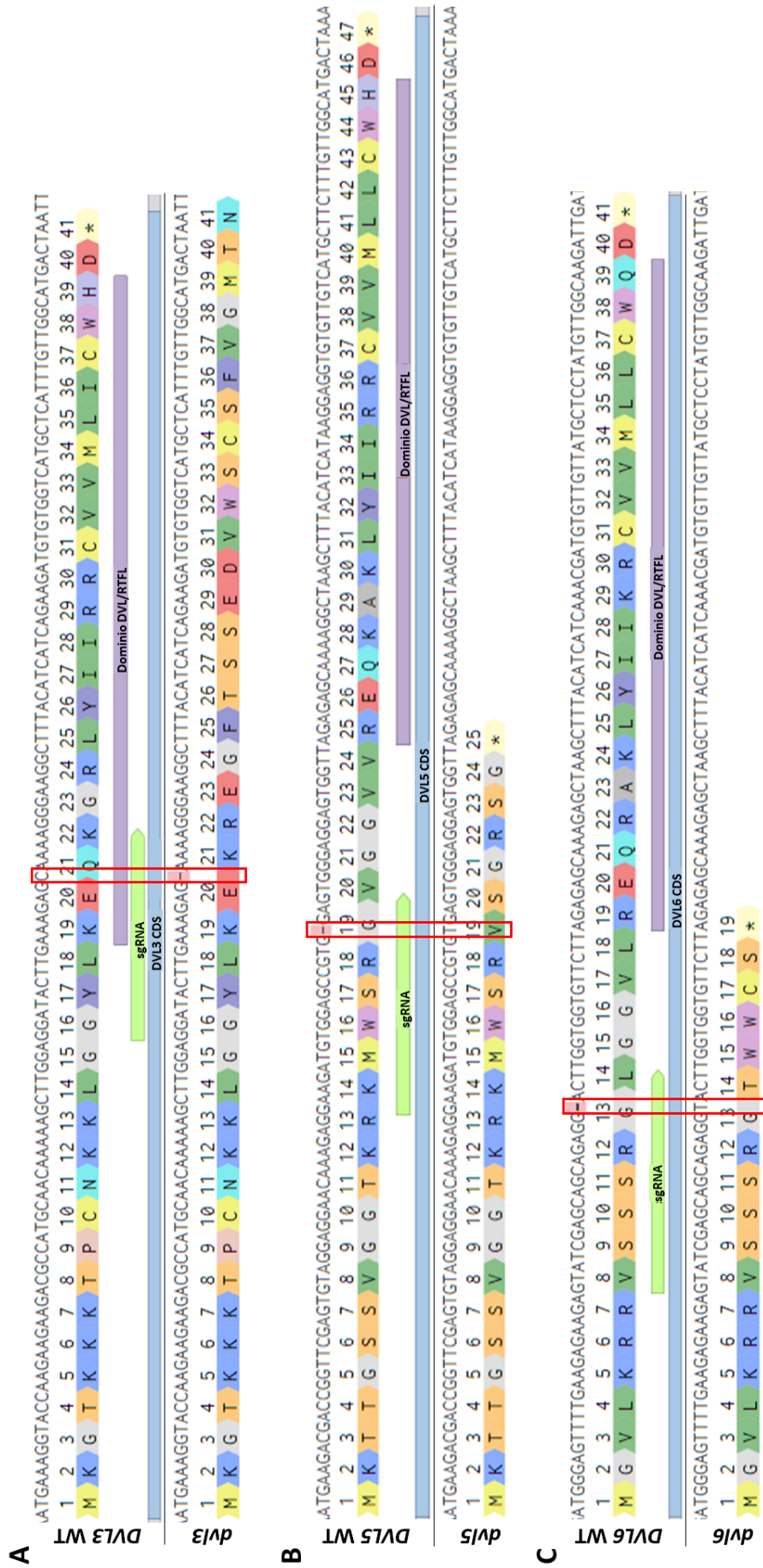


Figura 18. Representación esquemática de las secuencias de los genes mutados por edición genómica dirigida CRISPR/Cas9. A) Representación esquemática del gen *DVL3* y el mutante *dv/3*. B) Representación esquemática del gen *DVL5* y el mutante *dv/5*. C) Representación esquemática del gen *DVL6* y el mutante *dv/6*. En la parte superior se indica la secuencia de nucleótidos del gen silvestre (WT), seguida de la secuencia de aminoácidos, las anotaciones correspondientes al dominio *DVL/RTFL*, *sgRNA* y CDS. En la parte inferior se indica la secuencia de nucleótidos del gen mutante (*dv/6*), seguida de la secuencia de aminoácidos. La mutación puntual aparece recuadrada en rojo.

A pesar de haber mutado casi la mitad de los integrantes de la familia génica *DVL/RTFL*, no se observó ningún fenotipo remarcable en la morfología de la planta en los aspectos anteriormente estudiados como eran el tamaño y forma de las hojas de roseta, la forma de las inflorescencias y primeras flores en antesis o la morfología de las silicuas de las plantas décuple mutantes *dvl1 dvl3 dvl5 dvl6 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* (Figura 19A-C) con respecto a las plantas silvestres Col-0 (Figura 19D-E).

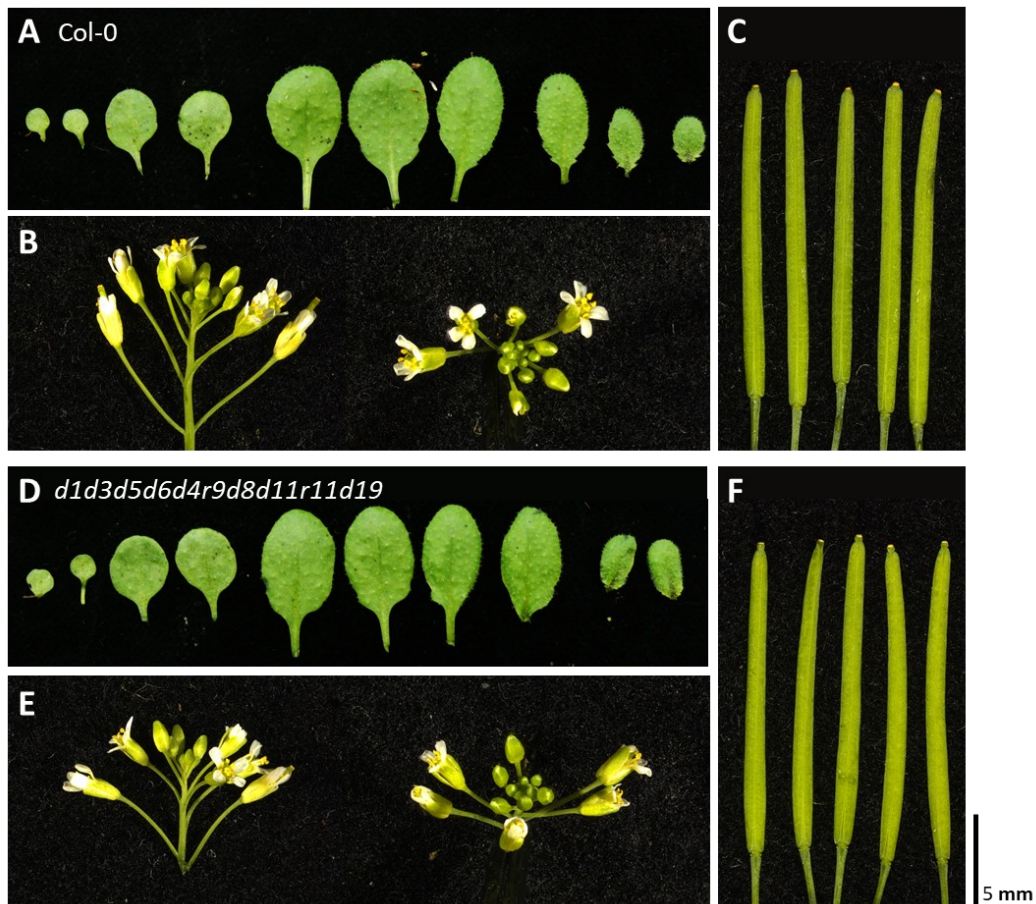


Figura 19. Fenotipos de la línea décuple mutante *dvl1 dvl3 dvl5 dvl6 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19*. Se muestran los fenotipos correspondientes a las plantas silvestres Col-0 (A a C) y a las plantas décuples mutantes *dvl1 dvl3 dvl5 dvl6 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* (*d1d3d5d6d4r9d8d11r11d19*) (D a F) en hojas de roseta de 16 días (A y D), en inflorescencias y flores en antesis (B y E) y en frutos formados (C y F). Escala 5 mm.

Estos resultados respaldan una vez más la hipótesis de la elevada redundancia génica existente entre los miembros de la familia (Wen et al., 2004; Narita et al., 2004; Ikeuchi et al., 2011; Guo et al., 2015). Aun así, tampoco se podría descartar la idea de que el efecto que puedan estar produciendo estas mutaciones no dé lugar a alteraciones morfológicas evidentes en la parte aérea, afectando a otros procesos de desarrollo en la planta que tendrían que inspeccionarse en más detalle, o que las condiciones de crecimiento en las que se realizó la caracterización de los mutantes no permitiesen ver el efecto de la mutación en sí.

1.5 Análisis transcriptómico de los quintuples mutantes disponibles mediante RNA-seq.

Con el fin de encontrar posibles fenotipos asociados a la pérdida de función que no fueran visualmente observables pero que sí podrían afectar a algún proceso a nivel molecular se decidió realizar un análisis de los perfiles transcriptómicos de los mutantes múltiples disponibles en el momento de realizar dicho análisis, los quintuples mutantes *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19*.

Se llevó a cabo un análisis de secuenciación de RNA (RNA-seq) comparando el transcriptoma de inflorescencias y flores en post-antesis de los quintuples mutantes *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19*, y de plantas silvestres Col-0 empleadas como referencia. El RNA-seq se realizó con tres réplicas biológicas independientes, cada una de las cuales estaba formada por material de unos 10 individuos. Se obtuvieron más de 23×10^6 lecturas de cada una de las muestras. Más del 95% de las lecturas de cada librería alineaban de manera inequívoca con la secuencia del genoma de *Arabidopsis thaliana*.

En primer lugar, y en el contexto de comprobar si la falta de fenotipos observables estaba asociada a la redundancia funcional de los miembros de la familia, se quiso comprobar si en los quintuples mutantes *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* el resto de genes *RTFL/DVL* se encontraban expresados de manera diferente que en las plantas silvestres, indicando una compensación activa por la cual los genes de una familia cambian su comportamiento para compensar la perturbación producida por la pérdida de función de alguno de los otros miembros de la familia. De no producirse, podíamos estar frente a un fenómeno de compensación pasiva, o verdadera redundancia génica, que sería aquella en la que el resto de genes de la familia no cambia su expresión para compensar la pérdida de alguno de ellos (Rodríguez-Leal et al., 2019). Para este fin, lo que se hizo fue analizar el número de lecturas por gen de cada uno de los miembros de la familia *DVL/RTFL* en cada uno de los quintuples mutantes, así como en las plantas silvestres.

Como se puede ver en la **Tabla 2**, no se observaron diferencias notables en el número de lecturas por gen de cada uno de los miembros de la familia *DVL/RTFL* entre las plantas silvestres y los quintuples mutantes analizados. Estos datos son compatibles con la compensación pasiva o verdadera redundancia génica entre los miembros de la familia.

Tabla 2. Número de lecturas por gen de los miembros de la familia *DVL/RTFL* en plantas silvestres, mutantes *dvl1 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* y *rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* de *Arabidopsis thaliana*. Se muestra el número de lecturas por gen de plantas silvestres (WT Col-0), mutantes *dvl1 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* (*d1d8d11r11d19*) y *rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* (*r9d8d11r11d19*). Con un asterisco rojo se indica que ese gen está mutado en el genotipo señalado. Resaltado en naranja aparecen los genes con un mayor número de lecturas en el genotipo silvestre.

GEN	ID	WT Col-0	<i>d1d8d11r11d19</i>	<i>r9d8d11r11d19</i>
<i>DVL1/RTFL18</i>	AT5G16023	0	0*	0,03
<i>DVL4/RTFL17</i>	AT1G13245	6,37	6,53	6,05
<i>DVL8/RTFL7</i>	AT3G55515	0,05	0,02*	0,01*
<i>DVL11/RTFL8</i>	AT2G39705	2,20	1,99*	1,20*
<i>RTFL9</i>	AT1G53708	0	0	0*
<i>RTFL11</i>	AT1G17235	0,29	0,33*	0,37*
<i>DVL19/RTFL10</i>	AT3G14362	0	0*	0*
<i>DVL21/RTFL23</i>	AT3G23637	0,09	0,08	0
<i>DVL16/ROT4</i>	AT2G36985	2,68	3,39	3,06
<i>DVL20/RTFL1</i>	AT3G53232	3,80	4,56	4,72
<i>RTFL13</i>	AT3G23635	0,05	0,13	0,15
<i>DVL14/RTFL14</i>	AT3G63088	0,66	0,95	0,98
<i>DVL12/RTFL22</i>	AT1G64585	0	0	0
<i>DVL15/RTFL4</i>	AT3G46613	0,20	0,16	0,04
<i>DVL18/RTFL5</i>	AT5G59510	2,93	2,67	3,01
<i>DVL13/RTFL2</i>	AT2G29125	3,21	3,28	3,18
<i>DVL9/RTFL3</i>	AT1G07490	0	0	0
<i>DVL7/RTFL20</i>	AT3G18518	0,25	0,25	0,36
<i>DVL2/RTFL19</i>	AT3G02493	0	0,15	0,11
<i>DVL3/RTFL21</i>	AT1G67265	11,65	8,95	8,13
<i>DVL5/RTFL15</i>	AT1G68825	3,54	2,65	2,96
<i>DVL6/RTFL16</i>	AT3G25717	23,25	25,55	26,16
<i>DVL17/RTFL6</i>	AT4G35783	0,90	1,15	0,83
<i>DVL10/RTFL12</i>	AT4G13395	0,26	0,81	0,28

Por otro lado, se observó como genes incluidos en los quintuples mutantes con los que estábamos trabajando, como eran *DVL1*, *DVL8*, *RTFL9* y *DVL19* no se expresaban apenas en los tejidos elegidos para el análisis transcriptómico (**Tabla 2**) por lo que era comprensible que un mutante múltiple que los incluyera no estuviese muy afectado y no se observase un fenotipo evidente en estos tejidos.

A su vez, los genes *DVL4*, *DVL3* y *DVL6* tenían un número de lecturas elevado (**Tabla 2**-resaltado en naranja) y, por tanto, se estarían expresando más en las flores e inflorescencias de los quintuples mutantes. Por esta razón se decidió incluir a los genes *DVL3* y *DVL6* como candidatos en el múltiple mutante generado en este trabajo y descrito anteriormente (apartado

1.4) pues pertenecían al mismo clado que *DVL4* y era posible que eliminar su expresión pudiera tener algún efecto fenotípico.

Continuando con el análisis de RNA-seq, y para ver qué otros genes podrían estar afectados en estos mutantes, se consideraron como “expresados” aquellos genes cuyo valor de lectura por kilobase por millón (RPKM) era $>0,5$ y se calculó la tasa de cambio (FC – *fold change*) dividiendo los valores de RPKM de una muestra entre los de la muestra a comparar. Para interpretar de una manera más sencilla la expresión diferencial, los valores de *fold change* se transformaron a una escala *log. 2*, donde un *fold change* de ± 1 equivale al doble de expresión de una muestra frente a otra. Así se seleccionaron transcritos con valores de *log. 2-fold change* $>0,5$ y $<-0,5$ y un *p-value* ajustado (padj) $<0,05$ para que el cambio de expresión tuviese un nivel de significatividad. Con estos parámetros se identificaron 224 genes diferencialmente expresados (DEGs) entre el quintuple mutante *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y las plantas silvestres Col-0 y 345 DEGs entre *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y Col-0. Para seleccionar aquellos comunes a ambos experimentos y que, por tanto, tendrían una mayor probabilidad de estar relacionados con la función DVL/RTFL en general, se compararon ambos análisis y la lista resultante incluía 199 DEGs. Un total de 10 genes tenían una expresión incrementada en ambas comparaciones, 188 genes reducían su expresión, y un único gen aumentaba su expresión en *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* comparado con Col-0 y disminuía en la comparación *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* - Col-0 (**Figura 20**).

Posteriormente, con la lista de genes diferencialmente expresados en los quintuples mutantes *dvl*, se llevó a cabo un análisis de los términos GO (*Gene Ontology enrichment*) usando la base de datos y herramienta web ShinyGO (Ge et al., 2020). De los 10 DEGs regulados al alza, solo 5 pudieron clasificarse en alguna categoría GO relacionada con procesos biológicos, identificándose un total de 17 términos GO significativos (**Anexo II**), pero solo una de ellas, transporte transmembrana, tenía un nivel de significatividad (FDR – *False Discovery Rate*) más alto, con solo cuatro genes pertenecientes a dicha categoría (AT4G01440: *UMAMIT31 - USUALLY MULTIPLE ACIDS MOVE IN AND OUT TRANSPORTERS 31*, AT5G40230: *UMAMIT37*, AT5G40260: *SWEET8* o *RPG1- RUPTURED POLLEN GRAIN1* y AT5G43340: *PHT1 - PHOSPHATE TRANSPORTER 1*). El resto de las categorías estaban formadas por un único gen (**Anexo II**).



Figura 20. Genes diferencialmente expresados entre los quintuplos mutantes *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y el silvestre analizados mediante RNA-Seq. Diagrama de Venn que muestra el número de genes comunes en ambos quintuplos mutantes con respecto al genotipo silvestre y los genes sobreexpresados (al ALZA) y cuya expresión está reducida (a la BAJA) tras comparar el quintuple mutante con el silvestre.

Entre los 103 términos GO más representados de los DEGs con expresión reducida en los quintuplos mutantes *dvl/rtfl*, se encontraban procesos como polinización (29 genes), desarrollo del tubo polínico (24 genes), crecimiento del tubo polínico (20 genes), crecimiento distal de la célula (20 genes), crecimiento de células de desarrollo (20 genes), morfogénesis celular (20 genes), diferenciación celular (24 genes) o procesos metabólicos de carbohidratos (28 genes) entre otros (**Figura 21 – Anexo II**). Al tratarse de un número no muy elevado de genes y categorías funcionales similares, la mayoría de genes o grupos de genes se incluyen en varias categorías GOs al mismo tiempo. En la **Tabla 3** aparecen reflejados algunos de los genes que son comunes a varias de estas categorías GO más significativas.

El hecho de que los procesos relacionados con el crecimiento del tubo polínico y la polinización fuesen los más significativos nos llevó a pensar que los genes *DVL/RTFL* pudiesen estar participando en dichos procesos. Por tanto, los siguientes experimentos fueron diseñados para evaluar el papel de estos genes en el desarrollo y germinación de polen o en el crecimiento del tubo polínico.

RESULTADOS: CAPITULO 1

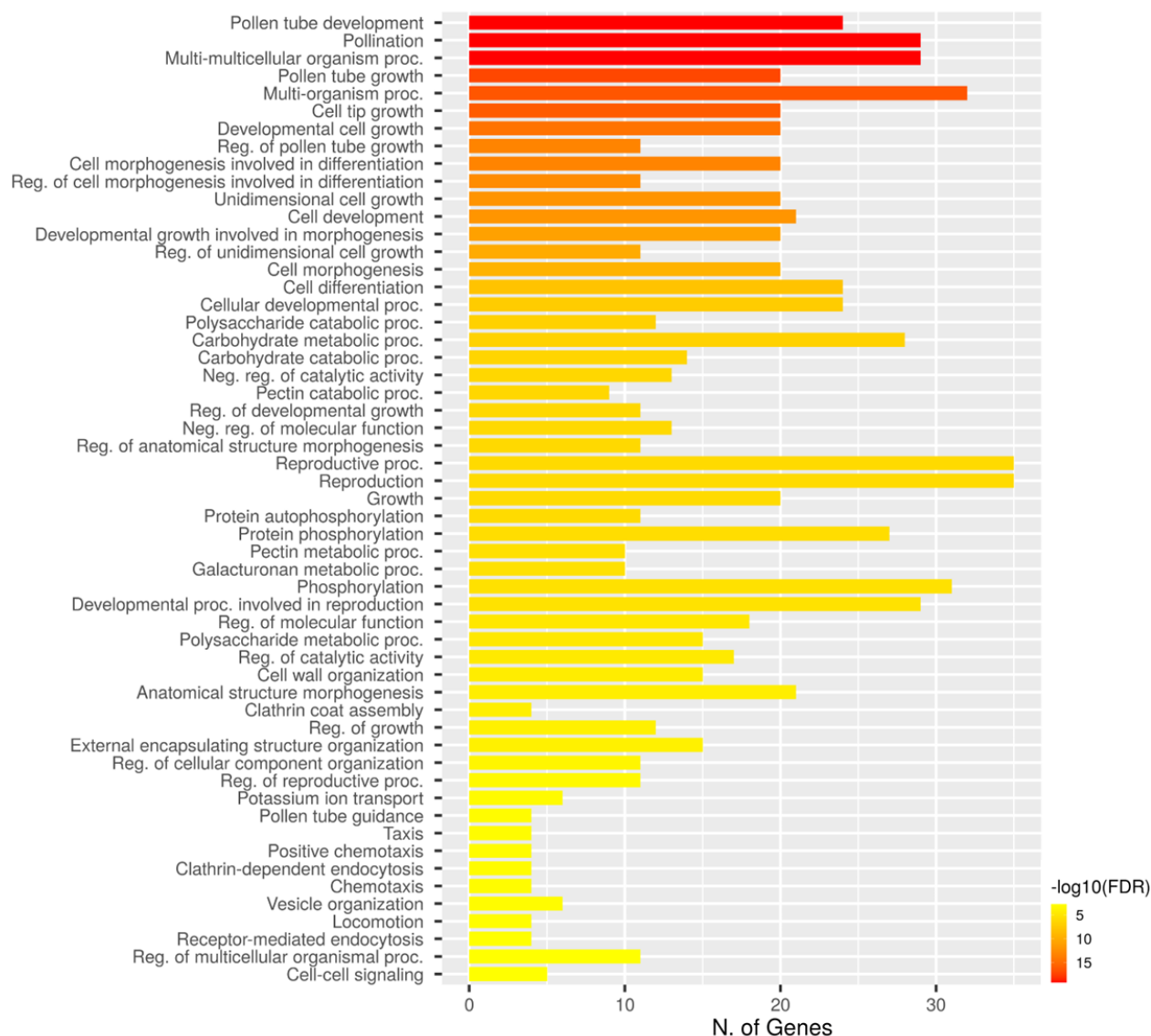


Figura 21. Análisis de términos GO más representados relacionados con procesos biológicos de los DEGs regulados a la baja en los quintuples mutantes *dvl/rtfl* con respecto al silvestre analizados en el RNA-seq. El color de cada barra representa el nivel de significatividad (FDR) siendo el color rojo el mayor nivel. En el eje horizontal se indica el número de genes perteneciente a cada una de las categorías GO indicada en el eje vertical. Aparecen representadas 60 categorías GO de las 98 más significativas. El gráfico ha sido generado usando la herramienta web ShinyGO.

Paralelamente al análisis transcriptómico de los quintuples mutantes *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19*, se llevó a cabo un RNA-seq con dos líneas sobreexpresoras, *dvl1-1D* y *35S:DVL8* (Wen et al., 2004; Wen and Walker, 2006; Valdivia et al., 2012). El fin de este análisis era comprobar si los procesos que se encontraban regulados al alza en los mutantes *dvl/rtfl* tenían un comportamiento contrario en las líneas sobreexpresoras y poder dilucidar un poco más acerca de la función de la familia génica *DVL/RTFL*.

Tabla 3. Genes diferencialmente expresados y regulados a la baja en ambos mutantes *dv1 dv18 dv11 rtf11 dv19* y *rtf19 dv18 dv11 rtf11 dv19* con respecto al silvestre y pertenecientes a alguna de las categorías GO más representadas relacionadas con procesos biológicos. Se muestra la ID del gen, el nombre correspondiente y los procesos biológicos a los que pertenecen todos ellos.

ID	NOMBRE	PROCESOS BIOLÓGICOS
AT1G03050	PICALM5A	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: auto;"> Polinización Crecimiento del tubo polínico Desarrollo del tubo polínico Crecimiento distal de la célula Crecimiento unidireccional de la célula Morfogénesis celular Crecimiento celular Desarrollo celular </div>
AT1G10770	-	
AT1G28270	RALFL4	
AT1G48020	PME11	
AT1G50610	PRK5	
AT1G61290	SYP124	
AT1G79860	ROPGEF12	
AT2G07040	PRK2	
AT2G21480	-	
AT2G31500	CPK24	
AT2G33460	RIC1	
AT2G33775	RALFL19	
AT3G01700	AGP11	
AT3G20190	PRK4	
AT3G20580	COBL10	
AT4G02650	-	
AT4G33970	-	
AT4G39110	-	
AT5G12180	CPK17	
AT5G19360	CPK34	

Se emplearon los mismos parámetros para considerar los genes significativamente expresados que se habían empleado en el análisis de los quintuplos mutantes (RPKM >0,5; \log_2 -fold Change >0,5 y <-0,5; y p_{adj} <0,05). Con estos parámetros se identificaron 1196 DEGs al comparar la línea sobreexpresora *dv1-1D* con la silvestre Col-0; y 131 DEGs entre el sobreexpresor 35S:DVL8 y Col-0. Al igual que se hizo con los quintuplos mutantes para seleccionar los genes diferencialmente expresados en ambos experimentos, se cruzaron ambas listas, pero en este caso solo aparecieron 33 DEGs para ambas líneas sobreexpresoras (**Figura 22 – Anexo III**). Esto era de algún modo sorprendente, dado que los fenotipos morfológicos de ambas líneas compartían muchas similitudes. Sin embargo, quizá pueda explicarse por el hecho de que la línea de sobreexpresión de *DVL1*, *dv1-1D*, se trate de una línea de inserción de T-DNA de *activation tagging* que puede provocar una expresión aumentada del gen, pero no necesariamente constitutiva, y en la línea 35S:DVL8, la expresión se dirija directamente por este promotor constitutivo.

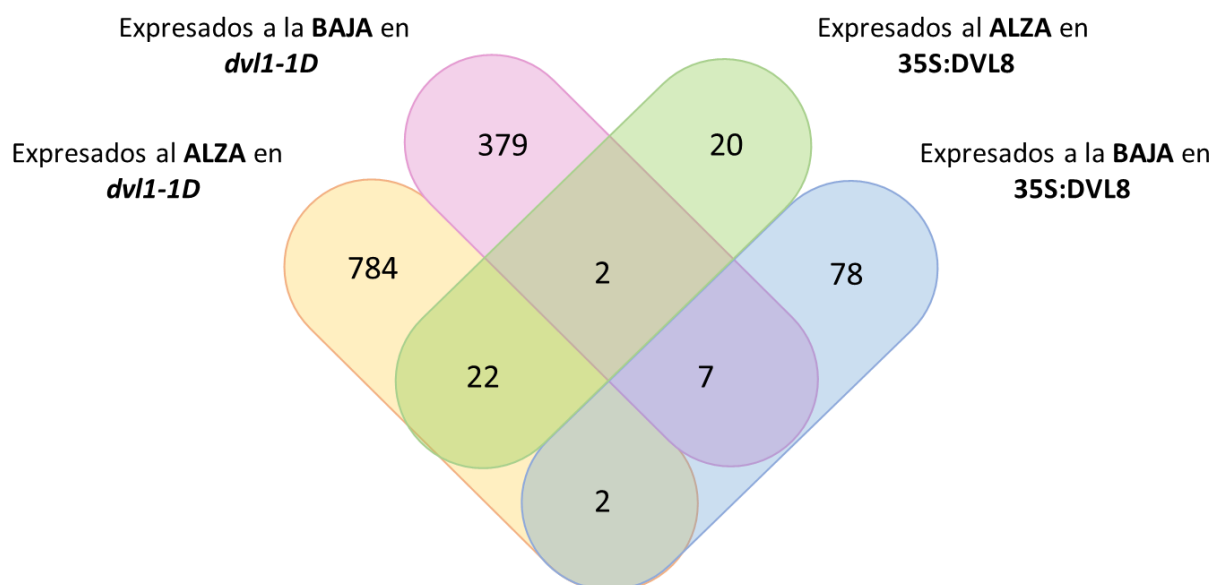


Figura 22. Genes diferencialmente expresados entre las líneas sobreexpresoras *dvl1-1D* y 35S:DVL8 comparadas con la silvestre analizados mediante RNA-Seq. Diagrama de Venn que muestra el número de genes comunes en ambas líneas sobreexpresoras con respecto a la silvestre y los genes sobreexpresados (al ALZA) y cuya expresión está reducida (a la BAJA) tras comparar el sobreexpresor con el silvestre.

A la hora de comparar la respuesta transcriptómica de la ganancia y pérdida de función *RTFL/DVL*, al no ser comunes la mayoría de los DEGs identificados en las dos líneas sobreexpresoras analizadas (**Anexo III**), se decidió comparar ambas líneas sobreexpresoras de manera independiente con las líneas mutantes *dvl/rtfl*.

Mientras que los 16 DEGs comunes entre la línea sobreexpresora *dvl1-1D* y los quintuples mutantes *dvl/rtfl* (**Anexo IV - Figura S1A**) no tenían ningún término GO común y destacable, de los 41 genes diferencialmente expresados tanto en la línea sobreexpresora 35S:DVL8 como en los quintuples mutantes *dvl/rtfl* analizados (**Anexo IV - Figura S1B y Anexo V**) sí que pudieron extraerse términos GO significativos. Dentro de estos procesos biológicos aparecieron algunos como el crecimiento y desarrollo del tubo polínico o el crecimiento distal de la célula que ya aparecieron como interesantes en el caso de los mutantes *dvl/rtfl*, además de otros muchos relacionados con procesos catabólicos y metabólicos (**Figura 23- Anexo VI**).

Otro aspecto sorprendente que destacar de este análisis transcriptómico fue que la sobreexpresión de los genes *DVL* en las líneas *dvl1-1D* y 35S:DVL8 cambiaba la respuesta transcriptómica de muchos de los DEGs en el mismo sentido que lo hacía la pérdida de función en los quintuples mutantes (**Anexo IV y Anexo V**), algo completamente diferente a lo esperado. Así, el efecto de la sobreexpresión podría ser similar al de un dominante negativo o deberse a una saturación o intoxicación de algunas rutas en las que participan los genes *DVL/RTFL*, por lo

que los fenotipos observados en las líneas sobreexpresoras podrían ser más bien similares a los de pérdida de función *DVL/RTFL*, al menos en parte de los procesos en los que participan.

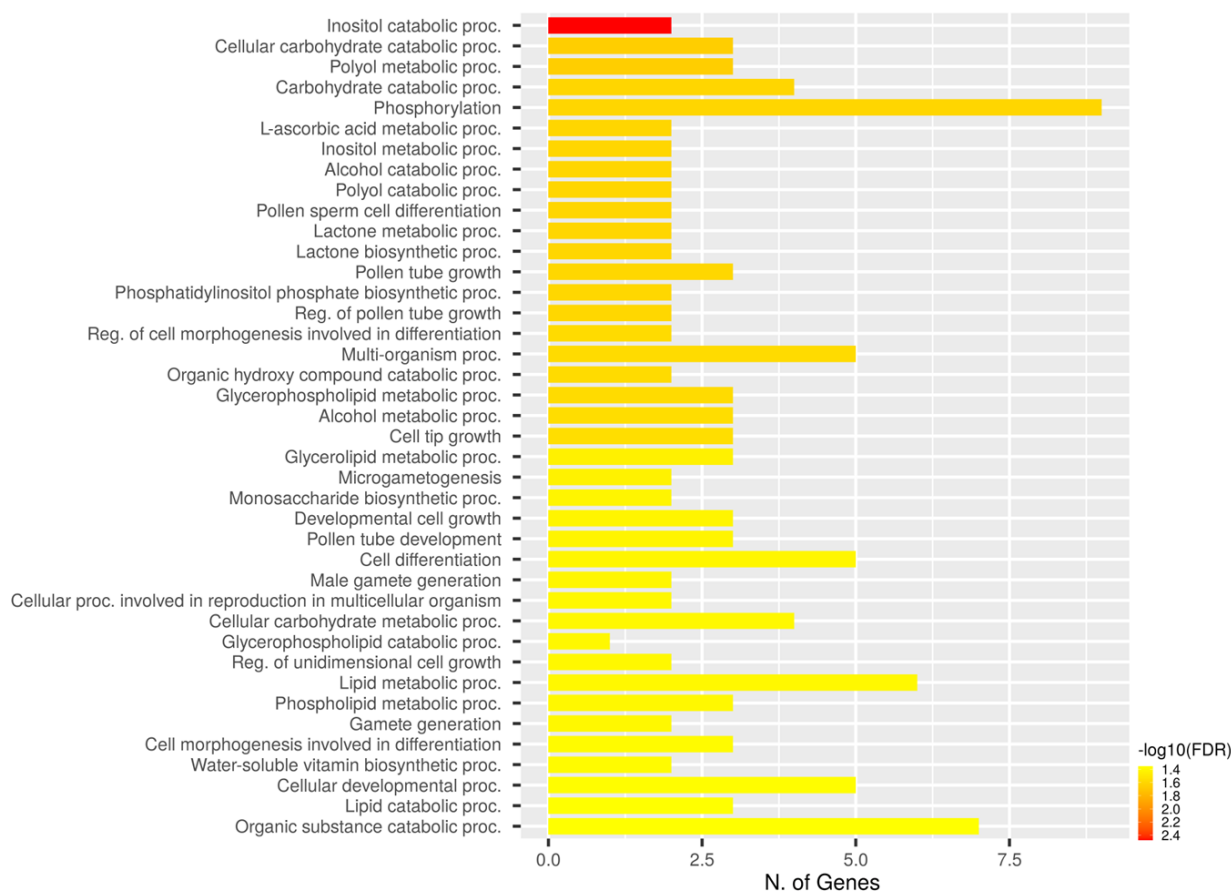


Figura 23. Análisis de términos GO más representados relacionados con procesos biológicos de los DEGs comunes en los quintuples mutantes *dvl/rtfl* y la línea sobreexpresora *35S:DVL8* analizados en el RNA-seq. El color de cada barra representa el nivel de significatividad (FDR) siendo el color rojo el mayor nivel. En el eje horizontal se indica el número de genes perteneciente a cada una de las categorías GO indicada en el eje vertical.

1.6 Análisis diferencial de proteínas de los quintuples mutantes disponibles

Puesto que la función molecular de los péptidos *DVL/RTFL* es esencialmente desconocida, cabe también la posibilidad de que afecte diferencialmente al proteoma, por lo que se decidió llevar a cabo un perfil de expresión proteómico que completase el perfil transcriptómico anteriormente realizado. Así, se podría explorar si estos péptidos pueden afectar de alguna manera la regulación post-transcripcional o la estabilidad de algunas proteínas.

Se realizó un análisis diferencial de proteínas de plantas décuples mutantes *dvl1 dvl3 dvl5 dvl6 dvl4 rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19*, mutante del que ya se disponía a la hora de hacer este experimento, comparado con plantas silvestres *Col-0*. Como en el análisis transcriptómico, se tomaron muestras de inflorescencias y flores en post-antesis para analizar tres réplicas biológicas independientes, cada una de las cuales estaba formada por material de unos 10

individuos. Los análisis proteómicos se llevaron a cabo en el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia, miembro de Proteored.

Así se consideraron como diferencialmente expresadas aquellas proteínas que tras los correspondientes análisis tenían un valor de *log. fold change* >0,01 y <-0,01 y un *p-value* <0,05. Con estos parámetros se identificaron 83 proteínas diferencialmente expresadas en el décuple mutante con respecto al silvestre, de las cuales 36 están más acumuladas en el décuple mutante y 47 menos acumuladas en el mutante que en silvestre (**Anexo VII**). Una vez identificadas las proteínas se hizo una búsqueda y comparación en la base de datos de proteínas Uniprot_Swissprot y en la base de datos TAIR para encontrar una equivalencia entre las anotaciones de las diferentes proteínas y su correspondiente gen. Así se pudo comparar los resultados obtenidos en el RNA-seq con los datos proteómicos y ver si existían elementos que apareciesen en ambos análisis. En este caso no se encontró ninguna coincidencia entre ambos perfiles por lo tanto no existiría ninguna correlación significativa entre los cambios en el transcriptoma y el proteoma. Teniendo en cuenta además que las diferencias detectadas en el proteoma eran muy pequeñas, con solo 83 proteínas diferencialmente expresadas, podríamos pensar que los niveles de sensibilidad de esta técnica son pequeños para el análisis planteado.

Tras realizar un análisis de los términos GO usando la base de datos y herramienta web ShinyGO (Ge et al., 2020), se identificaron 6 términos GO significativos relacionados con procesos biológicos comunes en ambos análisis: proceso metabólico de carbohidratos (11 proteínas), procesos catabólico de carbohidratos (5 proteínas), formación de la exina del polen (3 proteínas), formación de la pared del polen (3 proteínas), ensamblaje de compuestos involucrados en morfogénesis (3 proteínas) y morfogénesis de compuestos celulares (3 proteínas). Además de éstos, entre los que destacan procesos relacionados con el polen, se identificaron otros procesos biológicos interesantes como son el transporte de proteínas (9 proteínas) y múltiples procesos metabólicos (**Figura 24 - Anexo VIII**).

Al igual que como se había hecho en el análisis de RNA-seq, también se realizó un análisis proteómico de las líneas sobreexpresoras *dvl-1D* y 35S:DVL8. Se tomaron el mismo tipo y número de muestras que en el décuple mutante y se tuvieron en cuenta los mismos parámetros para considerar las proteínas significativamente expresadas con respecto al silvestre. Así, se identificaron 242 proteínas diferencialmente expresadas (178 al alza y 64 a la baja) en el caso de *dvl1-1D* con respecto al silvestre, con 13 elementos anotados comunes al RNA-seq (**Anexo IX**).

Puesto que no se trataba de un número muy alto de elementos que nos permitiese relacionar funciones directas de genes y proteínas entre el RNA-seq y el análisis proteómico, se

analizaron las categorías GO más significativas y aparecieron algunas como proceso metabólico de pequeñas moléculas (59 proteínas) y generación de precursores de metabolitos de energía (20 proteínas) que ya aparecían en los términos GO más significativos de las proteínas diferencialmente expresadas en el décuple mutante con respecto al silvestre (**Figura 25 – Anexo X**).

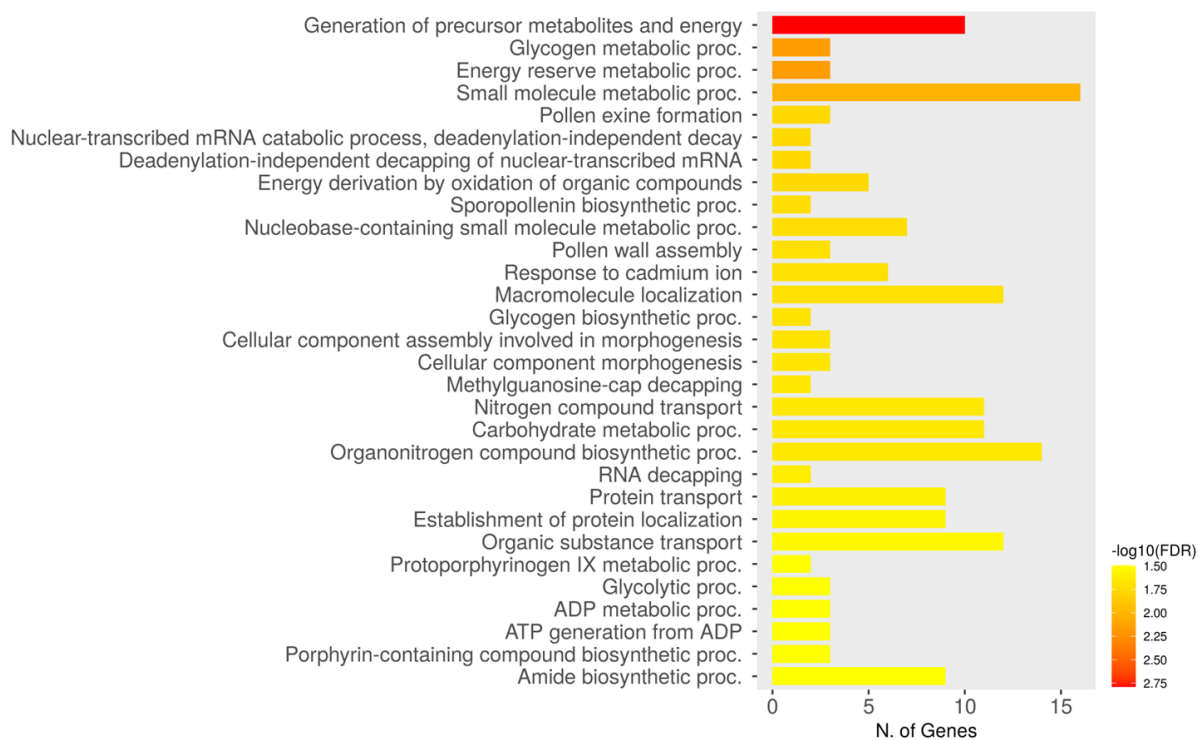


Figura 24. Análisis de los términos GO más representados relacionados con procesos biológicos de las proteínas diferencialmente expresadas en el décuple mutante *dvl1 dvl3 dvl5 dvl6 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* con respecto al silvestre extraídos en el análisis diferencial de proteínas. El color de cada barra representa el nivel de significancia (FDR) siendo el color rojo el mayor nivel. En el eje horizontal se indica el número de genes perteneciente a cada una de las categorías GO indicada en el eje vertical. El gráfico ha sido generado usando la herramienta web ShinyGO.

En el caso del análisis de la línea sobreexpresora 35S:DVL8, aparecieron 202 proteínas diferencialmente expresadas con respecto al silvestre (140 al alza y 62 a la baja) y al igual que pasaba en el caso anterior, apenas había coincidencias entre los elementos destacados en la transcriptómica y la proteómica, encontrando solo 4 proteínas o genes comunes anotados entre ambos análisis (**Anexo XI**). Sin embargo, en el análisis de categorías GO relacionadas con procesos biológicos encontramos términos comunes con el análisis transcriptómico como la formación de la exina del polen, ensamblaje de la pared del polen, morfogénesis de componentes celulares y ensamblaje de componentes celulares involucrados en morfogénesis, compuestos por las mismas proteínas. Además, aparecían muchos procesos catabólicos y metabólicos significativamente alterados (**Figura 26 – Anexo XII**) tal y como ya ocurría en los proteomas del décuple mutante y la línea sobreexpresora *dvl1-1D*.

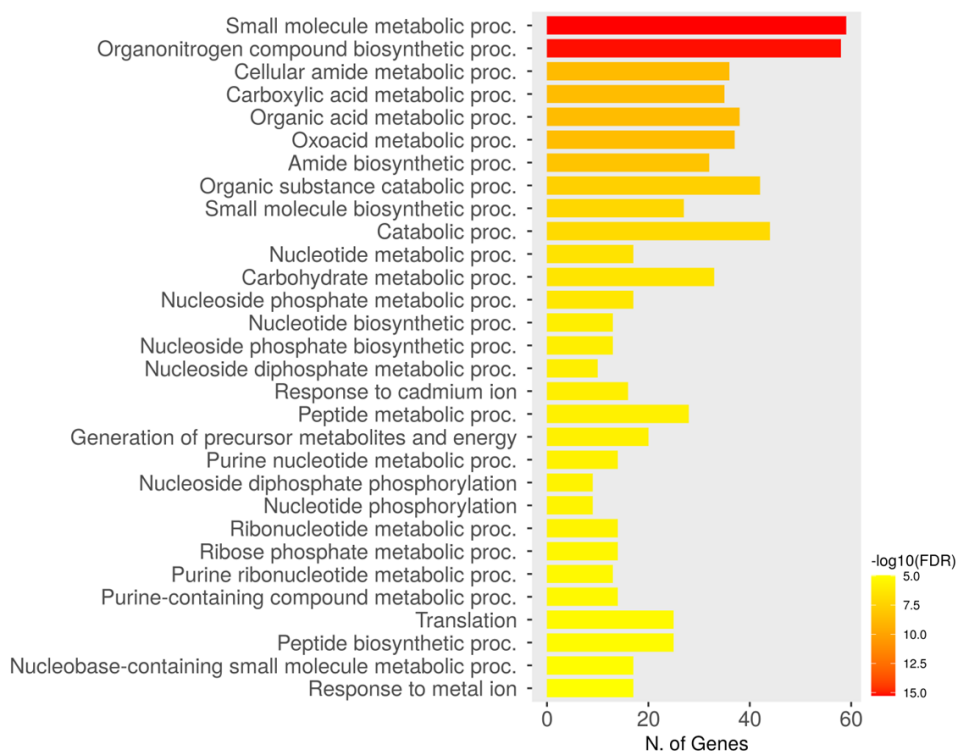


Figura 25. Análisis de los términos GO más representados relacionados con procesos biológicos de las proteínas diferencialmente expresadas en la línea sobreexpresora *dvl1-1D* con respecto al silvestre extraídos en el análisis diferencial de proteínas. El color de cada barra representa el nivel de significancia (FDR) siendo el color rojo el mayor nivel. En el eje horizontal se indica el número de genes perteneciente a cada una de las categorías GO indicada en el eje vertical. El gráfico ha sido generado usando la herramienta web ShinyGO.

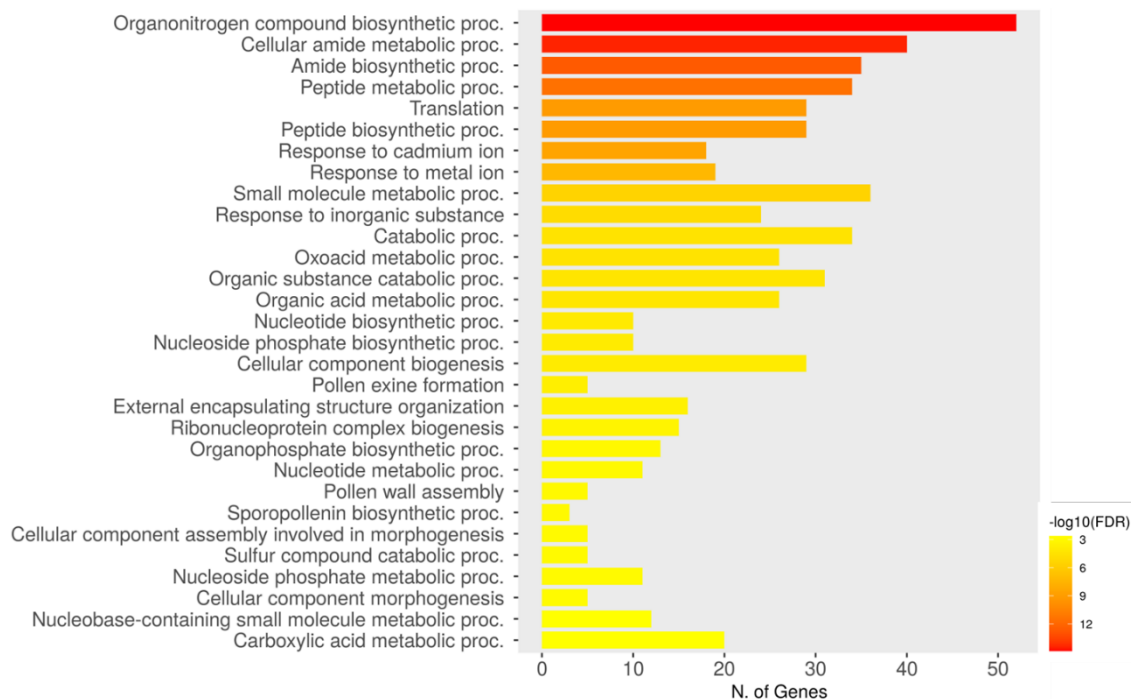


Figura 26. Análisis de los términos GO más representados relacionados con procesos biológicos de las proteínas diferencialmente expresadas en la línea sobreexpresora 35S:DVL8 con respecto al silvestre extraídos en el análisis diferencial de proteínas. El color de cada barra representa el nivel de significancia (FDR) siendo el color rojo el mayor nivel. En el eje horizontal se indica el número de genes perteneciente a cada una de las categorías GO indicada en el eje vertical. El gráfico ha sido generado usando la herramienta web ShinyGO.

Así, al comparar las 3 listas de proteínas diferencialmente expresadas obtenidas en el análisis del décuple mutante y las líneas sobreexpresoras *dvl1-1D* y 35S:DVL8 comparadas con la línea silvestre, son muy pocos los términos comunes a las tres listas (**Figura 27**) pero suficientes como para encontrar procesos biológicos significativamente alterados comunes, como son ensamblaje de la pared del polen, morfogénesis de componentes celulares, ensamblaje de componentes celulares involucrados en morfogénesis, proceso metabólico de pequeñas moléculas y otros procesos catabólicos y metabólicos (**Anexo XIII**).

Al igual que observamos en el análisis transcriptómico, el análisis proteómico mostraba que la sobreexpresión de los genes *DVL* en las líneas *dvl1-1D* y 35S:DVL8 cambiaba la respuesta de la mayoría de las proteínas diferencialmente expresadas en el mismo sentido que lo hacía la pérdida de función en el múltiple mutante (**Anexo XIII**). Esta observación reafirmaba de alguna manera la hipótesis de que el efecto de la sobreexpresión podría ser similar al de un dominante negativo o deberse a una saturación o intoxicación de algunas rutas en las que participan los genes *DVL/RTFL*, por lo que los fenotipos observados en las líneas sobreexpresoras podrían ser similares a los de pérdida de función *DVL/RTFL*.

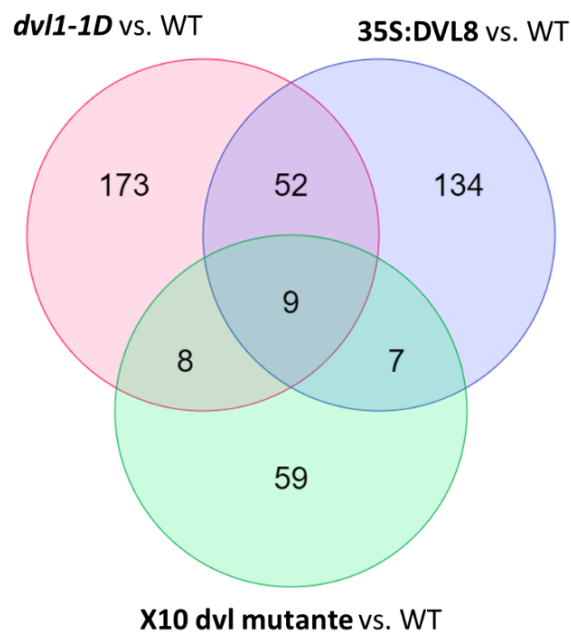


Figura 27. Proteínas diferencialmente expresadas en el décuple mutante *dvl1 dvl3 dvl5 dvl6 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19*, la línea sobreexpresora *dvl1-1D* y la línea sobreexpresora 35S:DVL8 comparadas con el silvestre. Diagrama de Venn que muestra el número de proteínas comunes en los 3 análisis con respecto al genotipo silvestre (WT). Décuple mutante *dvl3 dvl5 dvl6 dvl1 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* = x10 dvl mutante.

1.7 Implicación de los péptidos DVL/RTFL en el desarrollo y crecimiento del tubo polínico.

Como se ha indicado en los apartados anteriores, dentro de los procesos biológicos afectados de manera significativa en los quintuples mutantes *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* con respecto al silvestre, destacan aquellos relacionados con el crecimiento y desarrollo del tubo polínico. Es por ello por lo que se decidió estudiar cómo y de qué manera podrían estar los genes *DVL/RTFL* influyendo en estos procesos, para lo cual se diseñaron experimentos de germinación de polen y crecimiento del tubo polínico tanto *in vitro* como *in vivo*. Puesto que las plantas mutantes eran fértiles y producían frutos y semillas, se supuso que los posibles defectos en estos procesos no eran drásticos y podrían estar más relacionados con la dinámica de la germinación y crecimiento del tubo polínico más que con su viabilidad.

En primer lugar, se estudió la frecuencia de germinación del polen de plantas silvestres, del séptuple mutante *dvl1 dvl4 rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* (múltiple mutante disponible en ese momento) y de la línea sobreexpresora *dvl1-1D*. Los granos de polen de las plantas a comparar se germinaron *in vitro* en placa y se dejaron crecer durante 2, 4, 6 y 8 horas, tras las cuales se observaron y tomaron fotografías en un microscopio de campo claro para después llevar a cabo el conteo de granos germinados en cada una de las condiciones (**Figura 28**).

Tras calcular la frecuencia de germinación de polen en cada uno de estos periodos de crecimiento como el número de granos de polen germinados con respecto al total en un mínimo de 100 granos por fondo y tiempo, no se observaron cambios estadísticamente significativos (**Figura 29**).

Así mismo, también se midió la longitud de los tubos polínicos elongados durante los diferentes tiempos de crecimiento. Se contabilizaron y midieron aquellos tubos cuya longitud sobrepasaba la mitad del tamaño del grano de polen. En este caso no se hizo una media de la longitud de todos los tubos polínicos por genotipo y por tiempo, sino que se calculó la frecuencia de distribución de las diferentes longitudes categorizadas en diferentes grupos (**Figura 30**). En general, no observamos diferencias destacables en cuanto a estas frecuencias, aunque a las cuatro horas, los tubos polínicos de los mutantes parecían presentar una distribución más amplia de longitudes. En la **Figura 31** se representa la longitud de los tubos polínicos de granos individuales germinados en este punto temporal. A las 4 horas, aunque no encontramos una diferencia significativa en la media de las longitudes entre los diferentes genotipos, sí se podía

observar una mayor dispersión de los datos, tanto en la línea mutante como en la línea sobreexpresora *dvl1-1D*, con respecto a la línea silvestre.

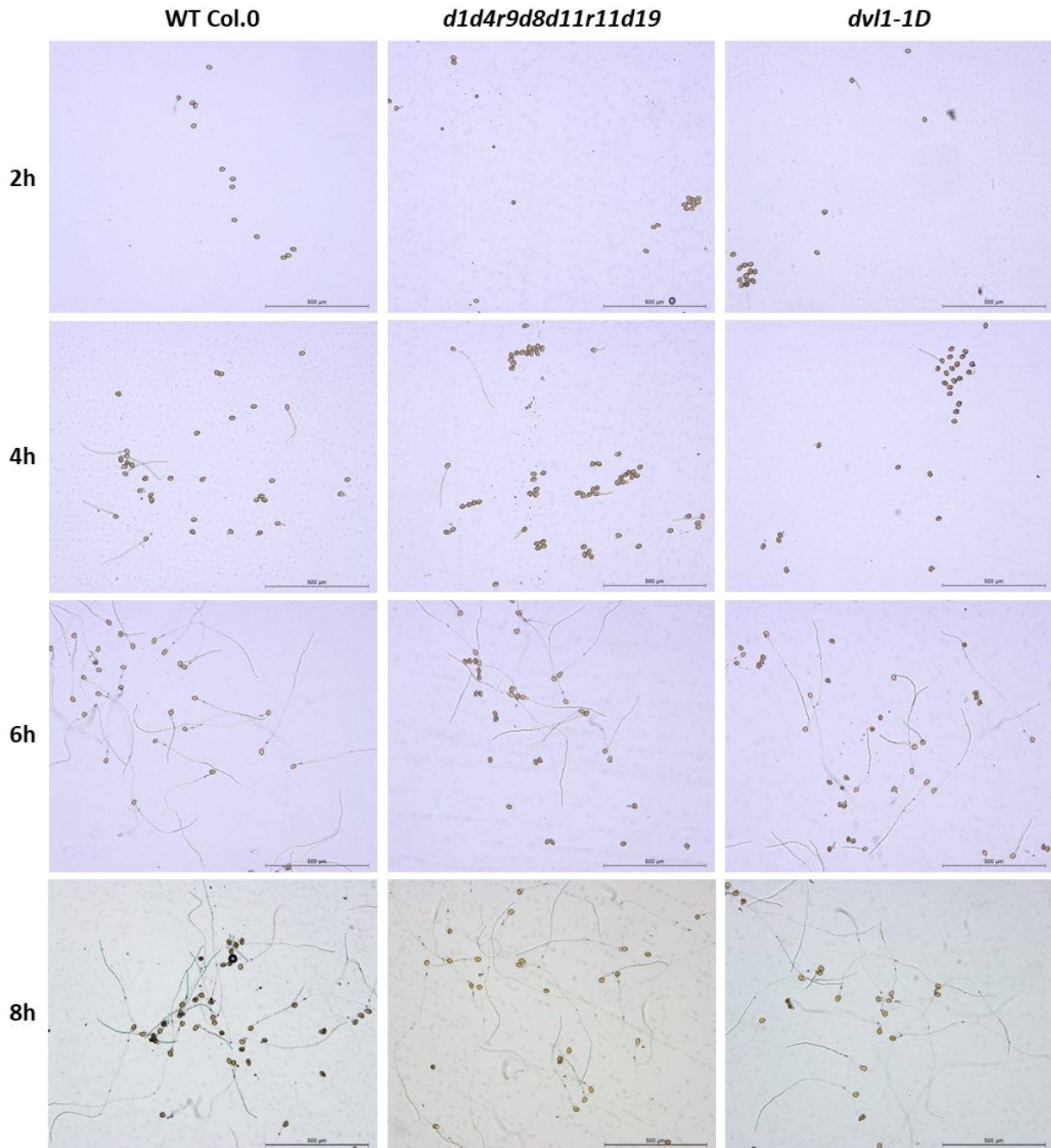


Figura 28. Germinación de polen y crecimiento del tubo polínico *in vitro*. Granos de polen y tubos polínicos de plantas silvestres (WT Col.0), plantas mutantes *dvl1 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19 (d1d4r9d8d11r11d19)* y plantas sobreexpresoras *dvl1-1D*. Los granos de polen se germinaron *in vitro* y dejaron crecer y se observaron tras 2, 4, 6 y 8 horas. Escala 500 µm.

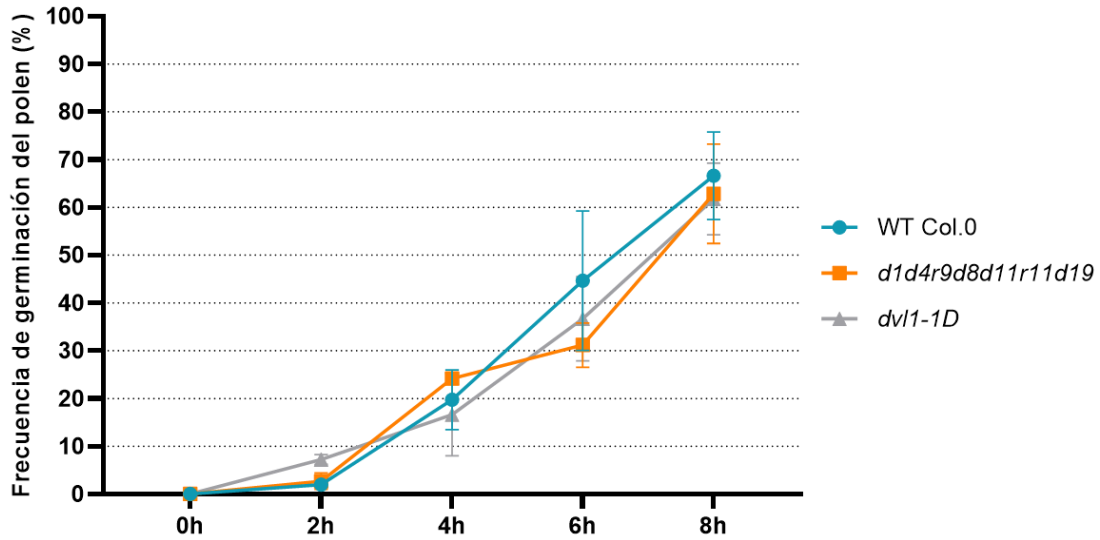


Figura 29. Frecuencia de germinación de polen *in vitro*. El porcentaje de germinación de polen se calcula tras 2, 4, 6 y 8 horas de crecimiento por genotipo (silvestre = WT Col.0 en azul; mutante *dvl1 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19 = d1d4r9d8d11r11d19* en naranja; línea de sobreexpresión *dvl1-1D* en gris). Los puntos representan la media de las frecuencias en cada uno de los tiempos y genotipos y las barras de error representan las desviaciones estándar correspondiente a tres réplicas por punto. n > 100.

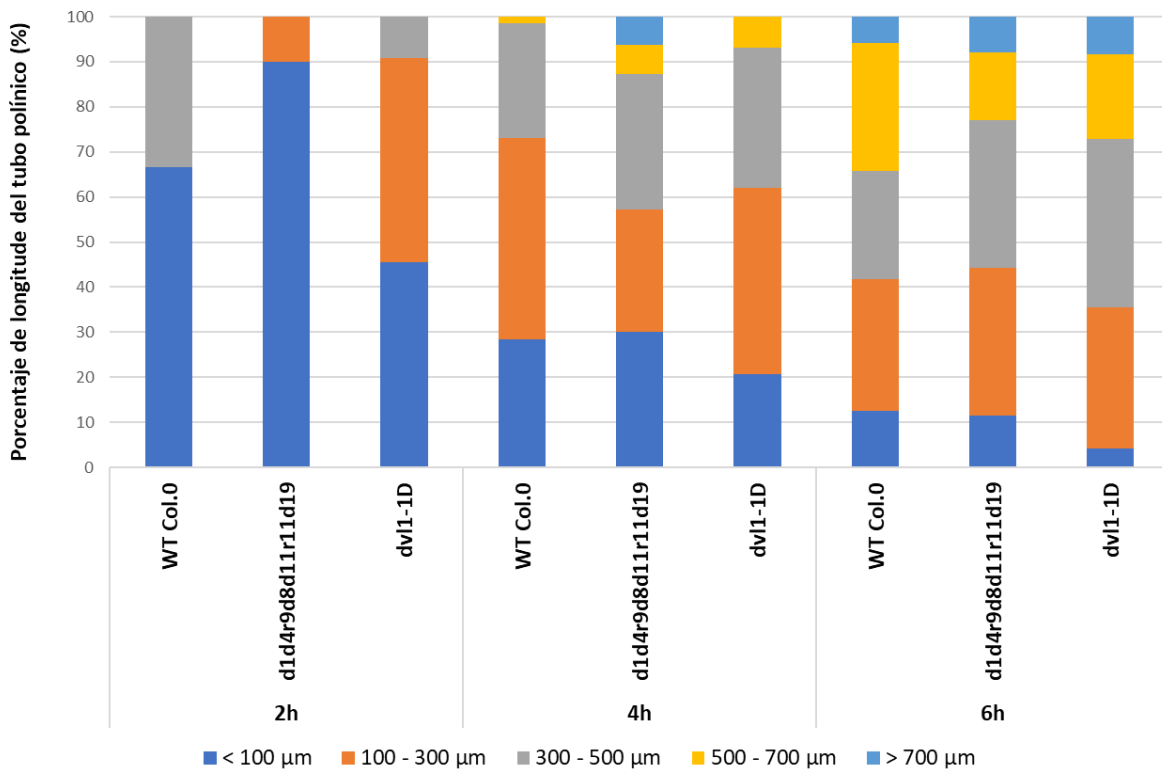


Figura 30. Longitud de tubo polínico. Frecuencia de distribución de diferentes longitudes de tubos polínicos medidas tras 2, 4 y 6 horas de crecimiento y por genotipo (silvestre = WT Col.0; mutante *dvl1 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19 = d1d4r9d8d11r11d19*; línea de sobreexpresión *dvl1-1D*). La longitud del tubo polínico se ha categorizado en 5 grupos (menor a 100 μm: <100 μm; entre 100 y 300 μm: 100–300 μm; entre 300 y 500 μm: 300–500 μm, entre 500 y 700 μm: 500–700 μm; y mayor a 700 μm: >700 μm).

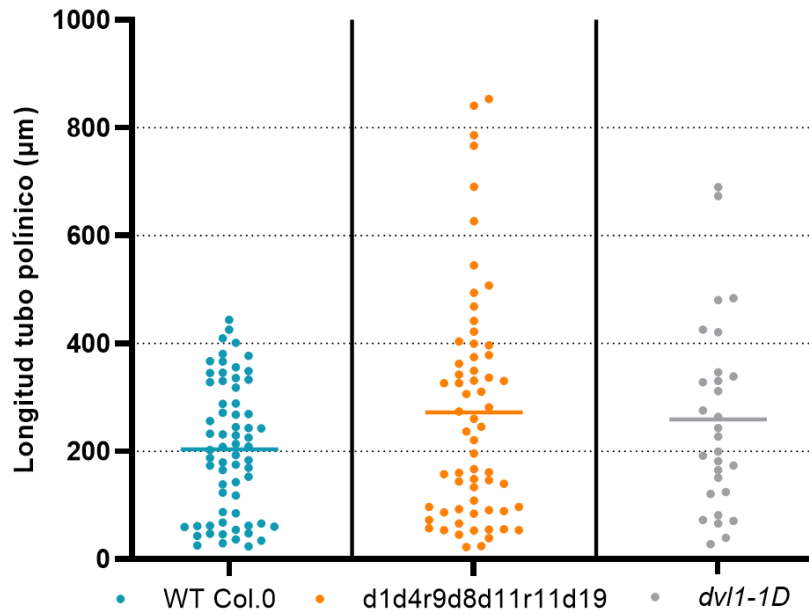


Figura 31. Longitud de tubo polínico tras 4 horas de crecimiento. Silvestre = WT Col.0; mutante *dvl1 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* = d1d4r9d8d11r11d19; línea de sobreexpresión *dvl1-1D*. Longitud del tubo polínico medida en micras (μm).

Para comparar el rendimiento general y la extensión del crecimiento del tubo polínico *in vivo* y, por tanto, observar el comportamiento del tubo polínico dentro del pistilo, se visualizaron los mismos tras la fertilización mediante tinción de azul de anilina. Para ello se emascularon y fertilizaron de manera manual pistilos silvestres con polen tanto silvestre como de plantas séptuples mutantes *dvl1 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* y plantas sobreexpresoras *dvl1-1D*. Solo se emplearon pistilos silvestres y no de los otros dos fondos genéticos puesto que lo que se quería evaluar era el crecimiento y desarrollo del tubo polínico. Al igual que en los experimentos *in vitro* realizados con anterioridad, se evaluó el crecimiento en diferentes tiempos, en este caso a las 6, 12 y 24 horas tras la polinización. Tal y como se observa en la **Figura 32**, no se detectaron cambios evidentes en el crecimiento de los tubos polínicos a través del tracto de transmisión del pistilo. Aunque no se realizó una cuantificación precisa, la cantidad de tubos y su elongación era similar en los tres fondos en los tres puntos temporales evaluados.

Por último, comprobamos si a pesar de no observar defectos evidentes en el crecimiento y desarrollo del tubo polínico pudiera haber algún problema en la fecundación del óvulo por parte del polen y por ende en la formación de las semillas dentro de la silicua. Ya se ha dicho que las plantas mutantes eran fértiles y producían semillas, pero para evaluar la eficiencia de la polinización se cuantificó el número de semillas por silicua tanto en las plantas silvestres como en las plantas nónples mutantes *dvl3 dvl5 dvl6 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19*, de las que ya se disponía en el momento de realizar este experimento.

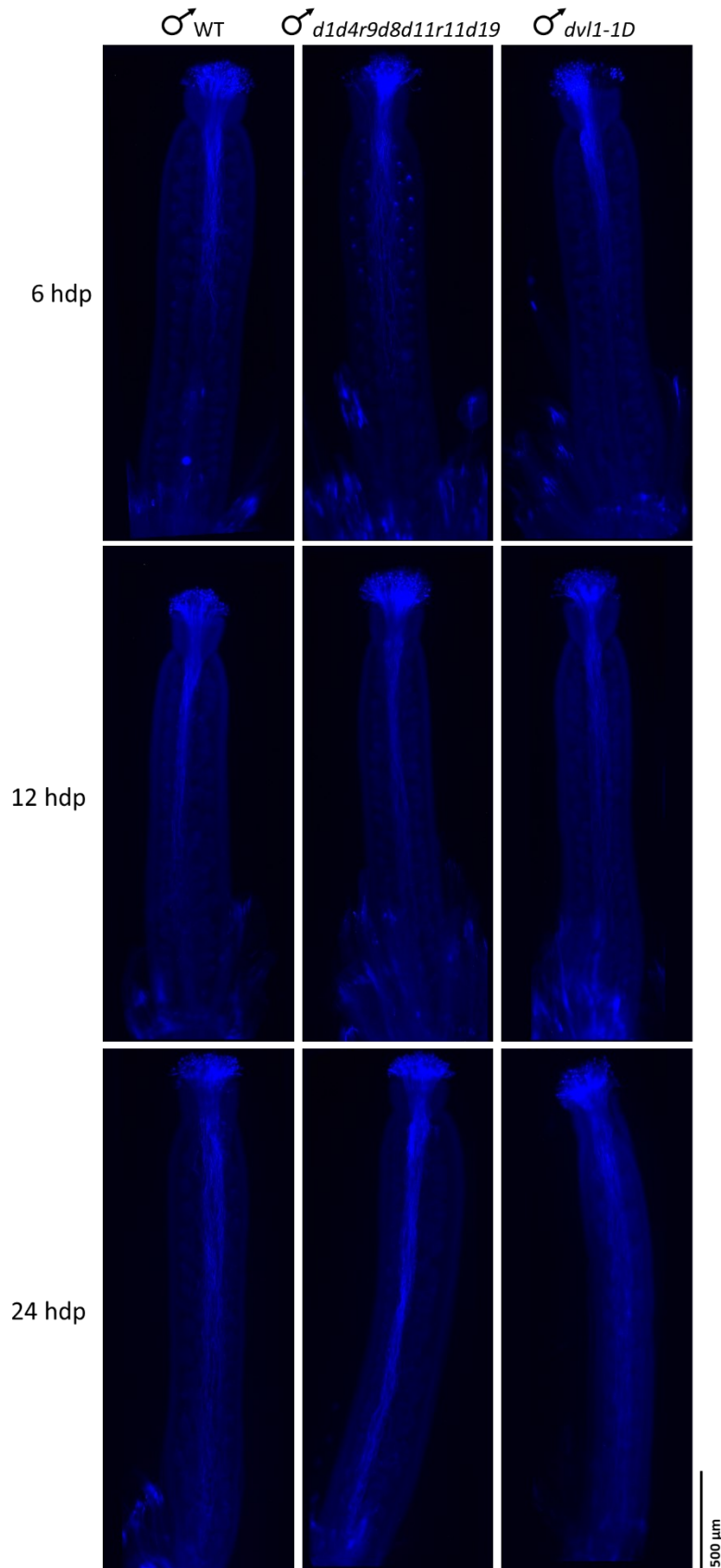


Figura 32. Crecimiento del tubo polínico *in vivo*. Imágenes representativas de tubos polínicos de polen de plantas silvestre Col-0 (WT), plantas mutantes *dv1 dv14 rtf19 dv18 dv111 rtf11 dv19* (*d1d4r9d8d11r11d19*) y plantas sobreexpresoras *dv1-1D* creciendo tras polinizar pistilos silvestres. Los pistilos se tiñeron con azul de anilina y observaron tras 6, 12 y 24 horas después de la polinización (hdp). Escala 500 μm.

En esta ocasión no se tuvieron en cuenta las líneas sobreexpresoras ya que, en estas silicuas, al no tener la misma morfología y tampoco el mismo número de semillas que el silvestre, era más difícil hacer una comparación.

En primer lugar, se colectaron las silicuas ya formadas de la posición 6 a la 10 del ápice principal de 12 plantas silvestres Col-0 y 12 plantas nónples mutantes (**Figura 33A**), que se trataron en conjunto por cada genotipo. Así se contabilizó el número total de semillas por cada una de las silicuas, y mientras que las plantas silvestres tenían una producción media de 62 semillas por silicua, con mínimos de 58 semillas y máximos de 69 semillas por silicua, las plantas mutantes tenían una media similar de 60 semillas, pero con una distribución mucho más dispersa, pues se encontraron silicuas con 73 semillas y otras con 28 semillas (**Figura 33B**). Sin embargo, en lo que se refiere a la longitud, las silicuas mutantes con 30-40 semillas, no eran mucho más cortas en comparación con las silicuas silvestres observándose posiciones alternas carentes de semillas a lo largo de la longitud de la silicua (**Figura 33C**).

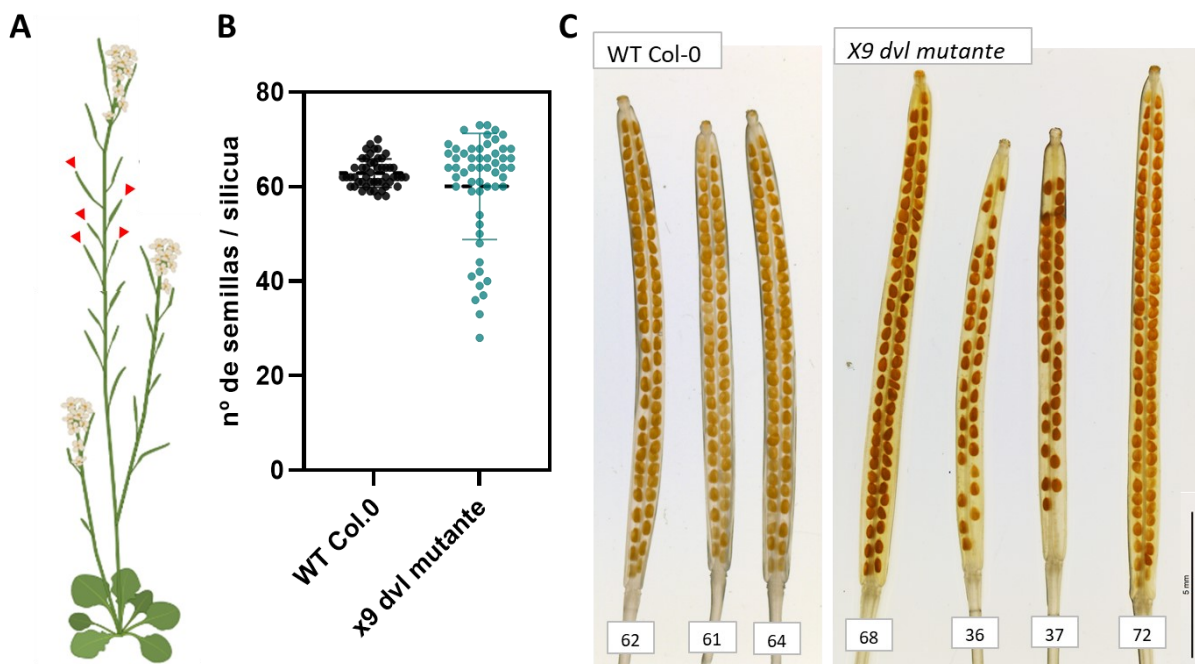


Figura 33. Producción de semillas por silicua. A) Representación de las silicuas seleccionadas para la medida (nº 6 a 10 del ápice principal). B) Producción de semillas calculada como el número de semillas por silicua, cada punto representa la medida de una silicua y la media de todas las medidas se indica con una barra central, calculado para el genotipo silvestre (WT Col.0 - negro) y el mutante *dvl3 dvl5 dvl6 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* (*x9 dvl mutante* - azul), $n > 50$. C) Imagen de 3 silicuas silvestres representativas (WT Col-0) y 4 silicuas mutantes *dvl3 dvl5 dvl6 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* representativas (*x9 dvl mutante*), el número de semillas de cada silicua se indica en la parte inferior. Escala 5 mm.

Al haberse tomado como un solo grupo muestral silicuas de diferentes plantas por cada genotipo, nos planteamos si la mayor dispersión de la producción de semillas en el genotipo mutante podía deberse a que hubiese mutaciones adicionales no identificadas segregando en

estos múltiples mutantes. Por ello, el siguiente muestreo se llevó a cabo contabilizando cada planta de manera individualizada.

Como se observa en la **Figura 34A**, las plantas silvestres siguen manteniendo su distribución de producción con una media de alrededor 62 semillas por silicua en todas las plantas analizadas. Además, las plantas nónples mutantes mantenían la distribución en lo que al número de semillas se refiere en las 5 silicuas contabilizadas por planta, es decir, en una misma planta se encontraron silicuas con 30-40 semillas y silicuas con más de 70 semillas, lo que evidencia que no se debe a un efecto de segregación poblacional. Así, dentro de la misma planta encontramos una dispersión muy amplia en lo que a la producción de semillas por silicua se refiere (**Figura 34**).

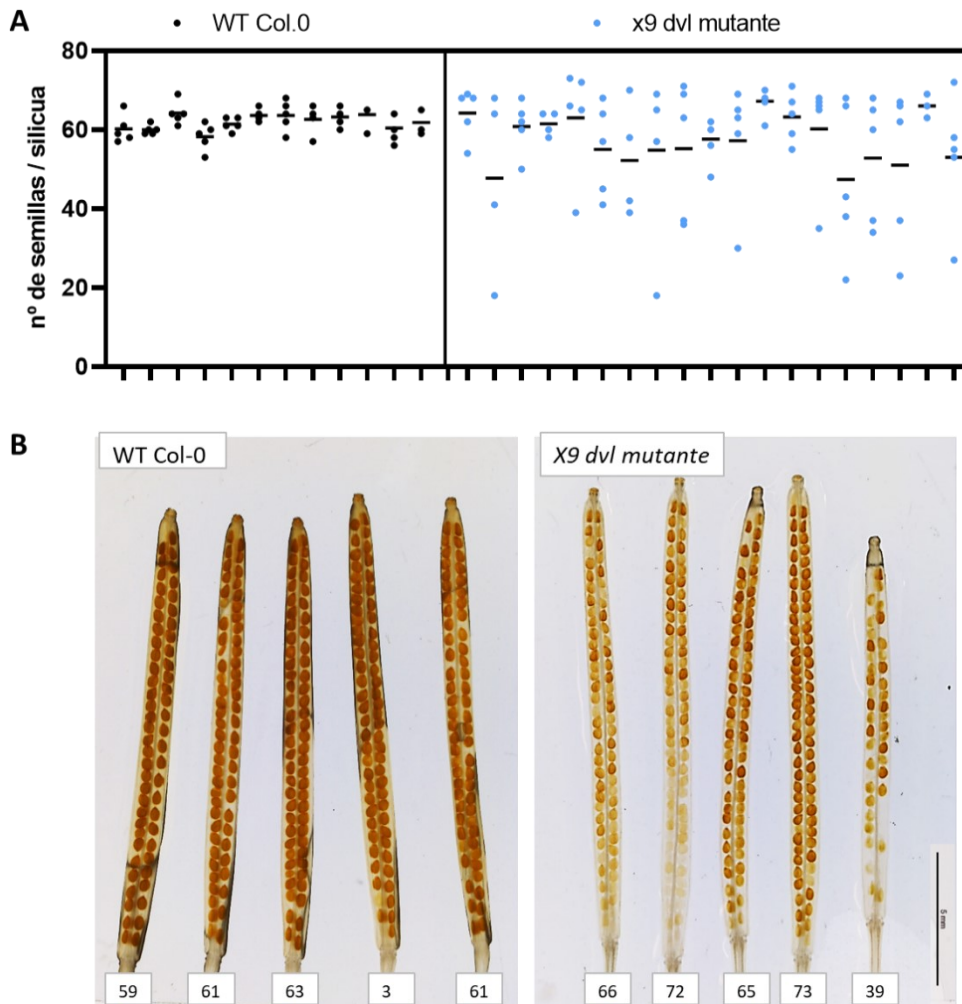


Figura 34. Producción de semillas por silicua por planta individualizada. A) Producción de semillas calculada como el número de semillas por silicua, cada punto representa la medida de una silicua y la media se representa con una barra central, calculado para el genotipo silvestre (WT Col.0 - negro) y el mutante *dvl3 dvl5 dvl6 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* (*x9 dvl mutante* - azul). Cada sección marcada en la parte inferior corresponde a una planta individual con los 5 puntos correspondientes a las 5 silicuas contabilizadas, n WT Col-0 = 12, n *x9 dvl mutante* = 19. B) Imagen de 5 silicuas de una planta silvestre representativa (WT Col-0) y una mutante *dvl3 dvl5 dvl6 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* representativa (*x9 dvl mutante*), el nº de semillas de cada silicua se indica en la parte inferior. Escala 5 mm.

Una pregunta adicional que nos planteamos fue si esta distribución en la producción de semillas se debía a un efecto posicional dentro de la misma planta, es decir, si los frutos en una posición más cercana a la roseta eran los que tenían un menor número de semillas que los que se encontraban más cerca de la parte apical o viceversa. Para comprobar esto, se colectaron las silicuas de la posición 6 a la 10 del ápice principal (**Figura 33A**) y, además, las silicuas de la posición 16 a la 20, más cerca de la parte apical. Como se puede observar en la **Figura 35A**, y tal y como ocurría en los casos anteriores, la distribución de la producción de semillas por silicua en las plantas nónples mutantes en las posiciones 6 y 10 del tallo principal variaba mucho, con números muy dispersos que iban desde las 35 semillas por silicua a las 68 semillas por silicua dentro de una misma planta; además, esta dispersión se mantenía en la mayoría de las plantas testadas.

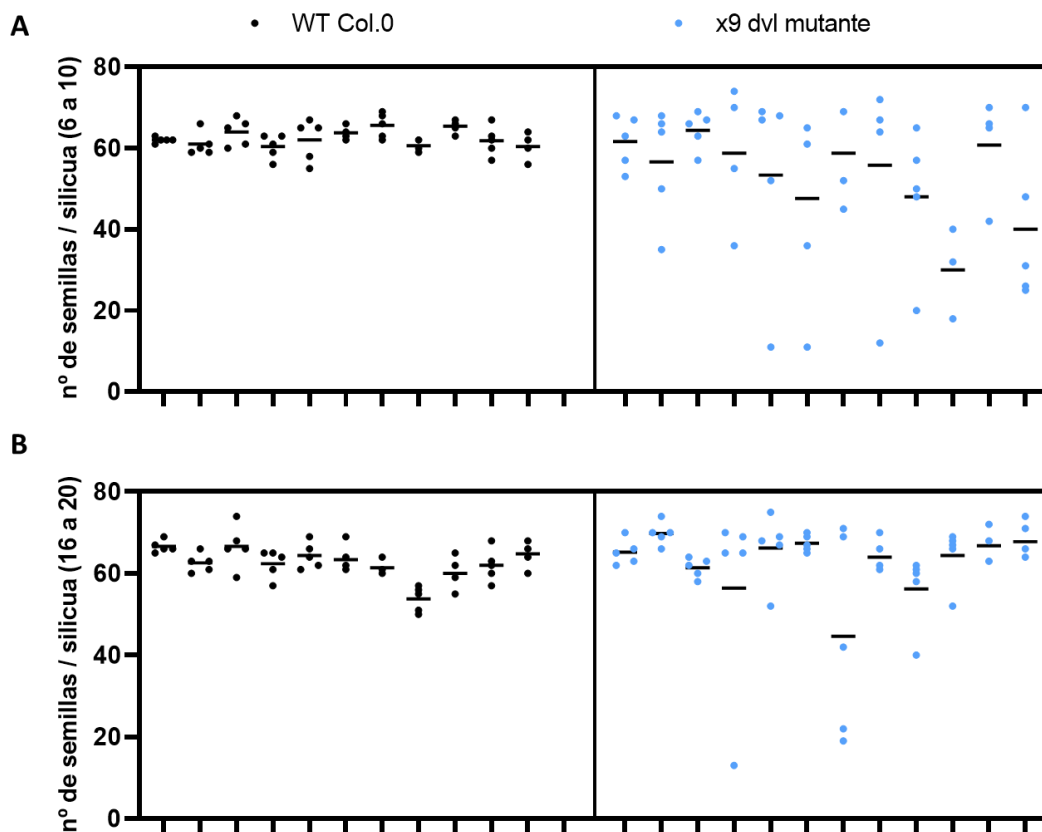


Figura 35. Producción de semillas por silicua por planta individualizada y posición. Producción de semillas calculada como el número de semillas por silicua, cada punto representa la medida de una silicua y la media se representa con una barra central, calculado para el genotipo silvestre (WT Col.0 - negro) y el nónples mutante *dv13 dv15 dv16 dv14 rtfl9 dv18 dv11 rtfl11 dv19* (x9 dvl mutante - azul). Cada sección marcada en la parte inferior que corresponde a un conjunto de 5 puntos representa 1 planta individual n WT Col-0 = 11 plantas, n x9 dvl mutante = 12 plantas. A) Datos correspondientes a las silicuas de la posición 6 a 10 del ápice principal. B) Datos correspondientes a las silicuas de la posición 16 a 20 del ápice principal.

En el caso de las silicuas más apicales, las de las posiciones 16 a la 20 del ápice principal, en la mitad de las plantas testadas se produce la dispersión amplia en lo que a la producción de

semillas se refiere que ya veníamos observando en los casos anteriores. Sin embargo, la otra mitad de plantas presentaban una dispersión más similar al silvestre en la producción de semillas por silicua (**Figura 35B**). Esto puede deberse a que, en muchas ocasiones, los fenotipos pueden atenuarse conforme avanza la edad de la planta.

Estos experimentos evidencian diferencias en la producción de semillas por silicua entre las plantas nónuples mutantes *dvl3 dvl5 dvl6 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* y las plantas silvestres. Este cambio no se había observado en la caracterización fenotípica de mutantes de menor orden (**Figura 16**) ni tampoco se aprecia en el décuple mutante *dvl/rtfl* (**Figura 19**) porque la longitud de la semilla no sufre cambios significativos y solo se observan cambios cuando se cuenta el número de semillas por silicua. Para determinar el origen de estas diferencias y como se relacionan con los posibles defectos en el crecimiento y desarrollo del tubo polínico sugeridos por el análisis transcriptómico del apartado 1.5 de Resultados, o con defectos adicionales en la fecundación del óvulo serán necesarios estudios posteriores que no han podido abordarse en este trabajo.

1.8 Implicación de los péptidos DVL/RTFL en el desarrollo y crecimiento de los pelos radiculares.

Dentro de los procesos biológicos significativamente alterados en el análisis transcriptómico de los múltiples mutantes *dvl/rtfl* (apartado 1.5 de Resultados) destacamos el crecimiento distal de la célula. Este modo de expansión de las células vegetales por el cual el crecimiento de la célula está limitado a un único punto de crecimiento permitiendo la formación de células elongadas con forma tubular no es exclusivo de los tubos polínicos, sino que también es característico de los pelos radiculares de la raíz (Schiefelbein et al., 1993; Hepler et al., 2001; Šamaj et al., 2006).

Por esta razón, se decidió caracterizar el crecimiento de los pelos radiculares en el múltiple mutante *dvl1 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19*, séptuple mutante en el que se había caracterizado el crecimiento del tubo polínico en el apartado anterior de resultados. Así, se sembraron plantas silvestres y séptuples mutantes y se crecieron durante 5 días en placas verticales *in vitro* para controlar el crecimiento de la raíz. Tras esto se observaron las raíces de varios individuos de cada uno de los genotipos en el microscopio óptico observando diferencias entre ambas poblaciones (**Figura 36**).

Dentro de la parte más apical de la raíz se encuentran dos zonas: el meristemo apical de la raíz (RAM - *Root Apical Meristem*) y la zona de elongación (EZ - *Elongation Zone*), caracterizadas por presentar mayoritariamente proliferación y elongación celular,

respectivamente. Por encima de la zona de elongación empiezan a diferenciarse las células y a formarse los pelos radiculares (Foreman and Dolan, 2001; Pacheco-Escobedo et al., 2016). Por ello, se prestó especial atención a estas zonas a la hora de caracterizar la posible implicación de los péptidos DVL/RTFL en el desarrollo y crecimiento de los pelos radiculares.

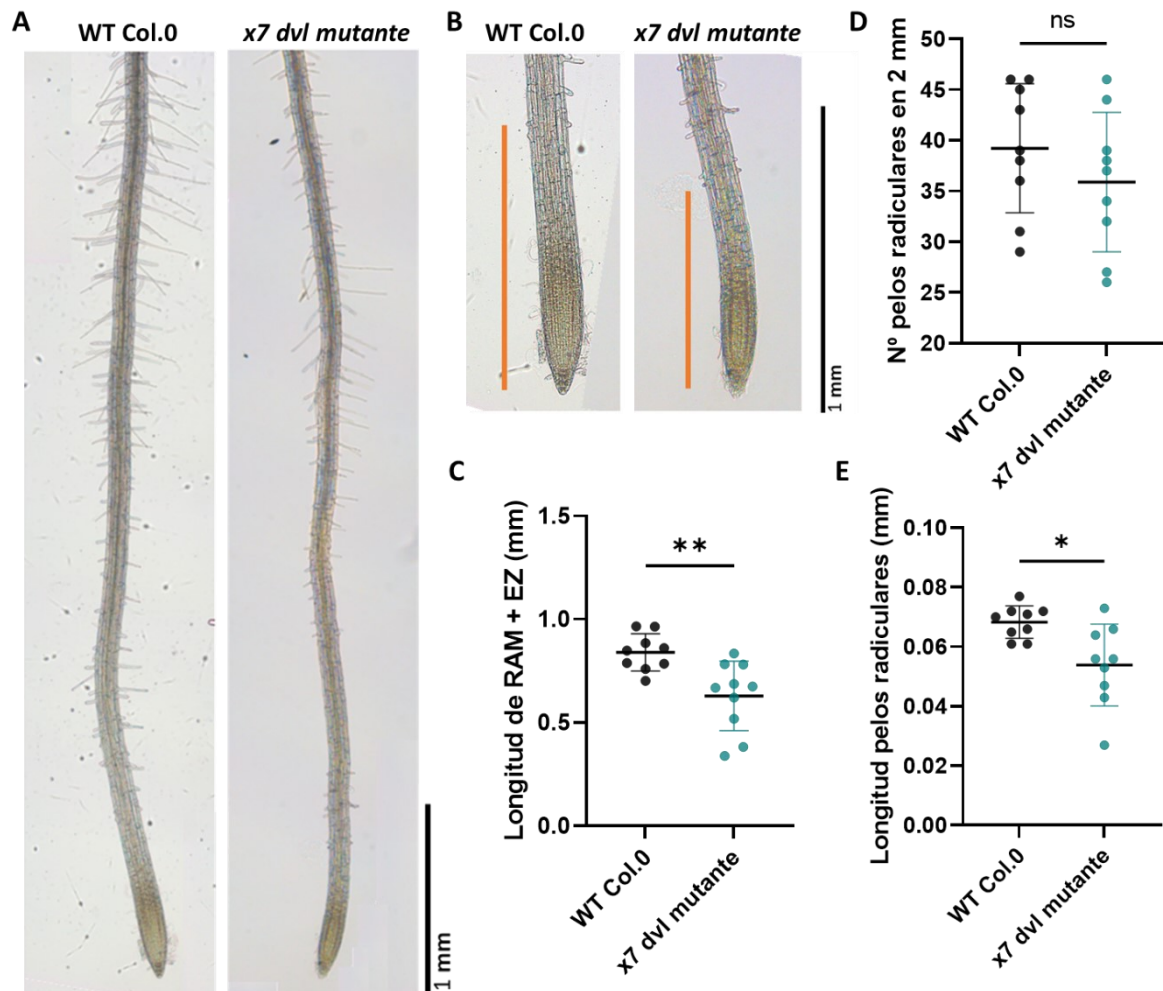


Figura 36. Fenotipos asociados al crecimiento de la raíz y los pelos radiculares en el séptuple mutante *dvl1 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19*. A) Imagen de una raíz representativa del genotipo silvestre (WT Col.0) y del genotipo séptuple mutante *dvl1 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* (x 7 dvl mutante). Escala 1 mm. B) Ampliación de la punta de la raíz silvestre (WT Col.0) y séptuple mutante *dvl1 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* (x 7 dvl mutante). La barra naranja representa la longitud del meristemo apical de la raíz (RAM) + la zona de elongación (EZ). Escala 1 mm. C) Longitud de la zona del meristemo apical de la raíz (RAM) + la zona de elongación (EZ) medida en mm. $n \geq 9$. D) Número de pelos radiculares en los dos primeros mm de raíz desde el punto de formación. $n \geq 9$. E) Longitud de los pelos radiculares en los dos primeros mm de raíz desde el punto de formación en mm, cada punto representa la medida de longitudes de los pelos de una raíz. $n \geq 9$. Las diferencias significativas se han calculado usando el t-test con la corrección de Welch's comparando la línea silvestre con la séptuple mutante. p -values **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$; ns, no significativo.

El primer aspecto en el que se observaron diferencias entre las raíces del silvestre y el múltiple mutante, y previo a la observación más detallada de los pelos radiculares, fue la distancia existente entre la punta de la raíz y el inicio de los pelos radiculares, o lo que es lo mismo, la longitud de las zonas de proliferación y elongación celular previas a la zona de células

ya diferenciadas. Como puede observarse en la **Figura 36A-C**, esta distancia era significativamente menor en los múltiples mutantes en comparación con el silvestre.

En lo referente a los pelos radiculares, no se observaron diferencias significativas en el número de pelos, variando mucho los datos en cada una de las raíces, tanto en el genotipo silvestre como en el séptuple mutante (**Figura 36D**). Sin embargo, en lo que sí se observaron diferencias fue en la longitud de estos pelos radiculares, encontrando que éstos eran generalmente más cortos en las raíces mutantes que en las raíces silvestres (**Figura 36E**). Además, y como ya se había observado en la caracterización del crecimiento del tubo polínico y la producción de semillas por silicua, existía una mayor dispersión de los datos en el caso del múltiple mutante con respecto al silvestre (**Figura 36C y 36D**).

Por tanto, se puede decir que los genes *DVL/RTFL* sí tienen una implicación en procesos de crecimiento distal y unidimensional de la célula, al encontrar diferencias en la longitud de los pelos radiculares. Adicionalmente, también podrían estar participando o afectando a la proliferación y diferenciación celular, ya que en el mutante *dvl1 dvl4 rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* la zona proliferativa correspondiente al RAM y la zona de elongación eran más cortas que en el silvestre, pudiendo estar diferenciándose las células más rápidamente. Esto concuerda con lo observado en el análisis transcriptómico y proteómico en los que se destacó como procesos biológicos relacionados con la morfogénesis también se encontraban alterados en las líneas mutantes *dvl/rtfl* y sobreexpresoras.

RESULTADOS: CAPITULO 2



CAPITULO 2. Determinación de la relevancia funcional de las interacciones proteína-proteína observadas y su implicación en el mecanismo de acción de los péptidos DVL/RTFL.

Antecedentes y resultados previos

Se ha comprobado, en estudios previos, que los péptidos DVL/RTFL se encuentran en el interior celular asociados a la membrana plasmática y que su localización aquí resulta ser esencial para su función molecular. Además, no poseen ni un dominio transmembrana ni señalizador reconocible, por lo que estos péptidos pueden que necesiten interactuar con otros componentes asociados a la membrana (Narita et al., 2004; Wen and Walker, 2006; Yamaguchi and Tsukaya, 2006; Ikeuchi et al., 2011).

Así, y con el fin de plantear nuevas hipótesis sobre el mecanismo de acción de estos péptidos, en el laboratorio donde se ha realizado este trabajo se llevaron a cabo experimentos para determinar qué tipo de asociación presentaban los péptidos DVL/RTFL con la membrana plasmática (Primo, 2013). Más concretamente, se llevó a cabo un primer ensayo de extracción alcalina de proteínas de membrana para lo cual el péptido DVL11, fusionado a un fragmento soluble de la proteína Lep (*Leader Peptidase*, explicado más adelante) que permitiría, entre otras cosas, detectarla, se incubó junto con membranas microsomales y posteriormente se realizó una extracción alcalina en presencia o no de diferentes agentes detergentes (Bañó-Polo et al., 2011). Este experimento mostró como el péptido DVL11 no se trataba de una proteína claramente integral de membrana ni estaba unida covalentemente a ésta, sino que DVL11 podría encontrarse parcialmente unido a la membrana plasmática o tener afinidad hacia algún elemento de ésta (Primo, 2013).

Tras esto, se realizó un segundo ensayo complementario para conocer de qué manera estaba orientado el péptido en la membrana. Para ello se llevó a cabo una prueba de inserción de la región con tendencia hidrofóbica del péptido DVL11 empleando el sistema Lep que se muestra en la **Figura 37A** y que permitiría conocer si el fragmento de interés se insertaba en la membrana o se translocaba cuando se expresa en un sistema *in vitro* de lisados de reticulocitos de conejo. Este sistema utiliza la proteína Lep que tiene dos segmentos hidrofóbicos transmembrana (H1 y H2) tras los cuales, en el extremo C-terminal, se fusiona el segmento que se va a probar flanqueado por dos dianas de glicosilación situadas a distancias adecuadas respecto a la bicapa lipídica de manera que la ubicación del segmento fusionado se refleja en el

estado de glicosilación de estas dianas. Así, si el segmento a testear se inserta en la membrana, una diana de glicosilación estará situada en la luz del lumen y la otra estará fuera, en el citoplasma. Por otra parte, si se transloca, ambas dianas de glicosilación se encontrarán en el lumen y la enzima oligosacárido transferasa (OST) presente en el sistema se encargará de glicosilarlas (Bañó-Polo et al., 2011).

El resultado de este experimento determinó que el fragmento hidrofóbico de DVL11 no se integraba en la membrana y, aunque parecía sugerir que se translocaba, no descartaba que pudiera estar parcialmente unido a ella o tener una gran afinidad hacia algún elemento de la membrana (**Figura 37B**) (Primo, 2013).

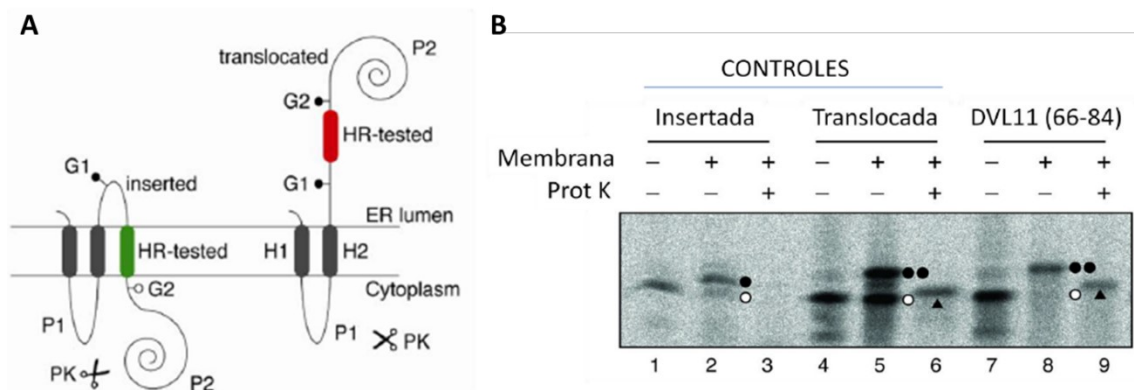


Figura 37. Ensayos de topología de membrana del péptido DVL11 en un sistema *Lep in vitro*. A) Modelo de la proteína Lep. Las barras en color gris (H1 y H2) son los fragmentos nativos transmembrana Lep. La barra coloreada es el segmento DVL11 hidrofóbico a investigar. G1 y G2 son los sitios de glicosilación. Las dianas de glicosilación no glicosiladas se muestran como un círculo blanco (○) y los sitios glicosilados se muestran como un círculo negro (●). Las tijeras representan la acción de la Proteínasa K (PK). P1 y P2 son los fragmentos de la proteína Lep que no se insertan en la membrana (Bañó-Polo et al., 2011). B) Ensayo de inserción. La carrera 1, 2 y 3 muestran una proteína que se inserta en membrana a modo de control, las carreras 4, 5 y 6 muestran un ejemplo de proteína translocada y las carreras 7, 8 y 9 son los aminoácidos con tendencia hidrofóbica del péptido DVL11. Prot K: es el ensayo en presencia o ausencia de Proteínasa K. Los círculos negros (●) indican la glicosilación de alguna de las dianas. Los círculos blancos (○) indican las dianas de glicosilación que no han sido glicosiladas. Una proteína insertada se reflejaría como 1 sola diana glicosilada (●○) y una proteína translocada se reflejaría como 2 dianas glicosiladas (●●). Imagen modificada de Primo, 2013.

Así, y para dilucidar el mecanismo de acción de los péptidos DVL/RTFL y su función, era interesante conocer el modo de interacción preciso de los péptidos con la membrana plasmática, y en el caso de que su interacción fuese a través de otra proteína, la identificación de esta sería un aspecto fundamental para la continuación de este trabajo.

Por este motivo, se quiso identificar posibles proteínas con las que los péptidos DVL/RTFL interaccionasen físicamente y para ello Priscilla Rossetto llevó a cabo en el laboratorio un ensayo de doble híbrido de levadura, rastreando frente una genoteca normalizada de cDNA de inflorescencias de *Arabidopsis* (cedida por Simona Masiero, Universidad de Milán). Así, se identificaron varios posibles interactores para DVL1 y DVL11, péptidos con los que se llevó a

cabo este ensayo, y se seleccionaron aquellas proteínas candidatas prometedoras, bien porque habían aparecido más de una vez en el escrutinio o porque pertenecían a distintas clases funcionales relacionadas en general con la regulación de la división y elongación celular, y el tráfico intra e intercelular, sugeridas como potencialmente relevantes por los estudios funcionales con ROT4 y la naturaleza de péptido pequeño asociado a membrana de los miembros de la familia DVL/RTFL (Tabla 4 y Tabla 5).

Tabla 4. Posibles interactores de DVL1 identificados en el rastreo de doble híbrido levadura. Se indica el ID y nombre del gen identificado, número de clones o veces que ha aparecido, el tamaño del gen, el tamaño de secuencia alineada para identificar ese gen (Alin.), la identidad del alineamiento de secuencias (Ident.) y el tipo de proteína que codifica ese gen.

ID	Nombre	Nº clon	Tamaño gen	Alin.	Ident.	Tipo de proteína
AT4G29670	ACHT2	1	1644	308	100	Tiorredoxina
		2	1644	311	100	
AT5G22060	ATJ2	1	2176	554	100	Co-chaperonina
AT3G06350	MEE32	1	3450	641	100	Enzima bifuncional deshidroquinato-shikimato deshidrogenasa
AT3G09840	CDC48, CDC48A	1	3713	769	99	ATPasa de tipo AAA
		2	3713	748	99	
AT5G25980	BGLU37	1	2964	375	100	Mirosinasa (tioglucósido glucohidrolasa)
AT3G06980		1	3367	825	100	DEA(D/H)-box RNA helicasa
		2	3367	774	100	
AT1G06680	PSBP-1, PSII-P	1	1683	262	100	Proteína extrínseca de 23 kD parte del fotosistema II
AT3G54030	BSK6	1	2767	681	100	Proteína quinasa con dominio repetido tetratricopeptido
AT5G19530	ACL5	1	2254	162	95	Espermina sintasa
AT3G07820		1	1656	637	99	Proteína tipo pectina liasa
AT4G35490	MRPL11	1	773	373	100	Proteína mitocondrial ribosomal L11
AT1G16280	RNAHELI CASE 36	1	2006	306	100	Supuesta DEAD-box RNA helicasa
AT5G48570	FKBP65, ROF2	1	3304	1789	100	Proteína <i>carboxylate clamp</i> (CC) - dominio tetratricopeptido repetido (TPR)
AT3G16860	COBL8	1	2861	440	100	Proteína tipo COBRA
AT1G51680	AT4CL1	1	2801	458	99	Isoforma de 4-coumarato: CoA ligasa
AT3G21055	PSBTN	1	552	340	100	Subunidad de 5 kD del fotosistema II
AT1G09070	SRC2	1	1266	761	99	Proteína de unión al péptido PIEPPPHH
		2	1266	163	99	
AT2G20550		1	1508	604	99	Proteína de unión a péptido HSP40/DnaJ
AT2G20890	THF1	1	1751	269	100	Proteína del centro de reacción del fotosistema II
AT5G50020		1	3158	773	100	Proteína tipo DHHC dedo de zinc
		2	3158	694	100	

		3	3158	243	100	
AT3G16630	KINESIN-13A	1	5420	727	99	Kinesina

Tabla 5. Posibles interactores de DVL11 identificados en el rastreo de doble híbrido levadura. Se indica el ID y nombre del gen identificado, número de clones o veces que ha aparecido, el tamaño del gen, el tamaño de secuencia alineada para identificar ese gen (Alin.), la identidad del alineamiento de secuencias (Ident.) y el tipo de proteína que codifica ese gen.

ID	Nombre	Nº clon	Tamaño gen	Alin.	Ident.	Tipo de proteína
AT5G13650	SVR3	1	4945	302	100	GTPasa TypA de elongación de la traducción
AT3G12587		1	1173	386	99	Oligosacariltransferasa
AT5G15090	VDAC3	1	2200	702	99	Canal de aniones dependiente de voltaje
AT4G05050	UBQ11	1	1383	269	100	Poliubiquitina
AT5G16023	DVL1	1	156	106	85	Familia DVL/RTFL
AT3G63150	MIRO2	1	3921	127	94	GTPasa de unión a calcio
AT4G05320	UBQ10	1	2139	305	100	Ubiquitina altamente conservada
AT2G20990	SYT1, SYTA	1	3485	41	100	Similar a sinaptotagminas
AT5G61790	CNX1	1	2690	510	99	Unión a proteínas desplegada y a iones de calcio
		2	2690	510	99	
AT5G55220		1	3227	563	99	Miembro de la familia chaperonas tipo factor desencadenante
AT5G42780	HB27	1	982	421	99	Proteína homeobox 27
AT1G48650		1	5929	827	100	Miembro de la familia DEA(D/H)-box RNA helicasa
AT1G54050		1	860	153	100	Miembro de la superfamilia HSP20-like chaperonas
AT4G02060	PROLIFERA	1	4203	363	99	Miembro del complejo de mantenimiento de minicromosomas

2.1 Caracterización del tipo de asociación de los péptidos DVL/RTFL con la membrana plasmática.

Debido a que los estudios previos de topología de membrana llevados a cabo en el laboratorio, además de estar realizados en un sistema *in vitro* de membranas microsomales, no dejaban claro el tipo de asociación del péptido DVL11 con la membrana plasmática, se decidió repetir dichos estudios con un sistema *in vivo* y más actualizado.

Para ello, el primer paso fue elegir los péptidos DVL que se iban a testear, así como predecir la estructura hidrofóbica de los mismos, y por tanto su posible capacidad para insertarse en la membrana plasmática. Los péptidos elegidos fueron DVL1 y DVL11 puesto que eran los que habían sido utilizados en el ensayo de doble híbrido de levadura con el fin de

determinar las posibles interacciones de estos péptidos con otras proteínas y, además, DVL11 ya había sido utilizado para los estudios de topología previos. Además, a nivel de secuencia, más de la mitad del péptido DVL1 se compone del dominio DVL/RTFL conservado en toda la familia (87 pb de 156 pb de CDS), mientras que el péptido DVL11, aparte del dominio conservado DVL/RTFL en la parte C-terminal, contiene una secuencia N-terminal de unos 53 aminoácidos.

Tras elegir los péptidos candidatos para el ensayo, se predijo la estructura de los péptidos para buscar la región hidrofóbica con tendencia a integrarse en la membrana empleando la base de datos PDBTM: *Protein Data Bank of Transmembrane Proteins* (<http://pdbtm.enzim.hu>). Como puede observarse en la **Figura 38**, el programa solo fue capaz de predecir correctamente el motivo conservado (resaltado en amarillo), el resto de la proteína no pudo ser plegada lo que puede deberse a que son secuencias que no contienen motivos estructurales conocidos. En ambos casos, se trata de hélices separadas por un enlace peptídico entre dos residuos cargados contiguos (resaltado en azul), según la predicción realizada por la base de datos. Este enlace podría explicar en parte por qué estos péptidos no se deberían insertar en la membrana, puesto que la mayoría de herramientas de predicción de topología de membrana modernas consideran que la presencia de aminoácidos cargados supone una penalización en la energía libre prevista de la inserción (Duart et al., 2022). Sin embargo, solo viendo esta predicción de estructura no estaba claro el tipo de relación que podrían tener el péptido DVL1 y DVL11 con la membrana plasmática.

En el trabajo previo realizado por Primo, 2013, empleando una herramienta de predicción menos actualizada, identificaron una región con cierta probabilidad de integrarse en membrana y que se encontraba en el dominio conservado del extremo C-terminal del péptido DVL11 tratándose de 19 aminoácidos predominantemente hidrofóbicos. De esta manera y puesto que los péptidos DVL no parecían tener una región hidrofóbica clara según la predicción de su estructura proteica llevada a cabo en este trabajo, se decidió clonar tanto los péptidos completos como las regiones conservadas del dominio DVL/RTFL de cada uno de ellos y determinar si la secuencia no conservada o la conservada podrían tener un papel en la asociación con la membrana plasmática de manera individualizada.

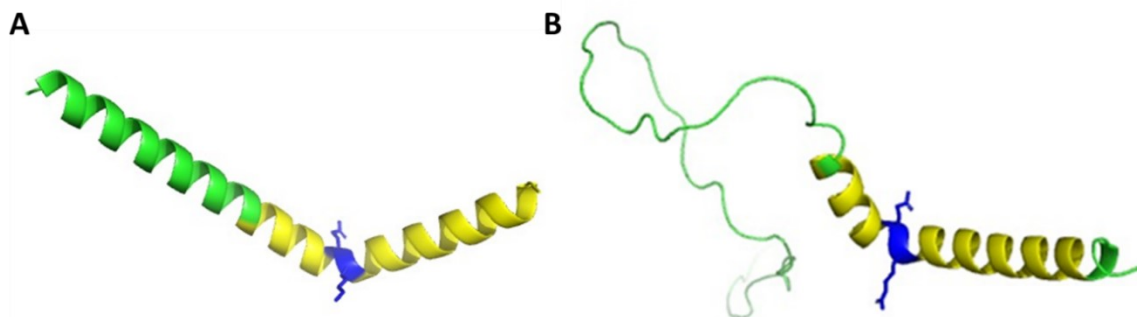


Figura 38. Predicción de la estructura de los péptidos DVL1 y DVL11. A) Estructura predicha del péptido DVL1. B) Estructura predicha del péptido DVL11. El dominio conservado DVL/RTFL se muestra en amarillo. Marcado en azul se muestra un enlace formado por residuos cargados contiguos. La predicción de estructura se ha realizado con la base de datos PDBTM: *Protein Data Bank of Transmembrane Proteins* (<http://pdbtm.enzim.hu>).

El siguiente paso fue clonar las secuencias completas y dominios conservados de los péptidos DVL1 y DVL11 en el plásmido C_LTM (facilitado por Ismael Mingarro, Universidad de Valencia; Duarte et al., 2022). Este plásmido C_LTM se trata de una construcción reportera que permite evaluar la capacidad de inserción de cierta secuencia de interés en la membrana del retículo endoplasmático. Así, se dispondría de un sistema reportero basado en glicosilaciones que permite conocer si la secuencia de interés se encuentra insertada en la membrana, siendo un sistema actualizado del Lep empleado por Primo, 2013 (**Figura 37**). El plásmido C_LTM está compuesto por la supuesta secuencia transmembrana (TM) de interés a testear fusionada a un dominio conservado y bien plegado de la cadena ligera del anticuerpo λ, C_L, a través de un enlace flexible (Feige and Hendershot, 2013). Como ya se ha mencionado, se trata de un sistema reportero basado en glicosilaciones al que, aparte del sitio de glicosilación Asn-Val-Thr (NVT) (G2) situado en la parte C-terminal tras la secuencia TM que posee el sistema original, se ha añadido un sitio de glicosilación extra dentro de la secuencia C_L (G1) (**Figura 39**, Duarte et al., 2022).

De esta manera, el sitio G1 siempre será glicosilado por parte de la enzima oligosacárido transferasa (OST) del lumen del retículo endoplasmático debido a la actividad nativa de translocación de la cadena ligera de anticuerpo λ. Sin embargo, el sitio de glicosilación G2 solo será glicosilado en el caso de que la secuencia TM a testear atraviese la membrana del retículo endoplasmático (**Figura 39**, Duarte et al., 2022). La OST reconoce la secuencia de aminoácidos NVT y modifica el residuo de asparagina (N). Esta glicosilación incrementa la masa molecular de la proteína alrededor de 2 kDa por cada glicosilación que añade la OST. Así se trata de un sistema similar al Lep empleado con anterioridad, en cuanto a que se encontraban uno o dos sitios glicosilados según si la secuencia a testear era transmembrana o se translocaba.

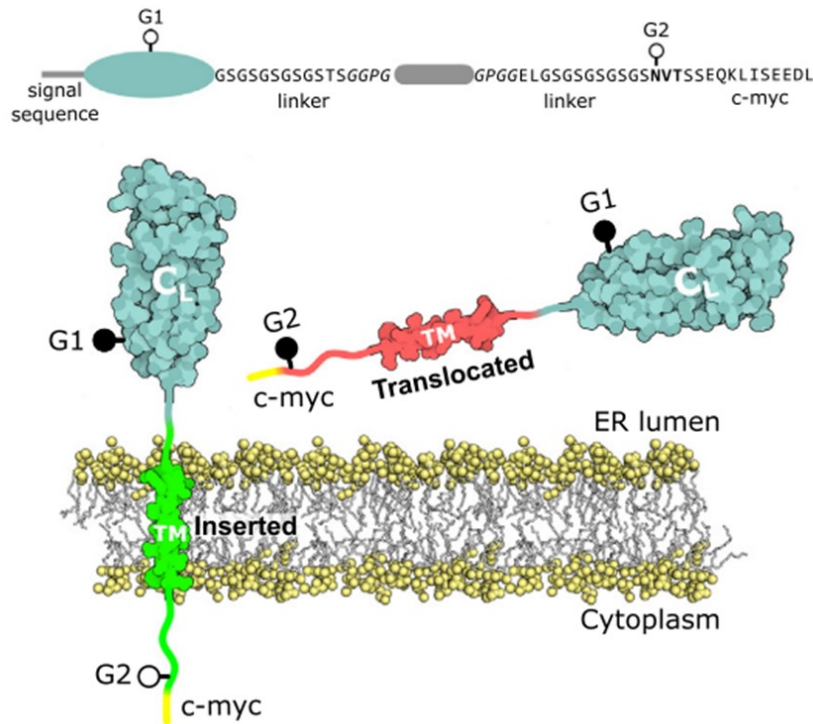


Figura 39. Esquema de la construcción C_L TM empleada. En la parte superior se muestra cómo se compone de un dominio de la cadena ligera (C_L) del anticuerpo λ que contiene un sitio de glicosilación (G1) conectada con regiones flexibles a la secuencia transmembrana a analizar (TM) y seguida, tras otra región flexible, de un sitio de glicosilación (G2) en la parte C-terminal y una etiqueta c-myc. En la parte inferior se muestra el esquema que representa las características principales del ensayo de inserción C_L TM, los puntos negros (●) representan sitios glicosilados mientras que los puntos blancos (○) representan sitios no glicosilados (Duart et al., 2022).

Una vez generadas y comprobadas las construcciones, éstas se transfectaron en un sistema *in vivo* de células eucariotas de riñón humano HEK-293T (apartado 1.3.1 de Materiales y Métodos). De esta manera, y a diferencia del sistema *in vitro* de membranas microsomales aisladas empleado anteriormente, se podría tener un contexto completo de la célula a la hora de expresar y traducir nuestras construcciones, lo que supone una ventaja frente al sistema Lep empleado por Primo, 2013. Aunque no se trata de un sistema vegetal sino animal, el hecho de que sean células eucariotas permite extrapolar los datos al ser el mismo tipo de membranas que las de las células vegetales.

24 horas post-transfección se recolectaron y lisaron las células con el fin de extraer las proteínas marcadas con uno o dos sitios reporteros glicosilados por parte de la actividad OST endógena de las propias células. El estado de glicosilación de los diferentes péptidos y regiones conservadas se analizó mediante una electroforesis de proteínas seguida de un Western Blot empleando un anticuerpo anti-c-myc. Puesto que en el lisado obtenido habría más proteínas presentes, en el plásmido C_L TM también se encontraba una etiqueta c-myc (Figura 39) que permitía localizar la secuencia proteica a testear. Adicionalmente, se llevó a cabo un tratamiento

de una pequeña parte del lisado de proteínas con la enzima Endoglicosidasa H (EndoH) puesto que deglicosila las glicoproteínas y permite emplearlo como control de ninguna glicosilación presente.

Así, en el gel de proteínas se cargaron las muestras de los experimentos correspondientes a cada una de las construcciones de los péptidos DVL1 y DVL11 completos (FL – *full length*), así como las de los dominios conservados correspondientes (CD – *conserved domain*) y los controles de cero glicosilaciones tratados con EndoH. De esta manera nos encontraríamos siempre una banda en el control EndoH que marca el tamaño del fragmento testeado sin glicosilaciones, seguido de la muestra sin tratar en la que se mostrarían una o dos glicosilaciones, detectándose como una banda de aproximadamente 2 kDa o 4 kDa mayor a la de la proteína sin glicosilar según esté insertada o se transloque en la membrana, respectivamente.

Tal y como se observa en el recuadro inferior de la **Figura 40**, los resultados obtenidos mostraron en la carrera 2 la doble glicosilación que sufría el péptido DVL1 completo (DVL1 FL) y en la carrera 4 lo mismo ocurría con su dominio conservado (DVL1 CD) en comparación con el control EndoH, puesto que la banda que aparecía era aproximadamente 4 kDa mayor que la del control. También en el caso del péptido DVL11 se observó el mismo patrón de doble glicosilación de la proteína completa (DVL11 FL, carrera 6) y el dominio conservado (DVL11 CD, carrera 8). Estos resultados indicaban que ambos péptidos atravesaban la membrana y, por tanto, no se insertaban en ella.

Adicionalmente, en estos resultados se pudo observar que los péptidos testeados formaban dímeros con ellos mismos (homodímeros), puesto que el patrón de glicosilación se observaba también en la parte superior del Western Blot, con bandas correspondientes a un tamaño doble del de los monómeros (**Figura 40**). La formación de homodímeros era más evidente cuando se analizaba sólo el dominio conservado que en el caso de los péptidos DVL completos, lo que podría sugerir que este dominio podría ser el implicado en el proceso de homodimerización. También podía observarse una correlación de tamaños entre las proteínas detectadas y los tamaños predichos de las mismas en base a su secuencia, siendo mayor en el caso de DVL11 con respecto a DVL1 y en el caso del péptido completo con respecto al dominio conservado aislado.

Los resultados obtenidos en este ensayo de topología de membrana concordaban con los datos obtenidos con anterioridad (Primo, 2013), confirmando que se trataba de proteínas periféricas de membrana, pero no añadían nueva información, al margen de la detección de la

formación de homodímeros y no permitían saber cómo estos péptidos realmente se asocian a la membrana tal y como se había sugerido previamente (Narita et al., 2004; Ikeuchi et al., 2011).

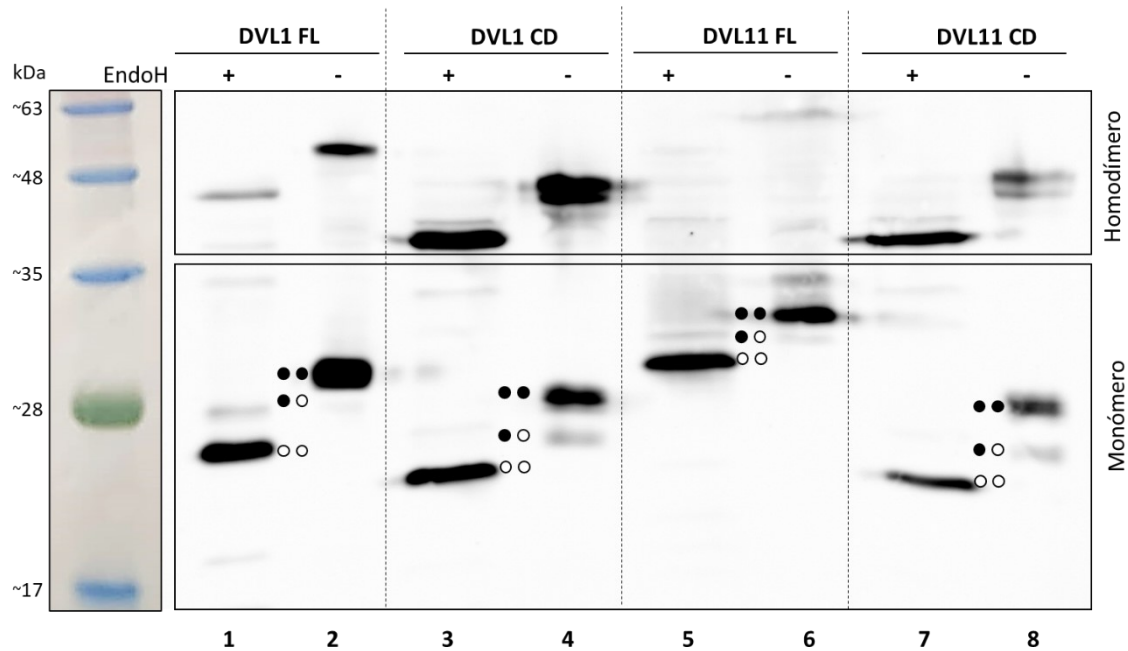


Figura 40. Ensayo de inserción de los péptidos DVL1 y DVL11 en la membrana. Western Blot representativo de células HEK-293T transfectadas con las construcciones indicadas y los lisados de células se inmunoprecipitaron con antisuero anti-c-myc en presencia (+) o ausencia (-) de EndoH. Las proteínas no glicosiladas se indican con dos puntos blancos (○○), glicosilaciones únicas con un punto blanco y uno negro (●○), y las dobles glicosilaciones están indicadas con dos puntos negros (●●). En la carrera 1 y 2 se muestra el péptido DVL1 completo (FL – *full length*), en la carrera 3 y 4 el dominio conservado (CD – *conserved domain*) de DVL1, en la carrera 5 y 6 se muestra el péptido DVL11 completo (FL) y en la carrera 7 y 8 el dominio conservado (CD) de DVL11.

Por esta razón y para determinar si los péptidos DVL pudiesen estar en contacto directo o asociados de un modo más lábil a la interfase de la membrana, se decidió modificar el plásmido C_LTM, añadiéndole un tercer sitio de glicosilación (un residuo Asn, N) muy próximo a la secuencia transmembrana (TM) (**Figura 41**). De esta manera, si el péptido DVL o el dominio conservado se encontrase asociado a la interfase de la membrana podría ocurrir que ambos sitios de glicosilación reporteros originales sufrieran dicha modificación puesto que estrictamente no se insertan en la membrana y existe un espaciador que separa la secuencia TM de los sitios y que permitiría el acceso de la enzima OST, a pesar de su proximidad con la membrana. Sin embargo, al añadir un sitio reportero adicional más pegado a la secuencia TM a testear, no sería posible su glicosilación por su proximidad a la membrana. Por tanto, si los péptidos se asociasen a la interfase de la membrana nos encontraríamos ante un patrón de doble glicosilación frente al triple patrón de glicosilación que aparecería en el caso de que los péptidos se transloquen y no estén en contacto con la interfase de la membrana plasmática.



Figura 41. Esquema de la construcción C_LTM con un residuo de glicosilación adicional. Se compone de un dominio de la cadena ligera (C_L) del anticuerpo λ que contiene un sitio de glicosilación (G1) conectada con regiones flexibles a la secuencia a analizar (TM), seguida inmediatamente de un sitio extra de glicosilación añadido (G3- en rojo) y después de otro sitio de glicosilación (G2) en la parte C-terminal y una etiqueta c-myc. Modificado de Duart et al., 2022.

Añadiendo mediante una mutagénesis dirigida del plásmido C_LTM los 3 nucleótidos correspondientes al residuo de glicosilación (Asn, N), se modificaron las construcciones ya disponibles que contenían los péptidos DVL1 y DVL11 completos, así como las de sus dominios conservados. Tal y como se había hecho en el ensayo anterior, se transfectaron células HEK-293T y tras una expresión de 24 h se recolectaron y lisaron y se llevó a cabo el Western blot para detectar los residuos reporteros glicosilados.

Tal y como se observa en la **Figura 42**, los resultados fueron muy similares a los obtenidos con la construcción C_LTM original. En la parte inferior se muestra, a la izquierda de cada muestra, el control tratado con EndoH que marcaba las cero glicosilaciones, y a la derecha la banda que indicaba una doble glicosilación pues tiene un tamaño de aproximadamente 4 kDa mayor con respecto al control. Además, no parecía detectarse ninguna banda que pudiera atribuirse a una tercera glicosilación, pero sí las bandas correspondientes a la formación de homodímeros de los péptidos DVL1 y DVL11, así como de sus dominios conservados.

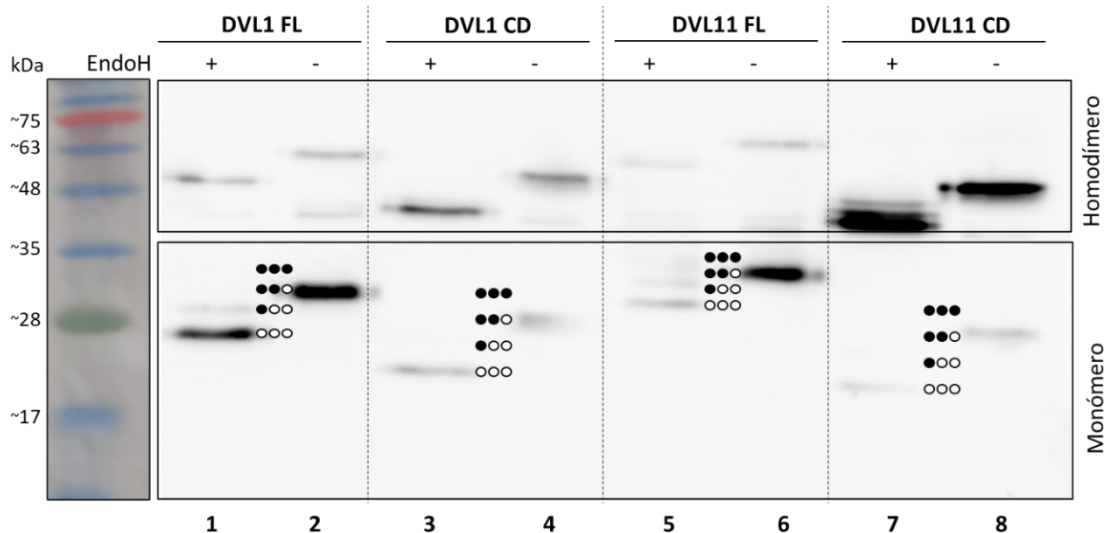


Figura 42. Ensayo de inserción de los péptidos DVL1 y DVL11 en la membrana con un tercer sitio de glicosilación adicional. Western Blot de células HEK-293T transfectadas con las construcciones indicadas, y los lisados de células se inmunoprecipitaron con antisuero anti-c-myc en presencia (+) o ausencia (-) de EndoH. Las proteínas no glicosiladas se indican con tres puntos blancos (ooo), glicosilaciones únicas con dos puntos blancos y uno negro (•oo), las dobles glicosilaciones están indicadas con un punto blanco y dos negros (••o) y las triples glicosiladas con tres puntos negros (•••). En la carrera 1 y 2 se muestra el péptido DVL1 completo (FL), en la carrera 3 y 4 el dominio conservado (CD) de DVL1, en la carrera 5 y 6 se muestra el péptido DVL11 completo (FL) y en la carrera 7 y 8 el dominio conservado (CD) de DVL11.

Con estos resultados se pudo concluir que los péptidos DVL/RTFL se asociaban a la membrana plasmática sin llegar a estar integrados en ésta, confirmando la localización subcelular de los mismos en el contexto celular, y sugiriendo que su asociación podría ser íntima, quizá en contacto directo con la interfase lipídica, siendo proteínas periféricas de membrana. Aun así, el mecanismo de asociación preciso sigue siendo desconocido y no se puede descartar que precise de su interacción con otras proteínas, que además podrían ser importantes para su función. Por ello, identificar los posibles interactores de estos péptidos DVL/RTFL sería muy interesante para comprender su mecanismo de acción.

2.2 Confirmación *in vivo* de las interacciones proteína-proteína observadas

Como ya se ha indicado, la necesidad de conocer las posibles proteínas con las que los péptidos DVL/RTFL pueden interactuar físicamente llevó a realizar en el laboratorio el escrutinio de una genoteca mediante ensayos de doble híbrido anteriormente citado. De todos estos posibles candidatos identificados (**Tabla 4 y Tabla 5**) se hizo una selección más restrictiva, escogiendo aquellos que habían aparecido varias veces en el escrutinio o que tenían relación con procesos de tráfico intra e intercelular, división y elongación celular, puesto que se relacionaba a los genes *DVL/RTFL* con estas funciones (**Tabla 6 y Tabla 7**).

Tabla 6. Posibles interactores de DVL1 seleccionados del rastreo de doble híbrido levadura para confirmar la interacción *in vivo*. Se indica el ID, nombre y tamaño de la CDS del gen, el lugar donde se expresa dentro de la planta y anotaciones adicionales.

ID	Nombre	Tamaño gen	Expresión	Anotación
AT3G54030	BSK6	1473	Filamentos de anteras, silicuas y raíz	Serina-proteína quinasa con motivos repetidos de tetratricopéptidos. Se localiza en membrana plasmática Regulador positivo de la señalización por brasinosteroides aguas abajo de BRI1
AT3G07820		1176	Anteras de flor abiertas, con polen. Pecíolo y vena de la hoja.	Pectina-liasa con actividad poligalacturonasa. Secretada, se localiza en pared celular. Se expresa bajo condiciones de estrés hipóxico
AT1G09070	SRC2	976	Anteras de flor abiertas, con polen y órganos senescentes	Se une específicamente al péptido PIEPPPHH y se mueve del retículo endoplasmático a la fracción vacuolar donde se internaliza. Se localiza en membrana plasmática. Inducido en estrés por frío.
AT2G20550		855	Meristemo y primer internodo elongado	Proteína de unión a péptido HSP40/DnaJ. Involucrado en el plegamiento de proteínas
AT3G16860	COBL8	1962	Órganos senescentes y polen maduro	COBRA-like protein 8. Se localiza en la membrana plasmática, anclada por GPI (glicosil-fosfatidil-inositol)

AT3G09840	CDC48, CDC48A	2430	Anteras de flor abiertas, con polen. Pecíolo y vena de la hoja.	Proteína del ciclo de división celular, miembro de la familia ATPasas de tipo AAA. Expresado en regiones de división celular. Mutantes con defectos en división, expansión y diferenciación celular.
AT3G06980		2346	Cotiledones, hojas y sépalos	Miembro de la familia DEA(D/H)-box RNA helicasa. Participa en el procesamiento del mRNA y regulación de la expresión génica. Se localiza en cloroplastos
AT3G16630	KINESIN-13A	2385	Anteras pre-antesis	Quinesina. Modula la síntesis de la pared celular y la expansión celular. Despolimeriza microtúbulos.

Tabla 7. Posibles interactores de DVL11 seleccionados del rastreo de doble híbrido levadura para confirmar la interacción *in vivo*. Se indica el ID, nombre y tamaño de la CDS del gen, el lugar donde se expresa dentro de la planta y anotaciones adicionales.

ID	Nombre	Tamaño gen	Expresión	Anotación
AT5G16023	DVL1	156	Semilla y órganos senescentes	Miembro de la familia <i>DVL/RTFL</i>
AT5G15090	VDAC3	825	Semilla, plántula y meristemo	Codifica un canal de aniones dependiente de voltaje
AT4G05320	UBQ10	1374	Anteras de flores abiertas con polen y órganos senescentes	Ubiquitina altamente conservada que se une covalentemente a sustratos de proteínas para dirigir su degradación
AT2G20990	SYT1, SYTA	1740	Generalizado	Proteína localizada en la membrana plasmática similar a sinaptotagminas, proteína de tráfico de membrana
AT4G02060	PROLIFERA	2151	Meristemo, flor y semilla	Miembro del complejo de mantenimiento de minicromosomas., involucrado en el inicio de la replicación del DNA

Puesto que los rastreos de doble híbrido se realizan empleando un sistema heterólogo de células de levadura en el que las proteínas pueden estar sujetas a modificaciones postraduccionales diferentes a las que tienen lugar en el contexto de la célula vegetal, y pudiendo así afectar a su plegamiento y capacidad de interacción, alguna de las interacciones observadas podrían no tener lugar en la planta. Por dicha razón, se decidió llevar a cabo un análisis de las interacciones observadas en el ensayo con levaduras en un sistema *in planta*. Para ello se empleó el sistema de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC) de expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* (Belda-Palazón et al., 2012). Este ensayo se basa en la división de una proteína fluorescente en dos mitades que de forma espontánea son incapaces de interactuar entre ellas y recuperar la fluorescencia. De tal manera, cuando estas mitades se fusionan a dos proteínas que sí son capaces de interactuar, ambas partes de la proteína fluorescente quedan lo suficientemente cerca para que se

reconstituya una nueva proteína fluorescente con propiedades de fluorescencia iguales que las de la proteína inicial.

Con el fin de llevar a cabo este ensayo, se generaron construcciones en las que las regiones codificantes de DVL1 y DVL11 se fusionaron a la mitad de la proteína fluorescente amarilla (YFP), la región N-terminal en el caso de DVL1 y la C-terminal en el caso de DVL11. Por otro lado, las regiones codificantes de los posibles interactores se fusionaron a la otra mitad de la YFP: BSK6, AT3G07820, SRC2, AT2G20550, COBL8, CDC48, AT3G06980 y AT3G16630 a la región C-terminal; y VDAC3, UBIQUITINA, SYT1 y PROLIFERA a la N-terminal.

Tras esto, las diferentes combinaciones DVL1_pYFP^N + sus interactores en pYFC43 y DVL11_pYFP^C + sus interactores en pYFN43, se agroinfiltraron en hojas de *Nicotiana benthamiana* y, tres días tras la infiltración, se analizó la fluorescencia de las hojas agroinfiltradas en el microscopio confocal. Se incluyó como control positivo la interacción nuclear ya descrita de las proteínas APETALA3 (AP3) Y PISTILLATA (PI) (McGonigle et al., 1996), y como control negativo se incluyó la interacción entre AGAMOUS (AG) y SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1), factores de transcripción tipo MADS cuya interacción se ha probado que no ocurre *in vivo* (De Folter et al., 2005).

En el ensayo correspondiente entre DVL1 y sus posibles interactores, tal y como puede observarse en la **Figura 43**, a excepción de las interacciones DVL1-COBL8 y DVL1- AT3G06980 cuya complementación de la fluorescencia no parecía muy clara y la interacción DVL1-AT2G20550, en la que se detecta señal, pero sin distinguir claramente la localización subcelular de la misma, el resto de las interacciones tenían lugar de manera inequívoca en la membrana plasmática de las células. Estos resultados eran esperados pues concordaban con los estudios de inserción de membrana descritos en el apartado de resultados anterior, así como con la bibliografía previa disponible (Narita et al., 2004; Ikeuchi et al., 2011), en los cuales se localizaba a los péptidos DVL/RTFL en la membrana plasmática. Así mismo, en alguna de estas interacciones confirmadas *in vivo*, la complementación parecía mucho más fuerte que otras puesto que la intensidad de la fluorescencia era mayor, siendo el caso de la interacción DVL1-CDC48. También, pudo observarse cierta señal fuera de la membrana plasmática en alguna de las interacciones como es el caso de las interacciones DVL1-SCR2 y DVL1-CDC48 en la que parecía verse cierta fluorescencia en lo que serían los núcleos de la célula. Por tanto, sería interesante el uso, en futuros experimentos, de reporteros de estructuras intercelulares como pueden ser marcadores de núcleo, cloroplasto, espacio extracelular o de la propia membrana para determinar de modo más preciso el lugar de interacción.

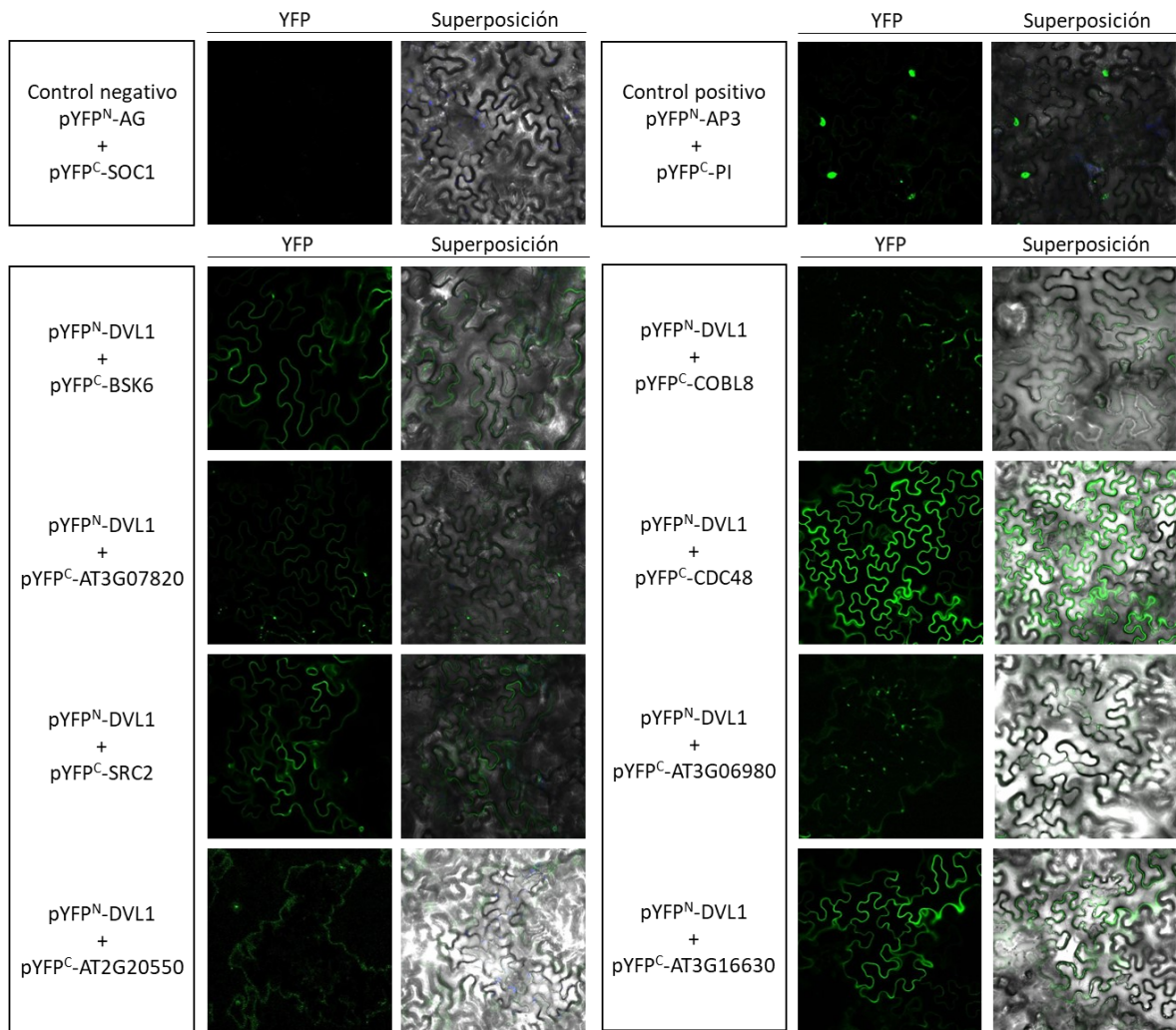


Figura 43. Análisis de la interacción entre el péptido DVL1 y sus interactores candidatos mediante ensayo de BiFC. Imágenes de microscopía confocal de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda de la figura. Aparece una imagen de la fluorescencia de la proteína YFP (izquierda) y una de la superposición de la señal fluorescente y la imagen en campo claro de la epidermis de las hojas (derecha). Se incluyen las imágenes correspondientes del control negativo AG-SOC1 y el control positivo AP3-PI.

En el caso del ensayo con DVL11, el primer hecho a destacar antes de observar las interacciones fue que uno de los posibles candidatos como interactores era el péptido DVL1. Este aspecto no era de extrañar pues ya se había demostrado la capacidad de los péptidos DVL1 y DVL11 para formar homodímeros y que además esta capacidad de homodimerización parecía más fuerte en el caso del dominio conservado aislado (**Figura 40 y Figura 42**). Así, y puesto que el dominio conservado DVL/RTFL es común a todos los péptidos de la familia, no resulta extraño que se dé una interacción entre diferentes miembros de la familia.

Cuando comprobamos las interacciones entre DVL11 y sus posibles interactores, la complementación de la fluorescencia observada en el caso de DVL11-DVL1 daba lugar a una señal muy intensa en la membrana plasmática, confirmando así tanto la localización subcelular

como la capacidad de los péptidos DVL/RTFL o al menos de DVL1 y DVL11 para formar dímeros. Aunque el resto de las interacciones no tenían la misma intensidad de señal que la anterior, sí se observó fluorescencia en el caso de las interacciones DVL11-VDAC3, DVL11-UBQ10 y DVL11-PROLIFERA, tanto en la membrana plasmática, lo que era de esperar, como en el núcleo de algunas células, así como en lo que parecían cloroplastos cuya autofluorescencia ya se observaba en el control negativo. Por su parte, no se observó señal en el caso de la combinación DVL11-SYT1 (**Figura 44**).

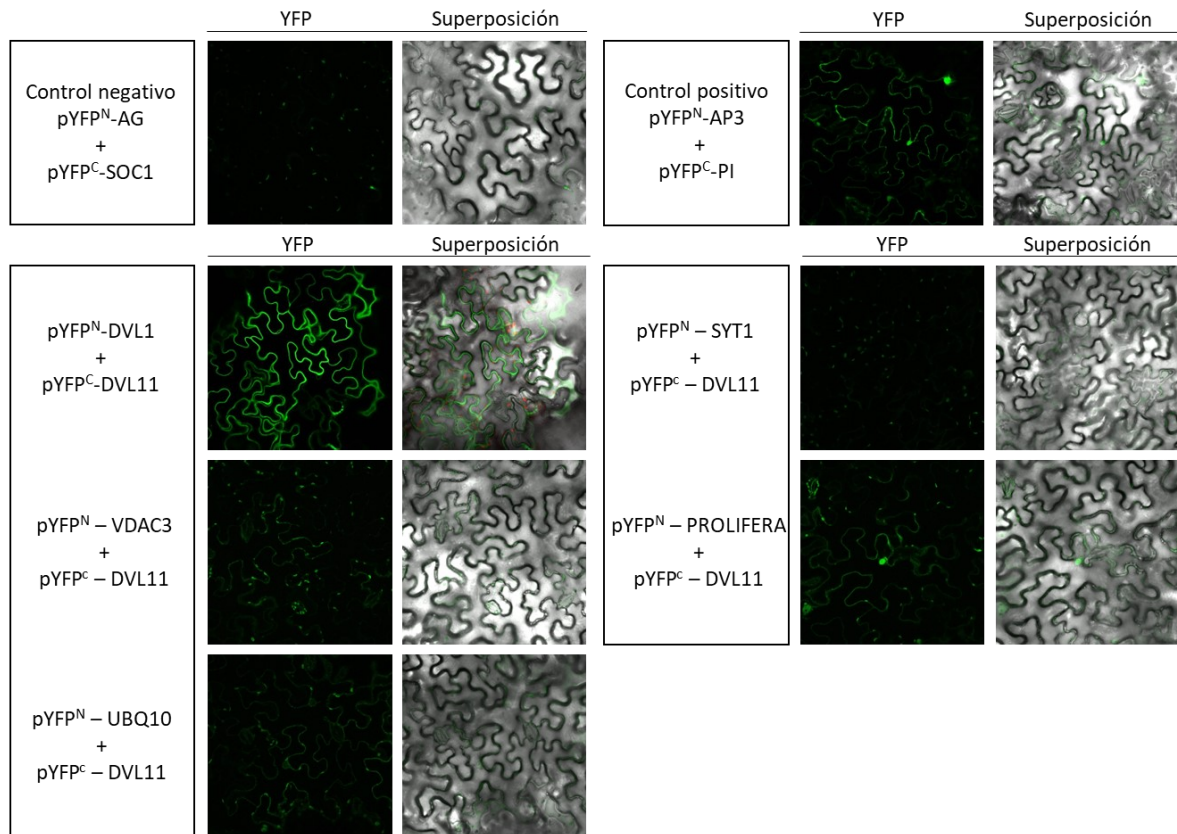


Figura 44. Análisis de la interacción entre el péptido DVL11 y sus interactores candidatos mediante ensayo de BiFC. Imágenes de microscopía confocal de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda de la figura. Aparece una imagen de la fluorescencia de la proteína YFP (izquierda) y una de la superposición de la señal fluorescente y la imagen en campo claro de la epidermis de las hojas (derecha). Se incluyen las imágenes correspondientes del control negativo AG-SOC1 y el control positivo AP3-PI.

2.3 Caracterización de la relevancia funcional de la interacción DVL1-CDC48 observada

Una vez identificadas aquellas proteínas que podrían interactuar de manera directa con DVL1 y DVL11 y que quizá pudiesen estar participando en el mecanismo de acción de los péptidos DVL/RTFL en la planta, se decidió profundizar un poco más para intentar determinar la relevancia funcional de las interacciones proteína-proteína observadas.

Un primer aspecto que podría permitir conocer un poco más acerca de la relación funcional de los péptidos DVL/RTFL con sus interactores sería conocer el efecto que pudiesen tener la combinación de mutantes *dvl/rtfl x interactor* o de la sobreexpresión de DVL/RTFL en el fondo mutante para el interactor o viceversa. Sin embargo, el hecho de que los mutantes simples *dvl/rtfl* no tuviesen ningún fenotipo evidente podría dificultar la tarea y el cruce con un múltiple mutante *dvl/rtfl* de mayor orden tampoco era viable en el momento en el que se decidió hacer esta parte del trabajo. Así se observó el fenotipo morfológico a grandes rasgos de algunos de los mutantes simples de los interactores de DVL1, en concreto, *bsk6*, *src2* o *cdc48*. Esta observación no nos proporcionó indicaciones relevantes, ya que, o bien los mutantes simples no tenían un efecto fenotípico como el caso de *bsk6* (Sreeramulu et al., 2013) o *src2* (para el que solo se han descrito fenotipos en condiciones de estrés; (Kawarazaki et al., 2013)) o bien el mutante simple homocigoto resultaba ser letal en las primeras fases del crecimiento como en el caso de *cdc48* (Park et al., 2008). Aun así, se hicieron algunos cruces de estas líneas mutantes con la línea sobreexpresora *dvl1-1D* pero tampoco observamos ningún fenotipo diferente al causado por la propia sobreexpresión de *DVL1*. En cualquier caso, estos análisis fueron muy preliminares y no se realizaron en profundidad por el momento del trabajo en el que se llevaron a cabo.

Por otra parte, los datos transcriptómicos y proteómicos (apartados 1.5 y 1.6 de Resultados) habían destacado procesos relacionados con el polen y el tubo polínico, así como de crecimiento unidimensional de la célula, que podrían también relacionarse con el crecimiento de los pelos radiculares, significativamente alterados en los quintuples mutantes *dvl/rtfl*. Teniendo en cuenta esto, se decidió centrar el foco de estudio en la caracterización funcional de la interacción DVL1-CDC48 observada para poder dilucidar el papel de los genes *DVL/RTFL*.

El gen *CDC48* de *Arabidopsis* (*AtCDC48* - AT3G09840) ha demostrado tener un papel clave en la división, expansión y diferenciación celular en plantas, y su localización subcelular es dependiente de la etapa del ciclo celular y el estado de diferenciación. Se ha descrito que los mutantes de pérdida de función detienen su crecimiento durante la fase embrionaria o como mucho en las primeras fases del desarrollo de la plántula, mostrando una expansión celular disminuida en la raíz y efectos pleiotrópicos en el desarrollo del polen y el embrión (**Figura 45**; Park et al., 2008). Además se han podido observar los efectos que tiene la pérdida de función del gen *AtCDC48* en estadios más tardíos del desarrollo gracias a una serie de líneas transgénicas que expresan proteínas mutantes *Atcdc48A* dominantes negativas (*Atcdc48A^{DN}*) bajo el control de un promotor inducible por etanol, viendo como la inactivación de *AtCDC48* provoca defectos morfológicos aberrantes tanto en la parte aérea como en los pelos radiculares de la raíz (**Figura**

46; Park et al., 2008). Por todo esto, nos pareció especialmente interesante intentar relacionar funcionalmente a *AtCDC48* con los genes *DVL/RTFL*.

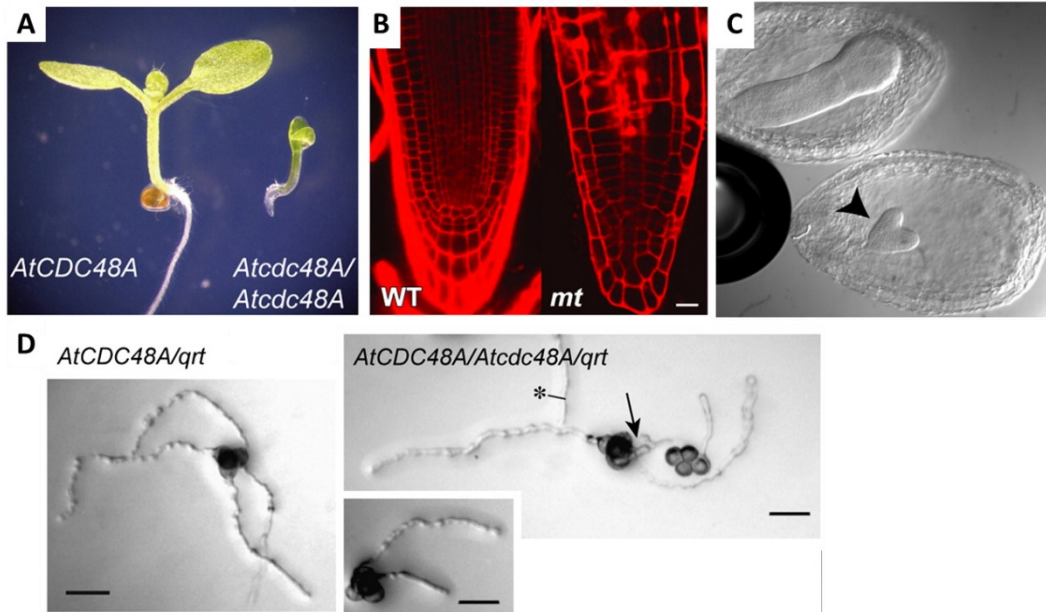


Figura 45. Representación de los fenotipos asociados a los mutantes de pérdida de función *Atcdc48*. A) Plántulas de 5 días de edad silvestre (*AtCDC48A*) y mutante (*Atcdc48A/Atcdc48A*). La plántula homocigota *Atcdc48A/Atcdc48A* para su crecimiento y muere en este estado del desarrollo. B) Raíces de plántulas de 5 días de edad silvestre (WT) y mutante homocigota *Atcdc48A* (*mt*), teñidas con yoduro de propidio. La imagen de la raíz mutante comprende toda la longitud de la raíz (como se muestra en la imagen A), mientras que la imagen de la izquierda comprende únicamente la punta de una raíz silvestre. Escala 10 μ m. C) Embriones hermanos de una silicua inmadura (aproximadamente 5 días después de la fertilización) de una planta *Atcdc48A*^{T-DNA} heterocigota autofecundada. El desarrollo del embrión mutante se muestra detenido en la etapa del corazón (punta de flecha). D) Granos de polen de *qrt* (*AtCDC48A/qrt*) y heterocigotos *AtCDC48A/Atcdc48A/qrt*. La flecha indica tubos de polen mutantes con una elongación inhibida. Escala 50 μ m. Imagen modificada de Park et al., 2008.

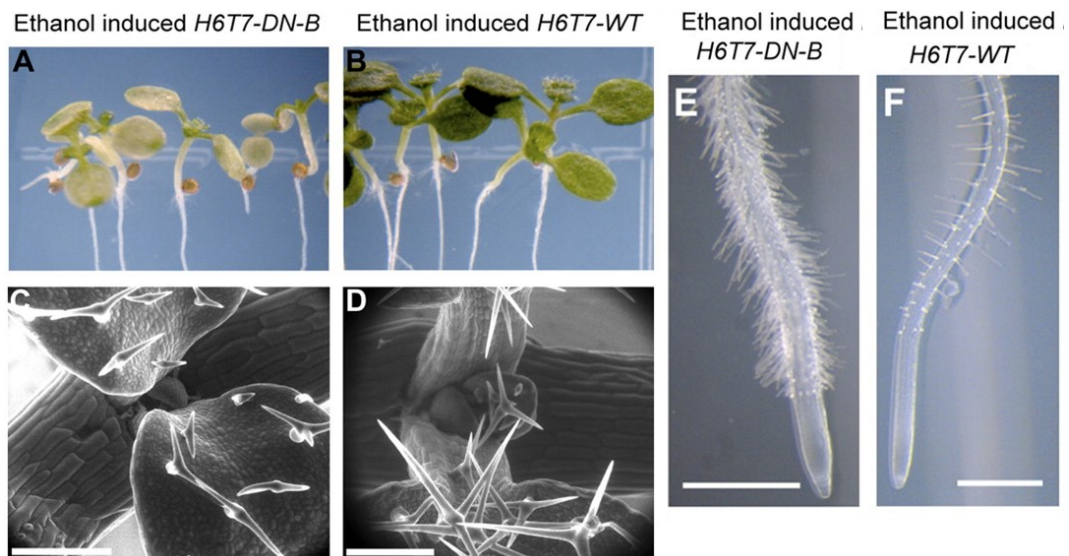


Figura 46. Análisis fenotípico de las líneas mutantes inducibles por etanol *Atcdc48ADN*. A) Plántulas de 5 días de edad H6T7-*Atcdc48ADN*-B (H6T7-DN-B; A, C y E) and H6T7-*AtCDC48A* (H6T7-WT; B, D y F) tratadas con etanol 2% (v/v) y fotografiadas después de 4 días. A y B) Fotografías de la parte aérea. C y D) Fotografías de SEM de primeras hojas y tricomas. Escala 200 μ m. E y F) Fotografías de raíces. Escala 0.5 mm. Imagen modificada de Park et al., 2008.

En este caso, no solo la falta de fenotipo evidente en los simples mutantes *dvl/rtfl* o la dificultad de hacer cruces con un mutante múltiple de alto orden *dvl/rtfl*, dificultaban el proceso, sino también el hecho de que los mutantes homocigotos de inserción de T-DNA de *AtCDC48* (*Atcdc48a^{T-DNA}*) fuesen letales o inviables más allá de 1 día post-germinación. En primer lugar, y dado que los mutantes *cdc48* tenían un porcentaje de germinación de solo el 4% (Park et al., 2008), se quiso comprobar si el múltiple mutante *dv/rtfl* del que se disponía en ese momento, el nóuple mutante *dv/3 dv/5 dv/6 dv/4 rtfl/9 dv/8 dv/11 rtfl/11 dv/19*, tenía también defectos en la germinación. En principio, no teníamos evidencias de que los mutantes múltiples *dvl/rtfl* pudieran presentar defectos en la viabilidad de los embriones, pues no se había observado un descenso evidente en el número de plantas germinadas por semillas, pero no se había analizado este aspecto con detalle.

Por tanto, se hizo un ensayo rápido de germinación de semillas para ver el porcentaje de germinación de las semillas de mutantes *dvl/rtfl* puestas a crecer en medio MS *in vitro*, así como el tiempo que tardaban en germinar y cómo era el desarrollo temprano de la plántula. No se observaron defectos en la germinación de las semillas: prácticamente el 100% de las semillas germinaba, a excepción de una o dos semillas por placa, una proporción similar a la que tenía lugar en el control silvestre Col-0. Así mismo, tampoco se vieron defectos en el proceso de germinación desde el día 1 hasta el día 5, momento en el cual se tomaron las imágenes (**Figura 47**).

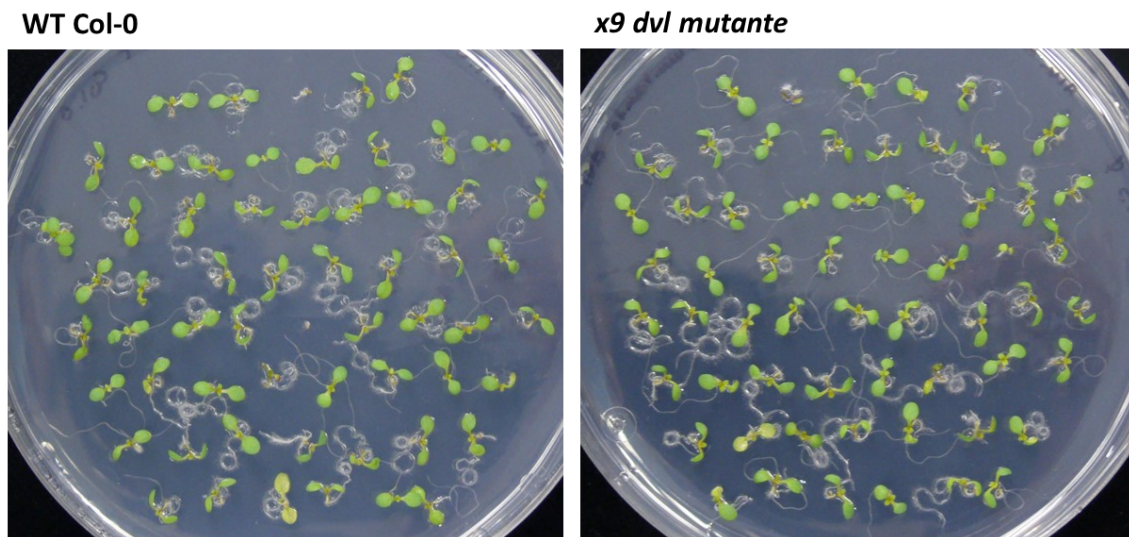


Figura 47. Estudio de germinación de semillas. Placa representativa con plántulas de 5 días de edad tras la germinación de una línea silvestre Col-0 (WT Col-0, izquierda) y una línea nóuple mutante *dv/3 dv/5 dv/6 dv/4 rtfl/9 dv/8 dv/11 rtfl/11 dv/19* (*x9 dvl mutante*, derecha).

Por otro lado, se ha descrito que *AtCDC48* se localiza en el citoplasma, en el núcleo y en la zona media del fragmoplasto durante la citocinesis (Feiler et al., 1995; Rancour et al., 2002;

Park et al., 2008), y se ha sugerido que la proteína se asocia al retículo endoplasmático y a la membrana plasmática (Aker et al., 2006, 2007). Además, se ha demostrado que el patrón de localización nuclear de AtCDC48 varía con el ciclo celular, asociándose a diferentes partes del núcleo en función de la fase del ciclo celular y estado de diferenciación en el que se encuentre la célula. Los defectos en el desarrollo y su presencia en zonas donde tienen lugar procesos de proliferación y expansión celular, concuerda con la hipótesis de la implicación de AtCDC48 en la división, expansión y diferenciación celular (Park et al., 2008).

Como los péptidos DVL/RTFL se localizan en la membrana, nos preguntamos si sería posible que actuaran modulando de algún modo el tráfico intracelular de AtCDC48, facilitando que cuando fuese necesario se asociase a la membrana, y controlando así de alguna manera la progresión de las fases del ciclo celular. De esta manera nos interesaba conocer si los péptidos DVL/RTFL podrían tener influencia sobre la localización subcelular de AtCDC48 y por tanto en los procesos de proliferación y expansión celular a través de AtCDC48.

Para intentar resolver esta cuestión, se decidió llevar a cabo un estudio de co-localización subcelular. Como ya se ha demostrado con anterioridad en este trabajo los péptidos DVL se localizan en la membrana plasmática (apartado 2.1 de Resultados) y nuestros experimentos de BiFC mostraron la interacción entre CDC48 y DVL1 también tenía lugar en la membrana plasmática (**Figura 43**).

Para ver si la localización subcelular de DVL1 o de CDC48 estaba influenciada por la presencia del otro, se llevó a cabo un estudio de co-localización agroinfiltrando hojas de *Nicotiana benthamiana*. De esta manera, si el péptido DVL pudiera influenciar la localización de CDC48, al co-infiltrar CDC48 con DVL1 podría observarse una distribución diferente. Para ello se clonaron las regiones codificantes de estos genes en dos plásmidos, pMDC32, que contenía un promotor constitutivo 2x35S, y pMDC43, que aparte del promotor constitutivo 2x35S, contenía el gen que codifica la proteína fluorescente reportera GFP. Tras esto se infiltraron hojas de *Nicotiana* con varias combinaciones: 35S:DVL1 o 35S:CDC48 separadamente como controles negativos, 35S:GFP-DVL1 y 35S: GFP-CDC48, como controles positivos y para comprobar la localización subcelular de DVL1 y CDC48 cuando se encuentran en solitario, y por último las co-infiltraciones de 35S:GFP-DVL1 + 35S:CDC48 y 35S:GFP-CDC48 + 35S:DVL1, para ver si la localización de DVL1 cambiaba al encontrarse en presencia de CDC48 y si la localización de CDC48 cambiaba en presencia de DVL1, respectivamente.

Como puede observarse en la **Figura 48**, los patrones de localización subcelular de las proteínas DVL1 y CDC48 no parecían cambiar en presencia o ausencia del otro interactante. Así,

cuando infiltramos DVL1 en solitario (35S:GFP-DVL1), la señal fluorescente de la GFP se localizaba en la membrana plasmática, como era de esperar, pero también, de manera algo inesperada, en el núcleo de la célula, el mismo patrón observado en la coinfiltración con la proteína CDC48 (35S:CDC48) (**Figura 48** - parte izquierda). Por su parte, CDC48 (35S:GFP-CDC48) se localizó en el núcleo, el citoplasma y la membrana plasmática, tal y como ya se había demostrado en Park et al., 2008. La presencia de DVL1 (35S:DVL1) en este contexto no modificó apreciablemente su localización subcelular (**Figura 48** - parte derecha). A pesar de que los resultados pareciesen indicar que la localización subcelular no está determinada significativamente por la interacción DVL1-CDC48, no siendo esenciales el uno para el otro en lo que a localización subcelular se refiere, consideramos este experimento no concluyente.

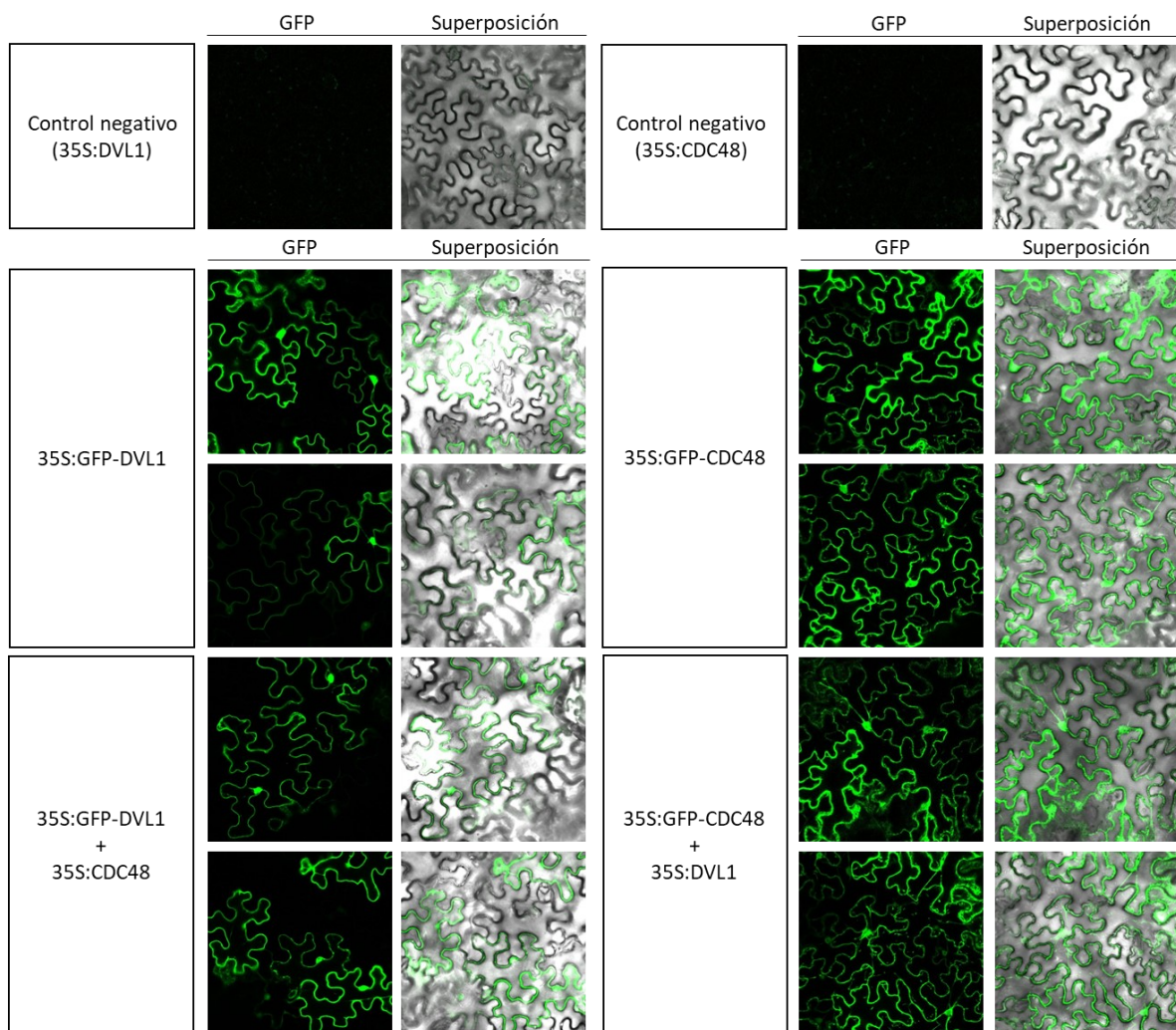


Figura 48. Ensayo de co-localización subcelular del péptido DVL1 y la proteína CDC48. Imágenes de microscopía confocal de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones y combinaciones indicadas en las columnas de la izquierda. Aparece una imagen de la fluorescencia de la proteína GFP (izquierda) y una de la superposición de la señal fluorescente y la imagen en campo claro de la epidermis de las hojas (derecha).

Por una parte, se observó señal GFP-DVL1 en el núcleo cuando todos los ensayos publicados hasta ahora han mostrado que los péptidos DVL/RTFL se localizan en la membrana plasmática. De esta manera puede ser que exista algún tipo de procesamiento quedando algo de proteína GFP libre que dé lugar a la señal en el núcleo, o que el promotor 2x35S provoque una expresión muy fuerte de tal manera que se sature el sistema. Además, la señal fluorescente de la proteína, en todos casos, es muy intensa, por lo que el experimento podría estar siendo fallido y se necesitaría determinar esta interacción y consecuente localización subcelular de una manera más precisa, haciendo por ejemplo más controles o empleando concentraciones crecientes de las diferentes construcciones. También existe la posibilidad de que hacer el ensayo en hojas de *Nicotiana* ya diferenciadas en las que no hay división celular activa, hace que la localización pierda importancia.

Los resultados no concluyentes de este estudio nos llevaron a buscar alternativas más cercanas a las condiciones de crecimiento *in vivo* de la planta. Para ello, se tuvo en cuenta el trabajo realizado por Park et al., 2008 en el que describen que AtCDC48, fusionado a la proteína reportera YFP bajo el control de su promotor nativo, se localiza en el núcleo y el citoplasma (**Figura 49C**) y que además, esta localización es dependiente del ciclo celular puesto que se asocia al huso mitótico durante la mitosis o la zona media del fragmoplasto durante la citocinesis (**Figura 49A** y **Figura 49B**). Así, llevamos a cabo una serie de cruces de la línea cedida por Park et al., 2008, AtCDC48_{pro}:YFP:AtCDC48 en el fondo mutante *Atcdc48A^{T-DNA}* homocigoto con las líneas sobreexpresoras 35S:DVL8 (**Figura 49F**) y *dvl1-1D* (**Figura 49G**), así como con la línea silvestre Col-0 a modo de control (**Figura 49E**). El fin de estos cruces era observar si la sobreexpresión de los genes *DVL8* o *DVL1* provocaba cambios significativos en las frecuencias de los patrones de localización subcelular de YFP-AtCDC48.

En primer lugar y analizando el cruce de la línea reportera con el genotipo silvestre Col-0 (**Figura 49E**), se pudieron observar diferencias con respecto a lo visto por Park et al., 2008 (**Figura 49C**) y al control de la misma línea AtCDC48_{pro}:YFP:AtCDC48 en el fondo *Atcdc48A^{T-DNA}* homocigoto analizado a la par (**Figura 49D**). Lo principal a destacar fue que, a pesar de observar señal en el núcleo y citoplasma de las células en la primera zona de elongación de la raíz de plántulas de 3 días de edad, la señal no era uniforme y no se veía en todas las células de la raíz (**Figura 49E**). Esto podría deberse a que el análisis se llevó a cabo en la primera generación filial a partir del cruce entre las dos líneas parentales y, por tanto, se trataba de una línea heterocigota para AtCDC48_{pro}:YFP:AtCDC48. Aun así, esto no debería afectar porque en principio todas las células tienen una copia del transgén, y que no se viese la señal YFP en todas las células podría deberse a algún tipo de autorregulación. A parte de esto, tampoco fue posible detectar ninguna

célula que se encontrase claramente en fase de división celular para comprobar posibles cambios durante la mitosis o citocinesis como sí hacía Park et al., 2008 (**Figura 49A** y **Figura 49B**), ni en nuestro control (**Figura 49D**), ni en el cruce con la línea silvestre (**Figura 49E**).

Por otro lado, no parecían observarse cambios significativos en la localización subcelular de YFP-AtCDC48 en el cruce entre las líneas sobreexpresoras 35S:DVL8 o *dv1-1D* con la línea AtCDC48_{pro}:YFP:AtCDC48 en el fondo *Atcdc48A^{T-DNA}* homocigoto (**Figura 49F** y **Figura 49G**) con respecto al control (**Figura 49D**). Así, que se alterara la cantidad de DVL1 o DVL8 en la célula no parecía inducir la retención de AtCDC48 en la membrana, tal y como podría haberse esperado. Sin embargo, esto era muy difícil de cuantificar al no existir una uniformidad en la señal de todas las células y si existía algún cambio, éste no era muy radical.

Si bien es cierto que no parecieron observarse cambios significativos en la localización subcelular de YFP-AtCDC48 cuando se altera la cantidad de DVL1 o DVL8 (**Figura 49F** y **Figura 49G**), este experimento no era concluyente y sería necesario repetirlo en generaciones sucesivas, hecho que no ha dado tiempo a completar en este trabajo.

Por último, y para explorar la posibilidad de que los péptidos DVL/RTFL fueran necesarios para la función de AtCDC48, razonamos que, si los péptidos DVL/RTFL eran necesarios para la función de AtCDC48, la sobreexpresión de éste en un fondo mutante para varios genes *DVL/RTFL* podría causar un efecto fenotípico atenuado. Para ello, recurrimos a líneas transgénicas publicadas que sobreexpresan de modo inducible AtCDC48 (**Figura 46**, Park et al., 2008). Se ha descrito que la inducción de la expresión de AtCDC48 silvestre no provoca alteraciones apreciables en el desarrollo de la planta, mientras que la expresión de una proteína mutante AtCDC48 dominante negativa (*Atcdc48A^{DN}*) causa la inactivación temporal de la función endógena de AtCDC48. Esto es posible gracias a un sistema dirigido bajo el control de un promotor inducible por etanol, en el que se ha incorporado una subunidad de unión a ATP al AtCDC48 endógeno que interrumpe su actividad *in vivo* y funciona como un mutante dominante negativo con efectos, en principio, equivalentes a los de su pérdida de función (Park et al., 2008).

Por ello, decidimos introducir esta versión inducible en el fondo múltiple mutante *dv1 dv13 dv15 dv16 dv14 rtf19 dv18 dv111 rtf1 dv119* para ver el efecto que provocaba la sobreexpresión de esta proteína mutante de AtCDC48 en el décuple mutante *dv1/rtf1* en diferentes etapas del desarrollo del Arabidopsis. Empleando este sistema, la actividad endógena de AtCDC48 se inactivaría temporalmente en el momento en que se induce, eludiendo así los fenotipos letales de gametofitos, embriones y plántulas encontrados en los mutantes de pérdida de función

Atcdc48A (Figura 45 y Figura 46; Park et al., 2008), pudiendo atender a posibles efectos en estados más tardíos del desarrollo de la planta.

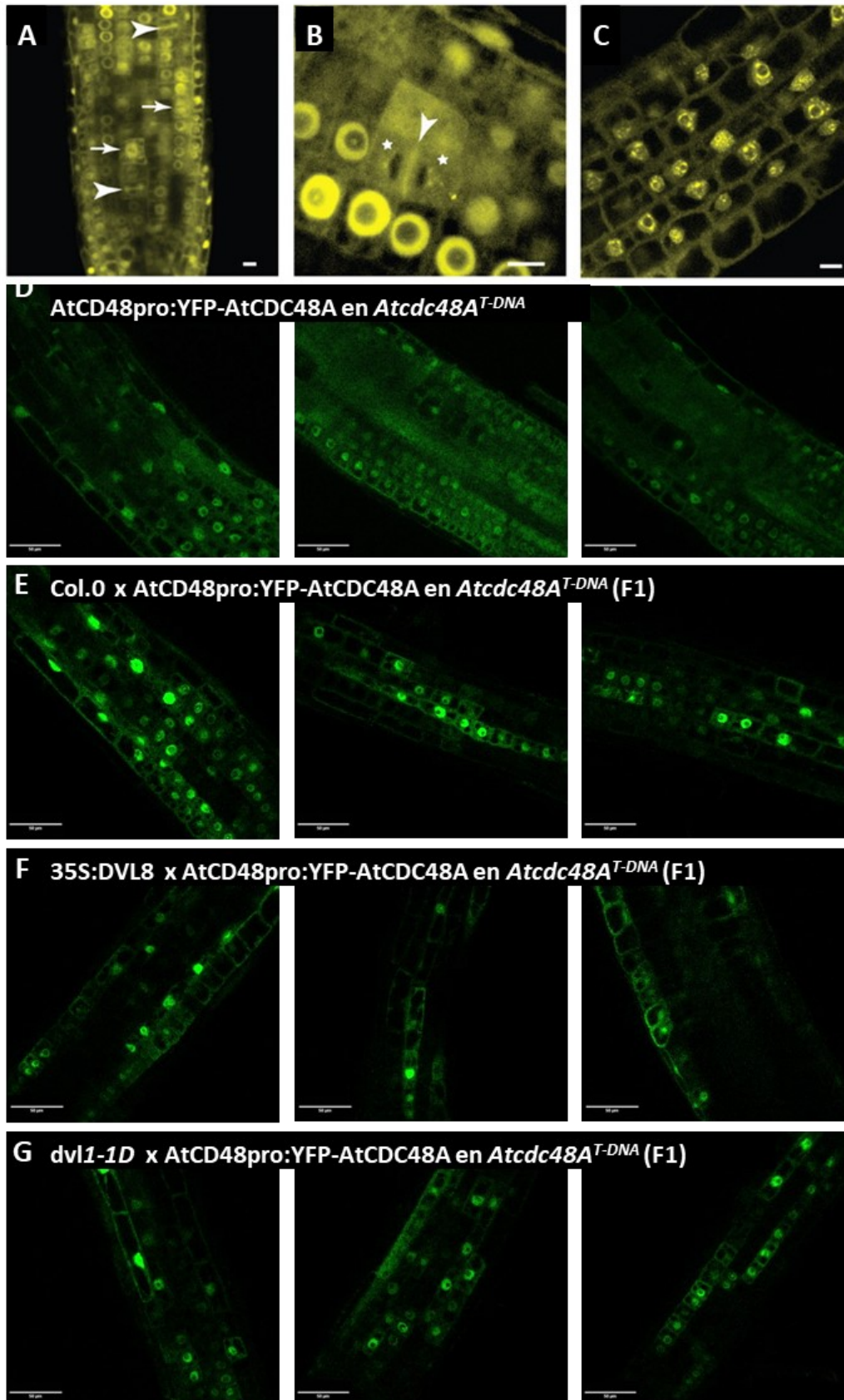


Figura 49. Localización de YFP-AtCDC48A. Pie de figura en página siguiente.

Figura 49. Localización de YFP-AtCDC48A. A, B y C) Localización de YFP-AtCDC48A en plántulas transgénicas AtCDC48A_{pro}:YFP-AtCDC48A en fondo *Atcdc48A^{T-DNA}* homocigotas a los 3 días tras la germinación. Imágenes de microscopía confocal de las células en la zona de división de la raíz indicando con puntas de flechas el plano de división (A y B) y de la zona primaria de elongación con los núcleos marcados (C). Escala 10 µm. Imágenes tomadas de Park et al., 2008. D) Localización de YFP-AtCDC48A en plántulas transgénicas AtCDC48A_{pro}:YFP-AtCDC48A en fondo *Atcdc48A^{T-DNA}* homocigotas. E) Localización de YFP-AtCDC48A en plántulas de la primera generación (F1) tras cruzar el genotipo silvestre (Col-0) con plantas transgénicas AtCDC48A_{pro}:YFP-AtCDC48A en fondo *Atcdc48A^{T-DNA}* homocigotas. F) Localización de YFP-AtCDC48A en plántulas de la primera generación (F1) tras cruzar plantas 35S:DVL8 con plantas transgénicas AtCDC48A_{pro}:YFP-AtCDC48A en fondo *Atcdc48A^{T-DNA}* homocigotas. G) Localización de YFP-AtCDC48A en plántulas de la primera generación (F1) tras cruzar plantas *dv1-1D* con plantas transgénicas AtCDC48A_{pro}:YFP-AtCDC48A en fondo *Atcdc48A^{T-DNA}* homocigotas. Imágenes de microscopía confocal de la raíz plántulas a los 3 días tras la germinación. Escala 50 µm.

Sin embargo, y tras transformar con la construcción inducible por etanol *Atcdc48A^{DN}* plantas de *Arabidopsis* fondo décuple mutante *dv1 dv3 dv5 dv6 dv4 rtf19 dv8 dv11 rtf1 dv19* así como plantas sobreexpresoras *dv1-1D* y silvestres Col-0, no se pudo obtener ningún resultado concluyente puesto que fuimos incapaces de inducir la construcción con etanol siguiendo el protocolo llevado a cabo por Park et al., 2008. Trabajamos con diferentes líneas transgénicas T2 en los diferentes fondos seleccionados porque poseían una sola copia del transgén. Tras 5 días de crecimiento en vertical, se trataron las plántulas con EtOH al 2% (v/v) durante 20 min y se dejaron crecer durante dos días más en vertical antes de recoger las muestras. En primer lugar, se llevó a cabo una RT-qPCR para medir los niveles de expresión de *AtCDC48* en las plantas tratadas con EtOH 2% frente a plantas tratadas solo con agua (Mock) usadas como control, diseñando oligonucleótidos dentro de la secuencia del gen. Como puede observarse en la **Figura 50** apenas se inducía la expresión de *AtCDC48* tras haber tratado las diferentes líneas transgénicas, viendo solamente cierta inducción (de menos de 1 punto) en las líneas *Atcdc48A^{DN}* fondo WT #17, *Atcdc48A^{DN}* fondo décuple mutante #7 y *Atcdc48A^{DN}* fondo *dv1-1D* #9. Estas líneas fueron las seleccionadas para analizar el posible fenotipo causado por la inducción de la proteína mutante *Atcdc48A* dominante negativa.

Tras realizar los tratamientos con etanol de las diferentes líneas seleccionadas creciéndolas en vertical durante 4 días tras la germinación antes el tratamiento, y durante 2 a 4 días tras el tratamiento, no fue posible observar ningún fenotipo evidente, ni siquiera en la línea *Atcdc48A^{DN}* fondo WT#17 empleada como control, en la que esperábamos ver el mismo efecto observado por Park et al., 2008 (**Figura 46**). No conseguimos inducir las líneas transgénicas y por tanto tampoco se consiguió observar ningún efecto fenotípico. De este modo, sería necesario generar otro tipo de construcciones inducibles, con algún sistema ya estandarizado en el laboratorio, que permitiesen ver el efecto de la falta de función de *AtCDC48* en estados más avanzados del desarrollo de *Arabidopsis*. Sin embargo, la falta de tiempo a la hora de analizar

estos resultados derivó en la imposibilidad de generar dichas construcciones durante la realización de la tesis.

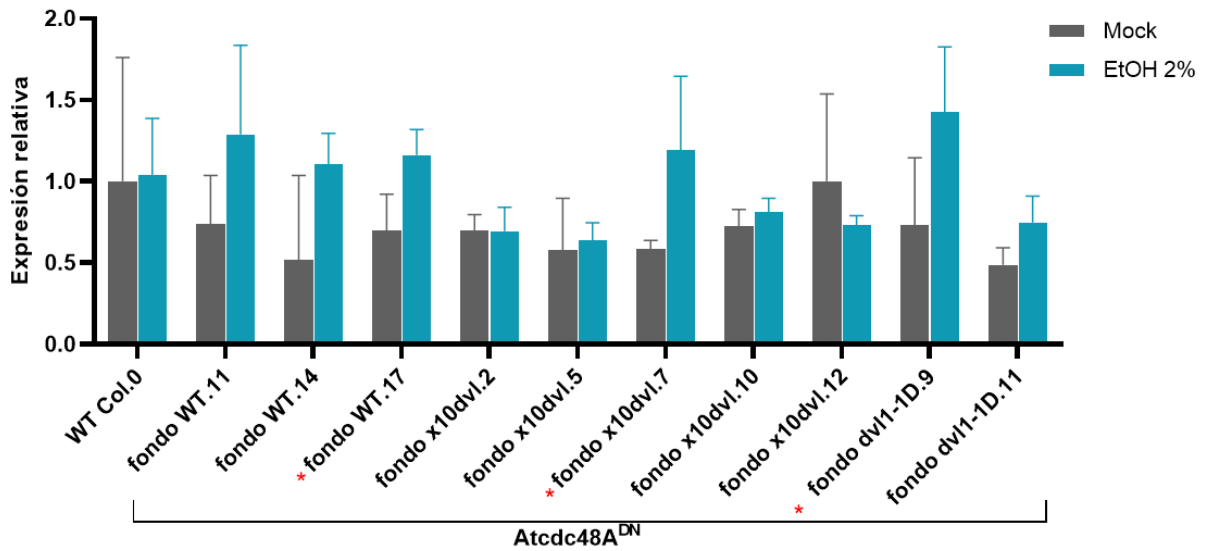
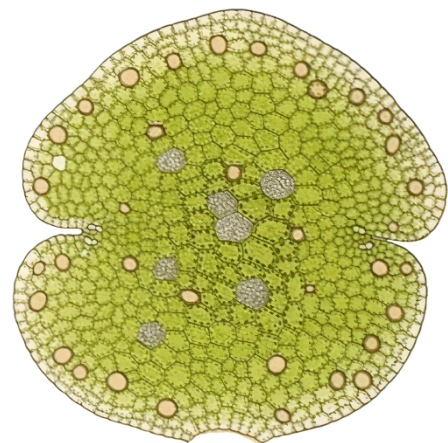


Figura 50. Niveles de expresión de *AtCDC48* en las líneas transgénicas *Atcdc48^{DN}*. Se muestran los niveles de expresión del gen *CDC48* en las diferentes líneas transgénicas *Atcdc48^{DN}* en los diferentes fondos silvestre (WT), décuple mutante *dvl3 dvl5 dvl6 dvl4 dvl1 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* (x10dvl) y sobreexpresor *dvl1-1D*, además del control silvestre (WT Col.0). Para cada línea aparecen los valores de expresión tras el tratamiento con etanol 2% (EtOH 2% - azul) y el control (Mock- gris). Los niveles de expresión son relativos con respecto a la expresión del gen en el silvestre *TIP41*, que tiene un valor de 1. Con un asterisco rojo se indican las líneas seleccionadas. Se indica el valor medio entre las tres réplicas técnicas en la base de la columna. Las barras de error indican límite superior e inferior de las tres réplicas técnicas.

Los experimentos realizados para estudiar la posible relación funcional entre CDC48 y DVL1 han sido escasos y preliminares. Aunque no se haya obtenido ningún resultado, CDC48 sigue siendo un candidato prometedor y sería necesario hacer más estudios que nos permitan establecer si esta posible relación tiene significado biológico, así como el mecanismo de acción implicado y por tanto dilucidar un poco más acerca de la función de los péptidos DVL/RTFL en la planta. Además, también sería interesante llevar a cabo análisis con otros de los interactores de DVL1 y DVL11 confirmados en este trabajo.

RESULTADOS: CAPITULO 3



CAPITULO 3. Caracterización del papel del homólogo *DVL/RTFL* en *Marchantia polymorpha*.

El hecho de que no se hubiese encontrado ningún fenotipo morfológico evidente asociado a la pérdida de función *DVL/RTFL* en *Arabidopsis* podía deberse, como se ha dicho con anterioridad, a una elevada redundancia génica existente entre los 24 miembros de la familia *DVL/RTFL* en esta especie. Por ello se planteó un nuevo objetivo de trabajo, la caracterización del único gen homólogo *DVL/RTFL* presente en la especie *Marchantia polymorpha*, una hepática, modelo de este linaje basal de las plantas terrestres (Guo et al., 2015), para determinar su posible función y si ésta puede extrapolarse a otras especies.

3.1. Identificación del homólogo *DVL/RTFL* en *Marchantia polymorpha*.

El primer paso, por tanto, fue la identificación del homólogo de los genes *DVL/RTFL* en *Marchantia* y su secuencia. Según la información disponible, existe un único homólogo en esta especie y el gen con el que comparte una mayor similitud en *Arabidopsis* es *DVL17/RTFL6* (Guo et al., 2015). Se llevó a cabo una búsqueda en bases de datos (Phytozome: <https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) de la secuencia del gen en cuestión identificándolo como Mapoly0151s0015.1, denominado en este trabajo como *MpDVL*. La secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente presentaba el dominio conservado *DVL/RTFL*, común en todos los miembros de la familia, así como un motivo conservado con su homólogo *DVL17/RTFL6* (**Figura 51**).

```

MPDVL      MGQCYTAQQKPRERWIKKSGKGGPAGRYSQRESYGNCGFALVREQRARFYIIRRCITMLL 60
            MGQC +A + R+R      +      R S E      GC A+V+E+R+RFYI RRCI MLL
DVL17/RTFL6 MGQCSSATKMRRKR - - - - KREECCRESM -ERRNKGCLAMVKERRSRFYIARRCILMLL 54

MPDVL      CWHKYGGS 68
            CWHKY S
DVL17/RTFL6 CWHKYANS 62
    
```

Figura 51. Alineamiento de secuencias entre *MpDVL* y *DVL17/RTFL6*. En la línea superior aparece la secuencia aminoacídica de *MpDVL* de *Marchantia polymorpha* y en la línea inferior la secuencia aminoacídica de *DVL17/RTFL6* de *Arabidopsis thaliana*, en la línea central aparecen los aminoácidos conservados (letra) o sustituciones conservadas (+). En azul se indica el dominio conservado *DVL/RTFL* y en naranja el motivo conservado entre *MpDVL* y *DVL17/RTFL6*. Modificado a partir de Guo et al., 2015.

3.2. Caracterización de la sobreexpresión de *MpDVL* en *Arabidopsis thaliana*.

Con el fin de conocer si la función de los péptidos *DVL/RTFL* se encuentra conservada en *Marchantia polymorpha* y, por tanto, si era interesante llevar a cabo la caracterización del homólogo *DVL/RTFL* de esta especie, se decidió sobreexpresar el gen *MpDVL* de *Marchantia polymorpha* en *Arabidopsis thaliana*. Debido a que solo que se observaban fenotipos asociados

a la sobreexpresión de los genes *DVL/RTFL* en *Arabidopsis*, se esperaba observar también fenotipos similares al sobreexpresar en esta especie el homólogo de *Marchantia*.

Para ello se generó una construcción en la que la región codificante del gen *MpDVL* estaba dirigida bajo la expresión de un promotor constitutivo en *Arabidopsis*, 2x35S. Una vez clonada la CDS del gen *MpDVL* e insertada en el vector final pMDC32, se transformaron plantas silvestres Col-0 de *Arabidopsis thaliana* mediante agroinfiltración. Tras seleccionar aquellas plantas transformantes resistentes a higromicina, que contenían una sola copia del transgén y homocigotas, se caracterizaron fenotípicamente atendiendo a la morfología de la planta tanto en fase vegetativa, observando las hojas de roseta; como en fase reproductiva, observando el desarrollo de la inflorescencia, flores en antesis y desarrollo de gineceo y fruto.

Como puede observarse en la **Figura 52**, existen diferencias entre los órganos de las plantas silvestres y los de las líneas sobreexpresoras. Así, las hojas de roseta de unos 15 días de edad son más pequeñas, redondeadas (**Figura 52A y 52B**); las inflorescencias son más compactas y pequeñas y, además, en ocasiones, el carpelo sobresale de la inflorescencia todavía cerrada (**Figura 52C y 52E**). También se observan flores con peciolo más cortos (**Figura 52C y 52E**). Por su parte, los frutos son más cortos, más aplanados y con las valvas más anchas; además el estilo resulta ser más largo en comparación en el silvestre Col-0 (**Figura 52D y 52F**).

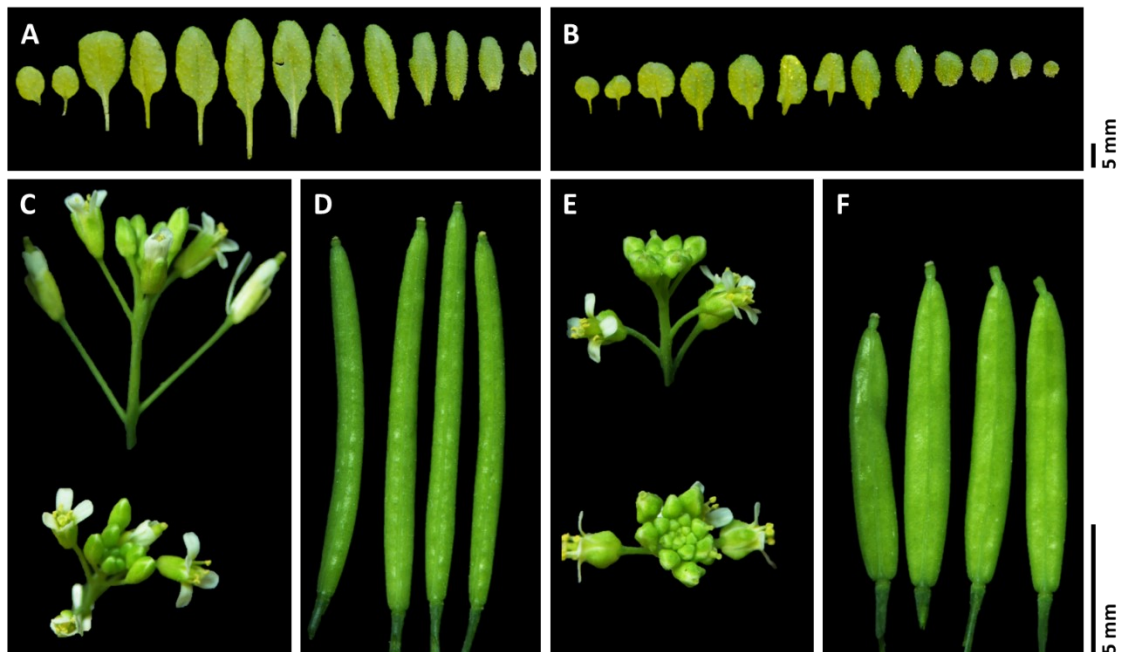


Figura 52. Fenotipos de la sobreexpresión de *MpDVL* en *Arabidopsis thaliana*. Se muestran los fenotipos correspondientes a las plantas silvestres Col-0 (A, C y D) y a las plantas sobreexpresoras *MpDVL* (B, E y F), en hojas de roseta de 15 días (A y B), en inflorescencias y flores en antesis (C y E) y en frutos formados (D y F). Escala 5 mm.

Estas plantas que sobreexpresan el gen *MpDVL* tenían fenotipos similares a los ya descritos para la sobreexpresión de otros péptidos DVL en lo referente a las hojas de roseta y las flores e inflorescencias (Narita et al., 2004; Wen et al., 2004; Ikeuchi et al., 2011) y además, la morfología del fruto recuerda completamente a la descrita para la sobreexpresión del gen *DVL11* de *Arabidopsis* por Primo, 2013 (**ANEXO XIV. Figura S2**).

Estos resultados apoyan la idea de que la función de los péptidos DVL/RTFL estaría conservada entre las diferentes especies de plantas. Por tanto, el siguiente paso fue llevar a cabo la caracterización del gen *MpDVL* en *Marchantia polymorpha*.

3.3. Caracterización de los fenotipos asociados a la pérdida y ganancia de función *MpDVL* en *Marchantia polymorpha*.

3.3.1 Generación de líneas mutantes de pérdida de función *MpDVL* en *Marchantia polymorpha*

Con el fin de determinar el efecto producido por la pérdida de función del gen *MpDVL* en *Marchantia polymorpha* y así intentar determinar su función, se decidió generar mutantes mediante el sistema CRISPR/Cas9 de edición dirigida del genoma. Para ello se empleó un sistema simple y altamente eficiente de edición genómica en *Marchantia polymorpha* que usa una endonucleasa Cas9 con una secuencia optimizada de codones predominantes en *Arabidopsis* y que permite obtener plantas con el genoma editado tras secuenciar un bajo número de transformantes (Sugano et al., 2018).

En primer lugar, se diseñó la guía (sgRNA) que reconocería la endonucleasa Cas9, realizando un corte en el gen diana para dar lugar a una posible mutación. El pequeño tamaño del gen *MpDVL* limitaba el proceso de selección de sgRNAs que cumpliesen las condiciones necesarias, de tal manera que solo se obtuvo una secuencia candidata, que se encontraba en el inicio de la secuencia de nucleótidos del gen. Esta sgRNA se clonó en un vector final (pMpGE010) que contenía, además, un promotor constitutivo de *Marchantia* correspondiente al gen *ELONGATION FACTOR 1 alpha* (*MpEF1 α _{pro}*) dirigiendo la expresión de la Cas9 optimizada de *Arabidopsis* (**Figura 53**).



Figura 53. Vector pMpGE010 empleado para la edición dirigida de *MpDVL* en *Marchantia polymorpha*. Vector binario que contiene un casete de expresión de la Cas9 con codones predominantes de *Arabidopsis* (*Atco-Cas9*) fusionada a una secuencia de localización nuclear (*NLS*) bajo el control de un promotor *MpEF1 α _{pro}* y un terminador (*ter*), un casete de expresión de la sgRNA diseñada para *MpDVL* dirigida por un fragmento de 500 pb de *MpU6pro* y un casete de expresión de una higromicina fosfotransferasa (*HPT*) que confiere resistencia a higromicina.

RESULTADOS: CAPITULO 3

Con esta construcción se transformaron gemas de *Marchantia polymorpha*, ecotipo silvestre TAK-1, mediante agroinfiltración tal y como se especifica en el apartado 2.6.4 de Materiales y Métodos. Los explantes transformados se crecieron en medio de selección con el antibiótico higromicina y, de aquellos callos que formaron copas con gemas, estas últimas se pasaron a nuevas placas con antibiótico para ya seleccionar, de aquellas resistentes, las transformantes en las que se hubiese producido la edición del gen *MpDVL*. Para este último fin se recogió material vegetal del cual se extrajo el DNA genómico y se secuenció de manera directa gran parte del gen *MpDVL* tras amplificarlo con oligonucleótidos específicos que se encontraban por fuera del gen *MpDVL* y que permitían amplificarlo en su totalidad debido a su pequeño tamaño de tan solo 207 pb.

De 25 plantas resistentes a higromicina, se identificaron 5 que contenían una mutación en torno a la secuencia donde apareaba la sgRNA. Dos de las líneas, CRISPR *MpDVL* 10 y CRISPR *MpDVL* 11, tenían la misma mutación, una inserción de un nucleótido en la región donde apareaba la sgRNA y por tanto de corte de la endonucleasa, que producía un codón de parada prematuro y, por ende, una proteína truncada de 26 aminoácidos en lugar de los 68 aminoácidos de la proteína funcional *MpDVL* (**Figura 54**). Por otra parte, las líneas CRISPR *MpDVL* 16 y CRISPR *MpDVL* 23 tenían una delección de 5 nucleótidos a la altura de reconocimiento de la sgRNA y que provocaban un cambio en el marco de lectura y un codón de parada prematuro, produciéndose una proteína de 24 aminoácidos en lugar de la funcional de 68.

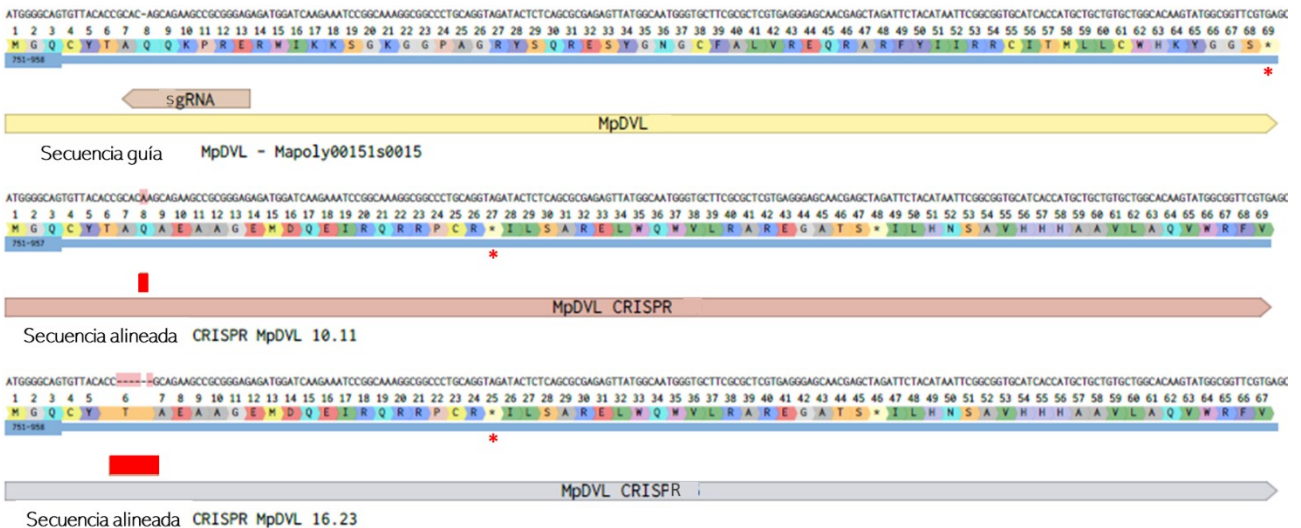


Figura 54. Representación esquemática de las secuencias de los genes mutados por edición genómica dirigida CRISPR/Cas9. En la parte superior se indica la secuencia de nucleótidos del gen silvestre (*MpDVL*), seguida de la secuencia de aminoácidos, las anotaciones correspondientes a la sgRNA y los aminoácidos de la proteína *MpDVL*. A continuación, aparecen las secuencias alineadas del gen *MpDVL* en los mutantes CRISPR *MpDVL* 10 y 11, y a continuación las secuencias alineadas del gen *MpDVL* en los mutantes CRISPR *MpDVL* 16 y 23. Las regiones señaladas en rojo indican las regiones discordantes con la secuencia guía y el asterisco rojo indica el codón de parada de la proteína.

En otra de las líneas, sin embargo, parecía haber ocurrido un evento de poliploidía o que se tratase de una quimera, puesto que tras secuenciar la región amplificada se encontraban dos secuencias, una con una inserción de un nucleótido en el sitio predicho de corte que daba lugar a un codón de parada prematuro tras 26 aminoácidos, y otra en la que se había delecionado un codón completo sin cambiar la pauta de lectura. Por este motivo, y puesto que se disponían de otras líneas mutantes claras, se descartó ésta en posteriores análisis.

De estas líneas, se seleccionaron la CRISPR *MpDVL* 10 y la CRISPR *MpDVL* 16 para seguir trabajando puesto que tenían mutaciones diferentes en la secuencia del gen produciendo ambas una proteína truncada. Estas líneas se propagaron asexualmente de manera clonal en su fase vegetativa mediante gemas para mantenerlas y llevar a cabo su caracterización fenotípica y otra serie de análisis.

3.3.2. Generación de líneas de sobreexpresión *MpDVL* en *Marchantia polymorpha*.

A su vez, y con el objetivo de ver qué efecto producía la sobreexpresión de *MpDVL* en *Marchantia*, se generó una construcción en la que la expresión de *MpDVL* estaba dirigida por un promotor constitutivo específico de *Marchantia*, $MpEF1\alpha_{pro}$, además de tener fusionada la proteína reportera fluorescente citrina. Este vector final, pMpGWB108, con el inserto *MpDVL* se introdujo en gemas de *Marchantia* TAK-1 mediante agroinfiltración.

Tras esto se seleccionaron como transformantes aquellos explantes que habían crecido en placa en presencia del antibiótico higromicina. Además, las plantas resistentes al antibiótico se genotiparon para comprobar que portaban el transgén para lo cual se llevó a cabo una extracción de DNA genómico y una posterior PCR para amplificar parte del transgén que iba desde el propio gen *MpDVL* hasta el gen reportero citrina.

El siguiente paso para acotar el número de líneas para caracterizar, fue medir los niveles de expresión relativos del gen *MpDVL* en las líneas sobreexpresoras con respecto a la línea silvestre TAK-1. Para ello se diseñaron oligonucleótidos dentro de la secuencia del gen y se llevó a cabo una RT-qPCR con cDNA obtenido de gemas de 14 días de las diferentes líneas. Como se observa en la **Figura 55**, todas las líneas aumentaban la expresión de *MpDVL* notablemente, así que con el fin de reducir el número de líneas a caracterizar se descartaron aquellas que tenían un nivel de expresión similar a otras y su fenotipo era más similar. Por ello se seleccionaron para continuar el análisis las líneas EF1:*MpDVL* 2, EF1:*MpDVL* 14, EF1:*MpDVL* 15 y EF1:*MpDVL* 19.

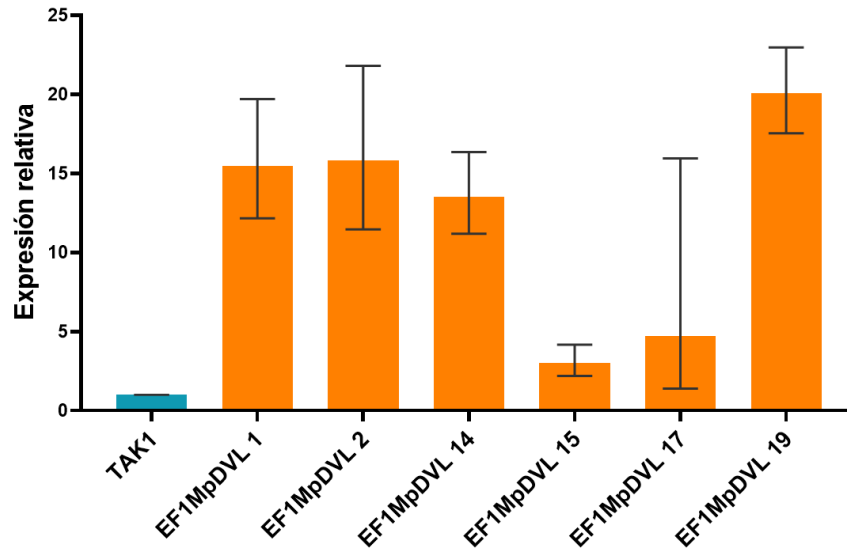


Figura 55. Niveles de expresión de las líneas sobreexpresoras *MpDVL* de *Marchantia polymorpha*. Se muestran los niveles de expresión del gen *MpDVL* en la línea silvestre TAK-1 (azul) y en las diferentes líneas sobreexpresoras *MpDVL* generadas (EF1:*MpDVL* - naranja). Los niveles de expresión son relativos con respecto a la expresión del gen en el silvestre TAK-1, que tiene un valor de 1, y al gen constitutivo *MpEF1a*. Las barras de error indican límite superior e inferior de las tres réplicas técnicas.

De todos los transformantes positivos para el transgén, se propagaron mediante gemas en la fase vegetativa aquellos que tenían un fenotipo morfológico evidente que los diferenciaba de la línea silvestre TAK-1 y que además tenían un nivel de expresión relativo de *MpDVL* mayor que el silvestre para su posterior análisis y caracterización.

3.3.3. Caracterización fenotípica de las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL*.

Caracterización fenotípica del desarrollo vegetativo

Una vez seleccionadas las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL*, se procedió a su caracterización fenotípica, centrada en la morfología del talo, el cuerpo vegetativo de la planta, en líneas procedentes de gemas a los 7, 14 y 28 días de edad.

Tras 7 días de crecimiento, ya se podían observar diferencias en el tamaño del talo de las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL* con respecto al silvestre TAK-1 (**Figura 56 – Tabla 8**). Las líneas CRISPR *MpDVL* tenían un mayor tamaño que el silvestre, si bien es cierto que solo la línea CRISPR *MpDVL* 10 tenía un área de proyección de talo significativamente mayor al silvestre, mientras que la línea CRISPR *MpDVL* 16 tenía un valor medio mayor que el TAK-1, pero no significativo (**Figura 56A – Tabla 8**). Por otro lado, las líneas sobreexpresoras tenían un tamaño menor que la silvestre, a excepción de la línea EF1:*MpDVL* 19 que tenía un tamaño medio mayor en este punto, existiendo una gran variabilidad en los valores individuales de las áreas de los talos (**Figura 56A – Tabla 8**). También cabe destacar la amplia dispersión de los datos en las líneas mutantes CRISPR *MpDVL* comparado con la línea silvestre (**Figura 56A**).

Con respecto a la morfología del talo a los 7 días (**Figura 56B**), la línea mutante CRISPR *MpDVL* 16 era muy similar a la silvestre, mientras que en la línea CRISPR *MpDVL* 10 sí se observaban diferencias tanto en la longitud y densidad del rizoide en la parte ventral, siendo estos mayores en la línea mutante que en la TAK-1, como en el crecimiento del talo en la vertical, siendo más aplanado en el silvestre y alargándose ligeramente en dirección vertical contra la superficie de la placa en el mutante. Las líneas sobreexpresoras, por su parte, tenían un tamaño de talo visiblemente menor (a excepción de EF1:*MpDVL* 19), además de un rizoide más largo y denso que el silvestre, siendo algo menos acusado en el caso de la línea EF1:*MpDVL* 15. También se producía un crecimiento más vertical del talo con respecto al aplanado del silvestre en las líneas sobreexpresoras.

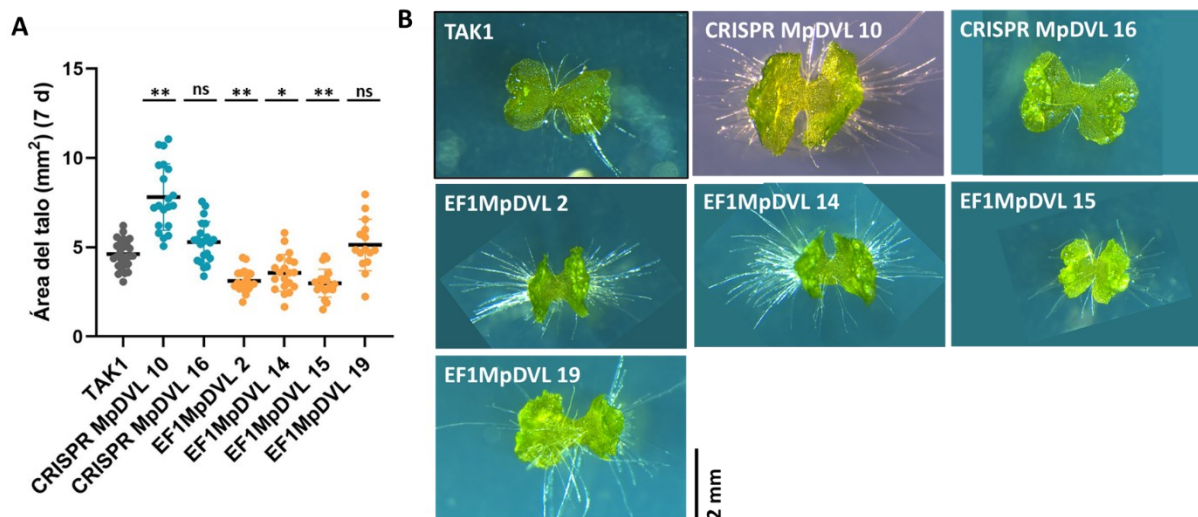


Figura 56. Morfología y tamaño del talo de las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL* a los 7 días de edad. Línea silvestre (TAK1), líneas mutantes generadas por CRISPR/Cas9 (CRISPR *MpDVL*) y líneas sobreexpresoras *MpDVL* (EF1:*MpDVL*). A) Tamaño de plantas de 7 días de edad medida como el área de proyección del talo en mm², n ≥ 20, excepto EF1:*MpDVL* 19 con n = 15. Las diferencias significativas se han calculado usando el test de Tukey post-hoc conjuntamente con ANOVA comparando las líneas mutantes/sobreexpresoras *MpDVL* con el silvestre TAK-1. *p-values* **, p < 0,01; *, p < 0,05; ns, no significativo. B) Morfología del talo de gemas de 7 días de edad. Escala 2 mm.

Tras 14 días de crecimiento y en lo referente al tamaño del talo, se observaba como las líneas mutantes *MpDVL* tenían un tamaño de área de talo muy similar al silvestre (**Figura 57A – Tabla 8**) pudiendo estar su crecimiento algo más ralentizado en este punto. Por su parte, todas las líneas sobreexpresoras EF1:*MpDVL* tenían un área de talo significativamente menor que TAK-1 (**Figura 57A – Tabla 8**), manteniéndose así la tendencia que ya se observaba a los 7 días de edad.

En el caso de la morfología de los talos a los 14 días (**Figura 57B**), las líneas mutantes CRISPR presentaban una forma muy similar al silvestre. Por su parte, las líneas sobreexpresoras, presentaban unos talos no tan aplanados como el silvestre TAK-1, con rizoides en la parte ventral

aparentemente más largos y abundantes (**Figura 57B**) aunque de una manera no tan evidente como ocurría a los 7 días (**Figura 56B**).

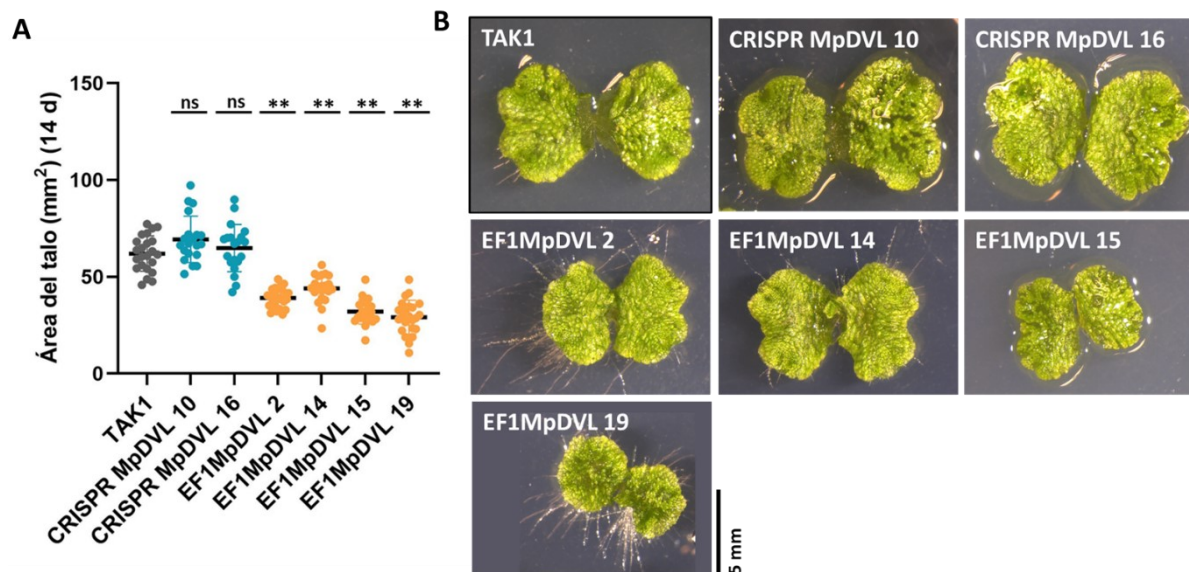


Figura 57. Morfología y tamaño del talo de las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL* a los 14 días de edad. Línea silvestre (TAK1), líneas mutantes generadas por CRISPR/Cas9 (CRISPR *MpDVL*) y líneas sobreexpresoras *MpDVL* (EF1*MpDVL*). A) Tamaño de plantas de 14 días de edad medida como el área de proyección del talo en mm², n ≥ 20. Las diferencias significativas se han calculado usando el test de Tukey post-hoc conjuntamente con ANOVA comparando las líneas mutantes/sobreexpresores *MpDVL* con el silvestre TAK-1. *p-values* **, p <0,01; *, p <0,05; ns, no significativo. B) Morfología del talo de gemas de 14 días de edad. Escala 5 mm.

Tabla 8. Tamaño del talo de las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL*. Línea silvestre (TAK1), líneas mutantes generadas por CRISPR/Cas9 (CRISPR *MpDVL*) y líneas sobreexpresoras *MpDVL* (EF1*MpDVL*). Valor medio y desviación estándar del área de proyección de talo de plantas de 7, 14 y 28 días de edad en mm², n ≥ 20, excepto EF1*MpDVL* 19 a día 7 con n = 15.

LÍNEA	MEDIA 7 días (mm ²)	MEDIA 14 días (mm ²)	MEDIA 28 días (mm ²)
TAK1	4,62 ± 0,77	62,02 ± 9,16	213,55 ± 30,01
CRISPR <i>MpDVL</i> 10	7,81 ± 1,86	69,39 ± 12,0	278,45 ± 47,50
CRISPR <i>MpDVL</i> 16	5,29 ± 1,14	64,84 ± 12,2	189,98 ± 42,66
EF1 <i>MpDVL</i> 2	3,12 ± 0,61	39,04 ± 4,83	170,70 ± 23,15
EF1 <i>MpDVL</i> 14	3,57 ± 1,03	44,02 ± 6,97	158,36 ± 30,04
EF1 <i>MpDVL</i> 15	2,99 ± 0,77	32,01 ± 6,36	133,21 ± 20,18
EF1 <i>MpDVL</i> 19	5,13 ± 1,44	29,14 ± 8,78	91,40 ± 19,47

A los 28 días de crecimiento, último punto en el que caracterizamos la morfología y área del talo de las diferentes líneas se puede observar en la **Figura 58** como las áreas se mantenían con un tamaño significativamente menor en las líneas sobreexpresoras *MpDVL* (**Tabla 8**), mientras que en el caso de las mutantes CRISPR existía una diferencia inesperada entre ambas

líneas. La línea CRISPR *MpDVL* 16 tenía un área similar al silvestre, como ya ocurría en los puntos de tiempo anteriores, mientras que la línea CRISPR *MpDVL* 10 destacaba por tener un tamaño notablemente mayor, tendencia que se observaba a los 7 días (**Tabla 8**).

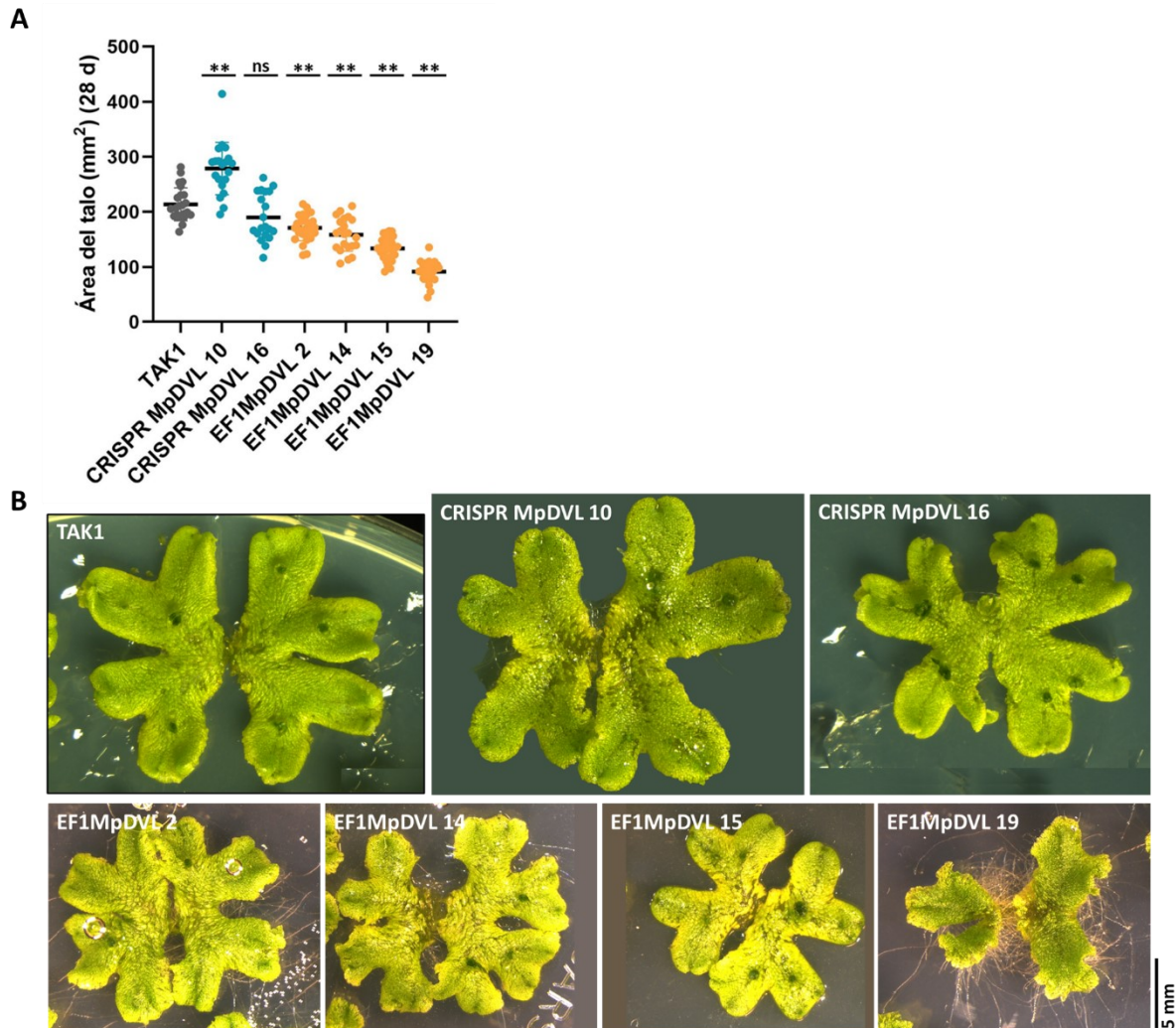


Figura 58. Morfología y tamaño del talo de las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL* a los 28 días de edad. Línea silvestre (TAK1), líneas mutantes generadas por CRISPR/Cas9 (CRISPR *MpDVL*) y líneas sobreexpresoras *MpDVL* (EF1*MpDVL*). A) Tamaño de plantas de 28 días de edad medida como el área de proyección del talo en mm², n ≥ 20. Las diferencias significativas se han calculado usando el test de Tukey post-hoc conjuntamente con ANOVA comparando las líneas mutantes/sobreexpresores *MpDVL* con el silvestre TAK-1. *p-values* **, p < 0,01; *, p < 0,05; ns, no significativo. B) Morfología del talo de gemas de 28 días de edad. Escala 5 mm.

En lo que a la morfología de los talos se refiere, tras 28 días de crecimiento y como puede observarse en la **Figura 58B**, las líneas mutantes CRISPR *MpDVL* 10 y CRISPR *MpDVL* 16, presentaban una forma muy similar a la de TAK-1, notando únicamente el mayor tamaño de la línea CRISPR *MpDVL* 10. Sin embargo, los cambios que se observaban en las líneas sobreexpresoras eran más evidentes, presentando un área de talo significativamente menor (**Figura 58A**) que se mantenía a lo largo del tiempo y con una morfología alterada (**Figura 58B**). Las líneas EF1:*MpDVL* 2 y EF1:*MpDVL* 14, con niveles de sobreexpresión de *MpDVL* muy similares

(Figura 55), presentaban una morfología muy parecida, con un talo más bifurcado en el que parece que se han producido más divisiones presentando más lóbulos a partir de los nichos apicales. La línea EF1:MpDVL 15, sin embargo, no presentaba cambios morfológicos muy evidentes aparte del tamaño del talo, lo que se podría corresponderse con los menores niveles de expresión de *MpDVL* con respecto a dos líneas anteriores (Figura 55). Por último y más sorprendentemente, la línea sobreexpresora EF1:MpDVL 19 tenía una morfología muy alterada, donde los extremos del talo crecían curvados hacia arriba, con un crecimiento desorganizado que no seguía la ramificación dicotómica o bifurcación desde los nichos apicales tan claramente como se observaba en el silvestre. En ocasiones presentaban una forma superpuesta y ondulada alrededor de la parte basal del talo y además tenían el rizoide más elongado y desorganizado, como ya se observaba en puntos anteriores (Figura 56B y Figura 57B). Estos fenotipos más extremos se corresponderían con la mayor expresión del gen *MpDVL* en esta línea (Figura 55).

En este punto temporal de 28 días también caracterizamos otros aspectos del desarrollo vegetativo como eran el número nichos apicales y el número de copas con gemas puesto que estas últimas ya estaban formadas en los talos silvestres de esta edad y no así en los puntos anteriores. Con respecto a las copas, a excepción de la línea mutante CRISPR *MpDVL* 16, que mostraba una morfología muy similar al silvestre (Figura 58A), todas presentaban un número de copas menor que el silvestre, con el extremo de la línea EF1:MpDVL 19 que todavía no tenía copas formadas (Figura 59).

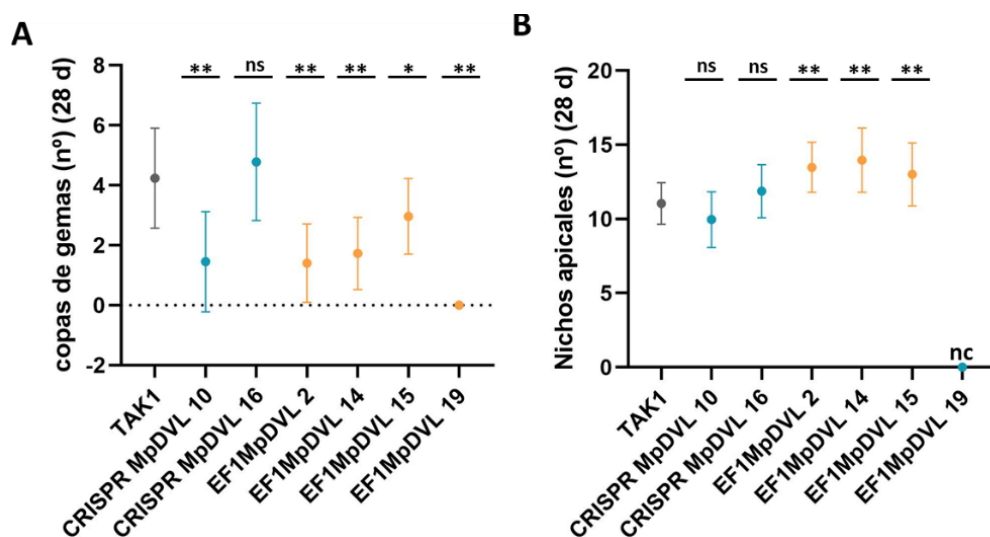


Figura 59. Fenotipo de las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL* a los 28 días de edad. Línea silvestre (TAK1), líneas mutantes generadas por CRISPR/Cas9 (CRISPR *MpDVL*) y líneas sobreexpresoras *MpDVL* (EF1:*MpDVL*). A) Número de copas con gemas. B) Número de nichos apicales de células meristemáticas. $n \geq 20$. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas se han calculado usando el test de Tukey post-hoc conjuntamente con ANOVA comparando las líneas mutantes/sobreexpresores *MpDVL* con el silvestre TAK-1. *p-values* **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$; ns, no significativo. nc, no cuantificable.

Los fenotipos anteriormente descritos para las líneas EF1:MpDVL 2 y EF1:MpDVL 14, en los que aparecían talos con más lóbulos se debía a un mayor número de nichos apicales por línea, tal y como puede observarse en la **Figura 59B**. El crecimiento desorganizado del talo de la línea EF1:MpDVL 19 impedía identificar los nichos apicales con claridad y por tanto cuantificarlos. En el caso de las líneas mutantes CRISPR, en las que la forma del talo era más similar a TAK-1 (**Figura 58B**), no se observaron diferencias en el número de nichos apicales (**Figura 59B**).

Hasta ahora, la caracterización fenotípica de las diferentes líneas generadas se había centrado sobre todo en la parte dorsal del talo, sin tener muy en cuenta las escalas y rizoides ventrales. Cabe recordar que en *Arabidopsis thaliana* los mutantes múltiples de los genes *DVL/RTFL* tenían defectos en el crecimiento de los pelos radiculares, estructuras unicelulares y tubulares con crecimiento unidimensional (apartado 1.8 de Resultados). Así, se consideró preciso el análisis de los rizoides de las líneas con actividad *MpDVL* alterada por tratarse de protuberancias unicelulares con un crecimiento distal y polarizado de la célula que da lugar a su forma tubular característica, pudiendo asemejarse tanto por forma como por función a los pelos radiculares de *Arabidopsis thaliana*.

Por tanto, se analizó el crecimiento de los rizoides de la línea mutante CRISPR *MpDVL* 10, que hasta ahora había demostrado más diferencias con respecto a la silvestre TAK-1, y de dos líneas sobreexpresoras: EF1:MpDVL 14 y EF1:MpDVL 15. Como puede observarse en la **Figura 60**, en gemas de dos días de edad podían observarse diferencias en el crecimiento de los rizoides. Mientras que en la línea silvestre TAK-1 los rizoides tenían un crecimiento distal caracterizado por una proyección recta de la punta de la célula (**Figura 60B**, recuadro naranja), en la línea CRISPR *MpDVL* 10 podía observarse un crecimiento menos uniforme, con una proyección ondulada de la punta de los rizoides (**Figura 60B**, recuadro verde). Por su parte, las líneas sobreexpresoras no presentaban diferencias en lo que a la ondulación de los rizoides se refiere con respecto al silvestre TAK-1. Podemos especular que el crecimiento alterado de la punta de las células rizoides en el mutante CRISPR *MpDVL* 10 podría estar relacionado con un defecto en la estabilización o desestabilización de los microtúbulos (Champion et al., 2021).

La caracterización fenotípica de la parte vegetativa mostró que tanto las líneas mutantes como las líneas sobreexpresoras *MpDVL* presentaban diferencias con respecto a la línea silvestre TAK-1, pudiendo tener alterados ciertos aspectos del crecimiento, la proliferación o la diferenciación celular que se evidencia en procesos alterados de desarrollo. Así, por ejemplo, el mayor tamaño de la línea mutante CRISPR *MpDVL* 10 y el menor tamaño generalizado de las

líneas sobreexpresoras EF1:MpDVL, podría estar asociado a una menor proliferación celular que se refleja en una mayor densidad de nichos apicales en estas líneas.

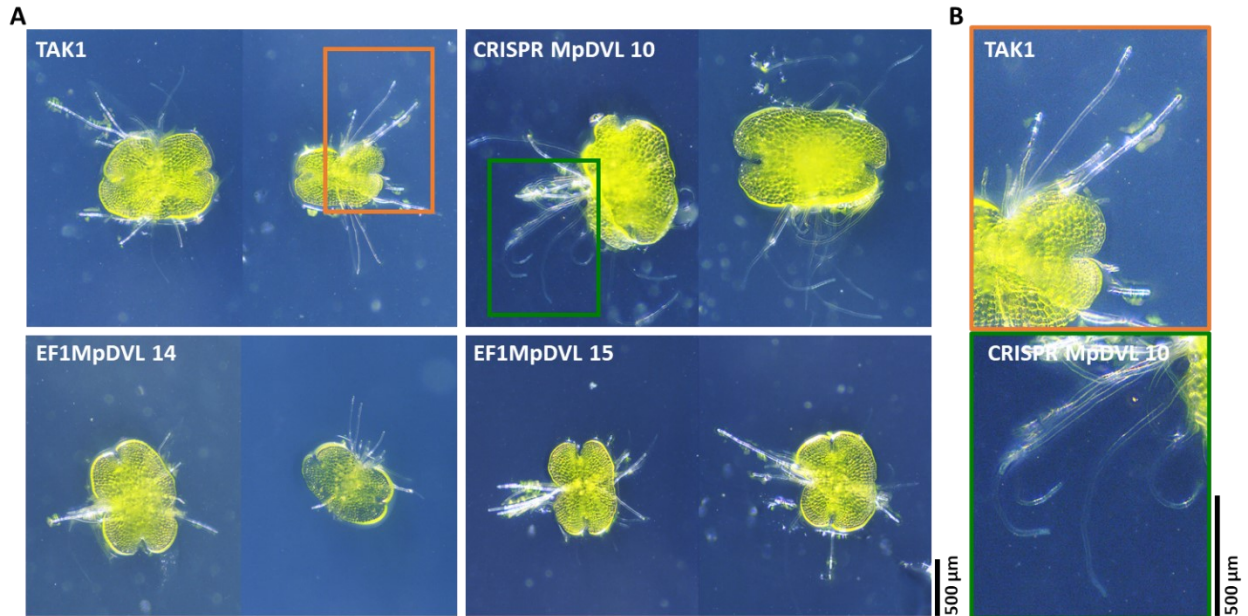


Figura 60. Morfología de los rizoides de línea mutante y sobreexpresoras *MpDVL* a los 2 días de edad. A) Imágenes de gemas representativas de 2 días de edad por la parte ventral del talo. Línea silvestre (TAK1), línea mutante generada por CRISPR/Cas9 (CRISPR *MpDVL* 10) y líneas sobreexpresoras *MpDVL* (EF1*MpDVL*). B) Ampliación de detalle de punta de rizoide de la línea silvestre (TAK1) (recuadrada en naranja) y línea CRISPR *MpDVL* 10 (recuadrada en verde). Escala 500 μm.

Además, y tal como ocurría en el caso de *Arabidopsis thaliana*, los fenotipos de sobreexpresión de *MpDVL* en *Marchantia polymorpha*, en la mayoría de los casos, eran más evidentes que los de pérdida de función de los genes *DVL/RTFL*.

Caracterización fenotípica del órgano reproductor sexual

Además de la caracterización fenotípica en la fase vegetativa haploide de la planta, también se quiso prestar atención a la formación de los órganos reproductores de *Marchantia polymorpha*. Estos órganos sexuales y en concreto el anteridióforo, órgano sexual correspondiente a la accesión masculina TAK-1 empleada en este trabajo, se inducen fácilmente bajo condiciones de luz de día largo suplementada con luz roja lejana (*Far Red* – FR).

En este caso se caracterizaron aquellas líneas que habían presentado diferencias más significativas en el desarrollo del talo en fase vegetativa, siendo éstas la línea mutante CRISPR *MpDVL* 10 y las líneas sobreexpresoras EF1:*MpDVL* 14 y EF1:*MpDVL* 19.

Tras 28 días creciendo en estas condiciones de luz FR, ya se podían observar diferencias entre las líneas silvestre TAK-1, la mutante CRISPR y las sobreexpresoras, en lo que a la formación de los anteridióforos se refiere. Como puede observarse en la **Figura 61**, la línea silvestre TAK-1 estaba empezando a desarrollar y formar los anteridióforos en los nichos apicales del talo

distinguiéndose los botones que darán lugar a los anteridióforos (cabezas de flechas amarillas). Por su parte, la línea mutante CRISPR *MpDVL* 10, aparte de presentar un talo con los lóbulos más engrosados y por ende una mayor área de talo, no presentaba ningún anteridióforo, ni formado, ni empezándose a desarrollar en los nichos apicales.

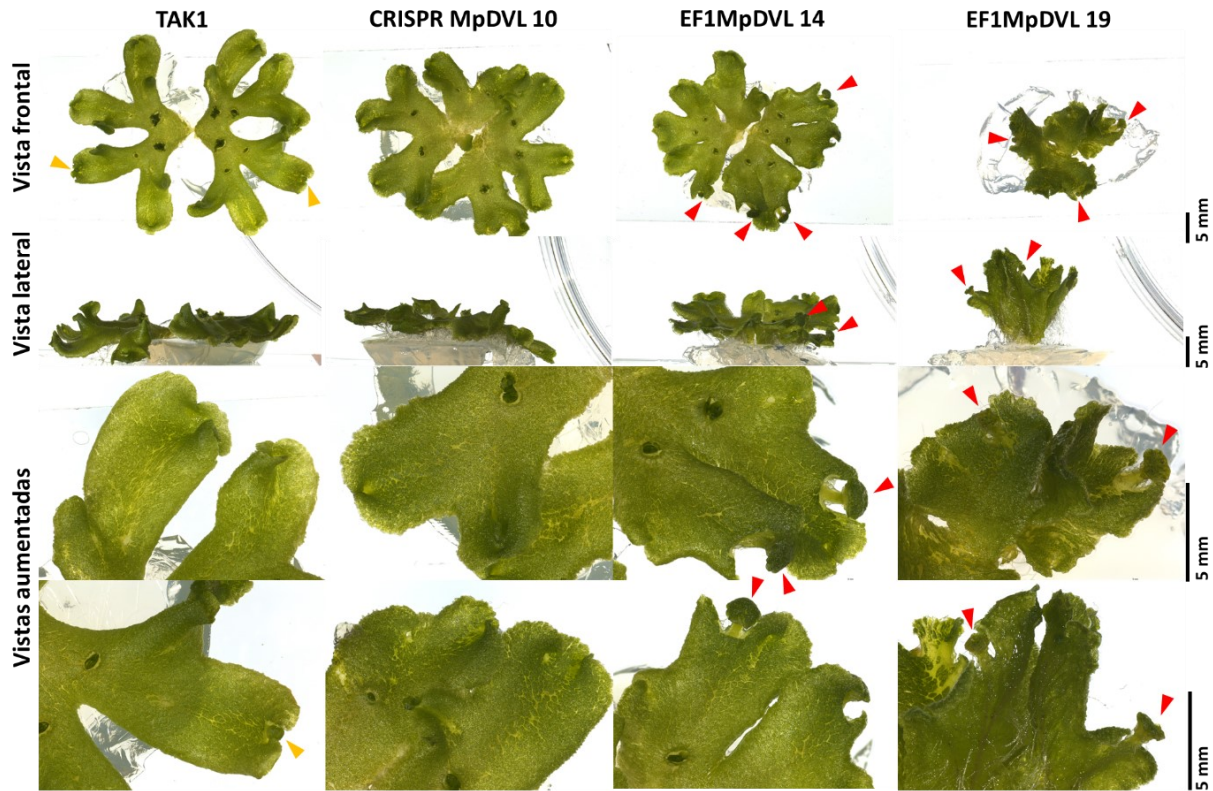


Figura 61. Caracterización de los anteridióforos en las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL* a los 28 días de crecimiento. Línea silvestre (TAK1), línea mutante generadas por CRISPR/Cas9 (CRISPR *MpDVL* 10) y línea sobreexpresoras *MpDVL* (EF1*MpDVL* 14 y EF1*MpDVL* 19) crecidas durante 28 días en luz continua suplementada con luz roja lejana (*Far Red*, FR). En la parte superior se muestra la vista frontal del talo completo, seguida de la vista lateral y en la parte inferior dos vistas frontales aumentadas. Los anteridióforos formados se indican con una cabeza de flecha roja, los anteridióforos en desarrollo se indican con una cabeza de flecha amarilla. Escala 5mm.

Por el contrario, la línea sobreexpresora EF1:*MpDVL* 14, tenía los anteridióforos ya formados y elongados a partir de los nichos de células meristemáticas (**Figura 61** - cabeza de flechas rojas). En el caso de la línea EF1:*MpDVL* 19, también encontrábamos anteridióforos ya formados y elongados (**Figura 61** - cabeza de flechas rojas), aunque en este caso con un tamaño menor que los de EF1:*MpDVL* 14 pero acordes al menor tamaño del área del talo. Así, la formación de los órganos sexuales masculinos parecía estar adelantada en las líneas que sobreexpresan *MpDVL*.

A los 42 días de crecimiento, tal como puede observarse en la **Figura 62**, en la línea silvestre TAK-1 ya se habían formado y elongado los anteridióforos en las regiones meristemáticas de los nichos del talo (cabeza de flecha roja), mientras que en la línea mutante

CRISPR *MpDVL* 10 seguía sin apreciarse ningún anteridióforo ni botón que fuera a dar lugar a estos órganos. Las líneas sobreexpresoras mantenían los anteridióforos que ya se encontraban formados y elongados con anterioridad (**Figura 61** y **Figura 62**).

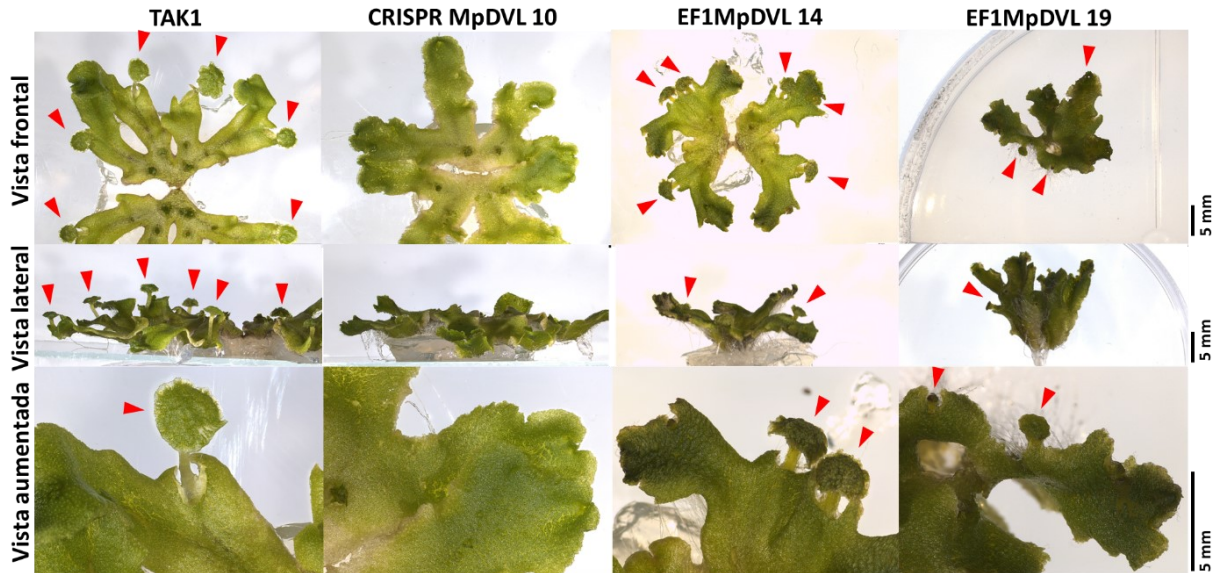


Figura 62. Caracterización de los anteridióforos en las líneas mutantes y sobreexpresoras MpDVL a los 42 días de crecimiento. Línea silvestre (TAK1), línea mutante generada por CRISPR/Cas9 (CRISPR MpDVL 10) y líneas sobreexpresoras MpDVL (EF1MpDVL 14 y EF1MpDVL 19) crecidas durante 42 días en luz continua suplementada con luz roja lejana (*Far Red*, FR). En la parte superior se muestra la vista frontal del talo completo, seguida de la vista lateral y en la parte inferior una vista frontal aumentada. Los anteridióforos formados se indican con una cabeza de flecha roja. Escala 5mm.

Para cuantificar lo observado (**Figura 61** y **Figura 62**) se anotó el momento en el que aparecía el primer anteridióforo visiblemente formado en cada línea. Así, en la línea silvestre los anteridióforos se formaban tras 30 días de crecimiento en condiciones de luz continua suplementada con luz roja lejana. En las líneas sobreexpresoras, como ya se observaba (**Figura 61**), se producían los anteridióforos con anterioridad al silvestre, apareciendo a los 24 días en ambas líneas (**Figura 63**). Por su parte, en la línea mutante CRISPR *MpDVL* 10, el proceso de formación de anteridióforos se encontraba retrasado, puesto que tras 28 y 42 días de crecimiento (**Figura 61** y **Figura 62**) no se observaba ningún órgano sexual formado, pero sí llegaban a aparecer tras 65 o 70 días de crecimiento (**Figura 63**).

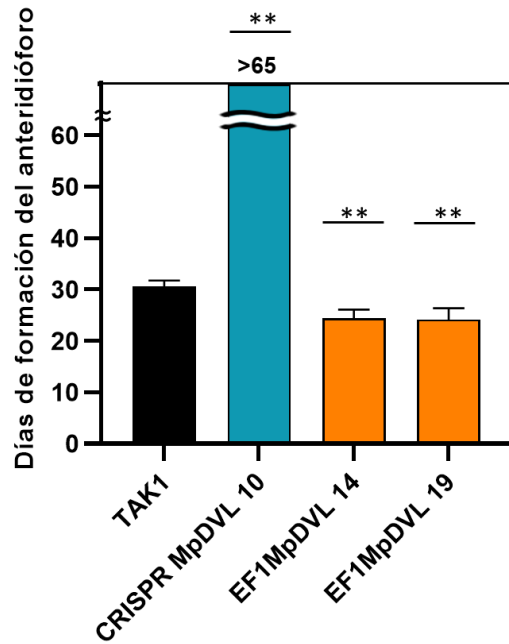


Figura 63. Día de aparición de los anteridióforos completamente formados en las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL*. Línea silvestre (TAK1), línea mutante generada por CRISPR/Cas9 (CRISPR MpDVL 10) y líneas sobreexpresoras MpDVL (EF1MpDVL 14 y EF1MpDVL 19) crecidas en luz continua suplementada con luz roja lejana (*Far Red*, FR), $n \geq 12$. Las diferencias significativas se han calculado usando el test de Tukey post-hoc conjuntamente con ANOVA comparando las líneas mutantes/sobreexpresores MpDVL con el silvestre TAK-1. *p-values* **, $p < 0,01$.

Además de la formación de los anteridióforos, el análisis de las plantas en estas fases de crecimiento permitió observar los aspectos ya destacados con anterioridad referentes al tamaño del área del talo o la formación de copas y gemas. Así, se confirmó que los talos en la línea mutante eran más grandes en superficie que los silvestres, mientras que en las líneas sobreexpresoras el área era menor (**Figura 58**). Por otra parte, las líneas sobreexpresoras, a diferencia de la silvestre y las mutantes, cuyo crecimiento era más aplanado, se alargaron en dirección vertical contra la superficie de la placa con un margen de talo más ondulado e irregular que el de TAK-1 (**Figura 61** y **Figura 62** - vista lateral). Por último, cabe destacar las diferencias existentes en la formación de copas y gemas entre las diferentes líneas. Mientras que, en la línea silvestre TAK-1, tras 28 días creciendo con luz continua suplementada con FR, las copas de gemas aparecían típicamente una vez en cada bifurcación del talo (**Figura 61** - vista frontal), la línea CRISPR *MpDVL* 10 presentaba menos copas y con menos gemas ya formadas saliendo por fuera de la cavidad de la copa como sí ocurría con la silvestre. En el caso de la línea EF1:*MpDVL* 14, también aparecían copas de tamaño reducido y en la línea EF1:*MpDVL* 19, ni siquiera se llegaban a observar copas formadas (**Figura 62** - vista frontal).

3.4. Caracterización del papel de *MpDVL* en el crecimiento de *Marchantia* vía división celular.

La caracterización fenotípica de las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL* llevó a plantearse la posibilidad de que este gen, *MpDVL*, estuviera afectando a la proliferación celular y así a la morfogénesis de la planta. Las gemas de *Marchantia polymorpha* poseen dos nichos apicales en los cuales tienen lugar procesos de proliferación celular y crece por bifurcación de los nichos apicales (Solly et al., 2017).

Para determinar, por tanto, si la división celular está afectada en las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL*, marcamos las células en fase S de ciclo celular con tinción 5- ethynyl-20-deoxyuridine (EdU) (Nishihama et al., 2015; Furuya et al., 2018; Busch et al., 2019; Hernández-García et al., 2021) y se observaron las señales nucleares en las regiones apicales de gemas de 7 días de edad.

Como ocurría en la caracterización fenotípica de la fase vegetativa de las diferentes líneas, los márgenes ondulados e irregulares de la línea sobreexpresora EF1:*MpDVL* 19 impidieron observar los nichos apicales marcados con claridad, por lo que no se muestra el análisis de la división celular de esta línea. Por su parte, los nichos apicales de la línea silvestre TAK-1, las líneas mutantes CRISPR *MpDVL* 10 y 16, y las sobreexpresoras EF1:*MpDVL* 14 y 15, no presentaban diferencias aparentes en lo que a núcleos en fase S se refiere (**Figura 64A**). Para analizar este aspecto más detalladamente, se cuantificó el número de nichos apicales en estas gemas de 7 días sin encontrarse diferencias significativas (**Figura 64B**), así como el número de núcleos marcados con EdU por nicho apical que tampoco presentaba diferencias entre líneas (**Figura 64C**).

Con estos datos podía decirse que la proliferación celular vía división celular no se encontraba alterada en las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL* con respecto a la silvestre TAK-1, al menos en los estadíos analizados.

Sin embargo, al medir el área de los núcleos marcados con EdU, sí que parecía verse una diferencia entre la línea silvestre y la línea mutantes CRISPR *MpDVL* 10, siendo los núcleos marcados de esta última de un mayor tamaño (**Figura 64D**).

Este último aspecto llevó a preguntarnos si las células de esta línea mutante tenían un mayor tamaño que las de la línea silvestre o resto de líneas analizadas. Para intentar determinar esto, se observaron gemas de las diferentes líneas mediante microscopio electrónico de barrido (SEM) para ver en detalle la superficie celular de gemas de 7 días de edad.

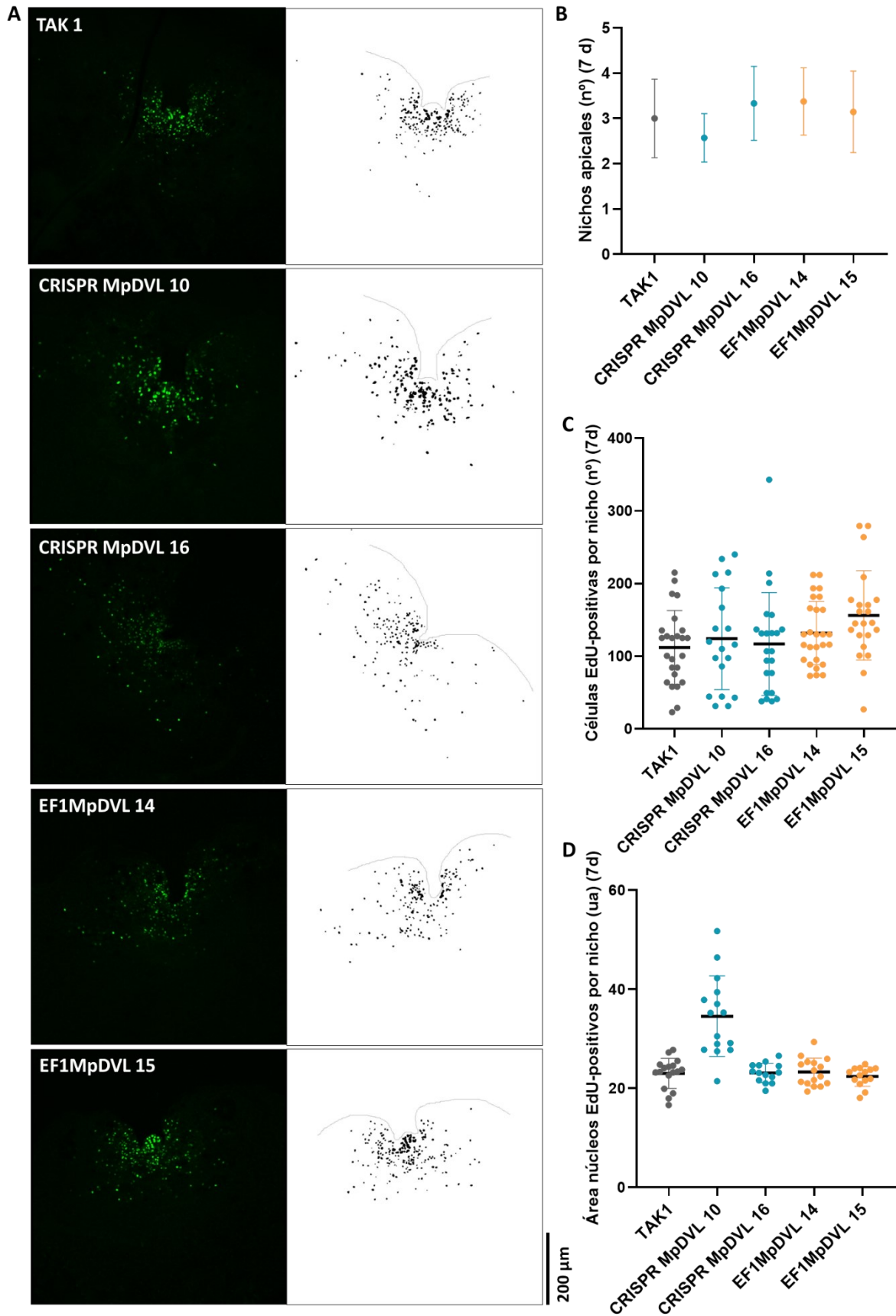


Figura 64. Visualización de los núcleos en fase S de división celular en líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL* a los 7 días de edad. Línea silvestre (TAK1), líneas mutantes generadas por CRISPR/Cas9 (CRISPR *MpDVL*) y líneas sobreexpresoras *MpDVL* (EF1*MpDVL*). A) Núcleos marcados con tinción EdU en nichos apicales de gemas de 7 días. A la izquierda se encuentra la imagen obtenida por

microscopía confocal en la que los núcleos marcados tienen señal de fluorescencia verde. A la derecha aparece la proyección del nicho apical con los núcleos que han sido contabilizados en negro y el perímetro del nicho apical marcado. Escala 200 μm . B) Número de nichos apicales de células meristemáticas. C) Número de núcleos EdU-positivos por nicho apical. D) Área de los núcleos EdU-positivos por nicho apical. $n \geq 18$. Los datos representan la media de las áreas de cada uno de los nichos apicales \pm la desviación estándar de las medias.

Aparte de la notable diferencia de tamaño de talo ya descrita con anterioridad (**Figura 56**), por la cual nos encontrábamos ante un talo de mayor tamaño en las líneas mutantes CRISPR *MpDVL* y un talo con una superficie menor en las líneas que sobreexpresan *MpDVL*, también notamos a simple vista una diferencia en lo referente a la formación de poros aeríferos en la parte dorsal del talo (**Figura 65**).

El número de poros aeríferos en las líneas mutantes CRISPR *MpDVL* 10 y CRISPR *MpDVL* 16 era significativamente mayor en comparación con la línea silvestre (**Figura 65** y **Figura 66A**). Además, las líneas sobreexpresoras EF1:*MpDVL* 14 y EF1:*MpDVL* 15 tenían un menor número de poros aeríferos en comparación con TAK-1, aunque esta diferencia solo era estadísticamente significativa en el caso de la línea EF1:*MpDVL* 14 (**Figura 65** y **Figura 66A**). Al igual que en las caracterizaciones anteriores, la cuantificación de la línea EF1:*MpDVL* 19 no fue posible debido a la morfología tan irregular de su talo, en el que el ángulo entre el talo y el medio es muy acusado y los márgenes son muy curvados y se superponen y pliegan entre sí (**Figura 65**).

Los poros aeríferos se asocian a una de las dos zonas diferenciadas de desarrollo de la región dorsal de la gema de *Marchantia polymorpha*. Por un lado nos encontramos la zona de diferenciación que consiste en células dorsales diferenciadas derivadas de los nichos apicales, como aquellas que dan lugar a los poros aeríferos; y por el otro estaría la zona central conformada por tipos celulares que son inactivos desde el punto de vista del desarrollo donde las células no se dividen (Briginshaw et al., 2022).

Un mayor número de poros aeríferos podía significar, por tanto, un aumento o adelanto de la actividad apical en las líneas mutantes CRISPR *MpDVL*. Para caracterizar en profundidad este defecto de diferenciación en las líneas con la actividad *MpDVL* alterada, se decidió cuantificar la extensión de la zona de diferenciación dorsal. Así, teniendo en cuenta el límite discernible entre la zona de diferenciación y la región central del talo, se evaluó el índice de área de diferenciación como el valor del área de diferenciación, donde se encuentran los poros aeríferos, dividido entre el área total del talo (Briginshaw et al., 2022) en gemas de 7 días de edad (**Figura 66B** y **66C**).

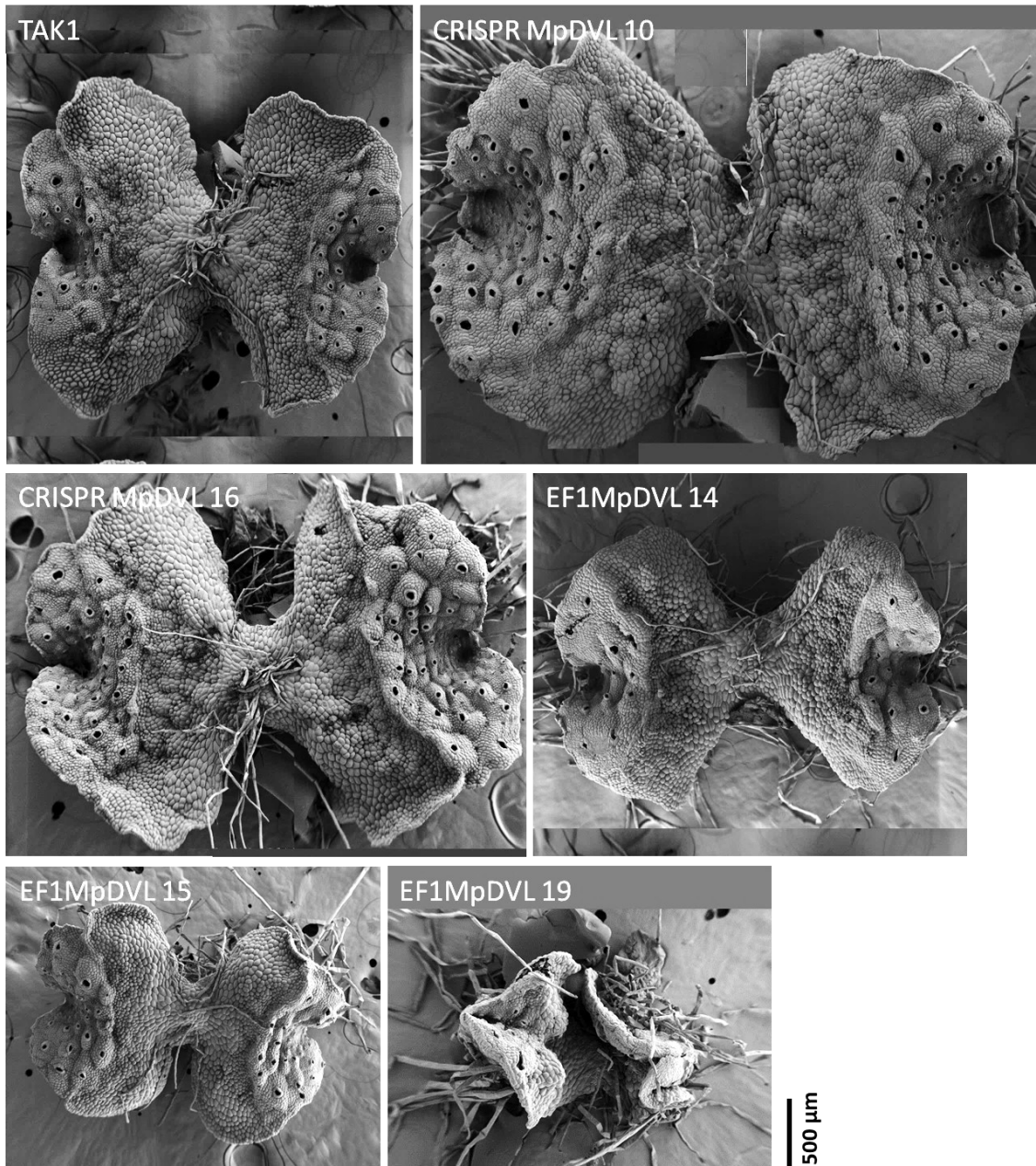


Figura 65. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpdVL* a los 7 días de edad. Línea silvestre (TAK1), líneas mutantes generadas por CRISPR/Cas9 (CRISPR *MpdVL*) y líneas sobreexpresoras *MpdVL* (EF1*MpdVL*). Escala 500 µm.

Las líneas mutantes CRISPR *MpdVL* tenían un índice de área de diferenciación mayor que la línea silvestre, lo que se correlaciona con el mayor número de poros aeríferos y una mayor capacidad de diferenciación del tejido dorsal. Esto nos da una idea del papel de *MpdVL* como un regulador negativo de la diferenciación celular en *Marchantia polymorpha* en su fase vegetativa. Por el contrario, en las líneas sobreexpresoras EF1:*MpdVL* 14 y EF1:*MpdVL* 15, no se observaba una correlación entre el menor número de poros (**Figura 66A**) y el índice de área de diferenciación mayor comparado con el silvestre (**Figura 66B**) pareciendo por tanto que existiera

una menor densidad de poros en esta zona, encontrando un menor número de poros por área pero dándose un proceso de diferenciación mayor que en el silvestre.

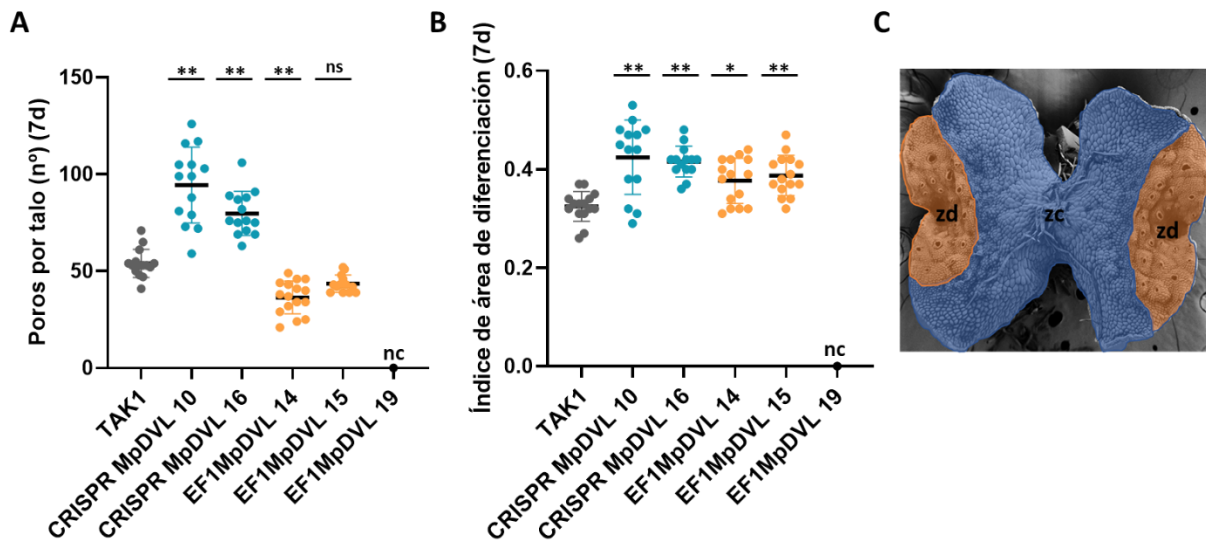


Figura 66. Zona de diferenciación en talos de las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL* a los 7 días de edad. Línea silvestre (TAK1), líneas mutantes generadas por CRISPR/Cas9 (CRISPR *MpDVL*) y líneas sobreexpresoras *MpDVL* (EF1*MpDVL*). A) Número de poros por talo. B) Índice de área de diferenciación calculado como el área de la zona diferenciación (zd) dividido por el área total del talo (zona de diferenciación-zd + zona central-zc). (A, B) $n \geq 12$. Los datos representan la media \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas se han calculado usando el test de Tukey post-hoc conjuntamente con ANOVA comparando las líneas mutantes/sobreexpresores *MpDVL* con el silvestre TAK-1. *p*-values **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$; ns, no significativo. nc, no cuantificable. C) Esquema representativo de las zonas consideradas para el cálculo del índice de área de diferenciación calculado como el área de diferenciación (zd, en naranja) dividido por el área total del talo (zd+zc) (zc, en azul).

En lo que a la morfología de las células de la parte dorsal del talo se refiere, no parecía haber diferencias entre las diferentes líneas aunque sí que parecían ser más grandes en el caso de las líneas CRISPR *MpDVL*. La forma de las células en la zona central ya madura y las células de diferenciación entre las que se encuentran aquellas que forman el poro aérfiero, no presentaban diferencias aparentes entre la línea silvestre y las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL*. Además, no parecían existir defectos en la polaridad de las diferentes líneas, con los tipos celulares de la zona dorsal correctamente posicionados (**Figura 65**).

3.5. Caracterización de la localización de *MpDVL* en *Marchantia polymorpha*.

Otro aspecto a estudiar fue determinar dónde se localizaba el péptido *MpDVL* en *Marchantia polymorpha* a lo largo del desarrollo de la parte vegetativa. Para ello se generó una construcción en la que la secuencia codificante del gen *MpDVL* se encontraba dirigida bajo la expresión de su propio promotor (*MpDVL_{pro}*) y, además, estaba fusionada al gen reportero *GUS* (**Figura 67**). Así, se obtuvieron fusiones traduccionales que podrían permitir determinar la localización tisular del péptido *MpDVL*.



Figura 67. Representación esquemática de la construcción generada para el estudio del patrón de localización de MpDVL. Las construcciones se generaron fusionando el promotor del gen *MpDVL* ($MpDVL_{pro}$) de 2811 pb, a la CDS del gen *MpDVL* sin el codón de parada y el gen reportero *GUS* contenido en el vector final pMPGWB304.

Con esta construcción se agroinfiltraron cortes de *Marchantia polymorpha*, ecotipo TAK-1 y, de los explantes que crecieron y formaron copas con gemas en medio de selección con el antibiótico clorsulfuron, se propagaron asexualmente de manera clonal mediante gemas. Para conocer la localización de MpDVL a lo largo del desarrollo de la parte vegetativa, se analizó la actividad β -glucuronidasa de las líneas propagadas a los 7, 14 y 28 días de crecimiento del talo.

Como puede observarse en la **Figura 68**, en la que vimos el patrón de localización de *MpDVL* en dos líneas independientes $MpDVL_{pro}:MpDVL:GUS$, a los 7 días de crecimiento del talo, la señal GUS se localizaba en la zona central del talo y en los nichos apicales de células meristemáticas, correspondientes a las zonas de diferenciación, así como en la región entre estas dos zonas, correspondiente a la zona de elongación. Esta localización se puede relacionar con los fenotipos diferenciados de las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL* en lo que a la formación de poros se refiere (**Figura 65**).

Tras 14 días de crecimiento de talo, la señal parecía más leve pero también se encontraba en la zona central y la zona expandida de los dos primeros lóbulos bifurcados, sin embargo, no se concentraba en los nichos de células madre (**Figura 68**). La zona y momento temporal donde encontrábamos señal GUS podía relacionarse con el momento de formación de las copas que contienen las gemas, aspecto de la caracterización en el que también encontramos diferencias entre las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL* con respecto a la línea silvestre (**Figura 59A**).

A los 28 días de crecimiento, se pudo observar una localización muy generalizada de MpDVL en todo el talo, encontrándose claramente en los nichos apicales (**Figura 68**) hecho que puede relacionarse tanto con las diferencias en el número de nichos apicales en las líneas sobreexpresoras EF1:MpDVL (**Figura 59B**) como con el inicio de la formación de los anteridióforos en estas zonas meristemáticas punto en el que se encontraban claras diferencias entre las línea silvestre TAK-1, la mutante CRISPR *MpDVL* 10 y las sobreexpresoras EF1:MpDVL 14 y 19 (**Figura 61**).

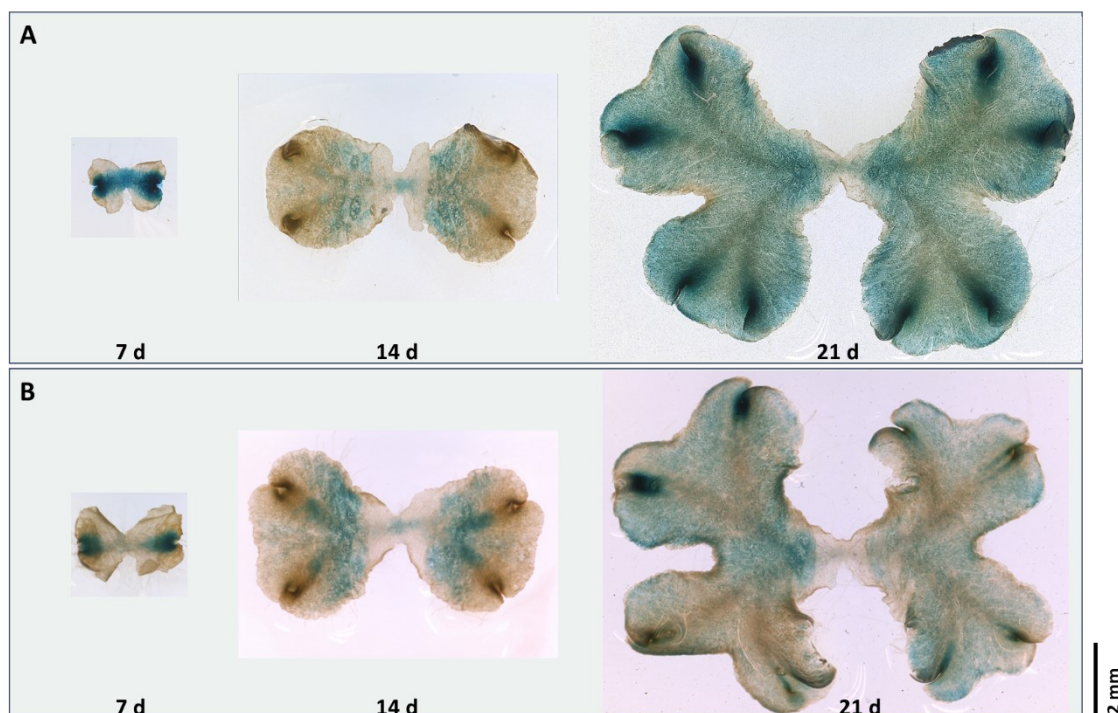


Figura 68. Patrón de localización de MpDVL en *Marchantia polymorpha*. Detección histoquímica de actividad β -glucuronidasa en la línea reportera MpDVL_{pro}:MpDVL:GUS #3 (A) y de la línea reportera MpDVL_{pro}:MpDVL:GUS #3 (B) en fondo TAK-1. Aparece una imagen correspondiente a cada punto de crecimiento de talos de 7, 14 y 21 días. Escala 2 mm.

Para conocer si *MpDVL* se expresa más en un momento u otro de crecimiento del talo, se decidió cuantificar los niveles de expresión de *MpDVL* en talos silvestres TAK-1 a los 7, 14 y 21 días de crecimiento, mismos puntos en los que se había analizado la actividad GUS. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas, siendo muy similar el nivel de expresión de *MpDVL* en los talos de 7, 14 y 28 días (**Figura 69**).

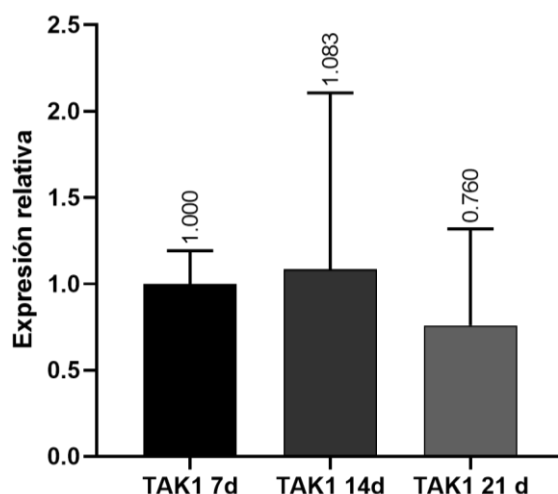


Figura 69. Niveles de expresión de MpDVL en *Marchantia polymorpha* silvestre a los 7, 14 y 21 días de crecimiento. Se muestran los niveles de expresión del gen *MpDVL* en la línea silvestre TAK1 en talos tras 7 días, 14 días y 21 días de crecimiento. Los niveles de expresión son relativos con respecto a la expresión del gen en el silvestre TAK1 tras 7 días de crecimiento, que tiene un valor de 1, y al gen constitutivo *MpEF1a*. Se indica el valor medio entre las tres réplicas técnicas en la base de la columna. Las barras de error indican límite superior e inferior de las tres réplicas técnicas.

Esta localización y expresión del péptido MpDVL junto con la caracterización previa de las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL*, nos indica el papel generalizado de MpDVL en los diferentes procesos a lo largo del desarrollo en *Marchantia polymorpha*.

3.6. Estudio de la capacidad de MpDVL de *Marchantia polymorpha* para formar homodímeros.

Por último, para completar la caracterización del homólogo MpDVL en *Marchantia polymorpha* y puesto que se había visto la capacidad de los péptidos DVL1 y DVL11 de *Arabidopsis thaliana* de formar homodímeros en ensayos de topología de proteínas de membrana en células de riñón humano (apartado 2.1 de Resultados), y formar heterodímeros en ensayos de BIFC en *Nicotiana benthamina* (apartado 2.2 de Resultados), se decidió estudiar la capacidad del péptido MpDVL de *Marchantia polymorpha* para formar homodímeros.

Para este fin se clonó la región codificante del gen *MpDVL* y se fusionó tanto a la región C-terminal como N-terminal de la proteína fluorescente YFP utilizando los plásmidos pYFC43 y pYFN43, respectivamente, como ya se había hecho con anterioridad para comprobar las interacciones entre los péptidos DVL1 y DVL11 de *Arabidopsis* y sus proteínas interactoras candidatas. Tras esto se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamina* con la combinación pYFP^N-MpDVL + pYFP^C-MpDVL y, tres días después de la infiltración, se analizó la fluorescencia de las hojas agroinfiltradas en el microscopio confocal. Para este ensayo se emplearon los mismos controles positivo y negativo empleados para las interacciones de *Arabidopsis*, PISTILATA (PI) y APETALA (AP3), y AGAMOUS (AG) y SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1), respectivamente. También se infiltró el vector pYFP^C-MpDVL solo como control negativo.

Como puede observarse en la **Figura 70**, sí se detectó complementación de la fluorescencia en todos los cortes de las hojas agroinfiltradas con la combinación pYFP^N-MpDVL + pYFP^C-MpDVL. La fluorescencia se observa clara y mayoritariamente en la membrana plasmática, tal y como era de esperar, y en algunos casos puede detectarse en los núcleos de las células de la epidermis de *Nicotiana* (último panel de la **Figura 70**).

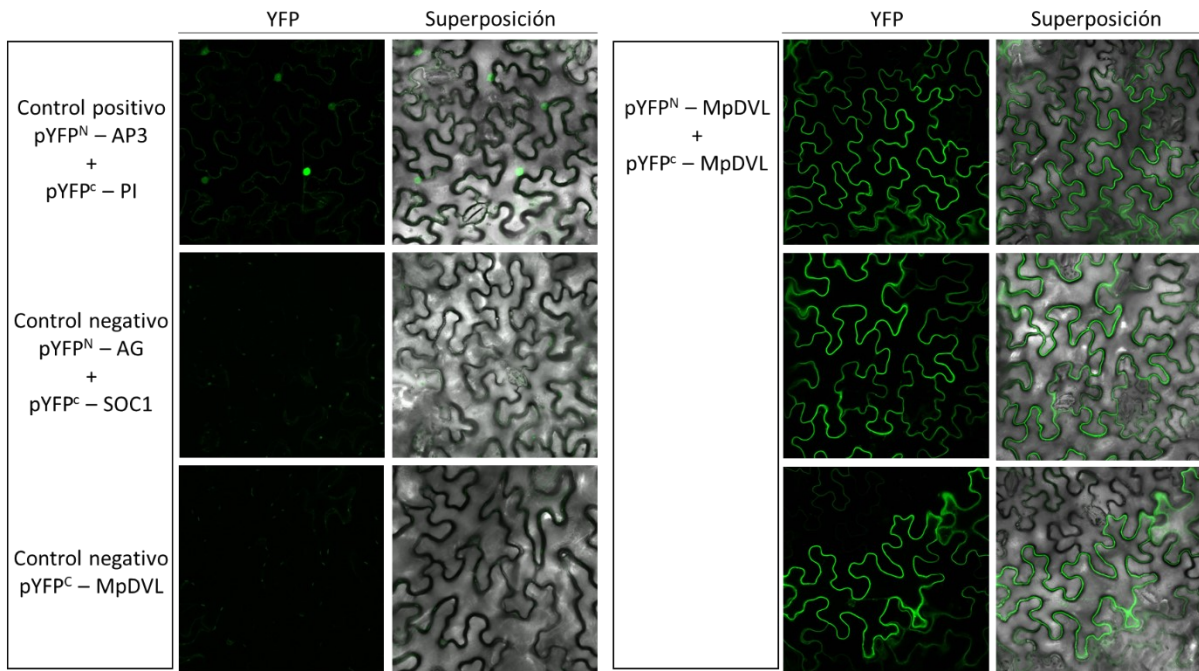


Figura 70. Formación de homodímeros de MpDVL. Ensayo de BIFC *in vivo* en hojas de *Nicotiana benthamiana* probando la interacción de MpDVL-MpDVL. Imágenes de microscopía confocal de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda de la figura. Aparece una imagen de la fluorescencia de la proteína YFP (izquierda) y una de la superposición de la señal fluorescente y la imagen en campo claro de la epidermis de las hojas (derecha). Se incluyen las imágenes correspondientes del control positivo pYFP^N-AP3 + pYFP^C-PI y los controles negativos pYFP^N-AG + pYFP^C-SOC1 y pYFP^C-MpDVL. Se muestran tres imágenes de tres cortes diferentes de la interacción pYFP^N-MpDVL + pYFP^C-MpDVL.

Estos resultados confirmaron la capacidad de MpDVL de formar dímeros, tal y como ya ocurre con sus homólogos de *Arabidopsis thaliana*. Además de seguir apoyando la idea de que la función de los péptidos DVL está conservada entre las especies *Marchantia polymorpha* y *Arabidopsis thaliana*, y probablemente entre las diferentes especies de plantas.

DISCUSIÓN



Las mutaciones de DVL/RTFL reducen la robustez de los patrones de crecimiento celular

Los genes *DVL/RTFL* fueron identificados en *Arabidopsis* por los fenotipos que confiere su sobreexpresión, que causa cambios morfológicos pronunciados a lo largo del desarrollo (Wen et al., 2004). Sin embargo, la pérdida de función de uno o varios miembros de la familia génica no ha mostrado provocar cambios evidentes en el desarrollo, siendo prácticamente invisibles en una caracterización macroscópica de la morfología de *Arabidopsis thaliana*. Los fenotipos tan característicos de las hojas de roseta, inflorescencias y frutos de las líneas sobreexpresoras *DVL/RTFL* nos llevaron a buscar, en primera instancia, cambios morfológicos en estos órganos en las líneas con actividad reducida *DVL/RTFL*, sin éxito (**Figura 19**). Hay que tener en cuenta que durante el desarrollo de esta tesis solo ha sido posible llegar a mutar de manera estable 10 de los 24 miembros de la familia *DVL/RTFL*, por lo que 14 de ellos conservan su función. La falta de cambios morfológicos visibles en el décuple mutante obtenido es compatible con la hipótesis de la existencia de una elevada redundancia génica entre los miembros de la familia (Narita et al., 2004; Guo et al., 2015) y así sería necesario mutar más genes para observar las consecuencias de la pérdida de función completa *DVL/RTFL*.

Es posible que los péptidos *DVL/RTFL* desempeñen papeles ocultos que solo bajo determinadas condiciones sean relevantes para los procesos de desarrollo o la respuesta al estrés, por ejemplo. Además, quizá podría existir una cierta especificidad funcional dentro de los subclados de la familia, como de algún modo sugiere los fenotipos morfológicos no totalmente idénticos de la sobreexpresión de distintos miembros de la familia. Ésta ha sido la razón de la estrategia mutacional llevada a cabo, en la que primeramente se mutaron los genes pertenecientes a un mismo clado (**Figura 13**), asumiendo que los genes más cercanos filogenéticamente también eran más probablemente redundantes y que la pérdida de función de todos los genes de un clado podría tener efectos observables que no se manifestarían si se mutaban genes de clados distintos donde otros parálogos cercanos podrían asumir la función del gen *DVL/RTFL* mutado más cercano. Sin embargo, el quintuple mutante *rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* no presenta ningún fenotipo evidente (**Figura 16**), lo cual de nuevo puede explicarse por la posible redundancia funcional general de todos los miembros de la familia, aunque también es compatible con que los genes de este clado compartan roles ocultos en procesos específicos, o bien que el resto de genes que no estén mutados alteren su expresión para suplir la función de los que sí lo están.

Uno de los aspectos que nos permitió estudiar el análisis transcriptómico de los quintuples mutantes *rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* y *dvl1 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* llevado a cabo fue éste de la redundancia génica. Los resultados determinaron que no existía ninguna compensación activa

DISCUSIÓN

por parte del resto de miembros no mutados, pues éstos no cambiaban su expresión ante la falta de los genes que sí estaban mutados (**Tabla 2**). Por tanto, se puede decir que, probablemente, entre los miembros de la familia *DVL/RTFL* existe una compensación pasiva o verdadera redundancia génica, y que ésta probablemente sea extrema pues no se observa ningún efecto evidente tras mutar 10 de los 24 miembros. Aunque así, sigue existiendo la posibilidad de que los péptidos *DVL/RTFL* desempeñen papeles ocultos que solo sean destacables en otras condiciones o procesos que no hemos explorado en este estudio, y que los efectos de su pérdida de función solo sean notables en estas condiciones.

El hecho de que la posible compensación funcional o redundancia dentro de la familia *DVL/RTFL* se haya mantenido a lo largo de la evolución podría relacionarse con que, en muchas ocasiones, la compensación funcional de genes duplicados se preserva para tamponar posibles fallos en funciones esenciales de los genes implicados (Hanada et al., 2009). Por tanto, estos genes redundantes contribuyen a la solidez o robustez genética, entendida como la capacidad de un sistema para mantener su función a pesar de variaciones genéticas o ambientales (Hanada et al., 2009; Diss et al., 2014; El-Brolosy and Stainier, 2017). Es probable que la compensación pasiva entre genes parálogos sea la base de muchos casos de solidez o robustez genética de las funciones celulares, de manera que la pérdida de un gen puede ser compensada por otro con funciones superpuestas (Diss et al., 2014). Así, los genes *DVL/RTFL* podrían estar dando robustez al sistema de desarrollo de la planta a través de la redundancia génica que existiría entre los diferentes miembros de la familia.

El análisis transcriptómico llevado a cabo también ha permitido identificar procesos, morfológicamente no muy evidentes, en los que los genes *DVL/RTFL* podrían estar actuando. El estudio de términos GO relacionados con procesos biológicos significativamente alterados en ambos quintuples mutantes destacó la morfogénesis como categoría general, así como el crecimiento y desarrollo del tubo polínico o el crecimiento distal de la célula, procesos de crecimiento celular más concretos que podrían incluirse dentro de la morfogénesis (**Figura 21 y Anexo II**).

Así, y para intentar determinar en qué medida estaban afectados dichos procesos, se llevaron a cabo experimentos de germinación de polen y crecimiento del tubo polínico, sin encontrarse diferencias significativas en la formación del tubo polínico (**Figura 28, Figura 29 y Figura 30**). Sin embargo, sí se observó una mayor dispersión de los datos en las longitudes de los tubos polínicos en el mutante (**Figura 31**). Esta mayor distribución en los datos también se evidenció en el caso de la producción de semillas por silicua de las plantas mutantes (**Figura 33**). Además, la variación en los datos por la cual nos encontrábamos silicuas con un número mucho

menor de semillas, así como con un número mayor que la media de las plantas silvestres era independiente de la planta, excluyendo que se debiera a la posible segregación de modificadores genéticos no identificados (**Figura 34**), así como independiente de la posición de la silicua que se analizase dentro de la misma planta (**Figura 35**). Por tanto, el incremento en la distribución de los datos en el nóuple mutante *dvl/rtfl* se observaba en todos los individuos, sugiriendo un efecto generalizado de la pérdida de función *DVL/RTFL*.

Seguidamente, y para investigar si el papel de los péptidos DVL/RTFL era exclusivo del crecimiento del tubo polínico o era más general de otros procesos de elongación celular, también se analizó el crecimiento de los pelos radiculares, puesto que tanto los tubos polínicos como los pelos radiculares se caracterizan por un crecimiento distal o unidimensional de la célula (Schiefelbein et al., 1993; Hepler et al., 2001; Šamaj et al., 2006). En este caso sí aparecieron diferencias significativas en cuanto a la longitud de los pelos radiculares y, además, también una mayor dispersión o variación en los datos en el caso de las plantas mutantes (**Figura 36**). Estos datos sugirieron que los péptidos DVL/RTFL tienen un papel generalizado aportando robustez al proceso de elongación celular.

Nuestros resultados muestran la importancia de analizar las distribuciones fenotípicas para estudiar la genética de la robustez. Así, es importante no fijarse solo en los valores promedios a la hora de cuantificar los diferentes aspectos fenotípicos de una población, sino que resulta fundamental analizar la varianza para estudiar la robustez y por tanto la capacidad de un sistema para mantenerse estable a pesar de las perturbaciones (Boukhibar and Barkoulas, 2016). Además, las distribuciones fenotípicas proporcionan información valiosa sobre los individuos de la población. De hecho, la heterogeneidad fenotípica es abundante incluso en individuos genéticamente idénticos y en muchos casos esta heterogeneidad puede ser crítica para múltiples procesos (Boukhibar and Barkoulas, 2016). Así en plantas, se han visto ejemplos de una variabilidad considerable en el crecimiento en el caso de la epidermis de las hojas o del meristemo (Elsner et al., 2012; Kierzkowski et al., 2012; Uyttewaal et al., 2012).

También hay que tener en cuenta que para cualquier fenotipo cuantificable, los mutantes clásicos del desarrollo se han definido como aquellos que son capaces de modificar la media de los valores, mientras que los mutantes de robustez serían aquellos que aumentan la varianza fenotípica sin mucho efecto en la media, aunque en la práctica los casos más comunes son aquellos en los que se dan ambas cosas (Waddington, 1942). Los resultados obtenidos en los diferentes análisis realizados han permitido ver como la pérdida de varios genes *DVL/RTFL* provoca cambios no solo en la distribución de los datos, sino que también modifica en algunas

DISCUSIÓN

ocasiones el valor medio de dichos datos con respecto a la población de plantas silvestres (**Figura 36**).

Existen sistemas capaces de amortiguar cambios sin que tenga lugar una modificación fenotípica como es el caso de la variación de expresión de *CLAVATA3 (CLV3)*, que el meristemo puede amortiguar sin llegar a cambiar su tamaño, tal y como observaron Müller et al., (2006) tras emplear promotores modificados de *CLV3* para modular sus niveles de expresión y ver como el meristemo apical e inflorescente es capaz de soportar cambios de hasta 10 veces de expresión sin que cambie el tamaño del meristemo. En términos de la genética del desarrollo, comprender los mecanismos que aportan robustez al sistema implica identificar genes que influyen en la variación fenotípica y que son capaces de amortiguar perturbaciones genéticas y ambientales sin que se lleguen a observar cambios. Así, la familia de genes *DVL/RTFL* puede ser responsable de mantener la robustez de ciertos procesos celulares, como puede ser la elongación celular, sin descartar otros. Sin embargo, el mecanismo por el cual podrían estar aportando estabilidad al sistema sigue siendo desconocido.

Así, cabe preguntarse cómo se consigue la robustez mecanísticamente hablando. La robustez en los procesos de desarrollo se relaciona con la redundancia funcional entre genes, tal y como se ha mencionado anteriormente, asegurando la estabilidad de los rasgos frente a las perturbaciones (Wagner, 2007; Boukhibar and Barkoulas, 2016). Sin embargo, las bases de la estabilidad no solo dependen de la redundancia funcional, sino que también de la distribución y conexión entre las diferentes partes del sistema. De esta manera, varios componentes de un sistema contribuyen al flujo de información y por tanto al funcionamiento del sistema, tal y como ocurre en rutas metabólicas o de desarrollo en las que existen bucles de retroalimentación o interconexión entre rutas de señalización. Así mismo, la distribución fenotípica también puede explicarse por la variación en la expresión génica entre individuos, expresión génica variable que puede surgir de muchas perturbaciones diferentes (Boukhibar and Barkoulas, 2016).

Por tanto, será interesante seguir estudiando a la familia *DVL/RTFL* y las rutas en las que puedan estar participando para así conocer el mecanismo por el cuál aportan robustez al sistema de desarrollo de la planta y si solo se basa en la redundancia funcional entre los diferentes miembros de la familia para dar estabilidad al sistema o si pudiesen ser nodos conectados en otras rutas celulares.

Los péptidos DVL/RTFL participan en el crecimiento y desarrollo del tubo polínico, el crecimiento distal de la célula, la dinámica de la pared celular o la morfogénesis vía elongación celular

El análisis transcriptómico de los quintuples mutantes *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* llevado a cabo ha permitido conocer procesos en los que los genes *DVL/RTFL* estaban actuando, quizá no de una manera evidente, pero sí aportando robustez al sistema. Entre todos estos procesos destacan la morfogénesis, como una categoría funcional más generalizada en la que se pueden incluir procesos como el crecimiento y desarrollo del tubo polínico o el crecimiento distal de la célula (**Figura 21** y **Anexo II**).

La morfogénesis o desarrollo de la forma y estructura de las células vegetales depende en gran medida del control adecuado de la dirección y extensión de la expansión celular. Un modo bien caracterizado de expansión celular en la planta es el crecimiento distal, en el que el crecimiento de las células se limita a un solo punto de crecimiento y conduce a la formación de una célula de forma tubular. Tanto los tubos polínicos como los pelos radiculares presentan este tipo de crecimiento unidimensional muy especializado, siendo este crecimiento polarizado en ambos tipos celulares similar en varios aspectos. La organización citoplasmática es característica, con vesículas de Golgi excitóticas y elementos del retículo endoplasmático en el ápice, orgánulos más grandes (cuerpos de Golgi, retículo endoplasmático y mitocondrias) en la zona subapical y una vacuola central en crecimiento en la parte proximal de la célula. Existe también un tráfico acelerado de vesículas de membrana que llevan material de membrana y pared celular a la punta en crecimiento para la remodelación continua de la pared. Por otro lado, la morfogénesis normal del pelo radicular y del tubo polínico requiere de un citoesqueleto funcional de microfilamentos de actina y microtúbulos que aportan estabilidad estructural controlando la dirección del crecimiento. Además, el crecimiento de cada célula está asociado y depende de una entrada continua en el ápice y un gradiente interno de iones reguladores entre los que destaca el Ca^{2+} por su participación en la regulación del citoesqueleto de actina y el tráfico vesicular necesario para el crecimiento del ápice de la célula (**Figura 71A**) (Schiefelbein et al., 1993; Foreman and Dolan, 2001; Campanoni and Blatt, 2007; Qin and Yang, 2011).

Son muchos los genes que han demostrado participar en estos procesos de crecimiento distal de la célula. Sin embargo, es improbable que los péptidos *DVL/RTFL* tengan un impacto directo sobre la regulación de la transcripción de estos genes. Aun así, sí que podrían estar actuando de alguna manera en las rutas génicas o procesos en los que participan estos genes por lo que es interesante pararse a analizar los genes diferencialmente expresados en los

DISCUSIÓN

quíntuples mutantes *dvl/rtfl* analizados en el RNA-seq, y que destacaron por ser comunes a varias de las categorías GO más significativas (Tabla 3).

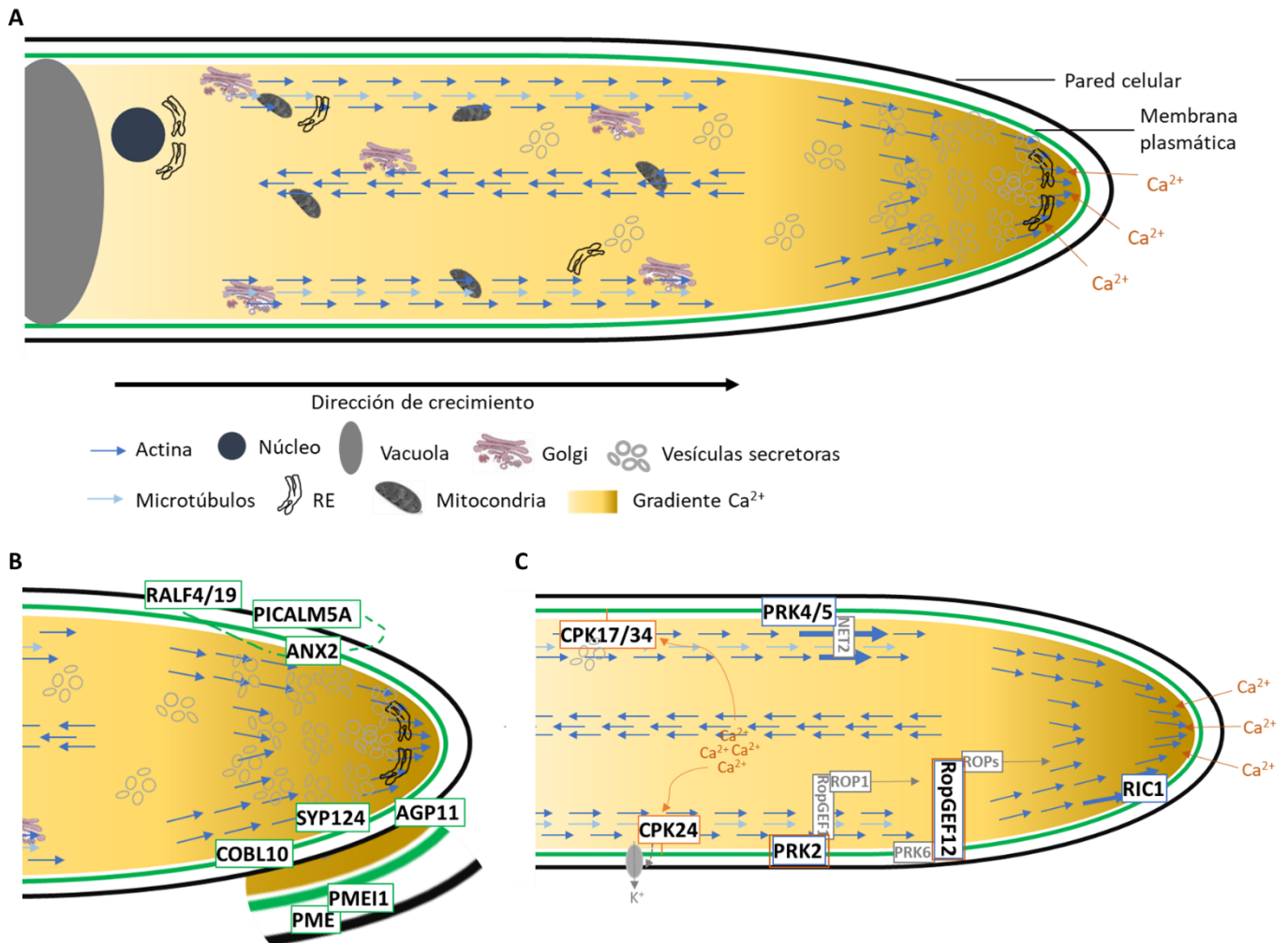


Figura 71. Morfología y representación esquemática del crecimiento distal y polarizado de un tubo polínico o un pelo radicular. A) Diagrama esquemático de la zona interna y elementos estructurales de un tubo polínico o un pelo radicular en crecimiento. La célula en crecimiento muestra un gradiente citoplasmático de Ca²⁺ centrado en la punta y una entrada continua Ca²⁺. La zona apical se caracteriza por una acumulación de vesículas secretoras, la zona subapical rica en orgánulos está seguida de la zona nuclear y vacuolar. Los microtúbulos y filamentos largos de actina se alinean a lo largo de la zona de elongación y se excluyen de la zona subapical y apical donde se acumulan microfilamentos cortos de actina. B) DEGs del análisis transcriptómico que participan en la remodelación y estabilidad de la pared celular (ANX2: ANXUR2, PICALM5A: PHOSPHATIDYLINOSITOL BINDING CLATHRIN ASSEMBLY PROTEIN 5A, RALF4/19: RAPID ALKALINIZATION FACTOR 4/19, COBL10: COBRA-LIKE 10, AGP11: ARABINOGALACTAN PROTEIN 11, SYP124: SYNTAXIN OF PLANTS 124. PME11: PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR 1 y PME: PECTIN METHYLESTERASE en una ampliación de la pared celular). C) DEGs del análisis transcriptómico y otros genes relacionados con la organización del citoesqueleto de actina (recuadrados en azul) o con la señalización de Ca²⁺ (recuadrados en naranja) (PRK: POLLEN RECEPTOR-LIKE KINASES, RopGEF12: ROP GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR 12, RIC1: ROP-INTERACTIVE CRIB MOTIF-CONTAINING PROTEIN 1, CPK: CALCIUM DEPENDENT PROTEIN KINASES).

Estos DEGs participan en procesos de morfogénesis, crecimiento y desarrollo celular y más concretamente en el crecimiento unidireccional de la célula característico del desarrollo y

crecimiento del tubo polínico (**Tabla 3**), teniendo un papel concreto en alguno de los aspectos que regulan el crecimiento polarizado de la célula descritos anteriormente (**Figura 71**).

En primer lugar, y relacionado con la estabilidad e integridad de la pared celular durante el crecimiento unidireccional del tubo polínico, nos encontramos varios DEGs que participan en esta dinámica de la pared (**Figura 71B**) como es *PICALM5A* (*PHOSPHATIDYLINOSITOL BINDING CLATHRIN ASSEMBLY PROTEIN 5A*) que en combinación con *PICALM5B*, muy cercano filogenéticamente, es responsable de la localización en el ápice en crecimiento de la célula de *ANXUR2* (AT5G28680), una kinasa tipo receptor, que también aparece como diferencialmente expresado en nuestro análisis transcriptómico. Estas proteínas mantienen la integridad del tubo polínico en *Arabidopsis thaliana* al actuar como adaptadores específicos durante la endocitosis mediada por clatrina que tiene lugar en la región subapical de la membrana plasmática del tubo polínico para su rápida elongación (Muro et al., 2018). *PICALM5A* también puede relacionarse con los resultados obtenidos en los mutantes *dvl/rtfl* en lo que la producción de semillas se refiere puesto que el doble mutante *picalm5a picalm5b* muestra una fertilidad reducida con una producción de semillas por silicua menor causada por la sobreacumulación de las proteínas ANXUR en la parte apical del tubo polínico (Muro et al., 2018).

Otros DEGs que aparecen en varias categorías GO en los quintuples mutantes y que también tienen relación con *ANXUR2* controlando la composición de la pared son *RALF4* y *RALF19* (*RAPID ALKALINIZATION FACTOR 4* y *19*). Se ha demostrado como, en *Arabidopsis thaliana*, el complejo receptor quinasa ANXUR/BUPS controla y mantiene el crecimiento del tubo polínico en respuesta a la señalización de RALF4/19. Además, se ha demostrado que RALF4 induce la producción de especies reactivas de oxígeno que estimulan el crecimiento del tubo polínico, manteniendo su viabilidad. RALF4 tiene un papel generalizado en el desarrollo de la pared celular en células con crecimiento distal que incluyen a los pelos radiculares al interactuar con las proteínas LRX (Mecchia et al., 2017; Feng et al., 2019).

También encontramos a *PME1* (*PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR 1*) que ha sido identificado como un inhibidor de la actividad de pectina metilesterasas (PME) siendo la pectina uno de los principales componentes estructurales de la pared celular vegetal que es secretada en una forma metilesterificada y por consiguiente desesterificada por parte de las PME. En el caso del tubo polínico, las pectinas esterificadas prevalecen en el vértice de los tubos polínicos en crecimiento, donde la pared celular debe expandirse. Por el contrario, las regiones laterales de la pared celular contienen principalmente pectinas desesterificadas. Así, varias PME se coexpresan con diferentes PME1 para regular la estabilidad de la pared celular en la punta del tubo polínico (Raiola et al., 2004; Röckel et al., 2008).

DISCUSIÓN

Por su lado, *COBL10* (*COBRA-LIKE PROTEIN 10 PRECURSOR*) codifica una proteína glicosilfosfatidilinositol (GPI)-anclada localizada en la membrana plasmática apical del tubo polínico afectando a la cubierta de pectina y las microfibrillas de celulosa claves para la estructura de la pared celular, desempeñando también un papel fundamental en las comunicaciones célula-célula en las plantas (Li et al., 2013). *AGP11* (*ARABINOGALACTAN PROTEIN 11*), un proteoglicano de la pared celular que junto con *AGP6*, participa en múltiples rutas de señalización involucradas en la remodelación de la membrana plasmática mediada por endocitosis durante el desarrollo del polen, mostrando así la importancia del tráfico endosomal en la regulación de la fisiología de la pared (Costa et al., 2013).

Por último, encontramos en este apartado de dinámica de pared celular a *SYP124* (*SYNTAXIN OF PLANTS 124*), concentrada en la membrana plasmática de las regiones apicales y subapicales del tubo polínico, participando en el transporte y tráfico de materiales de membrana a la zona apical de elongación, donde su polaridad se establece cuando se forma el gradiente de Ca^{2+} en la germinación del polen tras la polinización. Mientras que *SYP124* se localiza en la región apical del tubo polínico, se ha visto como otro miembro de su familia, *SYP123*, se localiza en la misma región apical pero de los pelos radiculares, permitiendo la elongación de los mismos (Ichikawa et al., 2015).

Por otro lado, y más relacionados con los gradientes y entrada de Ca^{2+} necesarios para la elongación unidimensional del tubo polínico, encontramos a varios miembros de una misma familia génica, los *CPK* (*CALCIUM DEPENDENT PROTEIN KINASES*) capaces de activar y regular proteínas diana de manera directa cuando reciben señales de Ca^{2+} (Shi et al., 2018). Concretamente, *CPK17* y *CPK34*, localizados en la membrana plasmática, transducen las señales de Ca^{2+} para mantener la tasa de crecimiento del tubo polínico y facilitar la respuesta a las señales de tropismo con el fin de alcanzar el óvulo. Así podrían estar promoviendo algún aspecto del crecimiento de la punta, como el tráfico de membranas o cambios dinámicos en el citoesqueleto (Myers et al., 2009). Por su parte, *CPK24*, también localizado en la membrana, está involucrado en la regulación de los canales de K^+ dependiente de Ca^{2+} actuando como regulador negativo de la elongación del tubo polínico (Zhao et al., 2013) (**Figura 71C**).

Por último, destacamos los DEGs más relacionados con la organización del citoesqueleto de actina donde encontramos diferencialmente expresados 3 genes pertenecientes a la misma familia: *PRK2*, *PRK4* y *PRK5* (*POLLEN RECEPTOR-LIKE KINASES*), que codifican proteínas transmembrana. Así, *PRK4* y *PRK5* interactúan con *NET2A* y dicha conexión actúa como plataforma para la transducción de señales extracelulares al citoesqueleto de actina en el ápice del tubo, logrando así un crecimiento polarizado de esta célula durante la fertilización (Duckney

et al., 2017). Por su parte, PRK2 ha demostrado actuar como regulador positivo de la ruta de señalización ROP1 (*Rho-like small GTPase from plant*) activando RopGEF1 y promoviendo el crecimiento polarizado del tubo polínico a través de rutas dependientes de la actina y del Ca^{2+} . Las proteínas ROP controlan el crecimiento polarizado de la célula y juegan un papel en muchos procesos del desarrollo como son el crecimiento del tubo polínico y los pelos radiculares, así como la morfogénesis de células de pavimento o respuestas de la planta a ABA y auxinas.(Chang et al., 2013).

Relacionado con estos DEGs anteriores, también apareció como diferencialmente expresado *RopGEF12 (ROP GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR 12)*. Se ha demostrado que RopGEF12 interacciona con PRK2 y que, junto con otra PRK, PRK6, juegan un papel crucial en el crecimiento polarizado de los tubos polínicos (Yu et al., 2018). Así mismo encontramos a *RIC1 (ROP-INTERACTIVE CRIB MOTIF-CONTAINING PROTEIN 1)* que contribuye en la dinámica y abundancia de la F-actina del citoesqueleto de los ápices y subápices del tubo polínico (Zhou et al., 2015). Además, RIC1 ha demostrado, junto con *ROP6*, regular la asociación de la clatrina con la membrana plasmática mediando la endocitosis durante el desarrollo de las raíces (Chen et al., 2012).

Con estos ejemplos vemos que los procesos relacionados con la estabilidad de la pared celular, la señalización mediada por Ca^{2+} o la organización del citoesqueleto de actina están altamente interconectados, por lo que no es de extrañar que alguno de estos genes esté relacionado con varios de estos procesos en su función de regulación del crecimiento unidireccional de la célula. Aunque muchos de estos genes sean específicos del polen, se ha denotado como otros miembros de sus familias génicas o del resto de elementos que participan en sus rutas de actuación también regulan otros procesos de crecimiento polarizado de la célula como es el que tiene lugar en los pelos radiculares.

En todos los casos, se ha visto como los genes *DVL/RTFL* estarían promoviendo la actuación de estos genes puesto que el análisis transcriptómico mostró como en los quintuples mutantes *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* estos genes estaban diferencialmente expresados a la baja (**Anexo II**). Sin embargo, estos datos transcriptómicos no nos dan una idea del mecanismo molecular por el cual los genes *DVL/RTFL* estarían participando en estas rutas, pero sí que la pérdida parcial de su función implica la desregulación de muchos actores importantes en los procesos de elongación polarizada del tubo polínico y, dado que parecen afectar a varios componentes funcionales del proceso, podrían estar aguas arriba de todo ello, promoviendo el crecimiento. Además, los genes *DVL/RTFL* probablemente no estén directamente implicados en las rutas génicas que regulan el crecimiento del tubo polínico

DISCUSIÓN

exclusivamente, si no que estén participando en otros procesos de crecimiento distal de la célula y por tanto en muchos procesos de elongación celular polarizada generales necesarios para la morfogénesis de la planta, aportando probablemente robustez al sistema.

Puesto que no hemos llegado a conocer el mecanismo exacto por el que estarían actuando los genes *DVL/RTFL*, además de que resulta llamativo el efecto tan generalizado de los genes *DVL/RTFL* en el proceso de elongación del tubo polínico a nivel transcriptómico en comparación con los efectos tan sutiles en los fenotipos, sería muy interesante estudiar en detalle y con técnicas avanzadas de biología celular el comportamiento de las membranas plasmáticas o la organización del citoesqueleto en los tubos polínicos o pelos radiculares y su dinámica, así como el posible mecanismo por el cual podrían aportar estabilidad o robustez al sistema en estos procesos de elongación polarizada de la célula.

Los datos transcriptómicos han resultado ser muy sólidos a la hora de proponer la participación de los genes *DVL/RTFL* en los procesos de elongación del tubo polínico y los pelos radiculares a pesar de que las muestras con las que se hizo el RNA-seq eran de inflorescencias y flores en antesis y no de tubos polínicos en sí. Esto puede dar idea de que estos procesos de crecimiento y desarrollo del tubo polínico podrían estar ya preprogramados en los granos de polen para que una vez germinados, el tubo polínico se desarrolle correctamente. O bien, y más acorde a nuestra hipótesis, que los genes *DVL/RTFL* no solo participen en los procesos de desarrollo del tubo polínico, si no en procesos más generales de elongación. Así, llevar a cabo análisis de tamaño de otras células como las que conforman los pétalos o los sépalos, nos podría dar idea de la implicación de los genes *DVL/RTFL* en muchos procesos de elongación que tienen lugar en las células vegetales y que permiten un correcto desarrollo de la planta.

Paralelamente al análisis transcriptómico de los quintuplos mutantes *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19*, se llevó a cabo un RNA-seq con dos líneas sobreexpresoras, *dvl1-1D* y 35S:DVL8. Puesto que las líneas sobreexpresoras tenían un fenotipo mucho más evidente morfológicamente, esperaríamos un efecto mayor en el transcriptoma aportándonos información adicional acerca de la función de la familia *DVL/RTFL*. Además, esperaríamos que los procesos que se encontraban regulados al alza en los mutantes *dvl/rtfl* tendrían un comportamiento contrario en las líneas sobreexpresoras.

Los resultados fueron un poco sorprendentes por varias razones: 1) los DEGs en la línea *dvl1-1D* eran muchos más que en el caso de la línea 35S:DVL8, 2) hay muy pocos DEGs comunes a ambas líneas sobreexpresoras (**Figura 22**) y 3) los DEGs no estaban desregulados en dirección opuesta a la causada por la pérdida de función, si no en la misma (**Anexo IV**).

El hecho de encontrar más DEGs en el caso de la línea *dv1-1D* podría estar reflejando los diferentes efectos de aumentar la expresión de *DVL1* mediante la inserción de un elemento potenciador (4x35S) en la región del promotor endógeno de *DVL1* a diferencia de estar expresando *DVL8* de manera más generalizada o amplia con un promotor 35S como ocurre en la línea 35S:DVL8. Además, también podría relacionarse con el posible grado de especificidad funcional de estos dos péptidos DVL pertenecientes a diferentes clados de la familia génica. Por otro lado, mientras que los resultados de las tres réplicas de *dv1-1D* se agrupan muy bien, las réplicas de 35S:DVL8 no son tan consistentes y una de ellas tiene una cierta desviación con respecto a las otras, lo que podría explicar que no aparezcan tantos DEGs en esta línea simplemente por motivos estadísticos.

Además, dentro de los DEGs en la línea *dv1-1D* con respecto a la silvestre encontramos muy pocos DEGs comunes al quintuple mutante *dv1 dv8 dv11 rtfl11 dv19*, clasificados mayoritariamente en categorías GO relacionadas con respuesta a diferentes estímulos y con pocas coincidencias con las enriquecidas en los mutantes, mientras que en la sobreexpresión de *DVL8* sí que encontramos genes comunes a ambos quintuples mutantes *dv1/rtfl* y que además tenían un efecto sobre la regulación de genes relacionados con el desarrollo y crecimiento del tubo polínico, el crecimiento distal de la célula y la diferenciación celular, que era lo esperable teniendo en cuenta los resultados del análisis de los mutantes (**Anexo IV**, **Anexo V** y **Anexo VI**). Esto vuelve a apoyar la idea que, aunque puedan estar trabajando de una manera altamente redundante en ciertos procesos, los diferentes péptidos DVL/RTFL podrían estar participando en procesos biológicos específicos.

Dentro de los DEGs comunes a ambas líneas sobreexpresoras solo se encontraron 33 términos (**Figura 22** y **Anexo III**). Estos DEGs comunes estaban enriquecidos en categorías GO relacionadas con respuestas a estrés oxidativo, aunque en primera instancia no pareciesen estar relacionados con los procesos de desarrollo del tubo polínico, crecimiento distal de la célula o morfogénesis anteriormente descritos. Sin embargo, si nos fijamos en los genes de manera individualizada, sí se encuentra una cierta relación. Así aparecen tres factores de transcripción: dos miembros de la familia *TCP* (*TEOSINTE BRANCHED1*, *CYCLOIDEA* Y *PCF*), *TCP1* y *TCP4*; y *ZAT7*. Los miembros de la familia *TCP* juegan papeles esenciales en el crecimiento y desarrollo de la planta al influir en la proliferación, expansión y crecimiento celular (Li et al., 2019). Diferentes estudios han sugerido que *TCP1* está involucrado en la regulación de la simetría de los órganos florales y que se trata de un regulador positivo en el mecanismo de biosíntesis de brasinoesteroides que permiten un crecimiento y desarrollo normal de la planta (Guo et al., 2012). Por su parte, *TCP4* integra la respuesta de las auxinas al circuito molecular dependiente

DISCUSIÓN

de brasinoesteroides que promueve la elongación celular en los hipocótilos de *Arabidopsis thaliana*. Así la función de los *TCP* está conectada a la respuesta hormonal durante la morfogénesis celular para promover la elongación celular (Challa et al., 2016). Por su parte, *ZAT7*, miembro de la familia de factores de transcripción Zinc-Finger tipo C2H2, regula negativamente el crecimiento en respuesta al estrés abiótico (Xie et al., 2019). Otros de los DEGs comunes a las dos líneas sobreexpresoras están involucrados en la morfogénesis celular con funciones de desarrollo y remodelación de la pared celular como son *LRX3*, *TCH4* o *BFRUCT1*.

El último aspecto sorprendente del análisis transcriptómico es que la sobreexpresión de los genes *DVL* en las líneas *dvl1-1D* y *35S:DVL8* cambia la respuesta transcripcional de muchos de los DEGs en el mismo sentido que lo hace la pérdida de función en los quintuples mutantes (**Anexo IV** y **Anexo V**), algo completamente diferente a lo esperado, que era que la sobreexpresión y la pérdida de función de un gen causaran fenotipos opuestos, siendo común encontrar ejemplos de este fenómeno. Sin embargo, es posible encontrar casos en los que la sobreexpresión de un gen silvestre cause fenotipos idénticos o similares a los de la pérdida de función, aunque con mucha menor frecuencia. Así encontramos ejemplos, normalmente con proteínas que forman parte de complejos multiproteicos, en los que el exceso de alguno de los componentes altera la estequiometría o interfiere de alguna manera con el correcto funcionamiento de la proteína o de su complejo (Prelich, 2012). Un ejemplo de esto es el caso de la sobreexpresión de los pares de histonas de levaduras *SPT5*, *SPT6* o *SPT16*, en el que cada uno provoca los mismos fenotipos relacionados con la transcripción que los provocados por las mutaciones de pérdida de función de esos genes (Clark-Adams et al., 1988; Prelich, 2012).

Así, el efecto de la sobreexpresión de los genes *DVL/RTFL* podría ser similar al de un dominante negativo, quizá por producir una saturación o alteración de la estequiometría de algunos complejos moleculares que median su actividad, por lo que al menos una parte de los defectos fenotípicos observados en las líneas sobreexpresoras podrían ser debidos a su interferencia en parte de los procesos en los que participan los péptidos *DVL/RTFL*. Por tanto, para explorar esta posibilidad y obtener más información sobre los mecanismos moleculares que subyacen a la función *DVL/RTFL*, la identificación de las proteínas que interactúan con estos péptidos en la membrana u otras ubicaciones subcelulares cobra una especial relevancia.

Por otro lado, si la traducción de los mRNA fuera uniforme, un análisis proteómico debería ser muy similar a la transcriptómica, pero esto no es así normalmente. Un análisis proteotranscriptómico permitiría estudiar los mecanismos que pudiese haber detrás de la función de los péptidos *DVL/RTFL*, proporcionando información sobre un nuevo posible nivel de regulación al encontrar diferencias o similitudes entre ambos perfiles.

Tras llevar a cabo el análisis diferencial de proteínas en el décuple mutante *dv13 dv15 dv16 dv11 dv14 rtf19 dv18 dv111 rtf111 dv119*, destaca, en primer lugar, el hecho de no encontrar coincidencias entre los perfiles transcriptómico y proteómico del décuple mutante *dv1/rtf1* y los quintuples mutantes analizados en el RNA-seq (**Anexo VII**). En el caso de la línea sobreexpresora *dv1-1D* solo se encuentran 13 elementos diferencialmente expresados y anotados en ambos análisis (**Anexo IX**) y para la línea 35S:DVL8 solo 4 proteínas o genes comunes anotados (**Anexo XI**). Esta falta de correlación entre los datos transcriptómicos y proteómicos nos dice que pueden existir diferencias biológicas entre los procesos de transcripción y traducción como pueden ser modificaciones postraduccionales, interacciones con proteínas alostéricas o eventos de procesamiento proteolíticos. Sin embargo, también puede explicarse desde el punto de vista experimental por fallos en el diseño e interpretación de los datos, así como limitaciones tecnológicas que hacen que los niveles de sensibilidad no sean perfectamente comparables contribuyendo a las diferencias observadas (Hegde et al., 2003).

Tal y como ocurre en el RNA-seq, la sobreexpresión de los genes *DVL* en las líneas *dv1-1D* y 35S:DVL8 cambia la respuesta de la mayoría de las proteínas diferencialmente expresadas en el mismo sentido que lo hace la pérdida de función en el múltiple mutante (**Anexo XIII**). Así mismo, al comparar las 3 listas de proteínas diferencialmente expresadas obtenidas en el análisis del décuple mutante y las líneas sobreexpresoras *dv1-1D* y 35S:DVL8 comparadas con la línea silvestre, son muy pocos los términos comunes a las tres listas (**Figura 27**).

Tras analizar las categorías GO relacionadas con procesos biológicos sí que se pueden destacar procesos significativamente alterados en el análisis proteómico como son el ensamblaje de la pared del polen, morfogénesis de componentes celulares, ensamblaje de componentes celulares involucrados en morfogénesis, proceso metabólico de pequeñas moléculas y otros procesos catabólicos y metabólicos (**Anexo XIII**). Aunque puede parecer que la pared del polen no esté directamente relacionada con los procesos del elongación del tubo polínico que se destacaron en los procesos transcriptómicos, sí que podría ocurrir que, si los granos de polen no se forman correctamente, esto esté afectando a su germinación y la elongación del tubo.

Aun así, sí se puede destacar alguno de los genes pertenecientes a las categorías GO anteriormente destacadas en el análisis diferencial de proteínas y que tendría una relación más directa con el análisis transcriptómico como es el caso de *CEL1* (CELLULASE 1), con un papel importante en la expansión y elongación celular necesaria para el desarrollo de los diferentes tejidos de la planta. Así se ha demostrado como *CEL1* se localiza en las paredes celulares de los tejidos jóvenes en expansión participando en el proceso de biosíntesis de la celulosa (Shani et

DISCUSIÓN

al., 2006). Durante la expansión celular, la pared está metabólicamente activa, explicando así como muchos procesos de biosíntesis, metabólicos, catabólicos y de transporte de diferentes compuestos están significativamente alterados en este análisis proteómico.

También encontramos otra proteína común a las tres comparaciones llevadas a cabo en el análisis proteómico, DCP1 (DECAPPING 1), que aunque participa en procesos de renovación del mRNA y quizás no parezca tan relacionado con los procesos anteriormente descritos, se ha visto que tiene un papel en el desarrollo post-embriónico de *Arabidopsis* y, más concretamente, en la correcta formación de los pelos radiculares o la morfología de las células epidérmicas (Iwasaki et al., 2007). Además, resultados previos obtenidos en el laboratorio que muestran una expresión de los genes *DVL8* y *DVL11* en dominios espaciales muy diferentes de donde tiene lugar la acumulación de los péptidos, dan una idea de que o bien el mRNA o el péptido puede estar experimentando un transporte intercelular activo (Primo, 2013), para el cual procesos como el procesamiento del RNA o el transporte de proteínas, que sí aparecen como significativamente alterados en el décuple mutante (**Figura 24**), serían importantes.

En nuestro caso, el análisis proteotranscriptómico llevado a cabo no ha permitido tener una noción más clara del papel de los péptidos DVL/RTFL y todavía estamos lejos de comprender los mecanismos moleculares, el modo de acción y los procesos precisos en los que los péptidos DVL/RTFL pueden tener una función relevante, si bien es cierto que se ha visto como los péptidos DVL/RTFL pueden estar aportando robustez a los procesos de elongación celular al prevenir, quizá, un crecimiento descoordinado o la falta de uniformidad en las respuestas que provocan las modificaciones en la pared celular. En este punto, sigue siendo completamente desconocido cómo los péptidos DVL/RTFL pueden participar en estos procesos e incluso si son biológicamente relevantes. Así, sería crucial encontrar moléculas que interactúen y que puedan arrojar algo de luz sobre estas supuestas funciones y los mecanismos involucrados.

Los péptidos DVL/RTFL se asocian a la membrana plasmática, localización celular donde interaccionan con otras proteínas

Estudios previos han mostrado que los péptidos DVL/RTFL se encuentran en el interior celular asociados a la membrana plasmática y que su localización aquí resulta ser esencial para su función molecular. Además, no poseen ni un dominio transmembrana ni señalizador fácilmente identificable, por lo que es probable que estos péptidos necesiten interactuar con otros componentes de membrana para ejercer su función (Narita et al., 2004; Wen and Walker, 2006; Yamaguchi and Tsukaya, 2006; Ikeuchi et al., 2011). En el laboratorio ya se habían realizado experimentos para determinar qué tipo de asociación presentaban los péptidos DVL

(en concreto DVL11) con la membrana plasmática, concluyendo que el péptido DVL11 no se trata de una proteína claramente integral de membrana ni está unida covalentemente a ésta. Sin embargo, no se pudo determinar si DVL11 se encontraba parcialmente unido a la membrana plasmática o tenía afinidad hacia algún elemento de ésta (**Figura 37**) (Primo, 2013).

En este trabajo, hemos realizado estudios de topología de membrana para intentar completar y actualizar los descritos anteriormente. Así, hemos corroborado en un sistema experimental nuevo y más cercano a la situación *in vivo* (células de riñón) que tanto los péptidos DVL1 y DVL11 completos como sus dominios conservados no se insertan en la membrana (**Figura 40**). Además, un ensayo complementario en el que se añadió un sitio de glicosilación muy cercano a la secuencia a testear nos ha permitido confirmar que, aunque los péptidos DVL no se integran en la membrana plasmática, sí que están asociados a la misma a través de su interfase (**Figura 42**). Por tanto, descartamos que los péptidos DVL/RTFL sean proteínas integrales de membrana, aunque sí que podrían estar unidos a proteínas transmembrana o unidos directamente a la bicapa lipídica electrostáticamente. Así mismo, no descartamos que se trate de proteínas periféricas de membrana, asociándose a ésta mediante secuencias aminoacídicas cortas o lípidos (**Figura 72**). Todas estas posibilidades concuerdan con los resultados obtenidos y con su asociación íntima con la membrana plasmática. Sin embargo, el mecanismo preciso de asociación de los péptidos DVL/RTFL con la membrana plasmática sigue siendo desconocido.

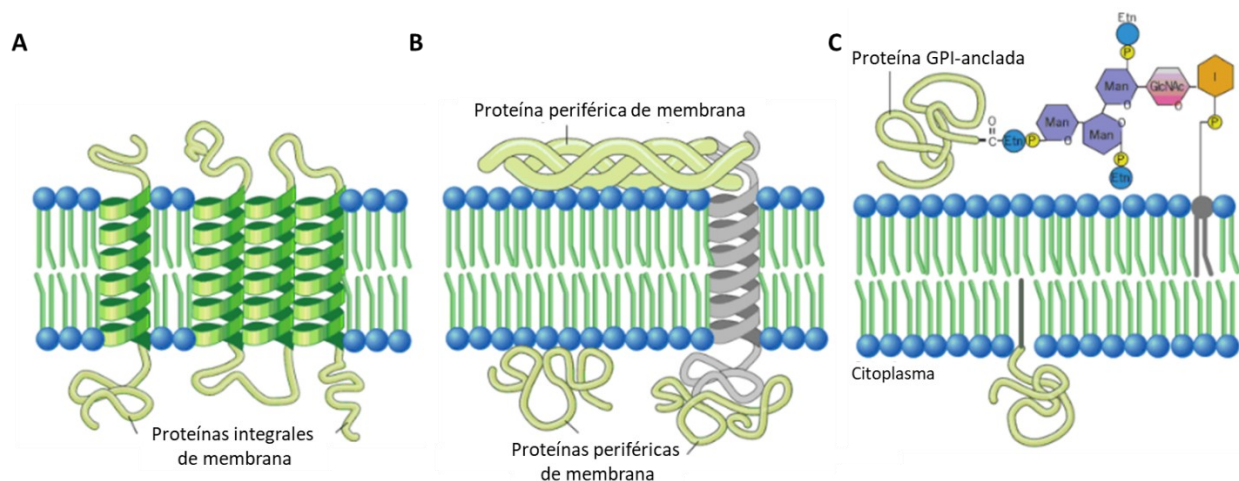


Figura 72. Interacciones de las proteínas de membrana con la bicapa lipídica. A) Proteínas integrales de membrana con una o más hélices transmembrana. B) Proteínas periféricas de membrana unidas no covalentemente a las cabezas de los grupos polares de la bicapa lipídica y/o a una proteína integral de membrana. C) Proteínas ancladas a lípidos unidas covalentemente a un grupo lipídico con residuos en la membrana o a una secuencia terminal corta de aminoácidos hidrofóbicos. Imagen adaptada de Karp, 2010.

Volviendo a la participación de los péptidos DVL/RTFL en los procesos de expansión y elongación celular direccional en los que tan importantes resultan los microtúbulos y filamentos de actina que componen el citoesqueleto (**Figura 71A**), cabe destacar la importancia de

DISCUSIÓN

proteínas que permitan la unión entre los microtúbulos y microfilamentos con la membrana plasmática para su correcta organización (Gardiner et al., 2001; Wasteneys and Galway, 2003). Además, se cree que este mecanismo de unión entre microtúbulos y membrana plasmática involucra a más de una proteína y aunque se han descrito ejemplos de proteínas transmembrana que se unen a los microtúbulos como es el caso de las fosfolipasas D (Gardiner et al., 2001) o proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI)-ancladas como son las COBRA (Wasteneys and Galway, 2003; Li et al., 2013), puede que los péptidos DVL/RTFL, a través de su asociación con la membrana plasmática y otras proteínas, participen en la organización del citoesqueleto que permite el crecimiento unidireccional de la célula. Por ello, validar las posibles interacciones de estos péptidos DVL/RTFL con algunas de las proteínas identificadas en el escrutinio de doble híbrido es crucial para comprender su mecanismo de acción.

Por otro lado, y como ya se comentó en la introducción, los péptidos pequeños tienen un papel importante en el desarrollo de la planta a través de la comunicación célula a célula. Así, en esta señalización serán importantes proteínas que estén asociadas a la cara intracelular de la membrana plasmática que reciban la información transmitida por otras que se encuentren en la superficie de la membrana (Casey, 1995). Además, estudios llevados a cabo previamente en el laboratorio sugieren que los péptidos DVL/RTFL (o sus mRNA) podrían estar experimentando un transporte intercelular activo, indicando su posible función como péptidos o moléculas señal (Primo, 2013). Por tanto, la capacidad de los péptidos DVL/RTFL para atravesar la membrana y asociarse a la interfase de ésta podría permitir que llevaran a cabo esta función como factores de señalización o señales posicionales, aunque el mecanismo molecular mediante el cual lo hacen sigue sin conocerse con exactitud.

Puesto que los péptidos DVL/RTFL no tienen características de secuencia que permitan deducir su función molecular, así como su mecanismo de asociación con la membrana, lo más probable es que necesiten interactuar de algún modo con otras proteínas, tanto para llevar a cabo su función como para asociarse con la membrana plasmática. A partir del ensayo de doble híbrido de levadura llevado a cabo con anterioridad ya se habían identificado posibles interactores de DVL1 y DVL11, seleccionando aquellas proteínas candidatas prometedoras (**Tabla 6** y **Tabla 7**) cuya interacción con DVL1 o DVL11 confirmaríamos *in planta* (**Figura 43** y **Figura 44**). Teniendo en cuenta que los péptidos DVL/RTFL estarían asociados a la interfase de la membrana plasmática, además de estar relacionados con procesos de elongación celular como son los que tienen lugar en los tubos polínicos o pelos radiculares, es interesante discutir la función de alguno de estos interactores confirmados.

De estas proteínas, algunas se pueden relacionar directamente con los mecanismos de elongación celular como es el caso de la KIN13A (KINESIN 13 A) (AT3G16630), que ha demostrado limitar la expansión y el tamaño celular en *Arabidopsis thaliana*, además de influir en la depolimerización de microtúbulos y la movilidad y distribución del aparato de Golgi, así como en la estructura de la pared celular (Fujikura et al., 2014).

Por otro lado, la elongación celular en las plantas está regulada por reguladores internos del crecimiento como son los brasinoesteroides. Así, podemos destacar a BSK6 (BRASSINOSTEROID SIGNALING KINASE 6) (AT3G54030), asociado a la membrana plasmática, que participa de manera redundante junto con otros miembros de su familia en la ruta de señalización de los brasinoesteroides, hormonas claves en la regulación de múltiples procesos fisiológicos y del desarrollo de la planta como son la proliferación celular o la fertilidad masculina. Así, múltiples mutantes *bsk* presentan un crecimiento y desarrollo de la planta alterado con un tamaño de hojas de roseta más reducido y hojas con mayor curvatura (Sreeramulu et al., 2013), fenotipos similares en algunos aspectos a los de la sobreexpresión *DVL/RTFL*. Además, y relacionado con el análisis transcriptómico llevado a cabo, se ha visto como los miembros de la familia TCP desarrollan su función en los procesos de morfogénesis y elongación celular a través de rutas dependientes de brasinoesteroides (Challa et al., 2016).

Por otra parte, algunas de estas proteínas interactoras han demostrado tener relación con el proceso de desarrollo del tubo polínico tras análisis transcriptómicos realizados, como es el caso de AT3G07820, significativamente alterado durante la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico (Wang et al., 2008) y relacionado con en el desarrollo de la intina de la pared del polen, similar a la pared celular primaria en plantas (Huang et al., 2008; Jiang et al., 2013). También, estudios de interacción mediante un ensayo de doble híbrido de levadura con AGP11 (Costa et al., 2013), desatacado en nuestro RNA-seq por su papel como proteoglicano de la pared celular, ha destacado como posibles interactores de éste a VDAC3 (VOLTAGE DEPENDENT ANION CHANNEL 3) (AT5G15090), que regula el transporte de metabolitos entre la mitocondria y el citoplasma y ha demostrado tener relación con la respuesta a estrés oxidativo (Kanwar et al., 2022) además de participar en el crecimiento de la raíz en respuesta a déficit de nutrientes (Bouain et al., 2019), o a UBI10 (POLYUBIQUITIN 10) (AT4G05320), constitutivamente expresado en *Arabidopsis*, que modifica postraduccionalmente las proteínas para su degradación (Callis, 2014).

Otro de los interactores de DVL1 y que podríamos relacionar con la posible función señalizadora de los péptidos *DVL/RTFL* es SRC2 (SOYBEAN GENE REGULATED BY COLD-2) (AT1G09070) que participa en la producción de especies reactivas del oxígeno en una vía

DISCUSIÓN

dependiente de Ca^{2+} en respuesta a estrés por frío (Kawarazaki et al., 2013), además de estar implicado en procesos de comunicación célula a célula. SRC2 es una proteína localizada en el retículo endoplasmático del interior celular que se asocia con elementos de la membrana plasmática en contacto con el exterior celular, entre ellos SYT1 (Ho et al., 2016), que aunque no confirmó *in planta* su interacción con DVL11, era uno de los candidatos a testear.

A su vez, encontramos otros interactores más relacionados con el ciclo celular como es el caso de PROLIFERA (AT4G02060), miembro del complejo de mantenimiento de minicromosomas (MCM) que se expresa coordinadamente durante el desarrollo y abunda en tejidos proliferativos, con un papel en la replicación del DNA dependiente del ciclo celular, y con una localización mayoritariamente nuclear que solo se dispersa en células mitóticas (Shultz et al., 2009), lo que puede explicar los resultados obtenidos en nuestra BiFC en los cuales encontramos señal en la interacción DVL11-PROLIFERA tanto en la membrana plasmática como en el núcleo (**Figura 44**). Su papel en la replicación del DNA también ha demostrado ser importante en el desarrollo del polen (Long et al., 2019).

Dentro de los interactores de ciclo celular cabe destacar, por último, a CDC48 (CELL DIVISION CYCLE 48) (AT3G09840), que ha mostrado tener un especial interés en este trabajo por su implicación en la división, expansión y diferenciación celular en plantas, con efectos en múltiples procesos de desarrollo de la planta como era la expansión celular de la raíz o el crecimiento de los pelos radiculares y el desarrollo y elongación del tubo polínico (**Figura 45** y **Figura 46**, Park et al., 2008). Todo esto hace que correlacionar las funciones de CDC48 con las de los péptidos DVL/RTFL, así como determinar si su modo de actuación podría estar interconectado, sea un objetivo importante.

CDC48 es una proteína altamente conservada perteneciente a la familia AAA-ATPasas y dependiente de ubiquitina que juega un papel central en la ruta de degradación de proteínas intracelular vía 26S proteasoma o ubiquitín-proteasoma, regulando la homeostasis proteica. CDC48 interactúa con una red de cofactores específicos para formar un complejo hexámero siendo necesaria para numerosos procesos celulares independientes como son la degradación asociada al retículo endoplásmico, a las mitocondrias, a la cromatina y de proteínas nucleares. Para ello, reconoce y segrega sustratos ubiquitinados mal plegados de cada estructura celular y los transloca al citoplasma o al núcleo para su posterior degradación proteosomal (Li et al., 2022).

Visto que DVL1 interactúa con CDC48 en el núcleo y en la membrana plasmática y que las funciones de CDC48 podrían estar relacionadas con las de los péptidos DVL/RTFL, sería

interesante llegar a conocer el modo de actuación de los DVL/RTFL y si éstos podrían estar participando en las vías de degradación de proteínas en las que participa CDC48, quizá, degradando o protegiendo de la degradación a aquellas proteínas que habíamos destacado en el análisis transcriptómico y que estaban relacionadas con los procesos de elongación celular vía reorganización del citoesqueleto, remodelación de la pared celular, tráfico vesicular o la señalización mediada por Ca^{2+} . De esta manera, si los péptidos DVL/RTFL estuviesen evitando la degradación de estas proteínas por parte de CDC48, estaría favoreciendo los procesos de elongación celular, quizá no directamente, pero sí aportando estabilidad al sistema, de manera que cuando los péptidos DVL/RTFL no están en la ecuación, hay una mayor dispersión en las respuestas. Puesto que CDC48 tiene una localización muy generalizada tanto en la planta como en la célula, no es de extrañar que los péptidos DVL/RTFL puedan estar controlando varios procesos en varias localizaciones de la planta.

Sin embargo, los análisis preliminares realizados para intentar caracterizar la interacción DVL1-CDC48, tanto a nivel funcional como a nivel de localización, no arrojaron pistas acerca de la posible relación, más allá de la interacción, existente entre los péptidos DVL/RTFL y CDC48. No obstante, conseguir generar unas líneas inducibles que nos permitan interrumpir la actividad de CDC48 en diferentes etapas del desarrollo en plantas mutantes *dvl/rtfl* así como en plantas sobreexpresoras parece un objetivo muy interesante que nos daría pistas acerca relación funcional existente entre DVL1 y CDC48, así como el mecanismo de acción entre ellos.

Estudiar la relación que existe entre los mecanismos de acción de todos estos interactores y los péptidos DVL/RTFL puede ayudarnos a tener una idea más clara del papel concreto de los péptidos DVL/RTFL en estos procesos de elongación celular y así determinar su mecanismo de acción y si éste tiene lugar a través de estas proteínas. Aun así, sí que hemos conseguido relacionar a los interactores de DVL1 y DVL11 con los procesos de crecimiento y desarrollo del tubo polínico, crecimiento distal de la célula, dinámica de la pared celular o la morfogénesis destacados en los análisis transcriptómico y proteómico llevados a cabo en este trabajo.

¿Qué importancia puede tener la capacidad de dimerización de los péptidos DVL para su función?

Los ensayos de topología de membrana llevados a cabo (**Figura 40** y **Figura 42**), así como el ensayo de BiFC realizado para comprobar la posible interacción entre DVL1-DVL11 (**Figura 44**), ha permitido determinar que los péptidos DVL son capaces de formar homodímeros y heterodímeros entre sí. Además, esta capacidad de dimerización parece residir en el dominio funcional DVL/RTFL.

DISCUSIÓN

La dimerización y oligomerización de proteínas es una propiedad física común entre las proteínas y contribuye a numerosos procesos celulares, aportando estabilidad, incrementando la actividad funcional al aumentar la concentración de sitios activos, facilitando un aumento de la concentración local de moléculas, transmitiendo señales o canalizando reactivos a través de las membranas, ampliando, además, las oportunidades de regulación (Marianayagam et al., 2004). Así, los péptidos DVL/RTFL podrían formar parte de estas proteínas que forman dímeros para desarrollar su función.

La dimerización puede, además, aportar un mecanismo por el cual agrupar componentes de señalización aguas abajo y por tanto aumentar la señalización o por el cual permitir la comunicación cruzada con el receptor (Marianayagam et al., 2004). Parece que los péptidos DVL/RTFL están influyendo, aguas arriba, en múltiples genes que participan en el crecimiento unidimensional de la célula, en procesos como son la organización del citoesqueleto y el citoplasma, la señalización por calcio o el transporte de materiales para la remodelación continua de la pared celular; procesos que, a su vez, están interconectados entre sí. Por tanto, los péptidos DVL/RTFL podrían formar dímeros para agrupar a varios de componentes involucrados en el proceso de elongación celular en el que parecen estar funcionando.

El estudio del homólogo *DVL* en *Marchantia polymorpha* permite confirmar su conservación funcional en procesos de morfogénesis aportando robustez al sistema

Marchantia polymorpha es en principio un sistema ideal para el estudio funcional y evolutivo de los péptidos DVL/RTFL debido a que presenta un único parálogo *DVL/RTFL*, *MpDVL*, en contraposición a los 24 miembros presentes en *Arabidopsis thaliana* (Guo et al., 2015).

Tras confirmar que la sobreexpresión de *MpDVL* en *Arabidopsis thaliana* daba lugar a los fenotipos de sobreexpresión tan característicos de los genes endógenos en esta especie en lo que a la morfología de las hojas de roseta, inflorescencias, y flores, así como de las silicuas se refiere (**Figura 52**), nos pareció interesante continuar con la caracterización funcional del gen *MpDVL* en *Marchantia polymorpha* puesto que se apoya la idea de que la función de los péptidos DVL/RTFL estaría conservada entre las diferentes especies de plantas.

Tras generar y caracterizar tanto líneas mutantes de pérdida de función *MpDVL* como líneas de sobreexpresión *MpDVL* en *Marchantia polymorpha*, se encontraron diferencias morfológicas con respecto a la línea silvestre, tanto en la fase vegetativa relativa al cuerpo taloide, como en su fase reproductiva, caracterizando la formación de los anteridióforos. Con estos resultados, se puede destacar, en primer lugar, que el gen *MpDVL* no es indispensable,

puesto que eliminar su función provoca cambios morfológicos en *Marchantia polymorpha*, pero no resulta ser una mutación letal, al menos en su fase gametofítica.

En lo referente al desarrollo vegetativo, se encuentran diferencias en lo que al tamaño del talo se refiere, siendo generalmente mayor en el caso de las líneas CRISPR *MpDVL* y menor en las líneas sobreexpresoras EF1:*MpDVL* (**Tabla 8** y **Figura 56 – Figura 58**). Además, las líneas sobreexpresoras también presentan un mayor número de nichos apicales (**Figura 59**), siendo estos los puntos donde se encuentran las células meristemáticas apicales en continua división y a partir de los cuales, mediante bifurcaciones periódicas, los talos van desarrollándose y creciendo. Estas diferencias permitirían relacionar al gen *MpDVL* con el proceso de morfogénesis del talo en el punto de ser este proceso el responsable del desarrollo de la forma del talo y estructura de los órganos que se desarrollarán a partir de él a través de la división, diferenciación y crecimiento celular. Esto concuerda con lo ya dicho en el caso de *Arabidopsis thaliana* de que los genes *DVL/RTFL* están participando en procesos de morfogénesis por los datos obtenidos en los análisis transcriptómicos y posteriores caracterizaciones morfológicas.

Así, y relacionado más concretamente con el proceso de morfogénesis vía elongación celular, papel con el que ya habíamos asociado a los péptidos *DVL/RTFL* en *Arabidopsis* por su implicación en el crecimiento y desarrollo del tubo polínico y de los pelos radiculares, se estudió la relación de *MpDVL* con el desarrollo de los rizoides en *Marchantia*. Los rizoides son estructuras unicelulares y tubulares con un crecimiento unidimensional igual que el que tiene lugar en los pelos radiculares de las plantas vasculares (Jones and Dolan, 2012; Honkanen et al., 2016; Champion et al., 2021; Kohchi et al., 2021). A rasgos generales, se observan diferencias en los rizoides en las líneas mutantes y sobreexpresoras *MpDVL* con respecto a la silvestre, pareciendo ser más abundantes y alargados en las líneas sobreexpresoras (**Figura 56 – Figura 58**). Además, y tras estudiar los rizoides con más detalle, observamos que los de la línea CRISPR *MpDVL* tienen una proyección ondulada de la punta a diferencia de los rizoides de la línea silvestre, caracterizados por una proyección recta de la misma (**Figura 60**). Estos resultados muestran un posible defecto en la estabilización de los microtúbulos y por tanto en el crecimiento polarizado de las células, sugiriendo que la región de crecimiento es inestable y no tiene lugar en una región apical concreta (Champion et al., 2021).

Así, el crecimiento distal de la célula que tiene lugar en los rizoides es el mismo tipo de expansión celular polarizado que ocurre en los pelos radiculares de la raíz donde no solo la organización de los microtúbulos del citoesqueleto resulta esencial, sino también otros procesos como son el tráfico vesicular para la incorporación de nueva membrana y pared que se restringe de manera estable a un solo dominio de la superficie celular (Champion et al., 2021; Kohchi et

DISCUSIÓN

al., 2021; Naramoto et al., 2022). Además, estos mecanismos subyacentes al crecimiento polarizado de la célula resultan estar conservados en las plantas terrestres y la mayoría de genes necesarios para el crecimiento distal de los rizoides en *Marchantia* han demostrado ser ortólogos de aquellos genes responsables del crecimiento de los pelos radiculares y tubos polínicos de las angiospermas, lo que sugiere que están controlados por mecanismos comunes (Honkanen et al., 2016; Kohchi et al., 2021; Naramoto et al., 2022).

Estudios como el llevado a cabo por Honkanen et al., 2016, han identificado genes involucrados en el crecimiento de los rizoides que incluyen algunos que codifican proteínas involucradas en la biosíntesis de la pared (celulosas sintetas clase D, por ejemplo), en la detección de la integridad de la pared celular (receptores quinasa de la familia CrRLK1L o serina/treonina quinasa) o en el transporte de vesículas y organización del citoesqueleto (proteínas de unión a microtúbulos, proteínas tipo unión a Ca^{2+} o miosinas). Un ejemplo concreto, y relacionado con los genes destacados en el análisis transcriptómico, puede ser el de la proteína RopGEF1, presente en *Marchantia polymorpha*, que ha demostrado tener un papel en la iniciación de las gemas. Aunque en *Arabidopsis thaliana* la señalización de ROP mediada por RopGEF está involucrada en el crecimiento polarizado de los tubos polínicos y pelos radiculares, en *Marchantia* sí se puede asociar esta vía de señalización con el crecimiento polarizado de la célula que permite las divisiones celulares asimétricas que dan lugar a las gemas (Kohchi et al., 2021).

Por tanto, los resultados obtenidos por los cuales sí se observan diferencias en los rizoides de las plantas mutantes *MpDVL* apoyan la idea de la participación del péptido *MpDVL* en los procesos de morfogénesis asociados a la elongación celular, al igual que sus homólogos *DVL/RTFL* en *Arabidopsis*.

Otros resultados obtenidos en este trabajo tras caracterizar líneas de pérdida de función y sobreexpresoras *MpDVL* han destacado defectos generalizados en el desarrollo de *Marchantia polymorpha*, con un desfase temporal en la formación de los anteridióforos (**Figura 63**). La iniciación del desarrollo reproductivo está controlada por múltiples factores como son la percepción de la luz roja lejana y la duración del día o el reloj circadiano que da lugar a una división y diferenciación celular que permite la formación del anteridióforo en el caso de la accesión masculina (Kohchi et al., 2021). Al igual que ocurre en nuestros mutantes de pérdida de función *MpDVL*, los mutantes de pérdida de función *MpBNB* (*MpBONOBO*) tienen un retraso en la formación de los gametangióforos (Yamaoka et al., 2018). *MpBNB* juega un papel primordial en el desarrollo de los gametangióforos al promover los cambios morfológicos de los tejidos apicales del talo que comienzan con la diferenciación de la célula inicial del anteridio y

arqueogonio, siendo este proceso dependiente la luz roja lejana. Además, esta función parece estar conservada filogenéticamente, puesto que en *Arabidopsis thaliana*, los homólogos *BNB1* y *BNB2*, son necesarios para la especificación de la célula generativa precursora de los espermatozoides durante la formación del polen (Yamaoka et al., 2018). Aunque no esté directamente vinculados con el desarrollo del tubo polínico, su relación con el desarrollo del polen en el caso de *Arabidopsis* y la formación de los anteridióforos en *Marchantia*, nos permite relacionar directamente a los genes *DVL/RTFL* y su parálogo *MpDVL* con los genes *BNB*, quizá participando en las mismas rutas que controlan dichos procesos. Con esto podemos decir que *MpDVL* parece ser un regulador positivo de la diferenciación celular en *Marchantia polymorpha* en su fase reproductiva.

Por otro lado, también se observaron defectos en el número de poros aeríferos cuantificados en nuestras líneas transgénicas *MpDVL*, con un mayor número en las líneas mutantes y menor en las sobreexpresoras (**Figura 65** y **Figura 66**). Este aspecto se relaciona directamente con los procesos de diferenciación celular necesarios para una correcta morfogénesis del talo en el cual encontramos dos zonas de desarrollo diferenciadas: una zona de diferenciación con células dorsales diferenciadas derivadas de los nichos apicales como son las que dan lugar a los poros aeríferos, y otra zona central formada por células inactivas desde el punto de vista de desarrollo al no dividirse (Briginshaw et al., 2022). Las líneas mutantes CRISPR *MpDVL* tienen un índice de área de diferenciación mayor que la línea silvestre, reflejando una mayor capacidad de diferenciación del tejido dorsal, pudiendo indicar un posible papel de *MpDVL* como un regulador negativo de la diferenciación celular en *Marchantia polymorpha* en su fase vegetativa.

Sin embargo, en las líneas sobreexpresoras EF1:*MpDVL* no se observa un menor índice de área de diferenciación como era de esperar por el menor número de poros aeríferos contabilizados (**Figura 66**). Sin embargo, y a pesar de poder parecer una contradicción, este hecho podría relacionarse con lo ya visto en *Arabidopsis*, en el que la sobreexpresión y delección de los genes *DVL/RTFL* provoca fenotipos similares, de tal manera que los defectos fenotípicos observados en lo referente al área de diferenciación en las líneas sobreexpresoras son similares a los de pérdida de función *MpDVL*, al menos en esta parte de los procesos, pudiendo ser parecidos a un dominante negativo o estar alterando la estequiometría de algunas rutas en las que participan.

También se ha notado el posible papel de *MpDVL* aportando robustez y estabilidad al sistema de desarrollo de la planta, tal y como ocurría en *Arabidopsis*. Esto se ha visto con la mayor distribución de los datos existente en el caso de los mutantes CRISPR *MpDVL* con respecto

DISCUSIÓN

al silvestre tras analizar ciertos aspectos como eran el tamaño del área del talo (**Figura 56** y **Figura 57**) o el número de poros aeríferos por talo (**Figura 66**).

Tras analizar todos los resultados observados en *Marchantia polymorpha*, podemos proponer que *MpDVL* tenga un papel generalizado en el desarrollo. Así no ubicaríamos concretamente a *MpDVL* en las rutas génicas que regulan el crecimiento en los nichos apicales como son aquellas en las que participan los genes *MpCLE2*, *MpCLE1*, *MpCLV1* o *MpTDR* al controlar el tamaño de la región proliferativa del meristemo; o las que regulan la formación de los poros aeríferos en cuya iniciación y desarrollo participan genes como *MpNOP1* o *MpWIP*; o las que controlan la transición del desarrollo reproductivo mediada por luz necesarias para la formación de los anteridióforos en las que si se ha visto la implicación de genes como son *MpARF3*, *MpPIF* y *MpBNB*, o aquellas que participan en el crecimiento polarizado de los rizoides (Kohchi et al., 2021).

De este modo *MpDVL* estaría teniendo un papel generalizado en la morfogénesis por su implicación en procesos de diferenciación y elongación celular, al igual que ocurría en el caso de *Arabidopsis* y la implicación de los genes *DVL/RTFL* en la morfogénesis. Este rol generalizado también se apoya, aparte de con los defectos morfológicos ya comentados con anterioridad, con la localización extendida de *MpDVL* a lo largo del desarrollo del talo en *Marchantia* (**Figura 68**).

Con todo lo dicho anteriormente, podemos decir que los genes *DVL/RTFL* no son esenciales para el desarrollo de la planta y que su función está más relacionada con la regulación general de procesos de morfogénesis a lo largo del desarrollo, aportando robustez o estabilidad al sistema.

Encontrar procesos relacionados con la morfogénesis como es la elongación celular conservados entre *Arabidopsis thaliana* y *Marchantia polymorpha* da idea de una conservación funcional entre los ortólogos *DVL/RTFL* de las dos especies estudiadas en este trabajo lo que puede dar evidencia de la conservación funcional generalizada de los genes *DVL/RTFL*.

Así, esta conservación sugiere que los mecanismos involucrados en el crecimiento polarizado de las estructuras radiculares, en los que estarían participando los genes *DVL/RTFL*, se establecieron en las primeras fases de la evolución de los organismos vegetales y que quizá algunos de estos genes se cooptaron para otros procesos relacionados con innovaciones evolutivas. Por ejemplo, es posible especular que adquirieran un papel relacionado con la evolución del polen y los tubos polínicos. Es interesante destacar cómo, después de la aparición de las plantas con flor, que acompaña a la expansión de la familia *DVL/RTFL*, los procesos de

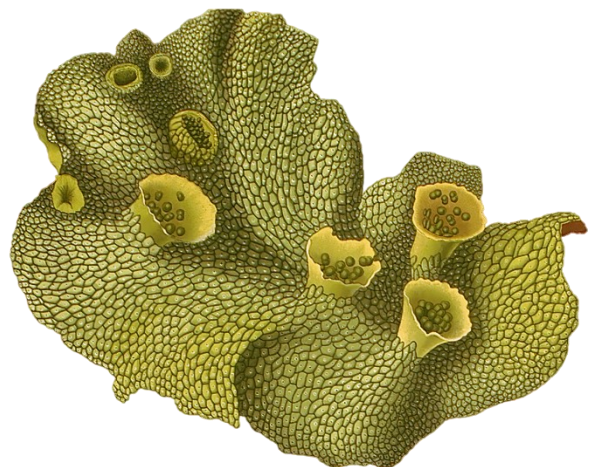
elongación del tubo polínico adquieren una mucha mayor velocidad de crecimiento y mayor direccionalidad que en las gimnospermas. Se apoya por tanto la hipótesis de Guo et al., 2015, según la cual la familia DVL/RTFL podría haberse originado a partir de secuencias ancestrales presentes en briófitas tempranas y habría experimentado una expansión amplia durante la transición a las plantas con flores, existiendo un cierto grado de diversificación funcional, que podría depender de motivos adquiridos, así como la relevancia biológica de estos péptidos, que podrían estar adquiriendo nuevas funciones en distintos taxones.

Además, muchas familias de genes de *Arabidopsis thaliana* que contienen genes implicados en el crecimiento de los pelos radiculares han demostrado estar presentes como un gen de una sola copia en *Marchantia polymorpha* (Honkanen et al., 2016). Por lo tanto, puede ocurrir que los homólogos de *Marchantia* de algunos genes implicados en el crecimiento del pelo radicular tengan funciones de desarrollo más generales que sus homólogos de *Arabidopsis* y, en consecuencia, puedan producir defectos de crecimiento más graves, tal y como parece ocurrir con el gen *MpDVL* en *Marchantia* y sus homólogos *DVL/RTFL* en *Arabidopsis*.

Por tanto, continuar el estudio y la caracterización de la familia DVL/RTFL en estas especies modelo, así como en otras especies representativas de distintos taxones en las plantas terrestres resulta imprescindible para conocer con exactitud el mecanismo de acción que da lugar a su función biológica, así como la importancia de su conservación a nivel evolutivo.

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES



Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral nos han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. Los genes *DVL/RTFL* podrían estar aportando robustez a procesos de desarrollo a través de la redundancia génica que existiría entre los diferentes miembros de la familia.
2. Los péptidos *DVL/RTFL* actúan en el crecimiento distal de la célula, y en particular el crecimiento y desarrollo del tubo polínico, pudiendo tener un papel general manteniendo la robustez del proceso de elongación celular.
3. El efecto de la sobreexpresión de los genes *DVL/RTFL* podría ser similar al de un dominante negativo, quizá por producir una saturación o alteración de la estequiometría de algunos complejos moleculares que median su actividad.
4. Los péptidos *DVL/RTFL* no se integran en la membrana plasmática, aunque sí que están asociados a la misma a través de su interfase descartándose que se traten de proteínas integrales de membrana, pero pudiendo estar unidos a proteínas transmembrana o unidos directamente a la bicapa lipídica electrostáticamente.
5. Los péptidos *DVL/RTFL* interactúan *in planta* con proteínas relacionadas con la elongación celular como son *KIN13A* o *BSK6*, con la señalización celular como es *SRC2*, con la proliferación celular como es *PROLIFERA* o con la división, expansión y diferenciación celular como es *CDC48*.
6. Los péptidos *DVL/RTFL* son capaces de formar homodímeros y heterodímeros entre sí y esta capacidad de dimerización parece residir en el dominio funcional *DVL/RTFL*.
7. El estudio en *Marchantia polymorpha* confirma que *MpDVL* no se trata de un gen esencial y que la función de los péptidos *DVL/RTFL* estaría conservada entre las diferentes especies de plantas, participando de manera generalizada en procesos de morfogénesis asociados a la diferenciación y elongación celular aportando robustez al sistema.
8. El gen *MpDVL* parece ser un regulador positivo de la diferenciación celular en *Marchantia polymorpha* en su fase reproductiva y un regulador negativo de la diferenciación celular en su fase vegetativa.

CONCLUSIONES

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Material biológico

1.1. Material vegetal

En este trabajo se han empleado como modelos experimentales las especies *Arabidopsis thaliana* y *Marchantia polymorpha*. Además, para la expresión transitoria *in planta*, en los ensayos de BIFC y para el análisis de colocación celular, se ha utilizado *Nicotiana benthamiana*. Como parental silvestre de *Arabidopsis* se ha empleado el ecotipo Col-0 y en *Marchantia* el parental masculino TAK-1. Los mutantes de pérdida de función *dvl/rtfl* de *Arabidopsis* provienen de la colección de líneas mutantes de inserción de T-DNA del instituto SALK (<http://signal.salk.edu>), de la colección de mutantes de la universidad de Bielefeld GABI-KAT (<https://www.gabi-kat.de/>) y de la colección de mutantes de inserción de T-DNA de Syngenta, SAIL.

1.1.1. Líneas mutantes

Las líneas mutantes de *Arabidopsis* empleadas en este trabajo se detallan en la **Tabla MM1**.

Tabla MM1. Líneas mutantes de *Arabidopsis* empleadas en este trabajo.

LÍNEA	MUTÁGENO	ECOTIPO	SELECCIÓN	COLECCIÓN / CÓDIGO/ REFERENCIA
<i>dvl8</i>	T-DNA	Col-0	Kanamicina	SALK_093633C
<i>dvl11</i>	T-DNA	Col-0	Kanamicina	SALK_204467
<i>rtfl11</i>	T-DNA	Col-0	Sulfadiazina	GK_321A11
<i>dvl19</i>	T-DNA	Col-0	BASTA	SAIL_691_G09
<i>dvl1</i>	CRISPR/Cas9	Col-0	Higromicina (T1, T2) – Sin resistencia (\geq T3)	Este trabajo
<i>dvl4</i>	CRISPR/Cas9	Col-0	Higromicina (T1, T2) – Sin resistencia (\geq T3)	Este trabajo
<i>rtfl9</i>	CRISPR/Cas9	Col-0	Higromicina (T1, T2) – Sin resistencia (\geq T3)	Este trabajo
<i>dvl3</i>	CRISPR/Cas9	Col-0	Higromicina (T1, T2) – Sin resistencia (\geq T3)	Este trabajo
<i>dvl5</i>	CRISPR/Cas9	Col-0	Higromicina (T1, T2) – Sin resistencia (\geq T3)	Este trabajo
<i>dvl6</i>	CRISPR/Cas9	Col-0	Higromicina (T1, T2) – Sin resistencia (\geq T3)	Este trabajo
* A partir de los simples mutantes descritos se generaron múltiples mutantes por cruzamiento o transformación sobre un fondo mutantes				

Por otra parte, en la **Tabla MM2** se indican las líneas mutantes de *Marchantia* generadas en este trabajo.

Tabla MM2. Líneas mutantes de *Marchantia* generadas en este trabajo.

LÍNEA	MUTÁGENO	ECOTIPO	SELECCIÓN
CRISPR <i>MpDVL 10</i>	CRISPR/Cas9	TAK1	Higromicina
CRISPR <i>MpDVL 11</i>	CRISPR/Cas9	TAK1	Higromicina
CRISPR <i>MpDVL 16</i>	CRISPR/Cas9	TAK1	Higromicina
CRISPR <i>MpDVL 23</i>	CRISPR/Cas9	TAK1	Higromicina

1.1.2. Líneas transgénicas

En cuanto a líneas transgénicas de *Arabidopsis*, en este trabajo se han empleado las detalladas a continuación en la **Tabla MM3**.

Tabla MM3. Líneas transgénicas de *Arabidopsis* empleadas en este trabajo.

LÍNEA	CONSTRUCCIÓN	FONDO GENÉTICO	SELECCIÓN	PROCEDENCIA
<i>dv1-1D</i>	T-DNA	Col-0	BASTA	(Valdivia et al., 2012)
35S::DVL8	pBIB	Col-0	Kanamicina	(Valdivia et al., 2012)
AtCDC48 _{pro} :YFP:AtCDC48	pPZP211	<i>Atcdc48A</i> ^{T-DNA}	Kanamicina	(Park et al., 2008)
Etanol inducible Atcdc48 ^{DN}	(Park et al., 2008)	Col-0	Kanamicina	(Park et al., 2008) y este trabajo
Etanol inducible Atcdc48 ^{DN}	(Park et al., 2008)	<i>dv1-1D</i>	Kanamicina	(Park et al., 2008) y este trabajo
Etanol inducible Atcdc48 ^{DN}	(Park et al., 2008)	<i>dv13 dv15 dv16 dv14 dv11 rtfl9 dv18 dv111 rtfl1 dv119</i>	Kanamicina	(Park et al., 2008) y este trabajo
35S::MpDVL	pMDC32	Col-0	Higromicina	Este trabajo

Para *Marchantia*, se han utilizado las líneas transgénicas indicadas en la **Tabla MM4**.

Tabla MM4. Líneas transgénicas de *Marchantia* generadas en este trabajo.

LÍNEA	VECTOR	FONDO GENÉTICO	SELECCIÓN	PROCEDENCIA
EF1:MpDVL:Citrine 1	pMpGWB108	TAK1	Higromicina	Este trabajo
EF1:MpDVL:Citrine 2	pMpGWB108	TAK1	Higromicina	Este trabajo
EF1:MpDVL:Citrine 14	pMpGWB108	TAK1	Higromicina	Este trabajo
EF1:MpDVL:Citrine 15	pMpGWB108	TAK1	Higromicina	Este trabajo
EF1:MpDVL:Citrine 17	pMpGWB108	TAK1	Higromicina	Este trabajo
EF1:MpDVL:Citrine 19	pMpGWB108	TAK1	Higromicina	Este trabajo
MpDVL _{pro} :MpDVL:GUS	pMpGWB304	TAK1	Clorsulfuron	Este trabajo

1.1.3. Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en el invernadero

Las plantas de *Arabidopsis* se crecieron en una mezcla de turba negra:perlita:vermiculita en proporción 2:1:1, en alveolos de 6,5 x 6,5 x 5 cm o de 4,1 x 4,5 x 5 cm, o macetas de plástico de 12 cm de diámetro. Una vez sembradas en tierra, y con el fin de sincronizar la germinación, las semillas se estratificaron durante 3 días en oscuridad y a una temperatura de 4°C. Las plantas se crecieron en cabinas de invernadero con luz natural combinada con luz blanca fría (4600lm) para completar un fotoperiodo de 16h de luz y 8h de oscuridad. La temperatura se mantuvo constante entre los 21°C y 23°C y una humedad del 50%. El riego se realizó por inmersión de manera periódica con una combinación de agua y solución Hoagland nº1 suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966).

1.1.4. Cultivo de *Nicotiana benthamiana* en el invernadero

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se cultivaron en macetas de 12 cm de diámetro con una mezcla 2:1:1 de turba negra:perlita:vermiculita en fitotroneos de cultivo en el invernadero con iluminación procedente de tubos fluorescentes de luz blanca fría (4600lm), bajo un fotoperiodo de día largo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 21°C. El riego se realizó por inmersión de manera periódica con una combinación de agua y solución Hoagland nº1 suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966).

1.1.5. Cultivo de *Arabidopsis thaliana in vitro*

Para el cultivo *in vitro*, las semillas de *Arabidopsis thaliana* se esterilizaron con una solución acuosa de etanol al 70% (v/v) y Tritón-X-100 al 0.005% (v/v) durante 3 minutos con agitación, seguido de un lavado con etanol al 96% (v/v) durante 1 minuto con agitación y se dejaron secar. Las plantas se cultivaron en placas de Petri de 90 cm o 140 cm de diámetro, selladas con cinta *Micropore™ 3M Surgical Tape* para facilitar el intercambio de gases, en un medio de cultivo sólido compuesto por 2.2 g/L de sales MS (Duchefa), 20 g/L de sacarosa, 0.1 g/L MES, y 6.0 g/L de agar; ajustando el pH a 5.9. Como agentes selectivos se utilizaron Higromicina (40 µg/ml), Glufosinato de amonio (BASTA, 15 µg/ml), Kanamicina (50 µg/ml) o Timentina (300 mg/ml) dependiendo de la línea cultivada. Tras sembrar las semillas en las placas Petri, se estratificaron durante 3 días a 4°C en oscuridad para después ser crecidas en una cabina de cultivo *in vitro* con fotoperiodo de día largo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a temperatura constante de 24°C. La luz blanca fría fue emitida por tubos fluorescentes Sylvania Gro Lux 36W (850 lm).

1.1.6. Cultivo de *Marchantia polymorpha in vitro*

Las plantas de *Marchantia polymorpha* se cultivaron en medio ½ Gamborg's B5 (Gamborg et al., 1968) (medio Gamborg B5 con vitaminas – Duchefa) con 1% de phyto agar (Duchefa), en

MATERIALES Y MÉTODOS

placas de 90 cm de diámetro en cabinas de cultivo *in vitro* con fotoperiodo de día largo de 16 h de luz ($90\text{-}100\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) y 8 h de oscuridad a temperatura constante de 24°C. La luz blanca fría fue emitida por tubos fluorescentes Sylvania Gro Lux 36W con una intensidad de $50\text{-}60\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$.

La inducción de los órganos sexuales reproductores o anteridióros se llevó a cabo en condiciones de luz blanca continua suplementada con luz rojo lejano (FR, Far Red) ($20\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) en proporción R:FR = 0.5 en comparación a la luz blanca continua con una proporción R:FR = 6. La presencia de anteridióforos se detectó a simple vista.

1.1.7. Fertilización cruzada en *Arabidopsis thaliana*

Para obtener plantas combinando dos genotipos como era el caso de la obtención de múltiples mutantes *dv1/rtfl*, se emascularon las flores receptoras, empleadas como parental femenino, con ayuda de unas pinzas de disección eliminando sépalos, pétalos y estambres hasta dejar únicamente el pistilo. A continuación, se recogieron los estambres de la planta donante, empleada como parental masculino, y se depositó el polen sobre el estigma de la planta receptora. Los pistilos polinizados se recogieron una vez elongados en el momento en el que empezaban a tornar el color de verde a amarillo.

1.2. Material bacteriano

Para este trabajo se han utilizado las cepas bacterianas indicadas en la **Tabla MM5**.

Tabla MM5. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

CEPA BACTERIANA	USO	ORIGEN/REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Transformación de bacterias	(Hanahan, 1983)
<i>Escherichia coli</i> Supercharge EZ10	Transformación de bacterias	Clontech
<i>Escherichia coli</i> one Shot® TOP10 Chemically Competent	Transformación de bacterias	Cat nº C4040 Invitrogen
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 pMP90	Transformación de plantas	(Koncz and Schell, 1986)

1.2.1. Cultivo de bacterias *in vitro*

Las bacterias se cultivaron en medio LB (*Luria-Bertani*), cuya composición es: triptono 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 1 g/L, pH 7.0. El medio sólido se obtuvo añadiendo 15 g/L de agar. Los cultivos líquidos de *E. coli* se incubaron toda la noche a 37°C con agitación de 200 rpm y los de *A. tumefaciens* a 28°C también con agitación. Los cultivos en medio sólido de *E. coli* se incubaron durante una noche a 37°C y los de *A. tumefaciens* a 28°C durante 2 días.

Para la selección de bacterias transformadas, los medios de cultivo se suplementaron con los correspondientes antibióticos según fuese necesario: Espectinomicina (100 µg/ml), Cloramfenicol (33 µg/ml), Gentamicina (100 µg/ml), Ampicilina (100 µg/ml), Kanamicina (50 µg/ml) y Rifampicina (100 µg/ml).

1.2.2. Conservación de los microorganismos en glicerol

Con el fin de conservar los cultivos de bacteria por un largo periodo de tiempo, se prepararon glicerizados en crioviales con 900 µl de cultivo de *E. Coli* o *A. tumefaciens* a los que se les añadió la misma cantidad de glicerol al 50%. Estos glicerizados se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron en cajas de congelación a -80°C.

1.3. Líneas celulares de mamífero

Las construcciones para los estudios de inserción de membrana se transfectaron y expresaron en células HEK293-T de riñón humano obtenidas de ATCC (<http://www.atcc.org>) y mantenidas en medio Eagle modificado Dulbecco (DMEM) (Gibco, <http://www.lifetechnologies.com>) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco). El cultivo de células se llevó a cabo en monocapa con las células creciendo adheridas sobre un soporte sólido plástico a 37°C en horizontal y se dispersaron por métodos enzimáticos con tripsina y pasaron a un nuevo frasco con medio de cultivo nuevo cada dos días.

1.3.1. Expresión en células de mamífero para estudios de topología de membrana

Las construcciones generadas en el plásmido C_LTM (facilitado por Ismael Mingarro del grupo de proteínas de membrana, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Valencia, Duart et al., 2022) y cuya construcción se detalla más adelante en el apartado 2.4.4, se transfectaron en células HEK293-T usando polietilenamina (PEI). Para ello se cultivaron las células en placas de 6 pocillos y cuando estas tenían una confluencia de entre el 70% - 90% (un día de crecimiento) y se añadieron 4 µg de PEI por cada µg de DNA además de 100 µl de DMEM/µg de DNA. Aproximadamente 24 horas tras la transfección las células fueron colectadas y lavadas con tampón PBS. Tras una centrifugación de 5 minutos a 200 g las células se lisaron añadiendo 200 µl de tampón de lisis (0.3% SDS en PBS 1X) y sonicando en un bioruptor (Diagenode) en un baño de hielo durante 15 minutos y centrifugando. 35 µl del lisado de proteínas se trataron con Endoglicosidasa H (EndoH) (Roche Molecular Biochemicals) para usarlo como control siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras, tanto tratadas como no tratadas con EndoH, se suplementaron con tampón de carga (Tris-HCl 625 mM pH 6.8, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), β- mercaptoetanol 4% (v/v) y azul de bromofenol 0.025% (p/v)) y sometidas a desnaturalización durante 5 minutos a 95°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Seguidamente se llevó a cabo un análisis SDS-PAGE (gel a 14% de poliacrilamida, amperaje constante de 20 mA y voltaje máximo de 200 V) y transferido a una membrana PVDF de transferencia (ThermoFisher Scientific) mediante una transferencia húmeda a 100 V durante 50 min. El estado de glicosilación de la proteína se analizó por Western Blot usando un anticuerpo primario *anti-c-myc* (Sigma), un anticuerpo secundario *anti-rabbit IgG*-peroxidasa conjugada (Sigma), y con un reactivo de revelado ECL (GE Healthcare), siguiendo las indicaciones de los fabricantes. La quimioluminiscencia se visualizó empleando un ImageQuantTMLAS 4000mini Biomolecular Imager (GE Healthcare).

2. Métodos de biología molecular

2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos

2.1.1. Extracción de DNA plasmídico de *E. Coli*

Para las extracciones de DNA plasmídico de *E. coli* se utilizaron kits comerciales. Partiendo de 5 ml de un cultivo líquido de *E. coli* crecido en medio LB suplementado con los antibióticos de selección correspondientes durante unas 16 horas aproximadamente, en agitación y a 37°C; se empleó el kit *NZYMiniprep* (nzytech) según las indicaciones del fabricante.

2.1.2. Extracción de DNA plasmídico de *A. tumefaciens*

Para el aislamiento del DNA plasmídico de *A. tumefaciens* se empleó el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, 1989. Se partió de un cultivo líquido de 5 ml de *A. tumefaciens* crecido durante 24 horas a 28°C en agitación en medio LB suplementado con Rifampicina y los antibióticos de selección correspondientes. Debido a la baja calidad y cantidad de DNA plasmídico obtenido mediante este protocolo, este material se empleó, exclusivamente, para la transformación de células de *E. coli*, de las cuales se volvió a extraer DNA plasmídico para el posterior análisis y comprobación del mismo.

2.1.3. Extracción de DNA genómico de *Arabidopsis thaliana* y *Marchantia polymorpha*

La extracción de DNA genómico de planta se llevó a cabo a partir de hojas de roseta de aproximadamente 1 cm de longitud, en el caso de *Arabidopsis*; y de un corte de talo de alrededor de 1 cm² para *Marchantia*, recolectado en frío y machacado en nitrógeno líquido, bien con un pistilo o con ayuda mecánica de bolas de cristal. El DNA genómico se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Weigel y Glazebrook, 2009, *Quick DNA prep for PCR*. El DNA obtenido se resuspendió en 100 µl de agua Milli-Q y se almacenó a -20°C para su posterior uso.

2.1.4. Extracción de RNA total de *Arabidopsis thaliana*

Para la extracción de RNA de *Arabidopsis* se recolectaron las muestras directamente en nitrógeno líquido evitando su descongelación en la medida de lo posible. Las muestras congeladas se machacaron con la ayuda de un mortero hasta obtener un polvo muy fino que se dividió en tubos eppendorf de 1,5 ml con aproximadamente 10 mg de polvo en cada uno.

La extracción de RNA de *Arabidopsis* para la realización de RT-qPCR se llevó a cabo utilizando el kit *E.Z.N.A. Plant RNA kit* (Omega) siguiendo las instrucciones del protocolo de la casa comercial. El RNA obtenido se cuantificó mediante un Nanodrop ND1000 (Applied) y su integridad se determinó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Por último, el RNA obtenido se trató con DNasa utilizando el sistema *DNA free kit* (Fermentas) para eliminar los posibles restos de DNA genómico.

Por su parte, para el análisis de expresión mediante RNA-seq que requiere de RNA de alta calidad, pureza e integridad, la extracción de RNA se realizó empleando el sistema *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) con las indicaciones del fabricante por las que se llevaba a cabo el tratamiento con DNasa directamente sobre la columna con el sistema *RNase-Free DNase Set* (Qiagen). El RNA obtenido se cuantificó en primer lugar con el NanoDrop ND1000 y después, su calidad se determinó en un Bioanalyzer 2100 (Agilent), empleando únicamente aquellas muestras que presentaron un valor RIN igual o superior a 7.

2.1.5. Extracción de RNA total de *Marchantia polymorpha*

Para la extracción de RNA de *Marchantia* se obtuvo el polvo del material vegetal moliéndolo en un mortero tras haberlo congelado con nitrógeno líquido. La extracción de RNA total para el análisis de los niveles de expresión mediante RT-qPCR se llevó a cabo empleando *TRIzol™ Reagent* (Invitrogen) siguiendo el protocolo y especificaciones del fabricante. El RNA obtenido se cuantificó mediante un Nanodrop ND1000 (Applied) y su integridad se determinó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Por último, el RNA obtenido se trató con DNasa utilizando el sistema *DNA free kit* (Fermentas) para eliminar los posibles restos de DNA genómico.

2.2. Manipulación de ácidos nucleicos

2.2.1. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se partió de entre 2 y 3 µg de RNA previamente aislado y tratado con DNasa según se describe en los apartados anteriores. El RNA se transcribió empleando el sistema *SuperScript IV* y *Oligo dT₁₂₋₁₈* (Thermofisher), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se empleó para amplificar fragmentos de DNA con varias finalidades, como el genotipado de líneas mutantes, la clonación o la cuantificación de la expresión génica. En cada uno de los casos se emplearon diferentes combinaciones de oligonucleótidos específicos (**Tabla MM11**), moldes de DNA diferentes como cDNA, DNA genómico, DNA plasmídico o fragmentos de PCR, así como diferentes tipos de DNA polimerasas comerciales. Para la amplificación de fragmentos de DNA para su posterior clonaje se emplearon la polimerasa de alta fidelidad *HF Phusion* (Thermofisher) en el caso de *Arabidopsis* y la polimerasa *Ex Taq* (TaKaRa) para *Marchantia* mientras que, para el genotipado de líneas mutantes en ambas especies de plantas, se empleó la polimerasa *GoTaq* (Promega). El uso de estas enzimas se llevó a cabo siguiendo los protocolos descritos por el fabricante. Las condiciones generales se muestran las **Tablas MM6, MM7 y MM8**.

Tabla MM6. Condiciones generales empleadas para la amplificación de DNA mediante PCR con la polimerasa de alta fidelidad *HF Phusion* (Thermofisher). Se indica la mezcla de reacción estándar (mix) y el programa empleado. T_m, temperatura óptima de hibridación de los oligonucleótidos.

MIX PCR		PROGRAMA PCR			
		Paso ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Tampón	1 X	Desnaturalización inicial	98°C	30 s	1
MgCl ₂	1.5 mM	Desnaturalización	98°C	10 s	35
dNTPs	400 µM	Hibridación	T _m + 3°C	30 s	
Oligo directo	0.5 µM	Extensión	72°C	15-30 s/kb	
Oligo reverso	0.5 µM	Extensión final	72°C	10 min	1
H ₂ O	Vol. final 50 µl	Almacenaje	4°C	∞	1
Polimerasa	1 U				
DNA molde	1 pg – 10 ng				

Tabla MM7. Condiciones generales empleadas para la amplificación de DNA mediante PCR con la polimerasa *Ex Taq* (TaKaRa). Se indica la mezcla de reacción estándar (mix) y el programa empleado.

MIX PCR		PROGRAMA PCR			
		Paso ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Tampón	1 X	Desnaturalización inicial	94°C	30 s	1
MgCl ₂	2 mM	Desnaturalización	98°C	20 s	35
dNTPs	200 µM	Hibridación	72°C	1 min/kb	
Oligo directo	0.4 µM	Extensión			
Oligo reverso	0.4 µM	Extensión final	72°C	5 min	1
H ₂ O	Vol. final 50 µl	Almacenaje	4°C	∞	1
Polimerasa	1.25 U				
DNA molde	< 500 ng				

Tabla MM8. Condiciones generales empleadas para la amplificación de DNA mediante PCR con la polimerasa *GoTaq* (Promega). Se indica la mezcla de reacción estándar (mix) y el programa empleado. T_m, temperatura óptima de hibridación de los oligonucleótidos.

MIX PCR		PROGRAMA PCR			
		Paso ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Tampón	1 X	Desnaturalización inicial	94°C	2 min	1
MgCl ₂	2 mM	Desnaturalización	94°C	30 s	30
dNTPs	200 µM	Hibridación	T _m - 5°C	40 s	
Oligo directo	0.8 µM	Extensión	72°C	1 min/kb	
Oligo reverso	0.8 µM	Extensión final	72°C	5 min	1
H ₂ O	Vol. final 25 µl	Almacenaje	4°C	∞	1
Polimerasa	0.5 U				
DNA molde	< 0.25 µg				

2.2.3. Purificación de fragmentos de DNA

Tras la PCR, en algunos procesos como son la clonación o la secuenciación, se requiere utilizar productos amplificados de alta calidad y pureza, es por ello por lo que en esas ocasiones se llevó a cabo un paso de purificación extra tras la reacción de amplificación.

En los casos en los que tras la PCR se amplificaban, además del amplicón de interés, algún otro fragmento adicional de diferentes tamaños se procedió a separarlos mediante electroforesis en gel de agarosa entre el 1% y 2%. El fragmento de interés se cortó, con ayuda de una cuchilla, y separó del gel y el DNA contenido en ese fragmento se extrajo empleando el kit comercial *Mi-Gel Extraction Kit* (Metabion) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Mientras que, tras la amplificación se obtenía únicamente el producto deseado, se empleó el kit comercial *Mi-PCR Purification Kit* (Metabion) con las instrucciones del fabricante como guía.

2.2.4. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

La PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se utilizó para la cuantificación relativa de la expresión génica. Para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen a cuantificar (**Tabla MM11**) intentando ajustarlos a los siguientes parámetros: T_a de hibridación entre 58-62°C, contenido de GC entre el 40-60% y amplicones generados entre 100-300 pb. En primer lugar, se probaron las diferentes parejas de oligonucleótidos diseñadas en una RT-qPCR con diluciones seriadas de cDNA (1, 1/10, 1/100 y 1/1000) para determinar tanto su eficiencia de amplificación, como analizar otros posibles problemas de amplificación como son la generación de amplicones inespecíficos o de dímeros de oligonucleótidos, descartando así aquellas parejas que mostraban valores de eficiencia superiores a 110 o inferiores a 90.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tanto para el cálculo de la eficiencia como para la cuantificación en sí, las reacciones de RT-qPCR se realizaron en un volumen final de 10 μ l, incluyendo 2 μ l de *Premix PyroTaq Eva Green qPCR Mix Plus*, 0.5 μ l de cada uno de los oligonucleótidos a una concentración de 5 μ M y 2 μ l de cDNA. Todas las reacciones se realizaron con tres réplicas técnicas y se incluyeron controles negativos de la reacción para descartar contaminaciones. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *QuantStudio™* (Thermofisher) y se utilizó el programa de amplificación recomendado por la casa comercial (2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C). El cDNA del gen de interés se cuantificó, durante la fase exponencial, según el número de ciclos necesarios para superar el umbral determinado de fluorescencia (Ct). A partir de ese valor, se calculó la expresión relativa del gen de interés respecto al gen constitutivo *TAP42 INTERACTING PROTEIN OF 41 KDA (TIP41)*, en el caso de Arabidopsis, o *MpELONGATION FACTOR 1a (MpEF1a)* en el caso de Marchantia, con el método $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

2.2.5. Análisis de DNA mediante digestión con enzimas de restricción

La digestión de DNA con enzimas de restricción se llevó a cabo siguiendo los protocolos estándar (Maniatis *et al.*, 1982), empleando el tampón y las condiciones recomendadas por el fabricante para cada enzima. Los fragmentos de DNA generados tras la digestión se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa entre el 0.8 y el 2% de concentración en tampón TBE 1X (Tris 44.5mM (pH 8.0), ácido bórico 44.5mM, EDTA 1.25mM). En caso de ser necesaria, la purificación de los fragmentos de DNA a partir del gel de agarosa se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.3.

2.3. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas de Arabidopsis se recolectaron las muestras directamente en nitrógeno líquido para evitar su descongelación. Las muestras congeladas se machacaron con la ayuda de un mortero hasta obtener un polvo muy fino que se dividió en tubos eppendorf de 2 ml con aproximadamente 500 mg de polvo en cada uno.

A continuación, se extrajeron las proteínas añadiendo 2 ml/g de tejido, de buffer de extracción de proteínas (BEP: 4 M Urea, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% β -mercaptoetanol, 0.1% SDS, Inhibidor de proteasa en pastilla). Se homogenizaron muy bien las muestras y con el buffer con ayuda del vortex y en frío para después centrifugarlas a máxima velocidad durante 30 minutos a 4°C. En el sobrenadante era donde se encontraban las proteínas que se cuantificaron para su posterior análisis mediante el método de Bradford (Kruger, 2009).

2.4. Construcciones

2.4.1. Vectores plasmídicos empleados

Para este trabajo se han utilizado los siguientes vectores que aparecen en la **Tabla MM9**.

Tabla MM9. Vectores plasmídicos empleados en este trabajo.

NOMBRE	USO - CARACTERÍSTICAS	RESISTENCIA (bacteria/planta)	PROCEDECIA
pCBC_DT1DT2	Clonaje del módulo inicial con múltiples sitios sgRNA para la edición genómica CRISPR/Cas9 en Arabidopsis.	Cloramfenicol	Addgene (Wang et al., 2015)
pCBC_DT2DT3	Clonaje del módulo inicial con múltiples sitios sgRNA para la edición genómica CRISPR/Cas9 en Arabidopsis.	Cloramfenicol	Addgene (Wang et al., 2015)
pHEE401_E	Clonaje y transformación de Arabidopsis para edición genómica CRISPR/Cas9 – promotor célula huevo, Cas9.	Kanamicina/ Higromicina	Addgene (Wang et al., 2015)
PCR8/GW/TOPO	Clonaje de productos de PCR, vector de entrada sistema <i>Gateway</i> .	Espectinomicina	Invitrogen
pYFC43	Vector de expresión para la generación de fusiones traduccionales a la mitad C-terminal de la proteína fluorescente YFP	Kanamicina/ Higromicina	A. Ferrando - IBMCP
pYFN43	Vector de expresión para la generación de fusiones traduccionales a la mitad N-terminal de la proteína fluorescente YFP	Kanamicina/ Higromicina	A. Ferrando - IBMCP
pMDC43	Clonaje y transformación de Nicotiana. Contiene el promotor 35S y la proteína de fusión GFP.	Kanamicina/ Higromicina	Invitrogen
pMDC32	Clonaje y transformación de Arabidopsis y Nicotiana. Contiene un promotor 2x35S.	Kanamicina/ Higromicina	Invitrogen
C_LTM	Estudio de topología de proteína de membrana. Contiene una cadena ligera del del anticuerpo λ con una secuencia transmembrana, dos sitios de glicosilación y una etiqueta c-myc.	Ampicilina	I. Mingarro (UV)
pMpGE_En03	Clonaje de un módulo de expresión de gRNA para edición genómica CRISPR/Cas9 en Marchantia. Sitios de restricción BsaI.	Kanamicina	Addgene (Sugano et al., 2018)
pMpGE010	Clonaje y transformación de Marchantia para edición genómica CRISPR/Cas9.	Espectinomicina/ Higromicina	Addgene (Sugano et al., 2018)
pDONR207	Clonaje de productos de PCR, vector de entrada <i>Gateway</i>	Gentamicina	Invitrogen
pMpGWB108	Vector binario <i>Gateway</i> para clonaje y transformación de Marchantia. Contiene el promotor MpEF1 α y el reportero Citrina.	Espectinomicina/ Higromicina	Addgene (Ishizaki et al., 2015)
pMpGWB304	Vector binario <i>Gateway</i> para clonaje y transformación de Marchantia. Contiene y el reportero GUS.	Espectinomicina/ Clorsulfuron	Addgene (Ishizaki et al., 2015)

2.4.2. Construcciones plasmídicas empleadas

En este trabajo se han utilizado las construcciones plasmídicas detalladas en la **Tabla MM10**.

Tabla MM10. Construcciones plasmídicas empleadas en este trabajo.

NOMBRE	USO – CARACTERÍSTICAS - INSERTO	PROCEDENCIA
CRISPR		
RTFL9_2sgRNA_pHEE401e	Obtención de líneas mutantes mediante la tecnología CRISPR/Cas9 para el gen <i>RTFL9</i> con dos guías. Obtenido mediante clonaje Golden Gate siguiendo el protocolo descrito por Wang <i>et al.</i> 2015.	Este trabajo
DVL1_2sgRNA_pHEE401e	Obtención de líneas mutantes mediante la tecnología CRISPR/Cas9 para el gen <i>DVL1</i> con dos guías. Obtenido mediante clonaje Golden Gate siguiendo el protocolo descrito por Wang <i>et al.</i> 2015.	Este trabajo
DVL4_2sgRNA_pHEE401e	Obtención de líneas mutantes mediante la tecnología CRISPR/Cas9 para el gen <i>DVL4</i> con dos guías. Obtenido mediante clonaje Golden Gate siguiendo el protocolo descrito por Wang <i>et al.</i> 2015.	Este trabajo
DVL3_DVL5_DVL6_sgRNA_pHEE401e	Obtención de líneas mutantes mediante la tecnología CRISPR/Cas9 para los genes <i>DVL3</i> , <i>DVL5</i> y <i>DVL6</i> con tres guías. Obtenido mediante clonaje Golden Gate siguiendo el protocolo descrito por Wang <i>et al.</i> 2015.	Este trabajo
Vectores tipo Entry		
DVL1_pCR8/GW/TOPO	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto: CDS de ATG a STOP del gen <i>DVL1</i> .	Este trabajo
DVL11_pCR8/GW/TOPO	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto: CDS de ATG a STOP del gen <i>DVL11</i> .	Este trabajo
BSK6_pCR8/GW/TOPO	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto: CDS de ATG a STOP del gen <i>BSK6</i> .	Este trabajo
AT3G07820_pCR8/GW/TOPO	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto: CDS de ATG a STOP del gen <i>AT3G07820</i> .	Este trabajo
SRC2_pCR8/GW/TOPO	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto: CDS de ATG a STOP del gen <i>SRC2</i> .	Este trabajo
AT2G20550_pCR8/GW/TOPO	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto: CDS de ATG a STOP del gen <i>AT2G20550</i> .	Este trabajo
COBL8_pCR8/GW/TOPO	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto: CDS de ATG a STOP del gen <i>COBL8</i> .	Este trabajo
CDC48_pCR8/GW/TOPO	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto: CDS de ATG a STOP del gen <i>CDC48</i> .	Este trabajo

AT3G06980_pCR8/GW/TOPO	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto: CDS de ATG a STOP del gen <i>AT3G06980</i> .	Este trabajo
AT3G16630_pCR8/GW/TOPO	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto: CDS de ATG a STOP del gen <i>AT3G16630</i> .	Este trabajo
VDCA3_pCR8/GW/TOPO	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto: CDS de ATG a STOP del gen <i>VDCA3</i> .	Este trabajo
UBQ10_pCR8/GW/TOPO	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto: CDS de ATG a STOP del gen <i>UBQ10</i> .	Este trabajo
SYT1_pCR8/GW/TOPO	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto: CDS de ATG a STOP del gen <i>SYT1</i> .	Este trabajo
PROLIFERA_pCR8/GW/TOPO	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto: CDS de ATG a STOP del gen <i>PROLIFERA</i> .	Este trabajo
BiFC		
AP3_pYFN43	Construcción de fusión a la mitad N-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. APETALA 3 como control positivo.	V. Balanzà (IBMCP)
PI_pYFC43	Construcción de fusión a la mitad C-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. PISTILLATA como control positivo.	V. Balanzà (IBMCP)
AG_pYFN43	Construcción de fusión a la mitad N-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. AGAMOUS como control negativo.	V. Balanzà (IBMCP)
SOC1_pYFC43	Construcción de fusión a la mitad C-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 como control negativo.	V. Balanzà (IBMCP)
DVL1_pYFN43	Generación de construcciones de fusión a la mitad N-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido <i>DVL1_pCR8/GW/TOPO</i> con el vector <i>pYFN43</i> .	Este trabajo
DVL11_pYFC43	Generación de construcciones de fusión a la mitad C-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido <i>DVL11_pCR8/GW/TOPO</i> con el vector <i>pYFC43</i> .	Este trabajo
BSK6_pYFC43	Generación de construcciones de fusión a la mitad C-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido <i>BSK6_pCR8/GW/TOPO</i> con el vector <i>pYFC43</i> .	Este trabajo
AT3G07820_pYFC43	Generación de construcciones de fusión a la mitad C-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido <i>AT3G07820_pCR8/GW/TOPO</i> con el vector <i>pYFC43</i> .	Este trabajo
SRC2_pYFC43	Generación de construcciones de fusión a la mitad C-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido <i>SRC2_pCR8/GW/TOPO</i> con el vector <i>pYFC43</i> .	Este trabajo
AT2G20550_pYFC43	Generación de construcciones de fusión a la mitad C-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. Obtenido mediante	Este trabajo

MATERIALES Y MÉTODOS

	recombinación <i>Gateway</i> del plásmido AT2G20550_pCR8/GW/TOPO con el vector pYFC43.	
COBL8_pYFC43	Generación de construcciones de fusión a la mitad C-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido COBL8_pCR8/GW/TOPO con el vector pYFC43.	Este trabajo
CDC48_pYFC43	Generación de construcciones de fusión a la mitad C-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido CDC48_pCR8/GW/TOPO con el vector pYFC43.	Este trabajo
AT3G06980_pYFC43	Generación de construcciones de fusión a la mitad C-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido AT3G06980_pCR8/GW/TOPO con el vector pYFC43.	Este trabajo
AT3G16630_pYFC43	Generación de construcciones de fusión a la mitad C-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido AT3G16630_pCR8/GW/TOPO con el vector pYFC43.	Este trabajo
VDCA3_pYFN43	Generación de construcciones de fusión a la mitad N-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido VDCA3_pCR8/GW/TOPO con el vector pYFN43.	Este trabajo
UBQ10_pYFN43	Generación de construcciones de fusión a la mitad N-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido UBQ10_pCR8/GW/TOPO con el vector pYFN43.	Este trabajo
SYT1_pYFN43	Generación de construcciones de fusión a la mitad N-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido SYT1_pCR8/GW/TOPO con el vector pYFN43.	Este trabajo
PROLIFERA_pYFN43	Generación de construcciones de fusión a la mitad N-terminal de la proteína YFP para ensayo BiFC. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido PROLIFERA_pCR8/GW/TOPO con el vector pYFN43.	Este trabajo
DVL1_pMDC32	Generación de construcción 35S::DVL1 para obtención de líneas transgénicas sobreexpresoras en Arabidopsis. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido DVL1_pCR8/GW/TOPO con el vector pMDC32.	Este trabajo
DVL1_pMDC43	Generación de construcción 35S::GFP-DVL1 para obtención de líneas transgénicas sobreexpresoras en Arabidopsis. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido DVL1_pCR8/GW/TOPO con el vector pMDC43.	Este trabajo
CDC48_pMDC32	Generación de construcción 35S::CDC48 para obtención de líneas transgénicas sobreexpresoras en Arabidopsis. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido CDC48_pCR8/GW/TOPO con el vector pMDC32.	Este trabajo
CDC48_pMDC43	Generación de construcción 35S::GFP-CDC48 para obtención de líneas transgénicas sobreexpresoras en Arabidopsis. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido CDC48_pCR8/GW/TOPO con el vector pMDC43.	Este trabajo

Etanol inducible Atcdc48^{DN}	Construcción con un promotor inducible por etanol de <i>Aspergillus nidulans</i> que dirige la expresión de una proteína mutante dominante negativa Atcdc48A (etiqueta de 6 His y T7 en parte N-terminal - H6T7 y subunidad D1 y D2 de ATP binding)	(Park et al., 2008)
Topología de membrana		
DVL1_FL_C_LTM	Plásmido final para el estudio de la topología del péptido completo DVL1 en membranas de células mamíferas <i>in vivo</i> .	Este trabajo
DVL1_CD_C_LTM	Plásmido final para el estudio de la topología del dominio conservado del péptido DVL1 en membranas de células mamíferas <i>in vivo</i> .	Este trabajo
DVL11_FL_C_LTM	Plásmido final para el estudio de la topología del péptido completo DVL11 en membranas de células mamíferas <i>in vivo</i> .	Este trabajo
DVL11_CD_C_LTM	Plásmido final para el estudio de la topología del dominio conservado del péptido DVL11 en membranas de células mamíferas <i>in vivo</i> .	Este trabajo
DVL1_FL_C_LTM+N	Plásmido final para el estudio de la topología del péptido completo DVL1 en membranas de células mamíferas <i>in vivo</i> con un sitio de glicosilación adicional.	Este trabajo
DVL1_CD_C_LTM+N	Plásmido final para el estudio de la topología del dominio conservado del péptido DVL1 en membranas de células mamíferas <i>in vivo</i> con un sitio de glicosilación adicional.	Este trabajo
DVL11_FL_C_LTM+N	Plásmido final para el estudio de la topología del péptido completo DVL11 en membranas de células mamíferas <i>in vivo</i> con un sitio de glicosilación adicional.	Este trabajo
DVL11_CD_C_LTM+N	Plásmido final para el estudio de la topología del dominio conservado del péptido DVL11 en membranas de células mamíferas <i>in vivo</i> con un sitio de glicosilación adicional.	Este trabajo
<i>Marchantia polymorpha</i>		
MpDVL_pMpGE010	Obtención de líneas mutantes mediante la tecnología CRISPR/Cas9 para el gen <i>MpDVL</i> con una guía en <i>Marchantia</i> . Obtenido mediante clonaje <i>Gateway</i> siguiendo el protocolo descrito por Sugano <i>et al.</i> 2018.	Este trabajo
MpDVL_pDONOR207	Plásmido intermediario para la recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto: <i>MpDVL</i> de ATG a STOP (sin STOP).	Este trabajo
MpDVL_pMpGWB108	Generación de construcción EF1:MpDVL:Citrina para obtención de líneas transgénicas sobreexpresoras en <i>Marchantia</i> .	Este trabajo
MpDVL_{pro}:MpDVL_PCR8/GW/TOPO	Plásmido intermediario para la recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto <i>MpDVL_{pro}:MpDVL</i>	Este trabajo
MpDVL_{pro}:MpDVL:GUS_pMpGWB304	Generación de construcción <i>MpDVL_{pro}:MpDVL:GUS</i> para obtención de líneas transgénicas reporteras en <i>Marchantia</i> .	Este trabajo
MpDVL_PCR8/GW/TOP O	Plásmido intermediario para la recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> . Inserto CDS de ATG a STOP del gen <i>MpDVL</i>	Este trabajo
MpDVL_pMDC32	Generación de construcción 35S::MpDVL para obtención de líneas transgénicas sobreexpresoras en <i>Arabidopsis</i> .	Este trabajo

	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido MpDVL_pCR8/GW/TOPO con el vector pMDC32.	
MpDVL_pYFC43	Generación de construcciones de fusión a la mitad C-terminal de la proteína YFp para ensayo BiFC. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido MpDVL_pCR8/GW/TOPO con el vector pYFC43.	Este trabajo
MpDVL_pYFN43	Generación de construcciones de fusión a la mitad N-terminal de la proteína YFp para ensayo BiFC. Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido MpDVL_pCR8/GW/TOPO con el vector pYFN43.	Este trabajo

2.4.3. Obtención de construcciones

Para la obtención de las diferentes construcciones empleadas en este trabajo, los fragmentos amplificados se clonaron en los plásmidos intermediarios adecuados según el vector final que se fuera a emplear en cada caso. Así, en este trabajo se han utilizado los sistemas de clonación comerciales *Gateway: TOPO TA Cloning* y reacción LR y reacción BP (Invitrogen); y el sistema *In-Fusion cloning kit* (TaKaRa), siguiendo en todos los casos las recomendaciones del fabricante. Además, se empleó el sistema de clonación *Golden Gate* siguiendo el protocolo descrito por Engler and Marillonnet, 2014.

2.4.4. Generación de construcciones para estudios de topología de membrana

Para generar las construcciones de los estudios de topología de membrana, las secuencias de interés (CDS completa de *DVL1* y *DVL11* o dominio conservado de ambos) se amplificaron e introdujeron en el plásmido C_LTM (facilitado por Ismael Mingarro, Universidad de Valencia, Duarte et al., 2022) entre los sitios de corte de las enzimas de restricción *SpeI* y *SacI* empleando el sistema *In-Fusion cloning kit* (Takara) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se comprobó por secuenciación de Sanger que el inserto estuviese correctamente integrado en el plásmido C_LTM.

2.4.5. Mutagénesis dirigida de plásmidos

Con el fin de añadir un sitio de glicosilación adicional a las construcciones generadas en el plásmido C_LTM, se empleó el método descrito por Fisher and Pei, 1997, para provocar lesiones dirigidas a un sitio específico de un plásmido sin llevar a cabo un clonaje adicional. Para ello se realizó una PCR empleando la enzima *PfuPlus! DNA Polymerase* (EURx), siguiendo las recomendaciones del fabricante y con oligonucleótidos específicos y complementarios entre sí que incluían las bases adicionales que se querían añadir al plásmido además de regiones solapantes con este mismo (**Tabla MM11**). Posteriormente se llevó a cabo una degradación del plásmido parental empleando la enzima de restricción *DpnI* (Thermo Fisher Scientific).

2.5. Secuenciación

2.5.1. Secuenciación Sanger

Los fragmentos de DNA amplificados mediante PCR fueron secuenciados para su posterior clonaje. Esta secuenciación se llevó a cabo en el servicio de secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, Valencia) con el secuenciador capilar *ABI 3130 XL* (Applied).

2.5.2. Análisis bioinformático de secuencias

Tanto el análisis de las secuencias obtenidas tras la secuenciación Sanger, así como para el diseño de cebadores para PCR o el análisis de sitios de restricción se empleó la plataforma virtual *Benchling* (<https://www.benchling.com/>). En el caso del análisis de las secuencias obtenidas en la secuenciación de los mutantes múltiples de CRISPR, se empleó la herramienta *ICE CRISPR Analysis* de *Synthego* (<https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-analysis>).

2.6. Generación de organismos transgénicos

2.6.1. Transformación de bacterias

Las bacterias se transformaron, en la mayoría de las ocasiones, mediante electroporación. Para ello se empleó un aparato *GenePulser™* (Bio-Rad), siguiendo las indicaciones del fabricante, aplicando un pulso eléctrico de 200 Ω , 25 μ F, 1.8 kV para *E. coli* y para *A. tumefaciens* de 400 Ω , 25 μ F, 1.8 kV. Se utilizaron células electrocompetentes obtenidas mediante un protocolo descrito en *Pulse controller, operation instructions and applications guide, accessory for bacterial and fungal electro-transformation* (Bio-Rad Laboratories, 1992) para el caso de *E. coli*, y según Wen-Jun y Forde (1989) para el caso de *A. tumefaciens*.

En aquellas ocasiones en las que se esperaba una baja eficiencia de transformación debido a la calidad de la construcción empleada, se utilizaron células de *E. Coli* comerciales *One Shot® TOP10 Chemically Competent* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.6.2. Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Para transformar *Arabidopsis* con las diferentes construcciones generadas en este trabajo (**Tabla MM10**) se siguió el protocolo de agroinfiltración descrito por Clough y Bent (1998). Las semillas transformadas se seleccionaron mediante cultivo *in vitro* en placas con medio de cultivo sólido y suplementado con el antibiótico de resistencia correspondiente a cada construcción.

2.6.3. Transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana*

La agroinfiltración en hojas de *Nicotiana benthamiana* se empleó para la expresión transitoria de proteínas en los ensayos de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC) y los análisis de co-localización subcelular de proteínas. Para estos ensayos, se infiltraron hojas jóvenes de *Nicotiana benthamiana* con suspensiones de diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con las construcciones descritas en la **Tabla MM10**, siguiendo el protocolo descrito por Belda-Palazón et al. (2012).

2.6.4. Transformación de *Marchantia polymorpha*

Todas las líneas transgénicas detalladas en la **Tabla MM4** se obtuvieron mediante transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* por regeneración de talos. Para ello, gemas TAK-1 se crecieron en condiciones estándar durante 14 días y cortadas en cuatro piezas eliminando además los nichos apicales, después se crecieron durante 3 días en medio estándar suplementado con un 1% de sucrosa para inducir la regeneración. Los fragmentos regenerados se co-cultivaron con *Agrobacterium* en medio líquido con 100 mM de acetosiringona en agitación. Tras 3 días las plantas fueron lavadas de 3 a 5 veces con agua estéril, incubadas durante 30 minutos en 1 mg/ml de cefotaxima y plaqueadas en medio de selección suplementado con 0.5 µM de Clorosulfuron o 10 mg/L de Higromicina además de 100 mg/L de cefotaxima. Las plantas regeneradas se comprobaron genotipando para usar las gemas formadas de estas plantas regeneradas para los diferentes análisis.

3. Análisis transcriptómico mediante RNA-seq

Para el análisis transcriptómico se recogieron un total de tres réplicas biológicas de un conjunto de inflorescencias y flores en anthesis de unos 10-15 individuos por réplica de cada una de las condiciones a comparar. La extracción de RNA y el tratamiento con DNAsa para el análisis de secuenciación de RNA (RNA-seq) se llevó a cabo usando el kit comercial *RNeasy Plant Mini Kit* y *RNase-Free DNase Set* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA extraído se cuantificó empleando un Nanodrop ND1000 (Applied) y su calidad fue determinada en un Bioanalyzer 2100 (Agilent). La preparación de librerías de cDNA, secuenciación y análisis de las mismas se llevó a cabo a través del servicio externo de secuenciación masiva de *Novogene (UK) Company Ltd.* mediante un sistema *Illumina Novaseq6000* con una estrategia PE150 (*pair end* – extremos sencillos de 150 pb).

3.1. Análisis bioinformático

Las secuencias obtenidas fueron procesadas y analizadas por el servicio de Bioinformática del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP). El procesado de las secuencias por el cual se eliminan adaptadores y extremos de baja calidad se realizó con el software *cutadapt* (<http://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/guide.html>). Las secuencias procesadas fueron alineadas con el transcriptoma de referencia TAIR10 de *Arabidopsis thaliana*, disponible en la base de datos TAIR (<http://arabidopsis.org>; Lamesch et al., 2012) usando *hisat2* (<https://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>) identificando así las lecturas que habían mapeado inequívocamente en un solo lugar del genoma de *Arabidopsis*.

La estimación de la expresión se realizó mediante el software con *htseq-count* (https://htseq.readthedocs.io/en/release_0.11.1/count.html) como número de lecturas por gen, y el posterior análisis de expresión diferencial de transcritos con el paquete *DESeq2* (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/DESeq2/inst/doc/DESeq2.html>).

Para identificar los genes diferencialmente expresados se calculó la tasa de cambio (*fold change*), dividiendo los valores de lecturas por millón de kilobases (RPKM) de la muestra problema entre las lecturas de la muestra control. Para poder interpretar con mayor facilidad la expresión diferencial de los genes, los valores de *fold change* se transformaron a una escala \log_2 , donde un *fold change* de ± 1 equivale al doble de expresión de un gen en una muestra frente a otra. Con el fin de seleccionar los datos significativos, se aplicaron las pruebas estadísticas correspondientes al *p-value* y al *False Discovery Rate* (FDR).

La selección de genes diferencialmente expresados se hizo aplicando como parámetros de selección un RPKM > 0.5 , un *log. 2-fold change* > 0.5 o < -0.5 y un *p-value* ajustado < 0.05 .

3.2. Análisis de enriquecimiento de categorías de ontología génica

El análisis de enriquecimiento de categorías de ontología génica o términos GO se realizó usando la base de datos y herramienta web ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>; Ge et al., 2020) y comparando frente a la base de datos de *Arabidopsis* (TAIR10).

4. Análisis diferencial de proteínas

4.1. Preparación de las muestras

Para el análisis diferencial de proteínas se recogieron un total de tres réplicas biológicas de un conjunto de inflorescencias y flores en anthesis de unos 10-15 individuos por réplica de

MATERIALES Y MÉTODOS

cada una de las condiciones a comparar. La extracción y cuantificación de proteínas se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos.

Los análisis proteómicos al completo se llevaron a cabo en las facilidades de proteómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia, miembro de Proteored.

Para ello llevaron a cabo una limpieza inicial del extracto de proteínas y una posterior digestión con tripsina para después preparar las muestras para el siguiente análisis como en Mikulášek et al., 2021.

4.2. Análisis LC-MS/MS

La biblioteca del espectro de péptidos se obtuvo por análisis de cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas (LC-MS/MS), operando el instrumento en un modo de adquisición independiente de datos (DIA). Las mezclas de péptidos se diluyeron en 0.1% de ácido fórmico y se cargaron en puntas *EvoTip pure tips* (EvoSep) según las instrucciones del fabricante. La espectrometría de masas en tándem se llevó a cabo en el sistema *EvoSep One* conectado un espectrómetro de masas *Tims TOF fleX* (Bruker). Las muestras cargadas en *EvoTip pure* se eluyeron en una columna analítica (resistencia 8 cm x 100 μm , 3 μm ; EvoSep) mediante el sistema *EvoSep One* y resulto con el método cromatográfico 60 SPD definido por el fabricante. Los péptidos eluidos se ionizaron (1600 V y 180°C) y analizaron en un modo diaPASEF. Se identificaron 4005 proteínas con el gradiente 60 SPD.

4.3. Cuantificación de proteínas y análisis de datos

El análisis cuantitativo de las muestras individuales se llevó a cabo mediante el sistema PASER (Bruker) para enviar los datos a cuantificar con DIAnn v 1.8 (<https://github.com/vdemichev/DiaNN>). Primero se creó una biblioteca de espectros predichos *in silico* a partir de una base de datos de secuencias (Uniprot_humanAndSarsCOVs_221206.fasta) por DIA-NN. Posteriormente, los archivos de datos brutos de día PASEF se analizaron con ciertos parámetros y se identificaron genes únicos y grupos de proteínas con un FDR $\leq 1\%$.

Los datos cuantitativos o áreas de proteínas obtenidos con DIAnn se analizaron con *Marker View* (Sciex). Se llevaron a cabo pruebas estadísticas de reducción de la dimensionalidad, PCA (Análisis de Componentes Principales) y DA (Análisis Discriminativos) (ambos con la escala de Pareto). Las proteínas diferencialmente expresadas se seleccionaron empleando un *Student t-test* con un *p-value* de 0.05

5. Estudios de interacción proteína-proteína

5.1. Ensayo de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC)

El objetivo del ensayo de Complementación Bimolecular de Fluorescencia (BiFC) era comprobar si dos proteínas de interés interactuaban entre sí. Para ello se utilizaron los plásmidos de *Gateway* pYFN43 y pYFC43 descritos en la **Tabla MM9** y que contienen un promotor doble 35S, la región N-terminal o C-terminal de la proteína YFP, un nexo flexible de unión entre la secuencia del gen YFP y la secuencia del gen de interés (que permite la movilidad de la proteína de fusión), el casete *Gateway* (donde se clona el gen de interés) y un terminador.

Una vez clonadas las regiones codificantes de los genes de estudio en los vectores pYFN43 y pYFC43, todas las construcciones se transformaron en *Agrobacterium tumefaciens*. Tres días antes de la infiltración de plantas de *Nicotiana benthamina* se inocularon cultivos de 3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos que correspondan a partir de un glicerinado o de una estría en placa y se creció a 28°C o/n.

Para el ensayo se inocularon, además de las construcciones con los genes a estudiar, los controles positivo y negativo. Como control positivo del ensayo se empleó la interacción AP3_pYFP^N y PI_pYFP^C y como control negativo la interacción entre AG_pYFP^N y SOC1_pYFP^C, construcciones cedidas por el Doctor Vicente Balanzà (IBMCP).

El día antes de la infiltración se inocularon cultivos de 50 ml de medio LB suplementado con los antibióticos que correspondan a partir del cultivo fresco de 3 ml o de la estría en placa y se crecieron a 28°C o/n. El día de la infiltración se transfirieron los cultivos de *Agrobacterium* a botes falcon de 50 ml y se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de solución de infiltración (10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5.6, 200 μM acetosiringona). A continuación, se incubaron los cultivos en oscuridad y agitación durante 1 hora y media a 28°C.

Transcurrido un primer paso de incubación, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm y se diluyeron los cultivos de tal forma que se ajustasen a una OD de 0.8 en un volumen final de 20 ml de solución de infiltración. Así, se llevó a cabo un segundo paso de incubación de 1 hora y media a 28°C en oscuridad y agitación.

Tras este tiempo, se prepararon las mezclas de cultivos a testear para la infiltración añadiendo 5 ml del cultivo con la parte N-terminal y 5 ml del cultivo con la parte C-terminal correspondiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

El siguiente paso fue la infiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana* que habían crecido unas 3 semanas en condiciones de día largo. Para ello se emplearon jeringuillas de 5 ml y se realizó la infiltración en el envés de hojas jóvenes, sanas y poco rugosas, y en una zona alejada de las venas principales.

A los tres días de la infiltración se observaron secciones de las hojas agroinfiltradas en un microscopio confocal, exponiendo el envés de la hoja montada en un portaobjetos y cubierto por un cubreobjetos.

6. Análisis fenotípico de las líneas mutantes y transgénicas

6.1. Observación y fotografía de bajo aumento

Para obtener imágenes de los fenotipos de las diferentes líneas transgénicas y mutantes, tanto de *Arabidopsis thaliana* como de *Marchantia polymorpha*, se utilizó entre otros métodos, la fotografía de bajo aumento, empleando una cámara digital Leica V-LUX1. Para la obtención de imágenes con un mayor aumento, se empleó un macroscopio DMS 1000 (Leica) con base de iluminación diascópica (BF, RC y DF) y una lupa binocular de fluorescencia MacroFluo MZ16F (Leica) conectados ambos a un ordenador con el software de análisis de imagen Leica *Application Suite* (Leica).

6.2. Técnicas de microscopía

6.2.1. Microscopía óptica

Para el análisis de muestras vegetales mediante técnicas de microscopía óptica, las muestras se colocaron sobre un portaobjetos de vidrio en glicerol 50% y se observaron y fotografiaron con un microscopio Leica DM5000 utilizando una iluminación de campo claro, campo oscuro, iluminación de contraste diferencial (DIC) o fluorescencia con condiciones de irradiación UV en función del tipo de muestra que se pretendía visualizar.

6.2.2. Microscopía confocal

Para el análisis de muestras que requerían esta técnica se empleó un microscopio confocal AxioObserver 780 (Zeiss) con 7 líneas de láser (405 nm, 458 nm, 488 nm, 514 nm, 561nm, 594nm y 633nm) acoplado a un microscopio óptico invertido con contraste de fases (Nikon Diaphot-TMD). Para su observación, las muestras vegetales frescas, como hojas de *Nicotiana benthamiana*, fragmentos de raíz de *Arabidopsis thaliana* o gemas de *Marchantia polymorpha*, se montaron sobre portaobjetos de vidrio y se cubrieron con un cubreobjetos sellándolo con cinta adhesiva en los laterales. Como medio de montaje e inclusión se empleó agua destilada. La GFP se excitó con un láser de 488nm y su emisión se recogió entre 500 nm y 520nm, la YFP

se excitó con un láser de 488nm y su emisión se recogió entre 520 nm y 540 nm. La clorofila se excitó con el mismo laser, y su emisión se recogió entre 660 nm y 690 nm. La identidad de la señal se confirmó en todos los casos mediante un barrido de longitudes de onda (λ -scan), para visualizar la intensidad de la emisión a las diferentes longitudes de onda. Las imágenes tomadas se analizaron y montaron con la ayuda de los softwares ZEN (Zeiss) y Fiji/ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

6.2.3. Microscopia electrónica de barrido (FESEM)

El análisis de muestras vegetales por Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM) se llevó a cabo en el Servicio de Microscopía electrónica de la UPV. Para su fijación, las muestras se sumergieron en FAA [etanol 50%, ácido acético glacial 5%, formaldehído 5% (v/v)] y se sometieron a 1 pulso de vacío de 15 minutos, y se incubaron en FAA toda la noche a 4°C tras la cual, el FAA fue sustituido por etanol al 70%. Una vez fijado, se procedió a deshidratar el tejido mediante lavados con etanol a concentraciones crecientes hasta llegar a etanol absoluto. Con las muestras deshidratadas, en el siguiente paso de preparación, las muestras se trataron en un secador por punto crítico Leica CPD300 y se montaron en tiras de carbono activado y se recubrieron con partículas de oro en un recubridor *BAL-TEC SCD 005 (LEICA MICROSYSTEMS)*. Las imágenes se obtuvieron mediante el programa *SmartSEM* (Zeiss), con una velocidad de barrido de 200s por imagen, en un microscopio electrónico Zeiss, modelo ULTRA55 operando bajo condiciones de microanálisis de entre 2.0 kV y una distancia de trabajo de entre 5.6 - 6.5 mm.

6.3. Análisis de germinación de polen y crecimiento de tubo polínico en Arabidopsis

6.3.1. Análisis de la frecuencia de germinación de polen y longitud del tubo polínico *in vitro*

Para los estudios de germinación de polen *in vitro* se siguió el protocolo descrito por Smith and Wallace, 2020 con algunas modificaciones. El medio de germinación de polen se componía de: 5 mM de CaCl₂, 0.01% de ácido bórico, 5 mM de KCl, 1 mM de MgSO₄ y 10% de sacarosa a un pH 7.5 y en el caso del medio sólido se añadió 1.5 % de agarosa de bajo punto de fusión. La frecuencia de germinación se calculó como el porcentaje de granos de polen germinados a las 0, 2, 4, 6 y 8 horas después de la incubación. Los portaobjetos donde se llevó a cabo la germinación de polen *in vitro* se observaron y fotografiaron en el microscopio óptico Leica DM5000 con iluminación de campo claro. Las imágenes se analizaron con el software Fiji/ImageJ, con el cuál se midió la longitud del tubo polínico.

6.3.2. Análisis del crecimiento del tubo polínico *in vivo*

Para los experimentos de crecimiento del tubo polínico *in vivo* dentro del pistilo se llevaron a cabo experimentos de fertilización y tinción de azul de anilina de los tubos polínicos, tal y como describen Balanzà et al., 2014. Se evaluó el crecimiento en diferentes tiempos, a las 6, 12 y 24 horas tras la polinización. Los pistilos fecundados y teñidos se montaron en portaobjetos con glicerol 50 % y se observaron en el microscopio óptico Leica DM5000 con iluminación fluorescente, condiciones de irradiación UV y filtro DAPI.

6.3.3. Cuantificación del número de semillas por silicua

Para contar el número de semillas por fruto se recogieron silicuas maduras, pero todavía verdes del ápice principal en diferentes posiciones según el objetivo final. Las silicuas se recogieron y fijaron en una solución de etanol absoluto:ácido acético en proporción 3:1 durante la noche. Al día siguiente o el día previo a la observación de las silicuas, éstas se aclararon con una disolución de hidrato de cloral (8 g de hidrato de cloral, 1 ml de glicerol y 2 ml de agua) o/n. Las silicuas se observaron en el macroscopio DMS1000 con campo claro.

6.4. Análisis de crecimiento de raíz y pelos radiculares

Para analizar el crecimiento de las raíces y pelos radiculares, así como determinar el número y longitud de estos últimos, se esterilizaron y sembraron las plantas de los diferentes genotipos tal y como se describe en el apartado 1.1.5 de Materiales y Métodos de Cultivo de *Arabidopsis thaliana in vitro*, pero con algunos cambios. El medio de cultivo sólido estaba compuesto por 2.2 g/L de sales MS (Duchefa), sin sacarosa y 6.0 g/L de phyto agar (Duchefa); ajustando el pH a 5.9 con KOH. Las semillas esterilizadas se colocaron en línea, en placas cuadradas de cm y tras una estratificación de 3 días a 4°C en oscuridad, se sacaron a la cabina de cultivo *in vitro* y se colocaron en vertical. Se observaron raíces de plántulas de 5 días de edad que se montaron en portaobjetos y fotografiaron en el microscopio óptico Leica DM5000 con iluminación de campo claro. Las imágenes se analizaron con el software Fiji/ImageJ, con el cuál se midieron las longitudes de la parte apical de la raíz y de los pelos radiculares de una sección de 2mm desde el primer pelo radicular en formación desde la punta de la raíz.

6.5. Análisis fenotípico de las líneas etanol-inducibles Atcdc48A^{DN}

Para determinar el posible efecto fenotípico de las líneas etanol-inducibles Atcdc48A^{DN}, se esterilizaron y sembraron en placa tal y como se indica en el apartado semillas T2 1.1.5 de Materiales y Métodos. Las placas se crecieron en la cámara de cultivo *in vitro* en vertical y tras 4 días tras la germinación se trataron con etanol 2% (v/v) añadiendo 1 ml del tratamiento o solo

1 ml de agua en el caso del control Mock, en la base de la placa y se dejaron en horizontal 30 min. Tras esto, las placas se volvieron a colocar en vertical y se crecieron durante 2 a 4 días más para observar el fenotipo.

6.6. Análisis de la morfología del talo de *Marchantia*

Para medir el tamaño de las plantas de *Marchantia polymorpha*, se tomaron fotografías empleando la lupa binocular MacroFluo MZ16F (Leica). Las áreas de proyección del talo se analizaron y calcularon empleando el software de análisis de imagen Fiji/ImageJ, ajustando la escala y dibujando el área del talo como un polígono. Por su parte, las imágenes realizadas en la caracterización de los anteridióforos se tomaron con el macroscopio DMS1000 con campo claro.

6.7. Detección de células en fase S de ciclo celular en *Marchantia* (tinción EdU)

Para la detección de células en división celular en *Marchantia polymorpha*, se crecieron gemas de las diferentes líneas silvestres y transgénicas durante 7 días en condiciones *in vitro* y se empleó el kit *Click-it EdU Imaging* con Alexa Flour 488 (Invitrogen). Las gemas se embebieron en medio ½ Gamborg's B5 líquido con 10 μ M de 5-ethynyl-20-deoxyuridine (EdU) durante 3 h a 22°C y bajo luz blanca continua. Después fueron fijadas con 3.7% de formaldehído en tampón fosfato salino (PBS) durante 30 min a temperatura ambiente, lavadas con PBS durante 5 min 2 veces y permeabilizadas con 0.5% de Tritón X-100 en PBS durante 20 min. Tras 2 lavados de 5 min con 3% de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS, las muestras se incubaron con el mix de reacción *Click-iT EdU Imaging Kit* con Alexa Fluor 488 durante 1 h en oscuridad que se lavó posteriormente dos veces con 3% de BSA en PBS durante 5 min. Después de la tinción y lavado, las gemas se montaron en PBS y se observaron con el microscopio confocal de fluorescencia AxioObserver 780 (Zeiss) empleando un objetivo 20X y unas longitudes de onda de excitación y detección de 488 y 519 respectivamente. Se tomaron imágenes de fluorescencia cada 2 μ m para realizar un *Z stack*.

7. Técnicas de histología vegetal

7.1. Análisis de la actividad β -glucuronidasa (GUS)

Para el análisis de la actividad β -glucuronidasa en las líneas reporteras de *Marchantia* de fusión al gen *GUS*, las gemas de 7, 14 y 21 días de edad se sumergieron directamente en la solución de tinción GUS (50 mM de tampón fosfato sódico pH 7.2, 0.5 de ferrocianuro de potasio, 0.5 de ferricianuro de potasio, 10 mM de EDTA, 0.01% de Tritón X-100, y 1 mM de X-Gluc), se aplicó un pulso de vacío de 15 minutos para facilitar la penetración y se incubaron las muestras

a 37°C, toda la noche y en oscuridad. Al día siguiente las muestras se destiñeron sometiéndolas a múltiples lavados con etanol 70% y las muestras se observaron mediante un macroscopio DMS1000 con campo claro.

8. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de significatividad de los diferentes experimentos llevados a cabo se realizaron mayoritariamente empleando la herramienta en línea *Astata* (https://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/). También se empleó la propia herramienta de análisis del software Prism (<https://www.graphpad.com/>) empleado para representar gráficamente los datos de los diferentes análisis.

Tabla MM11. Oligonucleótidos empleados en este trabajo. Tras el nombre del oligonucleótido se indica el sentido: _F = sentido directo o *Forward*, _R= sentido reverso o *Reverse*.

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	GEN	PROPÓSITO
CRISPR			
DT1BsF_RTFL9_F	ATATATGGTCTCGATTGATGTACCAG CAACAAAGCAGTT	RTFL9	CRISPR Target 1 (guía 3) de RTFL9
DT1F0_RTFL9_F	TGATGTACCAGCAACAAAGCAGTTTT AGAGCTAGAAATAGC	RTFL9	CRISPR Target 1 (guía 3) de RTFL9
DT1R0_RTFL9_R	AACTTCAAAGATCTTCATTTTTCAATC TCTTAGTCGACTCTAC	RTFL9	CRISPR Target 2 (guía 9) de RTFL9
DT1BsR_RTFL9_R	ATTATTGGTCTCGAAACTCAAAGAT CTTCATTTTTCAA	RTFL9	CRISPR Target 2 (guía 9) de RTFL9
DT1BsF_DVL1_F	ATATATGGTCTCGATTGAGCTCTGCA GAGAGATCAAGTT	DVL1	CRISPR Target 1 (guía 2) de DVL1
DT1F0_DVL1_F	TGAGCTCTGCAGAGAGATCAAGTTTT AGAGCTAGAAATAGC	DVL1	CRISPR Target 1 (guía 2) de DVL1
DT1R0_DVL1_R	AACTTTGTTCTTCATATACTTCAATC TCTTAGTCGACTCTAC	DVL1	CRISPR Target 2 (guía 6) de DVL1
DT1BsR_DVL1_R	ATTATTGGTCTCGAAACTTTGTTCTT CATATACTTCAA	DVL1	CRISPR Target 2 (guía 6) de DVL1
DT1BsF_DVL4_F	ATATATGGTCTCGATTGATATATCAA AGATGAAGATGTT	DVL4	CRISPR Target 1 (guía 2) de DVL4
DT1F0_DVL4_F	TGATATATCAAAGATGAAGATGTTTT AGAGCTAGAAATAGC	DVL4	CRISPR Target 1 (guía 2) de DVL4
DT1R0_DVL4_R	AACAACATCAGACTCTTCTCCCAATC TCTTAGTCGACTCTAC	DVL4	CRISPR Target 2 (guía 6) de DVL4
DT1BsR_DVL4_R	ATTATTGGTCTCGAAACAACATCAGC ACTCTTCTCCAA	DVL4	CRISPR Target 2 (guía 6) de DVL4
DT1-BsF_DVL3_F	ATATATGGTCTCGATTGGATACTTGA AAGAGCAAAAGTT	DVL3	CRISPR 3 sgRNA para DVL3/5/6
DT1-F0_DVL3_F	TGGATACTTGAAAGAGCAAAAGTTTT AGAGCTAGAAATAGC	DVL3	CRISPR 3 sgRNA para DVL3/5/6
DT0-BsR2_R	ATATTATTGGTCTCAATCTCTTAGTCG ACTCTACCAAT		CRISPR 3 sgRNA para DVL3/5/6
DT2-BsF2_DVL5_F	ATATTATTGGTCTCAAGATTGAAGAT GTGGAGCCGTGGAGGTT	DVL5	CRISPR 3 sgRNA para DVL3/5/6

DT2-F0_DVL5_F	TGAAGATGTGGAGCCGTGGAGGTTT TAGAGCTAGAAATAGC	DVL5	CRISPR 3 sgRNA para DVL3/5/6
DT3-R0_DVL6_R	AACAGTCCTCTGCTGCTCGATACAAT CACTACTTCGTCTCTAACCAT	DVL6	CRISPR 3 sgRNA para DVL3/5/6
DT3-BsR_DVL6_R	ATTATTGGTCTCGAAACAGTCCTCTG CTGCTCGATAC	DVL6	CRISPR 3 sgRNA para DVL3/5/6
U6-1p-R	TATGCAAGTCTCACTCACACTCACG		Colony PCR (Wang et al., 2015)
U6-29p-R	AGCCCTCTTTTCGATCCATCAAC		Secuenciar (Wang et al., 2015)
U6-29t-F	CGTGTTTCAGCTCTCATGATCCTTG		Secuenciar (Wang et al., 2015)
Cas9_F	CGCAAGTCAGAGGAGACGATCA	Cas9	Genotipar Cas9
Cas9_R	CCATCGCTCTTCAGGAAGTCGA	Cas9	Genotipar Cas9
htpII_F	GCCTGAACTCACCGGACGTC	htpII	Genotipar gen de resistencia a higromicina
htpII_R	GCACTGACGGTGTCGTCAT	htpII	Genotipar gen de resistencia a higromicina
RTFL9genCRISPR_F	CAGACCATGTTTCATCTGTTTCTCC	RTFL9	Genotipar RTFL9 para CRISPR
RTFL9genCRISPR_R	GGATTACGCAAATATCATCTGTAGG	RTFL9	Genotipar RTFL9 para CRISPR
DVL1genCRISPR_F	ATGCATGCATGCCACTAGTTCT	DVL1	Genotipar DVL1 para CRISPR
DVL1genCRISPR_R	GAAAAACAACCATCGATCGACCGG	DVL1	Genotipar DVL1 para CRISPR
DVL4genCRISPR_F	GTGCCATGATACATACCAACAACG	DVL4	Genotipar DVL4 para CRISPR
DVL4genCRISPR_R	TGAGCACTAAGGGCATCTTCATTC	DVL4	Genotipar DVL4 para CRISPR

BIFC

DVL1_F	ATGGAAATGAAGAGGGTCATGATG	DVL1	Amplificar CDS desde ATG a STOP
DVL1_R	TCAATCATGCGAACAAGGAGC	DVL1	Amplificar CDS desde ATG a STOP
CDC48_F	ATGTCTACCCAGCTGAATC	CDC48	Amplificar CDS desde ATG a STOP
CDC48_R	CTAATTGTAGAGATCATCATCGTCCC C	CDC48	Amplificar CDS desde ATG a STOP
CDC48noSTOP_R	ATTGTAGAGATCATCATCGTCCCAG	CDC48	Amplificar CDC48 sin STOP codon
AT3G06980_F	ATGTTGGCGAGAGCTCCACC	AT3G06980	Amplificar CDS desde ATG a STOP
AT3G06980_R	TTAGGTTGTGAACTCGTAAGCG	AT3G06980	Amplificar CDS desde ATG a STOP
COBL8_F	ATGGGTTTAACTCGAAATTTCAATTTA TGG	COBL8	Amplificar CDS desde ATG a STOP
COBL8_R	TTAAATCCGAAGAAACAGTAGAGCC	COBL8	Amplificar CDS desde ATG a STOP
BSK6_F	ATGGGAGCTCGTTGCTCAAAGT	BSK6	Amplificar CDS desde ATG a STOP
BSK6_R	TCAGCGCTTGTTACTCTTCTTAGC	BSK6	Amplificar CDS desde ATG a STOP
AT3G07820_F	ATGGGTGGATATTTTGGAGTTTCTAC	AT3G07820	Amplificar CDS desde ATG a STOP
AT3G07820_R	TTAGGCTGCTGGAGCGCTGCAT	AT3G07820	Amplificar CDS desde ATG a STOP
SRC2_F	ATGGAGTGTAGATCATTGGATCTGAC	SRC2	Amplificar CDS desde ATG a STOP
SRC2_R	TCAGAAATCGAAACCACCCATGTC	SRC2	Amplificar CDS desde ATG a STOP
AT2G20550_F	ATGAGTCACCCGAGAAATGCAG	AT2G20550	Amplificar CDS desde ATG a STOP
AT2G20550_R	TCATCCGAGAAGTTTCTTCAATCCTG	AT2G20550	Amplificar CDS desde ATG a STOP
AT3G16630_F	ATGGGCGGCCAAATGCAGCAAAC	AT3G16630	Amplificar CDS desde ATG a STOP
AT3G16630_R	CTACCGAGGAACTCTTACGGCT	AT3G16630	Amplificar CDS desde ATG a STOP
DVL11_F	ATGGCGTCATCGTCTAGCCTGA	DVL11	Amplificar CDS desde ATG a STOP

MATERIALES Y MÉTODOS

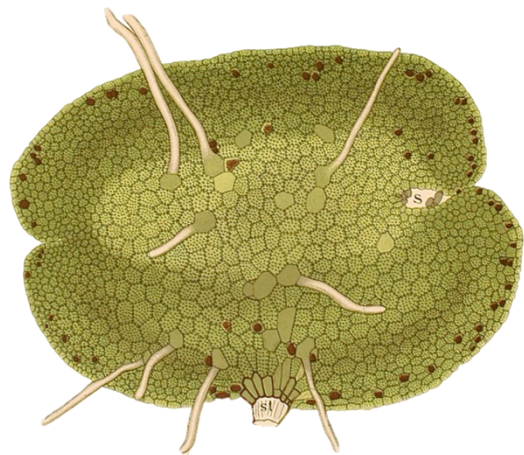
DVL11_R	TTAAGAATCAGAGTAATTATCTCTCC AGC	DVL11	Amplificar CDS desde ATG a STOP
VDCA3_F	ATGGTTAAAGGTCCAGGACTCTACAC	VDC3	Amplificar VDCA3 desde ATG a STOP
VDCA3_R	TCAGGGCTTGAGAGCGAGAGCA	VDC3	Amplificar VDCA3 desde ATG a STOP
UBQ10_F	ATGCAGATCTTTGTTAAGACTCTCAC CGG	UBQ10	Amplificar UBQ10 desde ATG a STOP
UBQ10_R	TAGAAACCACCACGAAGACGCAGG	UBQ10	Amplificar UBQ10 desde ATG a STOP
SYT1_F	ATGGGCTTTTTTCAGTACGATACTAGG	SYT1	Amplificar SYT1 desde ATG a STOP
SYT1_R	TCAAGAGGCAGTTCGCCACTCGA	SYT1	Amplificar SYT1 desde ATG a STOP
PROLIFERA_F	ATGAAAGACCACGATTTGACGGC	PROLIFERA	Amplificar PROLIFERA desde ATG a STOP
PROLIFERA_R	TCAGATAAAACGGATGTCAAAGGTG TGAGG	PROLIFERA	Amplificar PROLIFERA desde ATG a STOP
Atcdc48_qPCR_F	GGGTGAGCCTGTGAAGAGAG	CDC48	Medir niveles expresión de CDC48 en líneas transgénicas etanol-inducibles Atcdc48A ^{DN}
Atcdc48_qPCR_R	ACCCGTTTCATTAGCCACAG	CDC48	Medir niveles expresión de CDC48 en líneas transgénicas etanol-inducibles Atcdc48A ^{DN}

C_LTM

DVL1_CLTM_F	ATCTGGCTCTGGGTCCACTAGTATGG AAATGAAGAGGGTC	DVL1	Amplificar CDS sin STOP y ligar en vector C _L TM con In-Fusion
DVL1_CLTM_R	TACCGTGCCGCTGCCGAGCTCATCA TGCGAACAAGGAG	DVL1	Amplificar CDS sin STOP y ligar en vector C _L TM con In-Fusion
DVL11_CLTM_F	ATCTGGCTCTGGGTCCACTAGTATGG CGTCATCGTCTAGC	DVL11	Amplificar CDS sin STOP y ligar en vector C _L TM con In-Fusion
DVL11_CLTM_R	TACCGTGCCGCTGCCGAGCTCAGAA TCAGAGTAATTATCT	DVL11	Amplificar CDS sin STOP y ligar en vector C _L TM con In-Fusion
D1CD_CLTM_IF_F	CTCTGGGTCCACTAGTAGAAGATTGG GGAAGTATATGAAGG	DVL1	Amplificar dominio conservado y ligar en vector C _L TM con In-Fusion
D1CD_CLTM_IF_R	CCGCTGCCGCTGCCGAGCTCATCATG CGAACAAGGAGC	DVL1	Amplificar dominio conservado DVL1 y ligar en vector C _L TM con In-Fusion
D11CD_CLTM_IF_F	CTCTGGGTCCACTAGTAGAAAGTGTG CAAGATTGGTTAAAG	DVL11	Amplificar dominio conservado DVL11 y ligar en vector C _L TM con In-Fusion
D11CD_CLTM_IF_R	CCGCTGCCGCTGCCGAGCTCATCTCT CCAGCAAATAAGCATG	DVL11	Amplificar dominio conservado DVL11 y ligar en vector C _L TM con In-Fusion
CLTMseq_F	AGACAACCCAGCCTTCCAACAGA		Secuenciar inserto en C _L TM
CLTMseq_R	CCCCCTGAACCTGAAACATAAA		Secuenciar inserto en C _L TM
D1_N_CLTM_F	TTCGCATGATGAGCTCAACGGCAGC GGCAGCGGTA		Mutagénesis DVL1 y CD_C _L TM para añadir N en posición 3 tras inserto
D1_N_CLTM_R	TACCGTGCCGCTGCCGTTGAGCTCA TCATGCGAA		Mutagénesis DVL1 y CD_C _L TM para añadir N en posición 3 tras inserto
D11_N_CLTM_F	TACTCTGATTCTGAGCTCAACGGCAG CGGCAGCGGT		Mutagénesis DVL11_C _L TM para añadir N en posición 3 tras inserto
D11_N_CLTM_R	ACCGTGCCGCTGCCGTTGAGCTCAG AATCAGAGTA		Mutagénesis DVL11_C _L TM para añadir N en posición 3 tras inserto
D11C_N_CLTM_F	TGCTGGAGAGATGAGCTCAACGGCA GCGGCAGCGGT		Mutagénesis DVL11CD_C _L TM para añadir N en posición 3 tras inserto

D11C_N_CLTM_R	ACCGTGCCGCTGCCGTTGAGCTCAT CTCTCCAGCA		Mutagénesis DVL11CD_ C _L TM para añadir N en posición 3 tras inserto
<i>Marchantia polymorpha</i>			
MpDVLCRISPR_F	AAACCACAGCAGAAGCCGCGGGAG	MpDVL	Guía en MpDVL para CRISPR Marchantia
MpDVLCRISPR_R	CTCGCTCCCGCGCTTCTGCTGTG	MpDVL	Guía en MpDVL para CRISPR Marchantia
MpGenotDVL_F	GTGCATTGTTATATGCGTCCGGAG	MpDVL	Genotipar MpDVL (CRISPR) en genómico
MpGenotDVL_R	CAATTCGATGCCTCTGAGACGA	MpDVL	Genotipar MpDVL (CRISPR) en genómico
MpDVL+8_F	AGTGTTACACCGCACAGCAGAA	MpDVL	Amplificar MpDVL posicion+8 de la CDS
MpDVLqRT_F	AGTGTTACACCGCACAGCAG	MpDVL	Medir niveles expresión MpDVL en líneas sobreexpresoras
MpDVLqRT_R	GCACCGCCGAATTATGTAGA	MpDVL	Medir niveles expresión MpDVL en líneas sobreexpresoras
MpDVLInfus_F	AGCAGGCTCCGAATTCATGGGGCAG TGTTACACCG	MpDVL	Amplificar CDS para clonar con In-Fusion en PCR8 y mantener sitio EcoRI
MpDVLInfus_R	AAGCTGGGTCTGAATTCCTATCACGAA CCGCCATACTTGTGCCA	MpDVL	Amplificar CDS hasta STOP para clonar con In-Fusion en PCR8, con un doble STOP TAA y sitio EcoRI
MpDVLProm_F	AGCAGGCTCCGAATTCGAAAAACATT CTCTCGAGCGTCCGTGCACGTCATTC T	MpDVL _{pro}	Amplificar promotor MpDVL (2811 pb) para clonar con In-fusion en PCR8 y manter sitio EcoRI
MpDVLnoSTOP_R	AAGCTGGGTCTGAATTCGAACCGCC ATACTTGTGCCA	MpDVL	Amplificar CDS sin STOP para clonar con In-fusion en PCR8 manteniendo sitio EcoRI
pMpDVL-2268_F	CGAAACCTAGTGAATGTGTAG	MpDVL _{pro}	Secuenciar promotor pMpDVL
pMpDVL-1590_F	TCTGCGGAACCTCTCGAAACA	MpDVL _{pro}	Secuenciar promotor pMpDVL
pMpDVL-857_F	TAAGAAGAAGCGCCGCGGTAA	MpDVL _{pro}	Secuenciar promotor pMpDVL
MpEF1a_F	AAGCCGTCGAAAAGAAGGAG	MpEF1 α	RT-qPCR de MpELONGATION FACTOR 1 α (Mp3g23400) como gen constitutivo
MpEF1a_R	TTCAGGATCGTCCGTTATCC	MpEF1 α	RT-qPCR de MpELONGATION FACTOR 1 α (Mp3g23400) como gen constitutivo
MpDVLqPCR_F	AGTGTTACACCGCACAGCAG	MpDVL	RT-qPCR de MpDVL
MpDVLqPCR_R	GCACGGAATTATGTAGA	MpDVL	RT-qPCR de MpDVL

BIBLIOGRAFÍA



- Aker, J., Borst, J.W., Karlova, R., and de Vries, S.** (2006). The Arabidopsis thaliana AAA protein CDC48A interacts in vivo with the somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 receptor at the plasma membrane. *J. Struct. Biol.* **156**: 62–71.
- Aker, J., Hesselink, R., Engel, R., Karlova, R., Borst, J.W., Visser, A.J.W.G., and De Vries, S.C.** (2007). In Vivo Hexamerization and Characterization of the Arabidopsis AAA ATPase CDC48A Complex Using Förster Resonance Energy Transfer-Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Plant Physiol.* **145**: 339–350.
- Alarcia, A.** (2017). Caracterización funcional del papel de los péptidos DEVIL en la determinación de la morfología de los órganos de Arabidopsis thaliana. Trabajo fin de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Balanzà, V., Ballester, P., Colombo, M., Fourquin, C., Martínez-Fernández, I., and Ferrándiz, C.** (2014). Genetic and Phenotypic Analyses of Carpel Development in Arabidopsis. In *Flower Development. Methods in Molecular Biology*, vol 1110., J.L. Riechmann and F. Wellmer, eds (Springer New York), pp. 231–249.
- Bañó-Polo, M., Baldin, F., Tamborero, S., Marti-Renom, M.A., and Mingarro, I.** (2011). N-glycosylation efficiency is determined by the distance to the C-terminus and the amino acid preceding an Asn-Ser-Thr sequon. *Protein Sci.* **20**: 179–186.
- Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A.F., Culiáñez, F., Farràs, R., Carrasco, P., and Ferrando, A.** (2012). Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PLoS One* **7**: e46907.
- Berger, F., Bowman, J.L., and Kohchi, T.** (2016). Marchantia. *Curr. Biol.* **26**: R181–R191.
- Bouain, N., Korte, A., Satbhai, S.B., Nam, H.I., Rhee, S.Y., Busch, W., and Rouached, H.** (2019). Systems genomics approaches provide new insights into Arabidopsis thaliana root growth regulation under combinatorial mineral nutrient limitation. *PLOS Genet.* **15**: e1008392.
- Boukhibar, L.M. and Barkoulas, M.** (2016). The developmental genetics of biological robustness. *Ann. Bot.* **117**: 699–707.
- Bowman, J.L.** (2016). A Brief History of Marchantia from Greece to Genomics. *Plant Cell Physiol.* **57**: 210–229.
- Briginshaw, L.N., Flores-Sandoval, E., Dierschke, T., Alvarez, J.P., and Bowman, J.L.** (2022). KANADI promotes thallus differentiation and FR-induced gametangiophore formation in Marchantia. *New Phytol.* **234**: 1377–1393.
- Busch, A., Deckena, M., Almeida-Trapp, M., Kopischke, S., Kock, C., Schüssler, E., Tsiantis, M., Mithöfer, A., and Zachgo, S.** (2019). MpTCP1 controls cell proliferation and redox processes in Marchantia polymorpha. *New Phytol.* **224**: 1627–1641.
- Callis, J.** (2014). The Ubiquitination Machinery of the Ubiquitin System. *Arab. B.* **12**: e0174.
- Campanoni, P. and Blatt, M.R.** (2007). Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes. *J. Exp. Bot.* **58**: 65–74.
- Casey, P.J.** (1995). Protein lipidation in cell signaling. *Science.* **268**: 221–225.
- Challa, K.R., Aggarwal, P., and Nath, U.** (2016). Activation of YUCCA5 by the Transcription Factor TCP4 Integrates Developmental and Environmental Signals to Promote Hypocotyl Elongation in Arabidopsis. *Plant Cell* **28**: 2117–2130.
- Champion, C., Lamers, J., Shivas Jones, V.A., Morieri, G., Honkanen, S., and Dolan, L.** (2021). Microtubule associated protein WAVE DAMPENED2-LIKE (WDL) controls microtubule bundling and the stability of the site of tip-growth in Marchantia polymorpha rhizoids. *PLoS*

- Genet. **17**: 1–20.
- Chang, F., Gu, Y., Ma, H., and Yang, Z.** (2013). AtPRK2 Promotes ROP1 Activation via RopGEFs in the Control of Polarized Pollen Tube Growth. *Mol. Plant* **6**: 1187–1201.
- Chen, X., Naramoto, S., Robert, S., Tejos, R., Löffke, C., Lin, D., Yang, Z., and Friml, J.** (2012). ABP1 and ROP6 GTPase Signaling Regulate Clathrin-Mediated Endocytosis in Arabidopsis Roots. *Curr. Biol.* **22**: 1326–1332.
- Clark-Adams, C.D., Norris, D., Osley, M.A., Fassler, J.S., and Winston, F.** (1988). Changes in histone gene dosage alter transcription in yeast. *Genes Dev.* **2**: 150–159.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735–743.
- Combiér, J.P., Küster, H., Journet, E.P., Hohnjec, N., Gamas, P., and Niebel, A.** (2008). Evidence for the Involvement in Nodulation of the Two Small Putative Regulatory Peptide-Encoding Genes MtRALFL1 and MtDVL1. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-8-1118> **21**: 1118–1127.
- Costa, M., Nobre, M.S., Becker, J.D., Masiero, S., Amorim, M.I., Pereira, L.G., and Coimbra, S.** (2013). Expression-based and co-localization detection of arabinogalactan protein 6 and arabinogalactan protein 11 interactors in *Arabidopsis* pollen and pollen tubes. *BMC Plant Biol.* **13**: 1–19.
- Diss, G., Ascencio, D., Deluna, A., and Landry, C.R.** (2014). Molecular mechanisms of paralogous compensation and the robustness of cellular networks. *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.* **322**: 488–499.
- Duart, G., Lamb, J., Ortiz-Mateu, J., Elofsson, A., and Mingarro, I.** (2022). Intra-Helical Salt Bridge Contribution to Membrane Protein Insertion. *J. Mol. Biol.* **434**.
- Duckney, P., Deeks, M.J., Dixon, M.R., Kroon, J., Hawkins, T.J., and Hussey, P.J.** (2017). Actin-membrane interactions mediated by NETWORKED2 in *Arabidopsis* pollen tubes through associations with Pollen Receptor-Like Kinase 4 and 5. *New Phytol.* **216**: 1170–1180.
- El-Brolosy, M.A. and Stainier, D.Y.R.** (2017). Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLOS Genet.* **13**: e1006780.
- Elsner, J., Michalski, M., and Kwiatkowska, D.** (2012). Spatiotemporal variation of leaf epidermal cell growth: a quantitative analysis of *Arabidopsis thaliana* wild-type and triple cyclinD3 mutant plants. *Ann. Bot.* **109**: 897–910.
- Engler, C. and Marillonnet, S.** (2014). Golden Gate Cloning. *Methods Mol. Biol.* **1116**: 119–131.
- Feige, M.J. and Hendershot, L.M.** (2013). Quality Control of Integral Membrane Proteins by Assembly-Dependent Membrane Integration. *Mol. Cell* **51**: 297–309.
- Feiler, H.S., Desprez, T., Santoni, V., Kronenberger, J., Caboche, M., and Traas, J.** (1995). The higher plant *Arabidopsis thaliana* encodes a functional CDC48 homologue which is highly expressed in dividing and expanding cells. *EMBO J.* **14**: 5626–5637.
- Feng, H., Liu, C., Fu, R., Zhang, M., Li, H., Shen, L., Wei, Q., Sun, X., Xu, L., Ni, B., and Li, C.** (2019). LORELEI-LIKE GPI-ANCHORED PROTEINS 2/3 Regulate Pollen Tube Growth as Chaperones and Coreceptors for ANXUR/BUPS Receptor Kinases in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **12**: 1612–1623.
- Feng, Y.Z., Zhu, Q.F., Xue, J., Chen, P., and Yu, Y.** (2023). Shining in the dark: the big world of small peptides in plants. *aBIOTECH 2023*: 1–19.
- Fisher, C.L. and Pei, G.K.** (1997). Modification of a PCRBased Site-Directed Mutagenesis Method. *Biotechniques* **23**: 570–574.

- Floyd, S.K. and Bowman, J.L.** (2011). The Ancestral Developmental Tool Kit of Land Plants. *Int. J. Plants Sci.* **168**: 1–35.
- De Folter, S., Immink, R.G.H., Kieffer, M., Pařenicová, L., Henz, S.R., Weigel, D., Busscher, M., Kooiker, M., Colombo, L., Kater, M.M., Davies, B., and Angenent, G.C.** (2005). Comprehensive interaction map of the Arabidopsis MADS Box transcription factors. *Plant Cell* **17**: 1424–1433.
- Foreman, J. and Dolan, L.** (2001). Root hairs as a model system for studying plant cell growth. *Ann. Bot.* **88**: 1–7.
- Fujikura, U., Elsaesser, L., Breuninger, H., Sánchez-Rodríguez, C., Ivakov, A., Laux, T., Findlay, K., Persson, S., and Lenhard, M.** (2014). Atkinesin-13A Modulates Cell-Wall Synthesis and Cell Expansion in Arabidopsis thaliana via the THESEUS1 Pathway. *PLOS Genet.* **10**: e1004627.
- Fukuda, H. and Higashiyama, T.** (2011). Diverse Functions of Plant Peptides: Entering a New Phase. *Plant Cell Physiol.* **52**: 1–4.
- Furuya, T., Hattori, K., Kimori, Y., Ishida, S., Nishihama, R., Kohchi, T., and Tsukaya, H.** (2018). ANGUSTIFOLIA contributes to the regulation of three-dimensional morphogenesis in the liverwort marchantia polymorpha. *Dev.* **145**.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K.** (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**: 151–158.
- Gancheva, M.S., Malovichko, Y. V., Poliushkevich, L.O., Dodueva, I.E., and Lutova, L.A.** (2019). Plant Peptide Hormones. *Russ. J. Plant Physiol.* 2019 **66**: 171–189.
- Gardiner, J.C., Harper, J.D.I., Weerakoon, N.D., Collings, D.A., Ritchie, S., Gilroy, S., Cyr, R.J., and Marc, J.** (2001). A 90-kD Phospholipase D from Tobacco Binds to Microtubules and the Plasma Membrane. *Plant Cell* **13**: 2143–2158.
- Ge, S.X., Jung, D., Jung, D., and Yao, R.** (2020). ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics* **36**: 2628–2629.
- Guo, P., Yoshimura, A., Ishikawa, N., Yamaguchi, T., Guo, Y., and Tsukaya, H.** (2015). Comparative analysis of the RTFL peptide family on the control of plant organogenesis. *J. Plant Res.* **128**: 497–510.
- Guo, Z., Fujioka, S., Blancaflor, E.B., Miao, S., Gou, X., and Li, J.** (2012). TCP1 Modulates Brassinosteroid Biosynthesis by Regulating the Expression of the Key Biosynthetic Gene DWARF4 in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **22**: 1161–1173.
- Hanada, K., Kuromori, T., Myouga, F., Toyoda, T., Li, W.-H., and Shinozaki, K.** (2009). Evolutionary Persistence of Functional Compensation by Duplicate Genes in Arabidopsis. *Genome Biol. Evol.* **1**: 409.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557–580.
- Hegde, P.S., White, I.R., and Debouck, C.** (2003). Interplay of transcriptomics and proteomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 647–651.
- Hepler, P.K., Vidali, L., and Cheung, A.Y.** (2001). Polarized cell growth in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**: 159–187.
- Hernández-García, J., Sun, R., Serrano-Mislata, A., Inoue, K., Vargas-Chávez, C., Esteve-Bruna, D., Arbona, V., Yamaoka, S., Nishihama, R., Kohchi, T., and Blázquez, M.A.** (2021). Coordination between growth and stress responses by DELLA in the liverwort Marchantia

- polymorpha. *Curr. Biol.* **31**: 3678-3686.e11.
- Hewitt, E.J.** (1966). *Sand and Water Culture Methods Used in Study of Plant Nutrition*. 2nd Ed. England, Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, England.
- Ho, C.M.K., Paciorek, T., Abrash, E., and Bergmann, D.C.** (2016). Modulators of Stomatal Lineage Signal Transduction Alter Membrane Contact Sites and Reveal Specialization among ERECTA Kinases. *Dev. Cell* **38**: 345–357.
- Honkanen, S., Jones, V.A.S., Morieri, G., Champion, C., Hetherington, A.J., Kelly, S., Proust, H., Saint-Marcoux, D., Prescott, H., and Dolan, L.** (2016). The Mechanism Forming the Cell Surface of Tip-Growing Rooting Cells Is Conserved among Land Plants. *Curr. Biol.* **26**: 3238–3244.
- Huang, L., Cao, J., Zhang, A.-H., Zhang, Y.-C., Ye, Y.-Q., Huang, L., Cao, J., Zhang, A.-H., Zhang, Y.-C., and Ye, Y.-Q.** (2008). Characterisation of BcMF10, a novel gene involved in pollen wall development of *Brassica rapa* ssp. *chinensis*. *Funct. Plant Biol.* **35**: 1194–1204.
- Ichikawa, M., Iwano, M., and Sato, M.H.** (2015). Nuclear membrane localization during pollen development and apex-focused polarity establishment of SYP124/125 during pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Reprod.* **28**: 143–151.
- Ikeuchi, M., Yamaguchi, T., Kazama, T., Ito, T., Horiguchi, G., and Tsukaya, H.** (2011). ROTUNDIFOLIA4 Regulates Cell Proliferation Along the Body Axis in *Arabidopsis* Shoot. *Plant Cell Physiol.* **52**: 59–69.
- Ishizaki, K., Nishihama, R., Ueda, M., Inoue, K., Ishida, S., Nishimura, Y., Shikanai, T., and Kohchi, T.** (2015). Development of Gateway Binary Vector Series with Four Different Selection Markers for the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLoS One* **10**.
- Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K.T., and Kohchi, T.** (2016). Molecular Genetic Tools and Techniques for *Marchantia polymorpha* Research. *Plant Cell Physiol.* **57**: 262–270.
- Iwasaki, S., Takeda, A., Motose, H., and Watanabe, Y.** (2007). Characterization of *Arabidopsis* decapping proteins AtDCP1 and AtDCP2, which are essential for post-embryonic development. *FEBS Lett.* **581**: 2455–2459.
- Jiang, J., Zhang, Z., and Cao, J.** (2013). Pollen wall development: The associated enzymes and metabolic pathways. *Plant Biol.* **15**: 249–263.
- Jones, V.A.S. and Dolan, L.** (2012). The evolution of root hairs and rhizoids. *Ann. Bot.* **110**: 205–212.
- Kanwar, P., Sanyal, S.K., Mahiwal, S., Ravi, B., Kaur, K., Fernandes, J.L., Yadav, A.K., Tokas, I., Srivastava, A.K., Suprasanna, P., and Pandey, G.K.** (2022). CIPK9 targets VDACC3 and modulates oxidative stress responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* **109**: 241–260.
- Karp, G.** (2010). *Cell and molecular biology : concepts and experiments* (John Wiley, Hoboken, NJ).
- Katsir, L., Davies, K.A., Bergmann, D.C., and Laux, T.** (2011). Peptide Signaling in Plant Development. *Curr. Biol.* **21**: R356.
- Kawarazaki, T., Kimura, S., Iizuka, A., Hanamata, S., Nibori, H., Michikawa, M., Imai, A., Abe, M., Kaya, H., and Kuchitsu, K.** (2013). A low temperature-inducible protein AtSRC2 enhances the ROS-producing activity of NADPH oxidase AtRbohF. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1833**: 2775–2780.
- Kierzkowski, D., Nakayama, N., Routier-Kierzkowska, A.L., Weber, A., Bayer, E., Schorderet, M., Reinhardt, D., Kuhlemeier, C., and Smith, R.S.** (2012). Elastic domains regulate growth

- and organogenesis in the plant shoot apical meristem. *Science* (80-.). **335**: 1096–1099.
- Kohchi, T., Yamato, K.T., Ishizaki, K., Yamaoka, S., and Nishihama, R.** (2021). Development and Molecular Genetics of *Marchantia* polymorpha. *Annu. Rev. Pant Biol.* **72**: 1–26.
- Koncz, C. and Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet. MGG* 1986 2043 **204**: 383–396.
- Kruger, N.J.** (2009). The Bradford Method For Protein Quantitation. In Walker, J.M. (eds) *The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks. (Humana Press, Totowa, NJ), pp. 17–24.
- Lamesch, P. et al.** (2012). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Res.* **40**: D1202.
- Lei, Y., Lu, L., Liu, H.Y., Li, S., Xing, F., and Chen, L.L.** (2014). CRISPR-P: A Web Tool for Synthetic Single-Guide RNA Design of CRISPR-System in Plants. *Mol. Plant* **7**: 1494–1496.
- Li, D., Zhang, H., Mou, M., Chen, Y., Xiang, S., Chen, L., and Yu, D.** (2019). Arabidopsis Class II TCP Transcription Factors Integrate with the FT–FD Module to Control Flowering. *Plant Physiol.* **181**: 97–111.
- Li, J., Yuan, J., Li, Y., Sun, H., Ma, T., Huai, J., Yang, W., Zhang, W., and Lin, R.** (2022). The CDC48 complex mediates ubiquitin-dependent degradation of intra-chloroplast proteins in plants. *Cell Rep.* **39**: 110664.
- Li, S., Ge, F.R., Xu, M., Zhao, X.Y., Huang, G.Q., Zhou, L.Z., Wang, J.G., Kombrink, A., McCormick, S., Zhang, X.S., and Zhang, Y.** (2013). Arabidopsis COBRA-LIKE 10, a GPI-anchored protein, mediates directional growth of pollen tubes. *Plant J.* **74**: 486–497.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Long, Y.P., Xie, D.J., Zhao, Y.Y., Shi, D.Q., and Yang, W.C.** (2019). BICELLULAR POLLEN 1 is a modulator of DNA replication and pollen development in Arabidopsis. *New Phytol.* **222**: 588–603.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.K.** (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Marianayagam, N.J., Sunde, M., and Matthews, J.M.** (2004). The power of two : protein dimerization in biology. *TRENDS Biochem. Sci.* **29**: 618–625.
- Matsubayashi, Y.** (2011). Post-Translational Modifications in Secreted Peptide Hormones in Plants. *Plant Cell Physiol.* **52**: 5–13.
- Matsubayashi, Y.** (2014). Posttranslationally modified small-peptide signals in plants. *Annu. Rev. Pant Biol.* **65**: 385–413.
- Matsubayashi, Y. and Sakagami, Y.** (2006). Peptide hormones in plants. *Annu. Rev. Pant Biol.* **57**: 649–674.
- McGonigle, B., Bouhidel, K., and Irish, V.F.** (1996). Nuclear localization of the Arabidopsis APETALA3 and PISTILLATA homeotic gene products depends on their simultaneous expression. *Genes Dev.* **10**: 1812–1821.
- Mecchia, M.A., Santos-Fernandez, G., Duss, N.N., Somoza, S.C., Boisson-Dernier, A., Gagliardini, V., Martínez-Bernardini, A., Fabrice, T.N., Ringli, C., Muschietti, J.P., and Grossniklaus, U.** (2017). RALF4/19 peptides interact with LRX proteins to control pollen tube growth in Arabidopsis. *Science* (80-.). **358**: 1600–1603.

- Meyerowitz, E.M.** (2002). Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science* **295**: 1482–1485.
- Mikulášek, K., Konečná, H., Potěšil, D., Holánková, R., Havliš, J., and Zdráhal, Z.** (2021). SP3 Protocol for Proteomic Plant Sample Preparation Prior LC-MS/MS. *Front. Plant Sci.* **12**: 369.
- Mudge, A.J.** (2016). The role of the POLARIS peptide in ethylene signalling and root development in *Arabidopsis thaliana*. Doctoral thesis. Durham University.
- Müller, R., Borghi, L., Kwiatkowska, D., Laufs, P., and Simon, R.** (2006). Dynamic and Compensatory Responses of *Arabidopsis* Shoot and Floral Meristems to CLV3 Signaling. *Plant Cell* **18**: 1188.
- Muro, K., Matsuura-Tokita, K., Tsukamoto, R., Kanaoka, M.M., Ebine, K., Higashiyama, T., Nakano, A., and Ueda, T.** (2018). ANTH domain-containing proteins are required for the pollen tube plasma membrane integrity via recycling ANXUR kinases. *Commun. Biol.* **1**: 152.
- Myers, C., Romanowsky, S.M., Barron, Y.D., Garg, S., Azuse, C.L., Curran, A., Davis, R.M., Hatton, J., Harmon, A.C., and Harper, J.F.** (2009). Calcium-dependent protein kinases regulate polarized tip growth in pollen tubes. *Plant J.* **59**: 528–539.
- Naramoto, S., Hata, Y., Fujita, T., and Kyojuka, J.** (2022). The bryophytes *Physcomitrium patens* and *Marchantia polymorpha* as model systems for studying evolutionary cell and developmental biology in plants. *Plant Cell* **34**: 228–246.
- Narita, N.N., Moore, S., Horiguchi, G., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H., Goodrich, J., and Tsukaya, H.** (2004). Overexpression of a novel small peptide ROTUNDIFOLIA4 decreases cell proliferation and alters leaf shape in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **38**: 699–713.
- Nishihama, R., Ishizaki, K., Hosaka, M., Matsuda, Y., Kubota, A., and Kohchi, T.** (2015). Phytochrome-mediated regulation of cell division and growth during regeneration and sporeling development in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J. Plant Res.* **128**: 407–421.
- Pacheco-Escobedo, M.A., Ivanov, V.B., Ransom-Rodríguez, I., Arriaga-Mejía, G., Ávila, H., Baklanov, I.A., Pimentel, A., Corkidi, G., Doerner, P., Dubrovsky, J.G., Álvarez-Buylla, E.R., and Garay-Arroyo, A.** (2016). Longitudinal zonation pattern in *Arabidopsis* root tip defined by a multiple structural change algorithm. *Ann. Bot.* **118**: 763–776.
- Park, S., Rancour, D.M., and Bednarek, S.Y.** (2008). In planta analysis of the cell cycle-dependent localization of AtCDC48A and its critical roles in cell division, expansion, and differentiation. *Plant Physiol.* **148**: 246–258.
- Pearce, G., Moura, D.S., Stratmann, J., and Ryan, C.A.** (2001). RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 12843–12847.
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., and Ryan, C.A.** (1991). A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins. *Science* **253**: 895–898.
- Perpiñán, E.** (2013). Los genes DEVIL y su papel en el desarrollo del fruto de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Politécnica de Valencia.
- Prelich, G.** (2012). Gene Overexpression: Uses, Mechanisms, and Interpretation. *Genetics* **190**: 841–854.
- Primo, A.** (2013). Los genes DEVIL y su papel en el desarrollo del fruto de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo Fin de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Qin, Y. and Yang, Z.** (2011). Rapid tip growth: Insights from pollen tubes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**: 816–824.

- Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Mattei, B., De Lorenzo, G., Cervone, F., and Bellincampi, D.** (2004). Two *Arabidopsis thaliana* genes encode functional pectin methylesterase inhibitors1. *FEBS Lett.* **557**: 199–203.
- Rancour, D.M., Dickey, C.E., Park, S., and Bednarek, S.Y.** (2002). Characterization of AtCDC48. Evidence for Multiple Membrane Fusion Mechanisms at the Plane of Cell Division in Plants. *Plant Physiol.* **130**: 1241–1253.
- Röckel, Nina, Wolf, S., Kost, B., Rausch, T., and Greiner, S.** (2008). Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PME1 at the pollen tube tip involves PME1 endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. *Plant J.* **53**: 133–143.
- Rodriguez-Leal, D. et al.** (2019). Evolution of buffering in a genetic circuit controlling plant stem cell proliferation. *Nat. Genet.* **51**: 786–792.
- Šamaj, J., Müller, J., Beck, M., Böhm, N., and Menzel, D.** (2006). Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends Plant Sci.* **11**: 594–600.
- Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schiefelbein, J., Galway, M., Masucci, J., and Ford, S.** (1993). Pollen Tube and Root-Hair Tip Growth Is Disrupted in a Mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **103**: 979–985.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., and Weigel, D.** (2006). Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1121–1133.
- Shani, Z., Dekel, M., Roiz, L., Horowitz, M., Kolosovski, N., Lapidot, S., Alkan, S., Koltai, H., Tsabary, G., Goren, R., and Shoseyov, O.** (2006). Expression of endo-1,4-beta-glucanase (*cel1*) in *Arabidopsis thaliana* is associated with plant growth, xylem development and cell wall thickening. *Plant Cell Rep.* **25**: 1067–1074.
- Shi, S., Li, S., Asim, M., Mao, J., Xu, D., Ullah, Z., Liu, G., Wang, Q., and Liu, H.** (2018). The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinases (CDPKs) and their roles in plant growth regulation and abiotic stress responses. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: 1900.
- Shimamura, M.** (2016). *Marchantia polymorpha* : Taxonomy, Phylogeny and Morphology of a Model System. *Plant Cell Physiol.* **57**: 230–256.
- Shultz, R.W., Lee, T.J., Allen, G.C., Thompson, W.F., and Hanley-Bowdoin, L.** (2009). Dynamic Localization of the DNA Replication Proteins MCM5 and MCM7 in Plants. *Plant Physiol.* **150**: 658–669.
- Smith, D.K. and Wallace, I.S.** (2020). Internally Controlled Methods to Quantify Pollen Tube Growth and Penetration Defects in *Arabidopsis thaliana*. In *Pollen and Pollen Tube Biology. Methods in Molecular Biology*, vol 2160, A. Geitmann, ed (Springer US: New York, NY), pp. 129–147.
- Solly, J.E., Cunniffe, N.J., and Harrison, C.J.** (2017). Regional Growth Rate Differences Specified by Apical Notch Activities Regulate Liverwort Thallus Shape. *Curr. Biol.* **27**: 16–26.
- Sreeramulu, S., Mostizky, Y., Sunitha, S., Shani, E., Nahum, H., Salomon, D., Hayun, L. Ben, Gruetter, C., Rauh, D., Ori, N., and Sessa, G.** (2013). BSKs are partially redundant positive regulators of brassinosteroid signaling in *Arabidopsis*. *Plant J.* **74**: 905–919.
- Sudan, J., Sharma, D., Mustafiz, A., and Kumari, S.** (2018). Signaling peptides: Hidden molecular messengers of abiotic stress perception and response in plants. In *Abiotic Stress-Mediated Sensing and Signaling in Plants: An Omics Perspective*, S. Zargar and M. Zargar, eds (Springer Singapore), pp. 95–125.

- Sugano, S.S., Id, R.N., Shirakawa, M., Takagi, J., Matsuda, Y., Ishida, S., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Osakabe, K., and Kohchiid, T.** (2018). Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha*. *PLOS one* **13** (10): e0205117.
- Tavormina, P., De Coninck, B., Nikonorova, N., De Smet, I., and Cammuea, B.P.A.** (2015). The Plant Peptidome: An Expanding Repertoire of Structural Features and Biological Functions. *Plant Cell* **27**: 2095–2118.
- Topping, J.F. and Lindsey, K.** (1997). Promoter trap markers differentiate structural and positional components of polar development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**: 1713.
- Uyttewaal, M., Burian, A., Alim, K., Landrein, B., Borowska-Wykr, D., Dedieu, A., Peaucelle, A., Ludynia, M., Traas, J., Boudaoud, A., Kwiatkowska, D., and Hamant, O.** (2012). Mechanical stress acts via katanin to amplify differences in growth rate between adjacent cells in *Arabidopsis*. *Cell* **149**: 439–451.
- Valdivia, E.R., Chevalier, D., Sampedro, J., Taylor, I., Niederhuth, C.E., and Walker, J.C.** (2012). DVL genes play a role in the coordination of socket cell recruitment and differentiation. *J. Exp. Bot.* **63**: 1405–1412.
- Waddington, C.H.** (1942). The epigenotype. *Endeavour* **1**: 18–20.
- Wagner, A.** (2007). *Robustness and Evolvability in Living Systems*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Wang, Y., Zhang, W.Z., Song, L.F., Zou, J.J., Su, Z., and Wu, W.H.** (2008). Transcriptome Analyses Show Changes in Gene Expression to Accompany Pollen Germination and Tube Growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **148**: 1201–1211.
- Wang, Z.P., Xing, H.L., Dong, L., Zhang, H.Y., Han, C.Y., Wang, X.C., and Chen, Q.J.** (2015). Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biol.* **16**: 1–12.
- Wasteneys, G.O. and Galway, M.E.** (2003). Remodeling the Cytoskeleton for Growth and Form: An Overview with Some New Views. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 691–722.
- Wen-Jun, S. and Forde, B.G.** (1989). Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **17**: 8385.
- Wen, J., Lease, K.A., and Walker, J.C.** (2004). DVL, a novel class of small polypeptides: overexpression alters *Arabidopsis* development. *Plant J.* **37**: 668–677.
- Wen, J. and Walker, J.** (2006). DVL Peptides are Involved in Plant Development. *Handb. Biol. Act. Pept.:* 17–22.
- Xie, M., Sun, J., Gong, D., and Kong, Y.** (2019). The Roles of *Arabidopsis* C1-2i Subclass of C2H2-type Zinc-Finger Transcription Factors. *Genes* **10**: 653.
- Yamaguchi, T. and Tsukaya, H.** (2006). ROTUNDIFOLIA4: A Plant-Specific Small Peptide. In *Handbook of Biologically Active Peptides* (Academic Press), pp. 37–40.
- Yamaoka, S. et al.** (2018). Generative Cell Specification Requires Transcription Factors Evolutionarily Conserved in Land Plants. *Curr. Biol.* **28**: 479–486.e5.
- Yu, Y., Song, J., Tian, X., Zhang, H., Li, L., and Zhu, H.** (2018). *Arabidopsis* PRK6 interacts specifically with AtRopGEF8/12 and induces depolarized growth of pollen tubes when overexpressed. *Sci. China Life Sci.* **61**: 100–112.
- Zhao, L.N., Shen, L.K., Zhang, W.Z., Zhang, W., Wang, Y., and Wu, W.H.** (2013). Ca²⁺-dependent protein kinase11 and 24 modulate the activity of the inward rectifying K⁺ channels in

Arabidopsis pollen tubes. *Plant Cell* **25**: 649–661.

Zhou, Z., Shi, H., Chen, B., Zhang, R., Huang, S., and Fu, Y. (2015). Arabidopsis RIC1 Severs Actin Filaments at the Apex to Regulate Pollen Tube Growth. *Plant Cell* **27**: 1140–1161.

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS



ANEXO I. Secuencia de aminoácidos predicha de los mutantes generados por CRISPR.**Secuencia de aminoácidos predicha de las proteínas RTFL9 y RTFL9-*crispr*****RTFL9:**

MAEFKSKLNGHAFSTKSCASLVKEQ^RARLYILRRCATMLCCWYIQGDDSP^LAAWQNP^FTR
 NLTLS^SDI^FWCKTLLQAYKTERER^RTRDLSAKRAGVFTV^SETETVEM^LLIL*

RTFL9-*crispr*:

MAEFKSKLNGHAFSTKSCASLVKEQ^RARLYILRRCATMLEGFLMIGFTLDRRRLFWFHQ*

Secuencia de aminoácidos predicha de las proteínas DVL1 y DVL1-*crispr***DVL1:**

MEMKRVMSSAER^SKEKKRSISRRLGKYMKEQ^KGRIYIIRRCMVMLLC^SHD*

DVL1-*crispr*:

MEMKRVMSSAEEKYMKEQ^KGRIYIIRRCMVMLLC^SHD*

Secuencia de aminoácidos predicha de las proteínas DVL4 y DVL4-*crispr***DVL4:**

MKMGSKRRVSSKGLGAVLKEQ^RAKLYIIRRCVVMMLLC^WHD*

DVL4-*crispr*:

MK^FGA*

Secuencia de aminoácidos predicha de las proteínas DVL3 y DVL3-*crispr***DVL3:**

MKGTKKKT^PCNKKLGGYLKEQ^KGRLYIIRRCVVMMLIC^WHD*

DVL3-*crispr*:

MKGTKKKT^PCNKKLGGYLKEKREGFTSSE^DVWSCSFVGM^TNLQLICVIY^TCTICT^CIL*

Secuencia de aminoácidos predicha de las proteínas DVL5 y DVL5-*crispr***DVL5:**

MKTGSSVGGT^KRK^MWSR^GVGGVVREQ^KAKLYIIRRCVVMMLLC^WHD*

DVL5-*crispr*:

MKTGSSVGGT^KRK^MWSR^VSGRSG*

Secuencia de aminoácidos predicha de las proteínas DVL6 y DVL6-*crispr***DVL6:**

MGVLKRRVSSSRG^LGGVLREQ^RAKLYIIRKCVVMMLLC^WQD*

DVL6-*crispr*:

MGVLKRRVSSSRG^TWWCS*

En azul se muestra la región conservada tras el CRISPR. En gris se muestra la región delecionada tras el CRISPR. En las versiones de las proteínas *crispr* se incluye secuencia predicha hasta encontrar primer codon de parada, aunque corresponda con la región 3'UTR de la secuencia original.

ANEXO II. Términos GO representativos de los DEGs en los múltiples mutantes *dvl1/rtf19 dvl8 dvl11 rtf19 rtf111*.

TÉRMINOS GO DE LOS DEGs REGULADOS AL ALZA EN LOS MÚLTIPLES MUTANTES <i>dvl/rtf1</i>		
GENES	ID	DESCRIPCIÓN GO
AT4G01440 AT5G40230 AT5G40260 AT5G43340	GO:0055085	Transporte transmembrana
AT5G40260	GO:0010208	Ensamblaje de la pared del polen
	GO:0010584	Formación de la exina del polen
	GO:0010927	Ensamblaje de componentes celulares involucrados en morfogénesis
	GO:0032989	Morfogénesis de componentes celulares
	GO:0033037	Localización de polisacáridos
	GO:0034219	Transporte transmembrana de carbohidratos
	GO:0051260	Homo-oligomerización de proteínas
	GO:0052386	Espesamiento de la pared celular
	GO:0052543	Depósito de callosa en pared celular
	GO:0052545	Localización de callosa
	GO:0051259	Oligomerización de complejos proteicos
AT5G45150	GO:0016246	Interferencia de RNA
	GO:0030422	Producción de siRNA involucrada en la interferencia de RNA
	GO:0031050	Procesamiento de dsRNA
	GO:0070918	Producción de pequeños RNA involucrada en el silenciamiento génico por RNA
AT5G43340	GO:0006817	Transporte de ión fosfato

TÉRMINOS GO DE LOS DEGs REGULADOS A LA BAJA EN LOS MÚLTIPLES MUTANTES <i>dvl/rtf1</i>		
GENES	ID	DESCRIPCIÓN GO
AT1G03050 AT1G05580 AT1G10770 AT1G11765 AT1G24520 AT1G28270 AT1G48020 AT1G50610 AT1G51250 AT1G61290 AT1G68610 AT1G79860 AT2G07040 AT2G21480 AT2G31500 AT2G33100 AT2G33420 AT2G33460 AT2G33775 AT3G01700 AT3G02810 AT3G20190 AT3G20580 AT3G26860 AT4G02650 AT4G33970 AT4G35700 AT4G38190 AT4G39110 AT5G12180 AT5G16500 AT5G19360	GO:0051704	Proceso de multi-organismo
AT1G03050 AT1G05580 AT1G10770 AT1G11765 AT1G28270 AT1G48020 AT1G50610 AT1G51250 AT1G61290 AT1G79860 AT2G07040 AT2G21480 AT2G31500 AT2G33100 AT2G33420 AT2G33460 AT2G33775 AT3G01700 AT3G02810 AT3G20190 AT3G20580 AT3G26860 AT4G02650 AT4G33970 AT4G38190 AT4G39110 AT5G12180 AT5G16500 AT5G19360	GO:0009856 GO:0044706	Polinización Proceso de organismo multi-multicelular
AT1G03050 AT1G05580 AT1G10770 AT1G28270 AT1G48020 AT1G50610 AT1G61290 AT1G79860 AT2G07040 AT2G21480 AT2G31500 AT2G33420 AT2G33460 AT2G33775 AT3G01700 AT3G02810 AT3G20190 AT3G20580 AT4G02650 AT4G33970 AT4G39110 AT5G12180 AT5G16500 AT5G19360	GO:0048868	Desarrollo del tubo polínico
AT1G03050 AT1G10770 AT1G24520 AT1G28270 AT1G48020 AT1G50610 AT1G52240 AT1G61290 AT1G68610 AT1G79860 AT2G07040 AT2G21480 AT2G31500 AT2G33460 AT2G33775 AT3G01700	GO:0030154 GO:0048869	Diferenciación celular Procesos de desarrollo celulares

AT3G20190 AT3G20580 AT4G02650 AT4G33970 AT4G35700 AT4G39110 AT5G12180 AT5G19360	GO:0009860	Crecimiento del tubo polínico
	GO:0009932	Crecimiento distal de la célula
	GO:0048588	Crecimiento de células en desarrollo
	GO:0000904	Morfogénesis celular involucrada en diferenciación
AT1G03050 AT1G10770 AT1G28270 AT1G48020 AT1G50610 AT1G61290 AT1G79860 AT2G07040 AT2G21480 AT2G31500 AT2G33460 AT2G33775 AT3G01700 AT3G20190 AT3G20580 AT4G02650 AT4G33970 AT4G39110 AT5G12180 AT5G19360	GO:0009826	Crecimiento celular unidimensional
	GO:0060560	Crecimiento del desarrollo involucrado en morfogénesis
	GO:0000902	Morfogénesis celular
	GO:0016049	Crecimiento celular
	GO:0048589	Crecimiento del desarrollo
	GO:0040007	Crecimiento
	GO:0080092	Regulación del crecimiento del tubo polínico
	GO:0010769	Regulación de la morfogénesis celular involucrada en diferenciación
	GO:0051510	Regulación del crecimiento celular unidimensional
	GO:0001558	Regulación del crecimiento celular
AT1G28270 AT1G50610 AT1G79860 AT2G07040 AT2G21480 AT2G31500 AT2G33775 AT3G20190 AT4G39110 AT5G12180 AT5G19360	GO:0022604	Regulación de la morfogénesis celular
	GO:0048638	Regulación del crecimiento del desarrollo
	GO:0022603	Regulación de la morfogénesis de estructuras anatómicas
	GO:0051128	Regulación de la organización de componentes celulares
	GO:2000241	Regulación de procesos reproductivos
	GO:0051239	Regulación de procesos de organismos multicelulares
AT1G03050 AT1G10770 AT1G28270 AT1G48020 AT1G50610 AT1G52240 AT1G61290 AT1G79860 AT2G07040 AT2G21480 AT2G31500 AT2G33460 AT2G33775 AT3G01700 AT3G20190 AT3G20580 AT4G02650 AT4G33970 AT4G39110 AT5G12180 AT5G19360	GO:0048468	Desarrollo celular
	GO:0009653	Morfogénesis de estructuras anatómicas
AT1G14420 AT2G02720 AT2G26450 AT2G44560 AT2G47030 AT3G05610 AT3G17060 AT3G43860 AT3G62710 AT4G33230 AT5G15110 AT5G61680	GO:0000272	Procesos catabólicos de polisacáridos
AT1G14420 AT2G02720 AT2G16730 AT2G23900 AT2G26450 AT2G33100 AT2G44560 AT2G47030 AT3G05610 AT3G06260 AT3G17060 AT3G43860 AT3G52600 AT3G57240 AT3G62710 AT4G26260 AT4G33230 AT4G33860 AT4G38190 AT5G12960 AT5G15110 AT5G20390 AT5G43300 AT5G48140 AT5G56640 AT5G58050 AT5G58170 AT5G61680	GO:0005975	Procesos metabólicos de carbohidratos
AT1G14420 AT2G02720 AT2G26450 AT2G44560 AT2G47030 AT3G05610 AT3G17060 AT3G43860 AT3G62710 AT4G26260 AT4G33230 AT5G15110 AT5G56640 AT5G61680	GO:0016052	Procesos catabólicos de carbohidratos
AT1G10770 AT1G23350 AT1G48020 AT2G26450 AT2G47030 AT3G05610 AT3G36659 AT3G62180 AT4G02250 AT4G24640 AT4G33230 AT5G50030 AT5G50040	GO:0043086	Regulación negativa de la actividad catalítica
	GO:0044092	Regulación negativa de la función molecular
AT1G14420 AT2G02720 AT2G26450 AT2G47030 AT3G05610 AT3G17060 AT4G33230 AT5G15110 AT5G61680	GO:0045490	Proceso catabólico de pectina
AT1G03050 AT1G05580 AT1G10770 AT1G11765 AT1G24520 AT1G28270 AT1G48020 AT1G50610 AT1G51250 AT1G53490 AT1G61290 AT1G68610	GO:0022414	Proceso reproductivo
	GO:0000003	Reproducción

ANEXOS

AT1G79860 AT2G07040 AT2G21480 AT2G31500 AT2G33100 AT2G33420 AT2G33460 AT2G33775 AT3G01700 AT3G02810 AT3G20190 AT3G20580 AT3G26860 AT3G52600 AT4G02650 AT4G33970 AT4G35700 AT4G38190 AT4G39110 AT5G02110 AT5G12180 AT5G16500 AT5G19360		
AT2G17890 AT2G21480 AT2G31500 AT2G41860 AT3G61160 AT4G10010 AT4G39110 AT5G12180 AT5G18910 AT5G19360 AT5G28680	GO:0046777	Autofosforilación de proteínas
AT1G17540 AT1G23540 AT1G49270 AT1G50610 AT1G61860 AT1G76370 AT2G07040 AT2G17890 AT2G21480 AT2G31500 AT2G41860 AT2G43230 AT3G01085 AT3G02810 AT3G18810 AT3G20190 AT3G20530 AT3G61160 AT4G10010 AT4G39110 AT5G02110 AT5G12000 AT5G12180 AT5G16500 AT5G18910 AT5G19360 AT5G28680	GO:0006468	Fosforilación de proteínas
AT1G14420 AT2G02720 AT2G26450 AT2G47030 AT3G05610 AT3G06260 AT3G17060 AT4G33230 AT5G15110 AT5G61680	GO:0045488	Procesos metabólicos de pectina
	GO:0010393	Procesos metabólicos de galacturonano
AT1G01460 AT1G17540 AT1G23540 AT1G49270 AT1G50610 AT1G61860 AT1G76370 AT2G07040 AT2G17890 AT2G21480 AT2G31500 AT2G40850 AT2G41860 AT2G43230 AT3G01085 AT3G02810 AT3G18810 AT3G19310 AT3G20190 AT3G20530 AT3G56600 AT3G61160 AT4G10010 AT4G39110 AT5G02110 AT5G12000 AT5G12180 AT5G16500 AT5G18910 AT5G19360 AT5G28680	GO:0016310	Fosforilación
AT1G03050 AT1G05580 AT1G10770 AT1G24520 AT1G28270 AT1G48020 AT1G50610 AT1G61290 AT1G68610 AT1G79860 AT2G07040 AT2G21480 AT2G31500 AT2G33420 AT2G33460 AT2G33775 AT3G01700 AT3G02810 AT3G20190 AT3G20580 AT3G52600 AT4G02650 AT4G33970 AT4G35700 AT4G39110 AT5G02110 AT5G12180 AT5G16500 AT5G19360	GO:0003006	Procesos de Desarrollo involucrados en reproducción
AT1G10770 AT1G23350 AT1G48020 AT1G52240 AT1G79860 AT2G26450 AT2G31500 AT2G47030 AT3G05610 AT3G17980 AT3G36659 AT3G62180 AT4G02250 AT4G24640 AT4G33230 AT5G02110 AT5G50030 AT5G50040	GO:0065009	Regulación de la función molecular
AT1G14420 AT2G02720 AT2G26450 AT2G33100 AT2G44560 AT2G47030 AT3G05610 AT3G06260 AT3G17060 AT3G43860 AT3G62710 AT4G33230 AT4G38190 AT5G15110 AT5G61680	GO:0005976	Procesos metabólicos de polisacáridos
AT1G10770 AT1G23350 AT1G48020 AT1G52240 AT1G79860 AT2G26450 AT2G47030 AT3G05610 AT3G17980 AT3G36659 AT3G62180 AT4G02250 AT4G24640 AT4G33230 AT5G02110 AT5G50030 AT5G50040	GO:0050790	Regulación de la actividad catalítica
AT1G14420 AT2G26450 AT2G33100 AT2G33460 AT2G44560 AT2G47030 AT3G05610 AT3G06260 AT3G17060 AT3G20580 AT3G43860 AT4G33230 AT4G33970 AT4G38190 AT5G61680	GO:0071555	Organización de la pared celular
	GO:0045229	Organización de la estructura de encapsulamiento externo
	GO:0071554	Organización o biogénesis de la pared celular
AT1G28270 AT1G50610 AT1G79860 AT2G07040 AT2G21480 AT2G31500 AT2G33460 AT2G33775 AT3G20190 AT4G39110 AT5G12180 AT5G19360	GO:0040008	Regulación del crecimiento
AT1G03050 AT1G25240 AT1G68110 AT4G02650	GO:0048268	Ensamblaje de la capa de clatrina
	GO:0072583	Endocitosis dependiente de clatrina
	GO:0006898	Endocitosis mediada por receptor
	GO:0006900	Escisión de vesículas de membrana

	GO:0006897	Endocitosis
AT1G05580 AT1G08140 AT1G08150 AT2G25600 AT2G28180 AT2G31500	GO:0006813	Transporte del ión potasio
AT1G05580 AT1G08140 AT1G08150 AT2G25600 AT2G28180 AT2G31500	GO:0010183	Guía del tubo polínico
	GO:0042330	Taxis
	GO:0050918	Quimiotaxis positiva
	GO:0006935	Quimiotaxis
	GO:0040011	Locomoción
AT1G03050 AT1G25240 AT1G61290 AT1G68110 AT3G03800 AT4G02650	GO:0016050	Organización de vesículas
AT1G28270 AT2G22055 AT2G33775 AT3G25165 AT3G25170	GO:0007267	Señalización célula a célula
	GO:0019722	Señalización mediada por calcio
	GO:0019932	Señalización mediada por mensajeros secundarios
AT4G26260 AT5G56640	GO:0019310	Procesos catabólicos de inositol
AT4G26260 AT5G43300 AT5G56640 AT5G58050 AT5G58170	GO:0019751	Procesos metabólicos de polioles
	GO:0006066	Proceso metabólico del alcohol
AT2G26450 AT2G47030 AT3G05610 AT3G17060 AT4G33230 AT5G61680	GO:0042545	Modificación de la pared celular
AT1G05580 AT1G08140 AT1G08150 AT2G28180	GO:0006885	Regulación del pH
	GO:0055067	Homeostasis de cationes inorgánicos monovalentes
AT2G17890 AT2G31500 AT2G41860 AT5G12180 AT5G19360	GO:0018105	Fosforilación de peptidil-serina
	GO:0018209	Modificación de peptidil-serina
AT5G43300 AT5G58050 AT5G58170	GO:0019400	Proceso metabólico del alditol
	GO:0006071	Proceso metabólico del glicerol
AT1G61290 AT2G28640 AT3G03800 AT3G09530	GO:0006887	Exocitosis
	GO:0032940	Secreción por célula
	GO:0046903	Secreción
	GO:0140352	Exportación desde la célula
AT2G44560 AT3G43860 AT4G26260 AT5G56640	GO:0044275	Proceso catabólico de carbohidratos celulares
AT1G24520 AT1G68610 AT4G35700	GO:0048235	Diferenciación de la célula espermática del polen
	GO:0055046	Micro gametogénesis
	GO:0048232	Generación del gameto masculino
AT1G01460 AT2G40850 AT3G56600	GO:0046854	Proceso de biosíntesis del fosfatidilinositol fosfato
AT1G01460 AT2G40850 AT3G56600 AT5G39400	GO:0046488	Proceso metabólico del fosfatidilinositol
AT1G01460 AT2G40850 AT3G56600 AT5G39400 AT5G43300	GO:0006650	Proceso metabólico de glicerofosfolípidos
AT2G21990 AT4G39610	GO:0010274	Hidrotropismo
AT2G33100 AT2G44560 AT3G43860 AT4G38190	GO:0030243	Proceso metabólico de la celulosa
	GO:0051273	Proceso metabólico del meta-glucano
AT2G33460 AT3G20580	GO:0010215	Organización de microfibrillas de celulosa
	GO:0070726	Ensamblaje de la pared celular
	GO:0071668	Ensamblaje de la pared celular por tipo de planta
	GO:0030198	Organización de la matriz extracelular
	GO:0043062	Organización de la estructura extracelular
AT1G28270 AT2G17890 AT2G22055 AT2G31500 AT2G33775 AT2G40116 AT2G41860 AT3G25165 AT3G25170 AT5G12180 AT5G19360	GO:0035556	Transducción de la señal intracelular
AT1G03050 AT4G02650	GO:0072659	Localización proteica a la membrana plasmática
	GO:1990778	Localización proteica a la periferia celular

ANEXOS

AT2G44560 AT3G43860 AT3G62710	GO:0009251	Proceso catabólico del glucano
AT1G28270 AT1G50610 AT1G79860 AT2G07040 AT2G21480 AT2G31500 AT2G33775 AT3G20190 AT4G39110 AT5G12180 AT5G19360 AT5G26700	GO:0050793	Regulación del proceso de desarrollo
AT2G33100 AT2G44560 AT3G43860 AT4G26260 AT4G38190 AT5G43300 AT5G56640 AT5G58050 AT5G58170	GO:0044262	Proceso metabólico del carbohidrato celular
AT2G07040 AT2G33100 AT4G38190	GO:0009846	Germinación de polen
AT1G05580 AT2G25600 AT2G31500	GO:0071805	Transporte transmembrana del ion potasio
AT1G11765 AT1G51250 AT3G26860 AT5G16500	GO:0048544	Reconocimiento del polen
	GO:0008037	Reconocimiento celular

ANEXO III. Genes diferencialmente expresados y comunes a ambas líneas sobreexpresoras *dvl1-1D* y 35S:DVL8 con respecto al silvestre analizados mediante RNA-seq.

ID	Nombre	Regulado a la ALZA/BAJA		
		<i>dvl1-1D</i>	35S:DVL8	Quíntuples mutantes
AT1G21525		ALZA	ALZA	
AT1G36150		ALZA	ALZA	
AT1G56660		ALZA	ALZA	
AT1G74820		ALZA	ALZA	
AT2G15040	RLP18	ALZA	ALZA	
AT2G15042		ALZA	ALZA	
AT2G17000		ALZA	ALZA	
AT2G26750		ALZA	ALZA	
AT2G34655		ALZA	ALZA	
AT2G39060	SWEET9	ALZA	ALZA	
AT3G13790	BFRUCT1	ALZA	ALZA	
AT3G24420		ALZA	ALZA	
AT3G25810		ALZA	ALZA	
AT3G29644	SORF29	ALZA	ALZA	ALZA
AT3G46090	ZAT7	ALZA	ALZA	
AT4G11290		ALZA	ALZA	
AT4G13340	LRX3	ALZA	ALZA	
AT4G13900	RLP49	ALZA	ALZA	
AT5G06720	PA2	ALZA	ALZA	
AT5G19880		ALZA	ALZA	
AT5G57560	TCH4	ALZA	ALZA	
AT5G59080		ALZA	ALZA	
AT3G06355		ALZA	BAJA	ALZA
AT3G15450		ALZA	BAJA	
AT1G30795		BAJA	ALZA	
AT1G53490	HEI10	BAJA	ALZA	BAJA
AT1G67260	TCP1	BAJA	ALZA	
AT3G15030	TCP4	BAJA	ALZA	
AT2G19050		BAJA	ALZA	BAJA
AT4G09455		BAJA	ALZA	BAJA
AT5G35390	PRK1	BAJA	ALZA	
AT5G04950	NAS1	BAJA	ALZA	
AT5G28030	DES1	BAJA	ALZA	

ANEXO IV. Figura suplementaria S1. Genes diferencialmente expresados entre los quintuples mutantes *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y el silvestre, y entre las líneas sobreexpresoras *dvl1-1D* y *35S:DVL8* y el silvestre analizados mediante RNA-seq.

A



B

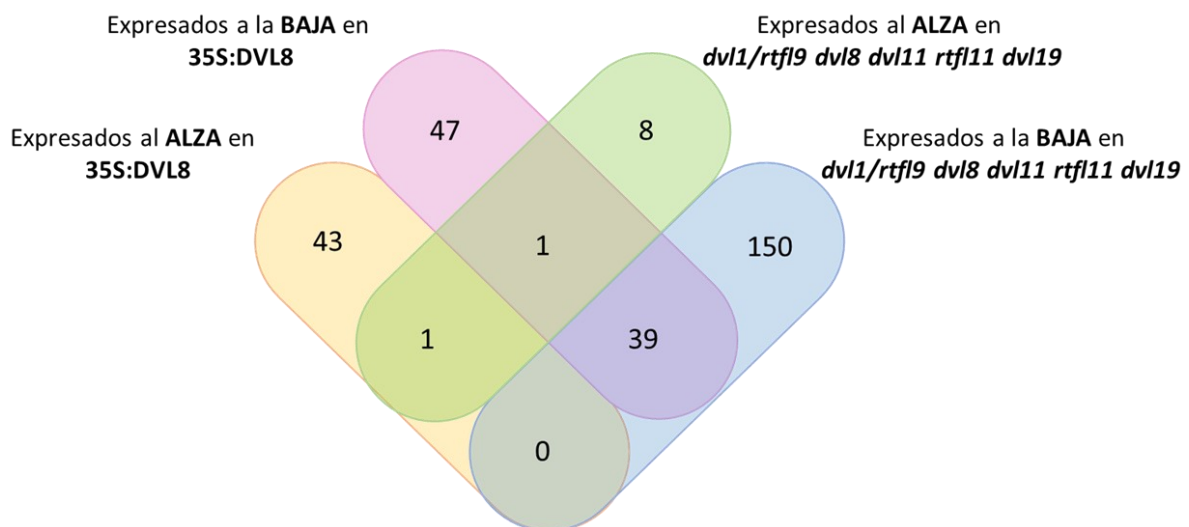


Figura S1. Genes diferencialmente expresados entre los quintuples mutantes *rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* y el silvestre, y entre las líneas sobreexpresoras *dvl1-1D* y *35S:DVL8* y el silvestre analizados mediante RNA-Seq. A) Diagrama de Venn que muestra el número de genes comunes en el quintuple mutante *dvl1 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* con respecto al genotipo silvestre y en la línea sobreexpresora *dvl1-1D* con respecto al silvestre. B) Diagrama de Venn que muestra el número de genes comunes ambos quintuples mutantes *dvl1/rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl11 dvl19* con respecto al genotipo silvestre y en la línea sobreexpresora *35S:DVL8* con respecto al silvestre. Se muestran los genes sobreexpresados (al ALZA) y cuya expresión está reducida (a la BAJA) en las diferentes comparaciones.

ANEXO V. Genes diferencialmente expresados comunes a quintuples mutantes *dvl1/rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* y la línea sobreexpresoras 35S:DVL8 analizados mediante RNA-Seq.

ID Gen	Nombre	log ₂ . fold change	
		<i>dvl/rtf1</i> mutante	35S:DVL8
AT3G29644	SORF29	1,27603	0,86869
AT3G06355		1,14462	-0,75162
AT3G62180		-0,50680	-0,58935
AT4G35700	DAZ3	-0,51399	-0,81762
AT5G02110	CYCD7;1	-0,51495	-0,78777
AT3G62640		-0,52652	-0,68607
AT1G74010		-0,53615	-0,64460
AT3G36659		-0,56364	-0,67973
AT4G26260	MIOX4	-0,57082	-0,84736
AT2G25600	SPIK	-0,58449	-0,62569
AT2G40116		-0,58957	-0,60364
AT1G75870		-0,59151	-0,77274
AT2G13350		-0,60768	-0,72335
AT1G01460	PIPK11	-0,60920	-0,76905
AT2G33460	RIC1	-0,61494	-0,76781
AT3G56600		-0,61956	-0,55964
AT5G56640	MIOX5	-0,62043	-0,72296
AT2G43230		-0,63515	-0,55219
AT3G19310		-0,63632	-0,75203
AT2G33270	ACHT3	-0,63847	-0,71019
AT5G25340		-0,64284	-0,77477
AT1G17540		-0,64313	-0,94289
AT4G10010		-0,64322	-0,59151
AT5G43300	GDPD3	-0,65624	-0,82671
AT2G22055	RALFL15	-0,66184	-0,91057
AT5G42490		-0,66274	-0,77570
AT5G27980		-0,66306	-0,83077
AT1G08150	CHX5	-0,66689	-0,69626
AT5G19360	CPK34	-0,68184	-0,77050
AT2G44560	GH9B11	-0,68792	-0,97649
AT2G19050		-0,68859	-1,14397
AT2G02720		-0,68944	-0,82530
AT4G04980		-0,69457	-0,84384
AT2G40990		-0,70583	-0,92084
AT1G44160		-0,70918	-0,69222
AT1G50610	PRK5	-0,71124	-0,72412
AT2G16586		-0,75688	-0,93415
AT1G68610	PCR11	-0,78175	-0,89198
AT2G46360		-0,79593	-0,87720
AT1G53490	HEI10	-1,35355	-1,40303
AT4G09455		-8,67912	-7,70723

ANEXO VI. Términos GO representativos de los DEGs comunes en los múltiples mutantes *dvl1/rtfl9 dvl8 dvl11 rtfl9 rtfl11* y la línea sobreexpresora 35S:DVL8.

TÉRMINOS GO DE LOS DEGs REGULADOS A LA BAJA COMUNES EN LOS MUTANTES <i>dvl/rtfl</i> Y 35S:DVL8		
GENES	ID	DESCRIPCIÓN GO
AT1G01460 AT1G17540 AT1G50610 AT2G43230 AT3G19310 AT3G56600 AT4G10010 AT5G02110 AT5G19360	GO:0016310	Fosforilación
AT2G02720 AT2G44560 AT4G26260 AT5G56640	GO:0016052	Proceso catabólico de carbohidratos
	GO:0019310	Proceso catabólico de inositol
	GO:0019852	Proceso metabólico del ácido L-ascórbico
AT4G26260 AT5G56640	GO:0019853	Proceso de biosíntesis del ácido L-ascórbico
	GO:0006020	Proceso metabólico de inositol
	GO:0046164	Proceso catabólico de alcohol
	GO:0046174	Proceso catabólico de polioles
AT2G44560 AT4G26260 AT5G43300 AT5G56640	GO:0044262	Proceso metabólico de carbohidratos celulares
	GO:0006066	Proceso metabólico del alcohol
AT4G26260 AT5G43300 AT5G56640	GO:0019751	Proceso metabólico de polioles
AT2G44560 AT4G26260 AT5G56640	GO:0044275	Proceso catabólico de carbohidratos celulares
	GO:0048235	Diferenciación de la célula espermática del polen
	GO:0055046	Micro gametogénesis
AT1G68610 AT4G35700	GO:0048232	Generación del gameto masculino
	GO:0022412	Proceso celular implicado en la reproducción en organismos pluricelulares
	GO:0007276	Generación del gameto
AT4G26260 AT5G56640	GO:1901334	Proceso metabólico de la lactona
	GO:1901336	Proceso de biosíntesis de la lactona
	GO:0009860	Crecimiento del tubo polínico
	GO:0009932	Crecimiento distal de la célula
AT1G50610 AT2G33460 AT5G19360	GO:0048588	Crecimiento de células en desarrollo
	GO:0048868	Desarrollo de tubo polínico
	GO:0000904	Morfogénesis celular involucrada en diferenciación
AT1G50610 AT5G19360	GO:0080092	Regulación del crecimiento del tubo polínico
	GO:0010769	Regulación de la morfogénesis celular involucrada en diferenciación
	GO:0051510	Regulación del crecimiento celular unidimensional
	GO:0051704	Proceso multi-organismo
AT1G50610 AT1G68610 AT2G33460 AT4G35700 AT5G19360	GO:0030154	Diferenciación celular
	GO:0048869	Proceso de desarrollo
AT1G01460 AT3G56600	GO:0046854	Proceso de biosíntesis del fosfatidilinositol fosfato
	GO:1901616	Proceso catabólico de compuesto orgánico hidroxilado
AT4G26260 AT5G56640	GO:0046364	Proceso de biosíntesis de monosacáridos
	GO:0042364	Proceso biosintético de vitaminas solubles en agua
AT1G01460 AT2G19050 AT2G40116 AT3G19310 AT3G56600 AT5G43300	GO:0006629	Proceso metabólico de lípidos
	GO:0006650	Proceso metabólico de glicerofosfolípidos
AT1G01460 AT3G56600 AT5G43300	GO:0046486	Proceso metabólico de glicolípidos

	GO:0006644	Proceso metabólico de fosfolípidos
AT1G01460 AT3G56600	GO:0006661	Proceso biosintético de fosfatidilinositol
AT5G43300	GO:0046475	Proceso catabólico de glicerofosfolípidos

ANEXO VII. Proteínas diferencialmente expresadas en el décuple mutante *dv13 dv15 dv16 dv17 dv18 dv19* con respecto al silvestre Col-0.

Se indica el ID de la proteína con su correspondiente ID del gen y nombre. Si no existe una equivalencia entre los ID de proteína obtenidos en la base de datos Uniprot_Swissprot y los ID de genes de la base de datos del TAIR, no aparece ID del gen. También se indica los valores de *p-value* y *Log. Fold Change*.

ID Proteína	ID Gen	Nombre	<i>p-value</i>	<i>Log. Fold Change</i>
Q9CAC1	AT1G70710	CEL1	0,01879	∞
B9DFS6	AT5G07120	SNX2B	0,01569	0,80591
A0A8T1ZRC2			0,01684	0,79284
Q9SUD4	AT4G28050	TET7	0,04272	0,68269
P55231	AT4G39210	APL3	0,02246	0,58898
Q93Z00	AT3G47620	TCP14	0,02925	0,53329
Q9SNY3	AT5G66280	GMD1	0,0473	0,49123
Q84LG4	AT3G09800		0,03197	0,36995
O65220	AT5G35100		0,04744	0,34476
Q8LG89	AT2G02850	ARNP	0,02969	0,25166
Q9FGF0	AT5G64460		0,02394	0,23244
Q9FJX2	AT5G67510	RPL26B	0,02082	0,22240
Q8LGC6	AT1G33040	NACA5	0,04817	0,19784
Q8RXP6	AT5G20520	WAV2	0,04948	0,17086
Q9LXC0	AT5G09550		0,03887	0,16611
Q56Z19	AT3G52930	FBA8	0,04351	0,16376
Q9LK36	AT3G23810	SAHH2	0,04636	0,15763
Q9SV73	AT4G12960	GILT	0,02295	0,12789
Q9SF85	AT3G09820	ADK1	0,03068	0,12498
Q9C648	AT1G58430	RXF26	0,0425	0,12069
Q38871	AT4G35310	CPK5	0,01922	0,11701
Q0WQ75	AT4G02030		0,04402	0,10896
P57750	AT5G18070	DRT101	0,04324	0,10715
Q9SJF3	AT1G08370	DCP1	0,03551	0,10303
Q9FFC7	AT5G22800	EMB86	0,02298	0,08548
Q9FIX1	AT5G39730	AIG2LB	0,02745	0,08058
O23247	AT4G26300	emb1027	0,03686	0,07369
Q43316	AT5G08280	HEMC	0,02599	0,07235
O23523	AT4G16830	RGGA	0,04845	0,06681
P49063	AT3G07850		0,03473	0,05887
Q9FVE6	AT3G44750	HDT1	0,0324	0,05876
P24100	AT3G48750	CDKA-1	0,04544	0,05102
Q9SA73	AT1G30580	YchF1	0,02352	0,04872
Q56WK6	AT1G72150	PATL1	0,02035	0,03991
P16181	AT3G48930	RPS11A	0,04073	0,02273
Q9CAX6	AT3G11510	RPS14B	0,04877	0,01618
Q940M2	AT4G39660	AGT2	0,03425	-0,01820
P50318	AT1G56190		0,01907	-0,03415
Q94BT9	AT1G66240	ATX1	0,02092	-0,05760
Q9FF55	AT5G60640	PDIL1-4	0,02943	-0,06268
P38418	AT3G45140	LOX2	0,03452	-0,06364
F4I9J7	AT1G51510	Y14	0,02659	-0,07181
Q8LA13	AT3G58510	RH11	0,03677	-0,07797
F4ICX9	AT1G52410	TSA1	0,02312	-0,08115

O80480	AT1G09270	IMPA4	0,05036	-0,08254
Q9C658	AT1G26110	DCP5	0,04619	-0,08493
O23647	AT2G36390	SBE2.1	0,0344	-0,09474
Q8RXD9	AT2G40840	DPE2	0,02622	-0,09670
Q9LJX0	AT3G28860	ABCB19	0,03337	-0,11328
Q9ZUX4	AT2G27730		0,02673	-0,11334
Q949Q5	AT1G08380	PSAO	0,01798	-0,11841
Q9FZ27	AT1G02335	GL22	0,04706	-0,12422
Q9CA28	AT1G68540	TKPR2	0,04613	-0,12543
Q9ZQX4	AT4G02620	VHA-F	0,02758	-0,12970
Q9LZR5	AT5G03740	HDT3	0,03789	-0,13401
Q9XEC4	AT4G04460	APA3	0,04875	-0,14512
O23138	AT1G22840	CYTC-1	0,04475	-0,14573
Q0WPT7	AT2G41040		0,03931	-0,15428
O22315	AT1G02840	SR34	0,046	-0,15526
Q8H1S4	AT1G06650		0,04738	-0,17614
P31169	AT5G15970	KIN2	0,03989	-0,17818
O23674	AT1G02050	PKSA	0,02084	-0,18031
AOA8T2A6J5			0,04008	-0,18458
Q9FMF7	AT5G64290	DIT2-1	0,04205	-0,19531
Q949Q7	AT4G30810	SCPL29	0,04925	-0,20067
Q9ZU32	AT2G01350	QPT	0,01965	-0,21602
P46312	AT4G30950	FAD6	0,02431	-0,22207
Q6NKS4	AT5G47110	LIL3.2	0,02293	-0,23009
AOA8T1ZQL2			0,02929	-0,24032
O64470	AT2G19070	SHT	0,01553	-0,24509
Q84WV2	AT1G75940	BGLU20	0,04182	-0,24663
O82251	AT2G47840	TIC20-II	0,02861	-0,29583
Q9FM19	AT5G62740	HIR1	0,03495	-0,35204
Q9SH59	AT1G64090	RTNLB3	0,03393	-0,50743
AOA8T1YZ98			0,02222	-0,59595
Q9M076	AT4G32840	PFK6	0,04782	-0,66304
Q9LY09	AT5G07530	GRP17	0,04583	-0,67584
Q9SR33	AT3G09300	ORP3B	0,04905	-0,72289
Q9LHE5	AT3G20000	TOM40-1	0,02604	-0,74708
Q8GWR1	AT3G56900	AAAS	0,02853	-0,7747
AOA8T2C5L4			0,0153	-0,87337
Q2HIM5	AT5G03345		0,03054	-1,06381
Q6NKW9	AT1G64760		0,04703	-1,17753

ANEXO VIII. Términos GO representativos de las proteínas diferencialmente expresadas en el décuple mutante *dvl3 dvl5 dvl6 dvl1 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf19 rtf11* con respecto al silvestre.

ID	DESCRIPCIÓN GO	PROTEÍNAS
GO:0044281	Procesos metabólicos de pequeñas moléculas	BGLU20 QPT ADK1 SAHH2 LOX2 FBA8 emb1027 FAD6 PFK6 DRT101 EMB86 LIL3.2 DIT2-1 GMD1
GO:1901566	Procesos de biosíntesis de compuestos organonitrogenados	DCP1 DCP5 Y14 QPT SHT ADK1 RPS14B RPS11A emb1027 HEMC EMB86 LIL3.2 RPL26B
GO:0033036	Localización de macromoléculas	IMPA4 NACA5 Y14 TIC20-II ORP3B TOM40-1 AAAS SNX2B GRP17
GO:0071702	Transporte de sustancias orgánicas	IMPA4 NACA5 Y14 TIC20-II TOM40-1 AAAS SNX2B DIT2-1
GO:0071705	Transporte de compuestos nitrogenados	IMPA4 NACA5 Y14 TIC20-II TOM40-1 AAAS SNX2B DIT2-1
GO:0005975	Procesos metabólicos de carbohidratos.	CEL1 BGLU20 SBE2.1 DPE2 FBA8 PFK6 APL3 DRT101
GO:0006091	Generación de metabolitos precursores y energía	PSAO CYTC-1 ARPN SBE2.1 DPE2 FBA8 FAD6 PFK6 APL3
GO:0015031	Transporte de proteínas	IMPA4 NACA5 TIC20-II TOM40-1 AAAS SNX2B
GO:0045184	Establecimiento de localización de proteínas	IMPA4 NACA5 TIC20-II TOM40-1 AAAS SNX2B
GO:0043604	Proceso de biosíntesis de amidas	DCP1 DCP5 Y14 SHT RPS14B RPS11A emb1027 EMB86 RPL26B
GO:0055086	Procesos metabólicos de pequeñas moléculas que contienen nucleobases	QPT ADK1 FBA8 PFK6 DRT101 GMD1
GO:0046686	Respuesta al ion cadmio	YchF1 ADK1 FBA8 APA3 AGT2
GO:0015980	Derivación de energía por oxidación de compuestos orgánicos	CYTC-1 SBE2.1 DPE2 APL3
GO:0016052	Procesos catabólicos de carbohidratos.	CEL1 DPE2 FBA8 PFK6
GO:0046034	Procesos metabólicos de ATP	CYTC-1 FBA8 PFK6
GO:0005977	Procesos metabólicos de glicógeno	
GO:0006112	Procesos metabólicos de reserva de energía.	SBE2.1 DPE2 APL3
GO:0010584	Formación de la exina del polen	
GO:0010208	Ensamblaje de la pared del polen	
GO:0010927	Ensamblaje de componentes celulares involucrados en morfogénesis	PKSA TKPR2 SHT
GO:0032989	Morfogénesis de componentes celulares	
GO:0080110	Proceso biosintético de esporopolenina	PKSA TKPR2
GO:0006096	Procesos glicolíticos	
GO:0046031	Proceso metabólico del ADP.	
GO:0006757	Generación de ATP a partir de ADP	
GO:0009135	Procesos metabólicos de purina nucleósido difosfato	FBA8 PFK6
GO:0009185	Procesos metabólicos de ribonucleosido difosfato	
GO:0006165	Fosforilación de ribonucleosido difosfato	
GO:0006779	Procesos de biosíntesis de compuestos que contienen porfirina	HEMC LIL3.2
GO:0033014	Proceso de biosíntesis de tetrapirrol	

GO:0046501	Proceso metabólico de la protoporphinogeno IX.	HEMC
GO:0005982	Proceso metabólico del almidón	SBE2.1 DPE2 APL3
GO:0005978	Proceso biosintético de glucógeno	SBE2.1 APL3
GO:0031086	Proceso catabólico de mRNA de transcripción nuclear, descomposición independiente de la deadenilación	
GO:0031087	Decapado independiente de la deadenilación del mRNA transcrito nuclearmente	DCP1 DCP5
GO:0110156	Descapsulación de la tapa de metilguanosina	
GO:0110154	Decapado de RNA	

ANEXO IX. Proteínas diferencialmente expresadas en la línea sobreexpresora *dv1-1D* con respecto al silvestre Col-0.

Se indica el ID de la proteína con su correspondiente ID del gen y nombre. Si no existe una equivalencia entre los ID de proteína obtenidos en la base de datos Uniprot_Swissprot y los ID de genes de la base de datos del TAIR, no aparece ID del gen. También se indica los valores de *p-value* y *Log. Fold Change*. Resultado en amarillo aparecen los términos comunes en el RNA-seq y el análisis proteómico.

ID Proteína	ID Gen	Nombre	<i>p-value</i>	<i>Log. Fold Change</i>
Q9C6Z0	AT1G30090		0,00026	∞
Q9FZ87	AT1G28130	GH3.17	0,0013	∞
F4IS91	AT2G03150	emb1579	0,00581	∞
Q8VYM6	AT4G26600		0,00789	∞
Q9CAC1	AT1G70710	CEL1	0,01397	∞
A0A8T2AN66			0,01728	∞
F4KHG6	AT5G46390	CTPA1	0,03007	∞
Q9LPC7	AT1G01940	CYP18-1	0,03683	∞
Q9ZVH4	AT1G26830	CUL3A	0,04569	∞
P33157	AT3G57260	BGL2	0,02561	1,364729
Q9MA41	AT1G05850	CTL1	0,00112	1,154711
Q9LZM1	AT5G02100	ORP3A	0,04095	1,132541
Q42396	AT5G23580	CPK12	0,02979	1,073207
Q9LFP1	AT5G11150	ATVAMP713	0,01023	0,977673
Q8LAJ9	AT1G22520		0,00715	0,930282
Q9C857	AT1G31550		0,00733	0,915647
F4JZY1	AT5G41790	CIP1	0,03521	0,883383
Q38879	AT5G39950	TRX2	0,03273	0,850825
Q9SUR3	AT4G23630	RTNLB1	0,03777	0,842488
Q9LV48	AT3G24550	PERK1	0,01855	0,822299
Q9FKU8	AT5G44400		0,04447	0,787753
Q9SY60	AT1G10180	EXO84C	0,03106	0,774235
Q9SVE5	AT4G38400	EXLA2	0,03056	0,757049
P92533	ATMG00990	NAD3	0,02393	0,756850
F4I718	AT1G77460	CSI3	0,02341	0,751129
Q8LB02	AT5G40650	SDH2-2	0,02634	0,736872
Q8LLD0	AT1G80680	NUP96	0,04473	0,722434
Q9LFH5	AT3G53430	RPL12B	0,03567	0,72040
P56754	ATCG00420	NDHJ	0,03367	0,70946
Q94B52	AT4G30690	IF3-4	0,02165	0,585613
Q84M24	AT2G41700	GRF9	0,02997	0,579622
Q8GWB7	AT5G18480	IPUT1	0,03671	0,52279
A0A8T1YB76			0,0266	0,514278
Q9FKS5	AT5G40810	CYC12	0,04516	0,51374
P52839	AT2G03760	SOT12	0,0358	0,510983
Q9C723	AT1G55090		0,03279	0,494249
A0A8T1ZQD3			0,04629	0,464077
Q9ZW34	AT2G29560	ENO3	0,04635	0,450387
Q9C6Z3	AT1G30120	PDH-E1 BETA	0,01492	0,44135
O23406	AT4G15550	UGT75D1	0,02115	0,427969
Q9SIL6	AT2G20530	PHB6	0,02536	0,425119
P68209	AT5G08300		0,01682	0,354956
O65220	AT5G35100		0,04732	0,350197

Q9SK22	AT2G09990	RPS16A	0,01412	0,349140
Q9FFN4	AT5G63800	BGAL6	0,02714	0,348190
P46422	AT4G02520	GSTF2	1,51E-05	0,341553
P25855	AT2G35370	RS2Z33	0,01783	0,335855
Q9SR73	AT3G10090;A T5G03850	RPS28A	0,04987	0,333071
Q8H1Z0	AT5G57800	CER3	0,04039	0,32700
Q9LQL0	AT1G32470	GDH3	0,02194	0,325923
Q9FKB0	AT5G48870	LSM5	0,01505	0,320024
Q41963	AT3G26520	TIP1-2	0,04258	0,317164
Q8W0Z6	AT2G20790	AP5M	0,00803	0,316633
Q9LPV8	AT1G12920	ERF1-2	0,01143	0,310375
Q84J75	AT5G12210	RGTB1	0,00441	0,306566
Q02166	AT5G17990	PAT1	0,01039	0,297656
O23193	AT4G36910	CBSX1	0,04638	0,29165
Q8RXX5	AT5G47190		0,00077	0,288383
Q8VZP1	AT5G57440	GPP2	0,04599	0,287541
Q8LFJ5	AT1G22270	TRM112A	0,03394	0,286399
P92994	AT2G30490	CYP73A5	0,03504	0,27300
A0A1P8B0B7	AT2G02790	IQD29	0,01051	0,271584
Q9SUR6	AT4G23600	CORI3	0,0006	0,266873
Q9SCS3	AT3G50520		0,01798	0,266585
P34789	AT5G64140	RPS28C	0,02995	0,263651
Q8LG58	AT3G23730	XTH16	0,04193	0,258727
Q8LGC6	AT1G33040	NACA5	0,02594	0,254015
Q9FR44	AT3G18000	NMT1	0,02298	0,249757
A0A8T1ZJM7			0,04324	0,249162
Q9FPJ4	AT5G47200	RABD2B	0,01292	0,249030
Q9SR70	AT3G10060	FKBP16-4	0,0024	0,233903
Q9FE65	AT1G69620	RPL34B	0,01435	0,229424
Q06327	AT1G55020	LOX1	0,00144	0,224977
Q9FVR6	AT1G32220		0,03785	0,213629
O48726	AT2G26590	RPN13	0,04713	0,213491
Q9SLK0	AT1G54340	ICDH	0,04874	0,207644
Q9LZF5	AT5G03350	LLP	0,0095	0,206399
P93655	AT5G26860	LON_ARA_ARA	0,02547	0,194314
Q9M2V9	AT3G55070	MAEA	0,04405	0,187314
P25853	AT4G15210	BAM5	0,00917	0,186195
O80852	AT2G30860	GSTF9	0,03003	0,182416
B5X574	AT5G65690	PCK2	0,04224	0,181183
Q8RWH9	AT4G37130	NUP58	0,02212	0,177627
Q9LU39	AT3G21200	GLUTRBP	0,03348	0,17686
Q9SJI7	AT2G42690	ATHOL1	0,0441	0,172372
Q6NLQ7	AT2G22450	RIBA2	0,03869	0,17143
O49203	AT4G11010	NDPK3	0,00974	0,170744
Q8L770	AT1G09130		0,04727	0,16945
Q94AR8	AT4G13430	IIL1	0,03168	0,168602
F4I3M3	AT1G63500	BSK7	0,04551	0,162876
Q84K25	AT5G11980		0,0101	0,16248
A0A7G2F762			0,04832	0,162248
Q9XJ36	AT1G12410	CLPR2	0,02881	0,160937
Q8RV79	AT2G03750	SOT11	0,02619	0,160833
Q9LYR5	AT5G13410	FKBP19	0,02366	0,154503
O65686	AT4G34620	RPS16-1	0,00885	0,153509

ANEXOS

Q9SV73	AT4G12960	GILT	0,01092	0,153013
P93017	AT2G33830	GDH2	0,03504	0,150114
Q9M2E2	AT3G61220		0,04579	0,149788
Q1JPL7	AT1G11580	ATPMEPCRA	0,0317	0,149424
Q9LRZ6	AT3G25810	TPS24	0,0447	0,148298
Q8L4Y5	AT3G60830	ARP7	0,00846	0,147915
Q9FMN0	AT5G42890	ATSCP2	0,02188	0,14731
Q9LZH9	AT3G62870	RPL7AB	0,02386	0,145719
P38418	AT3G45140	LOX2	0,00367	0,138754
Q9FLW9	AT5G52920	PKP2	0,02445	0,137216
F4J6T7	AT3G45940	XYL2	0,01333	0,135649
F4K410	AT5G13650		0,02608	0,135496
P28185	AT1G06400	RABA1A	0,03853	0,132082
P29514	AT5G12250	TUBB6	0,04277	0,131585
Q9SYT0	AT1G35720	ANN1	0,00882	0,122480
Q9XFT3	AT4G21280	PSBQ1	0,03586	0,120825
Q9FFF4	AT5G16290	VAT1	0,00114	0,120822
Q9SXJ6	AT1G66670	CLPP3	0,01279	0,12050
Q94JT5	AT4G35220	CYCLASE2	0,02403	0,120292
O50039	AT1G75330	OTC	0,01926	0,120052
Q9STF2	AT3G46780	PTAC16	0,01173	0,119139
P25697	AT1G32060	PRK	0,03368	0,118437
O80476	AT2G23600	ACL	0,0227	0,118400
P93042	AT3G13870	RHD3	0,03302	0,118044
Q9M5J8	AT5G06870	PGIP2	0,03119	0,117348
Q9SYB5	AT1G61790	OST3B	0,03201	0,114529
Q9SAB1	AT1G11660	HSP70-16	0,02267	0,113466
Q94BN2	AT5G53120	SPDS3	0,01591	0,112047
P19366	ATCG00480	ATPB	0,01925	0,111969
Q9SYL9	AT1G78630	RPL13	0,0305	0,11104
P32961	AT3G44310	NIT1	0,02999	0,110237
Q9SLJ2	AT1G54410	HIRD11	0,04707	0,109565
O23553	AT4G17090	BAM3	0,02386	0,108977
Q8LB10	AT4G17040	CLPR4	0,00468	0,108413
Q9LYW9	AT5G03160	P58IPK	0,04403	0,107897
P42793	ATMG00210	RPS8	0,03735	0,106139
Q8GUM2	AT4G37910	HSP70-9	0,04547	0,106010
Q9SID0	AT2G31390	RH21	0,03997	0,10445
O23523	AT4G16830	RGGA	0,01172	0,103782
P93008	AT2G33730	DRMH1	0,00516	0,103251
P34791	AT3G62030	ROC4	0,0016	0,099934
P37107	AT5G03940	FFC	0,01878	0,098479
Q9LY66	AT3G63490	RPL1	0,03401	0,096704
Q8L7N0	AT5G16070	CCT6B	0,01928	0,096579
O22886	AT2G40490	SFGH	0,02337	0,09573
Q9LVT8	AT5G47210	RGGC	0,03063	0,094082
Q43291	AT1G09590;A T1G09690	RPL21A	0,04797	0,093038
Q9M084	AT4G31180	IBI1	0,04995	0,090784
P56801	ATCG00770	RPS8	0,03862	0,090331
P17597	AT3G48560	ALS	0,04683	0,089283
Q8LAS8	AT2G41530	ABCA1	0,01975	0,088227
O81147	AT2G05840	PAA2	0,04328	0,088182
Q93WL3	AT4G25370	CLPT1	0,03815	0,088142

Q9SIZ2	AT2G40290	HEME2	0,03309	0,088120
Q9SJF3	AT1G08370	DCP1	0,04555	0,087947
Q8H7F6	AT2G38270		0,04652	0,086388
Q949Y0	AT1G51710	UBP6	0,03999	0,083396
Q8GXR9	AT5G08740	NDC1	0,04823	0,083357
Q9FWR4	AT1G19570	DHAR1	0,02776	0,083106
Q8VZM1	AT1G80410	EMB2753	0,02716	0,080660
P55228	AT5G48300	APS1	0,0485	0,07640
Q9FNF2	AT5G24300	SS1	0,03777	0,076139
Q9M1X0	AT3G63190	RRF	0,01076	0,075036
Q9SIB9	AT2G05710	ACO3	0,02687	0,074935
Q43316	AT5G08280	HEMC	0,03598	0,073666
P56799	ATCG00380	RPS4	0,01128	0,071019
Q9FIU6	AT5G54580	ORRM2	0,02136	0,069936
F4JMJ1	AT4G16660		0,00643	0,06920
O23715	AT2G27020	PAG1	0,0182	0,068421
P55230	AT1G27680	APL2	0,01668	0,062103
Q38799	AT5G50850	PDH2	0,01076	0,061054
Q9LV33	AT3G18080	BGLU44	0,00553	0,055734
Q0WP12	AT2G43910	ATHOL1	0,03192	0,055579
Q42601	AT1G29900	CARB	0,04258	0,047733
Q9LT75	AT3G19420	PTEN2A	0,01623	0,046511
P39207	AT4G09320	NDK1	0,00724	0,045788
Q9SZJ5	AT4G37930	SHM1	0,03849	0,04415
Q9FH05	AT5G42240	SCPL42	0,00302	0,043328
Q9SSD2	AT1G80070	PRP8A	0,04812	0,038284
Q940P8	AT5G20890	CCT2	0,03683	0,033593
O04130	AT1G17745	PGDH	0,03754	0,032404
P94078	AT3G26720		0,02226	0,027680
Q9FF86	AT5G23940	DCR	0,00566	-0,03085
Q940M2	AT4G39660	AGT2	0,02241	-0,04021
Q0WQF7	AT3G52200	LTA3	0,00845	-0,04128
Q38931	AT3G25230	ROF1	0,02582	-0,04318
Q9FY49	AT5G13520	LKHA4	0,04968	-0,05285
Q9XIB5	AT1G49480	REM19	0,04292	-0,06020
Q9FUP0	AT2G06050	OPR3	0,02143	-0,06048
Q42384	AT4G15900	PRL1	0,03526	-0,06249
Q9FF55	AT5G60640	PDIL1-4	0,02623	-0,06590
Q9FKK7	AT5G57655	XYLA	0,04941	-0,06776
Q9ZR12	AT4G03190	GRH1	0,04619	-0,07984
Q9LEY9	AT5G08180		0,04603	-0,08456
Q9ZSK1	AT1G64970	VTE4	0,04977	-0,09225
P53780	AT3G57050	CBL	0,01782	-0,09237
Q9LFS8	AT5G15920	SMC5	0,01912	-0,09364
Q940X9	AT5G21160		0,01669	-0,09374
Q9CA28	AT1G68540	TKPR2	0,0091	-0,09870
Q9XEC4	AT4G04460	APA3	0,02345	-0,10062
Q9LXV0	AT5G12890	UGT92A1	0,02608	-0,10460
Q8VYA5	AT2G37340	GRXS16	0,02587	-0,10547
Q8L716	AT1G60900	U2AF65B	0,0309	-0,10748
Q9LH85	AT3G28500	RPP2C	0,03702	-0,10764
Q9LRZ0	AT3G16830	TPR2	0,02568	-0,10851
F4J8K6	AT3G11964	RRP5	0,02656	-0,10878
Q9FIJ4	AT5G47870	RAD52-2	0,02606	-0,11049

ANEXOS

Q9SXZ2	AT1G65480	FT	0,00963	-0,11599
Q9STX2	AT4G24220	VEP1	0,00116	-0,11732
Q9SCV5	AT5G20710	BGAL7	0,00702	-0,11804
Q9SMQ6	AT4G39990	RABA4B	0,01785	-0,12445
Q9LLR6	AT5G59310	LTP4	0,00521	-0,12814
Q9SYM4	AT1G78580	TPS1	0,00358	-0,13385
O64481	AT2G19170	SBT2.5	0,03986	-0,13659
O80786	AT2G07690	MCM5	0,03493	-0,13889
Q949P3	AT2G17340		0,00175	-0,14550
Q9C5C2	AT5G25980	TGG2	0,00096	-0,14833
Q9FK35	AT5G50370	ADK2	0,0446	-0,15508
Q9M0I2	AT4G28250	EXPB3	0,00083	-0,15965
Q9CAI3	AT1G72680	CAD1	0,04632	-0,16455
Q3E8E5	AT5G48375	TGG3	0,00358	-0,16471
Q1H583	AT1G54000	GLL22	0,01316	-0,16844
Q9SH76	AT2G07560	AHA6	0,02409	-0,16867
O64470	AT2G19070	SHT	0,01206	-0,17478
Q9ZU32	AT2G01350	QPT	0,01812	-0,18358
Q9C9W4	AT1G67990	TSM1	6,74E-05	-0,18686
Q9LQ12	AT1G62940	4CLL1	0,01811	-0,20108
Q9ZPY1	AT2G46580	PPOX2	0,04165	-0,20910
Q9STT2	AT3G47810	VPS29	0,04416	-0,21552
O82179	AT2G35120	GDH1	0,02	-0,21787
Q9C9C4	AT1G74030	ENO1	0,00517	-0,21858
AOA8T2A6J5			0,02039	-0,22463
Q9ZUM0	AT2G02160		0,00215	-0,23676
AOA8T2B0I0			0,01546	-0,23901
Q1PF50	AT2G18080	EDA2	0,03797	-0,25240
Q9SK74	AT2G20280		0,02994	-0,25346
P21276	AT4G25100	FSD1	0,02115	-0,25506
O23674	AT1G02050	PKSA	0,00723	-0,26738
Q9LD90	AT3G57150	CBF5	0,024	-0,26951
P0DKJ6	AT1G20120		0,02864	-0,28427
Q96299	AT2G42590		0,01115	-0,49433
F4K5J1	AT5G20490	XI-K	0,03289	-0,52432
Q9FX93	AT1G49650	CXE4	0,01609	-0,56863
Q8RWV3	AT2G26430	CYCL1-1	0,03836	-0,7005
Q9M076	AT4G32840	PFK6	0,01113	-1,34279
Q9FKP8	AT5G65410	ZHD1	0,00259	-∞

ANEXO X. Términos GO representativos de las proteínas diferencialmente expresadas el sobreexpresor *dv1-1D* con respecto al silvestre Col-0.

ID	DESCRIPCIÓN GO	PROTEÍNAS
GO:0044281	Proceso metabólico de pequeñas moléculas	CTL1 PGDH CARB PDH-E1 BETA GDH3 ICDH LOX1 4CLL1 VTE4 ENO1 OTC QPT ACO3 OPR3 RIBA2 ACL ENO3 CYP73A5 GDH2 GDH1 SFGH ATHOL1 PPOX2 NIT1 LOX2 ALS LTA3 MAEA
GO:1901566	Proceso de biosíntesis de compuestos organonitrogenados	DCP1 RPL21A ATPMEPCRA ERF1-2 PGDH CARB PDH-E1 BETA OST3B 4CLL1 TSM1 RPL34B OTC RPL13 QPT RPS16A SHT RIBA2 HEME2 PPOX2 RPS28A NMT1 GLUTRBP RPP2C
GO:0009056	Procesos catabólicos	CTL1 DCP1 ATPMEPCRA CLPR2 CUL3A PDH-E1 BETA GDH3 UBP6 GLL22 CLPP3 CEL1 ENO1 QPT PAA2 RPN13 PAG1 ENO3 GSTF9 GDH2 GDH1 SFGH ATHOL1 XYL2 LTA3 MAEA GSTF2 GRH1 BAM5 CLPR4
GO:1901575	Procesos catabólicos de sustancias orgánicas	CTL1 DCP1 ATPMEPCRA CLPR2 CUL3A PDH-E1 BETA GDH3 UBP6 GLL22 CLPP3 CEL1 ENO1 QPT PAA2 RPN13 PAG1 ENO3 GDH2 GDH1 SFGH ATHOL1 XYL2 LTA3 MAEA GRH1 BAM5
GO:0043603	Proceso metabólico de la amida celular	DCP1 RPL21A ATPMEPCRA ERF1-2 DHAR1 PDH-E1 BETA 4CLL1 TSM1 RPL34B RPL13 RPS16A SHT GSTF9 RPS28A RPP2C LTA3 RPL12B RRF RPL1 GSTF2 IF3-4 IBI1 RPS16-1 SHM1 IP
GO:0019752	Proceso metabólico del ácido carboxílico	CTL1 PGDH CARB PDH-E1 BETA GDH3 ICDH LOX1 4CLL1 ENO1 OTC QPT ACO3 OPR3 ACL ENO3 GDH2 GDH1 NIT1 LOX2 ALS LTA3 CBL ROC4 IIL1 CORI3 IBI1 PFK6 CYCLASE2 SHM1
GO:0006082	Proceso metabólico de ácidos orgánicos	CTL1 PGDH CARB PDH-E1 BETA GDH3 ICDH LOX1 4CLL1 ENO1 OTC QPT ACO3 OPR3 ACL ENO3 GDH2 GDH1 ATHOL1 NIT1 LOX2 ALS LTA3 CBL ROC4 IIL1 CORI3 IBI1 PFK6 CYCLASE2
GO:0043436	Proceso metabólico de oxoácidos	
GO:0043604	Proceso de biosíntesis de la amida	DCP1 RPL21A ATPMEPCRA ERF1-2 PDH-E1 BETA 4CLL1 TSM1 RPL34B RPL13 RPS16A SHT RPS28A RPP2C LTA3 RPL12B RRF RPL1 IF3-4 IBI1 RPS16-1 IPUT1 PDH2 RPS28C RPS4 RPS8 RPL
GO:0044283	Proceso de biosíntesis de pequeñas moléculas	PGDH CARB PDH-E1 BETA LOX1 VTE4 OTC OPR3 RIBA2 CYP73A5 PPOX2 NIT1 LOX2 ALS MAEA CBL ROC4 IIL1 SHM1 NDC1 LKHA4 VAT1 PAT1 PKP2 GPP2 ZHD1 PCK2
GO:0006165	Fosforilación del nucleósido difosfato	PDH-E1 BETA ENO1 ENO3 LTA3 NDK1 NDPK3
GO:0046939	Fosforilación de nucleótidos	PFK6 PDH2 PKP2
GO:0009069	Proceso metabólico de aminoácidos de la familia de serina	PGDH GDH3 GDH2 GDH1 CBL ROC4 SHM1
GO:0009132	Proceso metabólico de nucleósido difosfato	PDH-E1 BETA ENO1 ENO3 LTA3 NDK1 NDPK3 PFK6 ADK2 PDH2 PKP2
GO:0009152	Proceso biosintético de ribonucleótido de purina	PDH-E1 BETA 4CLL1 LTA3 NDK1 NDPK3 CYC12 PDH2 ATPB
GO:0046390	Proceso biosintético de la ribosa fosfato	CARB PDH-E1 BETA 4CLL1 LTA3 NDK1 NDPK3
GO:0009260	Proceso biosintético de ribonucleótidos	CYC12 PDH2 ATPB
GO:0009165	Proceso biosintético de nucleótidos	

ANEXOS

GO:1901293	Proceso biosintético de ribonucleósidos fosfato	CARB PDH-E1 BETA 4CLL1 QPT LTA3 NDK1 NDPK3 CYC12 ADK2 PDH2 ATPB
GO:0046034	Proceso metabólico del ATP	PDH-E1 BETA ENO1 ENO3 LTA3 PFK6 NDC1 SDH2-2 CYC12 PDH2 PKP2 ATPB
GO:0009150	Proceso metabólico del ribonucleótido purina	PDH-E1 BETA 4CLL1 ENO1 ENO3 LTA3 NDK1 NDPK3 PFK6 CYC12 PDH2 PKP2 ATPB
GO:0009259	Proceso metabólico del ribonucleótido	CARB PDH-E1 BETA 4CLL1 ENO1 ENO3 LTA3
GO:0019693	Proceso metabólico de la ribosa fosfato	NDK1 NDPK3 PFK6 CYC12 PDH2 PKP2 ATPB
GO:0009117	Proceso metabólico del nucleótido	
GO:0006753	Proceso metabólico de nucleósido fosfato	CARB PDH-E1 BETA 4CLL1 ENO1 QPT ENO3 LTA3 NDK1 NDPK3 PFK6 CYC12 ADK2 PDH2 PKP2 ATPB
GO:0055086	Proceso metabólico de pequeñas moléculas con nucleobases	
GO:0006163	Proceso metabólico del nucleótido purina	PDH-E1 BETA 4CLL1 ENO1 ENO3 LTA3 NDK1 NDPK3 PFK6 CYC12 ADK2 PDH2 PKP2 ATPB
GO:0072521	Proceso metabólico de compuestos que contienen purina	
GO:0046686	Respuesta al ion cadmio	ANN1 ACO3 PAG1 GSTF9 SFGH ROF1 GSTF2 APA3 IIL1 FSD1 IBI1 HSP70-9 SHM1 AGT2 PKP2
GO:0016052	Proceso catabólico de carbohidratos	ATPMEPCRA PDH-E1 BETA CEL1 ENO1 ENO3 XYL2 LTA3 BAM5 BAM3 PFK6 PDH2 PKP2 XYLA
GO:1901605	Proceso metabólico de alfa aminoácidos	PGDH CARB GDH3 OTC GDH2 GDH1 ALS CBL ROC4 CYCLASE2 SHM1 VAT1 PAT1
GO:0010038	Respuesta a iones metales	DHAR1 ANN1 ACO3 PAG1 GSTF9 SFGH ROF1 GSTF2 APA3 IIL1 FSD1 IBI1 HSP70-9 SHM1 AGT2 PKP2
GO:0006091	Generación de metabolitos precursores y energía	APL2 PDH-E1 BETA ICDH ENO1 ACO3 ENO3 GLUTRBP LTA3 PSBQ1 PFK6 NDC1 SDH2-2 CYC12 APS1 PDH2 PKP2 NDHJ ATPB NAD3
GO:0019637	Proceso metabólico de organofosfatos	CARB PDH-E1 BETA 4CLL1 ENO1 QPT ENO3 PPOX2 NMT1 PTEN2A LTA3 NDK1 NDPK3 PFK6 IPUT1 CYC12 ADK2 PDH2 PKP2 ATPB
GO:0016053	Proceso de biosíntesis de ácidos orgánicos	PGDH CARB PDH-E1 BETA LOX1 OTC OPR3 NIT1 LOX2 ALS CBL ROC4 IIL1 SHM1 LKHA4 VAT1 PAT1 PKP2 ZHD1
GO:0006412	Traducción	DCP1 RPL21A ATPMEPCRA ERF1-2 RPL34B RPL13 RPS16A RPS28A RPP2C RPL12B RRF RPL1 IF3-4 IBI1 RPS16-1 RPS28C RPS4 RPS8 RPL5
GO:0043043	Proceso de biosíntesis de péptidos	
GO:0006518	Procesos metabólicos de péptidos	DCP1 RPL21A ATPMEPCRA ERF1-2 DHAR1 RPL34B RPL13 RPS16A GSTF9 RPS28A RPP2C RPL12B RRF RPL1 GSTF2 IF3-4 IBI1 RPS16-1 RPS28C RPS4 RPS8 RPL5
GO:0005975	Procesos metabólicos de carbohidratos	CTL1 ATPMEPCRA APL2 PDH-E1 BETA PRK CEL1 ENO1 CSI3 TPS1 ACO3 ENO3 BGLU44 XTH16 XYL2 LTA3 MAEA BGL2 BAM5 BAM3 PFK6 BGAL7 SS1 TGG2 APS1 TGG3 PDH2 PKP2 GPP2

ANEXO XI. Proteínas diferencialmente expresadas en la línea sobreexpresora 35S:DVL8 con respecto al silvestre Col-0.

Se indica el ID de la proteína con su correspondiente ID del gen y nombre. Si no existe una equivalencia entre los ID de proteína obtenidos en la base de datos Uniprot_Swissprot y los ID de genes de la base de datos del TAIR, no aparece ID del gen. También se indica los valores de *p-value* y *Log. Fold Change*. Resultado en amarillo aparecen los términos comunes en el RNA-seq y el análisis proteómico.

ID Proteína	ID Gen	Nombre	p-value	Log. Fold Change
Q9CAC1	AT1G70710	CEL1	0,00382	∞
F4IS91	AT2G03150	emb1579	0,00611	∞
Q9ZRZ8	AT4G16630	RH28	0,00674	∞
Q9FLL1	AT5G41190		0,00781	∞
Q6IMT1	AT1G58250	SAB	0,01295	∞
Q39080	AT1G32210	DAD1	0,01887	∞
Q66GP0	AT5G67385	SR1IP1	0,02027	∞
Q9LXG0	AT5G15210	ZHD8	0,0249	∞
Q9LIP2	AT3G26340	PBE2	0,02537	∞
Q8LEQ0	AT5G47700	RPP1C	0,02314	1,20550
Q9LZM1	AT5G02100	ORP3A	0,00286	1,13169
P33157	AT3G57260	BGL2	0,00581	1,12121
Q9FJU9	AT5G56590		0,00995	0,98553
Q9LRP6	AT3G15590		0,03143	0,94424
Q9SUD4	AT4G28050	TET7	0,00857	0,88535
Q9FQ09	AT1G48050	KU80	0,024	0,86802
F4I718	AT1G77460	CSI3	0,02298	0,86270
Q9LV48	AT3G24550	PERK1	0,01312	0,82285
F4JZY1	AT5G41790	CIP1	0,01949	0,8201
P38389	AT2G45070	SEC61 BETA	0,01375	0,81524
Q8L4A7	AT1G79210	PAB2	0,01498	0,80450
Q9LSX7	AT3G21865	PEX22	0,02608	0,75490
Q9LY84	AT5G14450		0,03272	0,74250
Q8GYX8	AT1G76700	ATJ10	0,03065	0,73949
Q9FI78	AT5G48930	HST	0,01826	0,70228
Q9M376	AT3G54300	VAMP727	0,04295	0,68976
Q9FV53	AT1G15390	PDF1A	0,00691	0,67804
P55231	AT4G39210	APL3	0,01099	0,65966
Q8GWB7	AT5G18480	IPUT1	0,03803	0,61836
Q9SHL7	AT2G17510	EMB2763	0,01098	0,60522
Q8RWS4	AT1G31660		0,02244	0,58916
Q9ZNV8	AT3G29350	AHP2	0,02078	0,57937
A0A8T1YB76			0,01992	0,55166
Q84WU9	AT5G56900		0,04219	0,54662
F4ISJ6	AT2G25510		0,0386	0,51196
Q9LR33	AT1G23290	RPL27AB	0,03474	0,50598
Q8GXX7	AT3G02830	ZFN1	0,04099	0,38272
Q9LPV8	AT1G12920	ERF1-2	0,04513	0,38246
Q9C6Z3	AT1G30120	PDH-E1 BETA	0,01379	0,3479
Q9LER7	AT3G56910	PSRP5	0,01907	0,34309
Q8W4I6	AT3G57180	BPG2	0,00405	0,33120
Q9FEE2	AT5G18580	TON2	0,01111	0,31842
P34789	AT5G64140	RPS28C	0,02359	0,31185

ANEXOS

P21276	AT4G25100	FSD1	0,00574	0,29348
Q9FGF0	AT5G64460		0,03539	0,29136
P56755	ATCG01090	NDHI	0,0368	0,29080
Q8LFJ5	AT1G22270	TRM112A	0,01282	0,27915
Q02166	AT5G17990	PAT1	0,00682	0,27883
Q8RX79	AT3G62910	APG3	0,04896	0,26738
Q9SUT2	AT4G11290	PER39	0,02614	0,25919
Q9FKB0	AT5G48870	LSM5	0,03653	0,25787
Q9S9N6	AT1G15980	PNSB1	0,04398	0,23883
Q9FY64	AT5G09510	RPS15D	0,04996	0,22980
Q84J75	AT5G12210	RGTB1	0,04055	0,22794
A0A8T2BHV4			0,03455	0,21993
Q1JPL7	AT1G11580	ATPMEPCRA	0,00743	0,21559
Q8LGC6	AT1G33040	NACA5	0,03778	0,20934
O23264	AT4G14030	SBP1	0,01627	0,20721
Q9SZI2	AT4G26110	NAP1	0,02761	0,19240
P42804	AT1G58290	HEMA1	0,02628	0,19018
O82533	AT2G36250	FTSZ2-1	0,01088	0,18977
Q96291	AT3G11630	BAS1	0,04716	0,18898
Q94B60	AT5G45390	CLPP4	0,04791	0,18762
O48529	AT2G42220	STR9	0,0208	0,18271
Q39189	AT5G62190	RH7	0,01915	0,18133
Q9SX79	AT1G47490	RBP47C	0,01262	0,18105
P40940	AT2G24765	ARF3	0,03256	0,18083
Q8L770	AT1G09130		0,01041	0,17923
A0A8T2AQU5			0,04717	0,17874
P38666	AT3G53020	RPL24B	0,04834	0,16304
Q39161	AT2G15620	NIR1	0,00201	0,16138
P29514	AT5G12250	TUBB6	0,01618	0,16093
Q9M2E2	AT3G61220		0,04672	0,16062
F4KEY9	AT5G58450	NAA25	0,01156	0,16036
Q9SR70	AT3G10060	FKBP16-4	0,01241	0,15911
Q9LRZ6	AT3G25810	TPS24	0,02499	0,15799
Q06327	AT1G55020	LOX1	0,01278	0,15770
O82514	AT5G63400	ADK1	0,04106	0,15602
Q9XJ36	AT1G12410	CLPR2	0,03144	0,15365
Q9LJE4	AT3G13470	CPN60B2	0,02784	0,15255
P42762	AT5G51070	CLPD	0,01807	0,14833
O22886	AT2G40490	HEME2	0,00571	0,13880
P51418	AT2G34480		0,0385	0,13015
Q9SMV6	AT5G17020	XPO1	0,0319	0,12869
Q9SF40	AT3G09630	RPL4A	0,02208	0,12754
Q8GXR9	AT5G08740	NDC1	0,01459	0,12448
Q9LPK6	AT1G21540	AEE9	0,04545	0,12407
Q9SF85	AT3G09820	ADK1	0,018	0,12352
P24636	AT5G44340	TUBB4	0,00246	0,12207
Q9FGT8	AT5G58070	TIL	0,03866	0,11708
P56801	ATCG00770	RPS8	0,01662	0,11654
Q84QC1	AT1G44790	GGCT2	0,00616	0,11643
Q9C865	AT1G31440	SH3P1	0,03615	0,11458
Q9LYW9	AT5G03160	P58IPK	0,03316	0,11345
O82462	AT5G26710		0,01789	0,11149
Q9LY66	AT3G63490	RPL1	0,04317	0,10876
P49691	AT5G02870	RPL4D	0,03471	0,10858

P41127	AT3G49010	RPL13B	0,0328	0,10708
P19366	ATCG00480	ATPB	0,03327	0,10580
Q9LVT8	AT5G47210	RGGC	0,01485	0,10476
Q96330	AT5G08640	FLS1	0,02258	0,10391
Q8GUM2	AT4G37910	HSP70-9	0,03939	0,10277
P56799	ATCG00380	RPS4	0,00877	0,10132
Q93ZV7	AT4G32720	LA1	0,00923	0,09902
Q9SJF3	AT1G08370	DCP1	0,0369	0,09342
O23593	AT4G17520	RGGB	0,02397	0,09332
Q9LNV5	AT1G07360		0,04336	0,08999
O65390	AT1G11910	APA1	0,0416	0,08718
Q93W34	AT4G27000	RBP45C	0,0451	0,08705
Q9SFU1	AT3G07110		0,01025	0,08512
Q9FVT2	AT1G57720		0,03894	0,08096
Q9ZT91	AT4G02930	TUFA	0,02458	0,08046
Q9LRS0	AT3G14415		0,01005	0,07801
Q93ZN9	AT4G33680	DAP	0,02876	0,07689
Q9ZUC1	AT1G23740	AOR	0,03198	0,07664
P60039	AT2G44120		0,01592	0,07565
Q9M1X0	AT3G63190	RRF	0,03675	0,07513
Q0WP12	AT2G43910	ATHOL1	0,01217	0,07502
Q9LTF2	AT5G52650	RPS10C	0,03444	0,07310
Q38893	AT3G04870	ZDS1	0,0348	0,07262
Q9C5R8	AT5G06290	2-Cys Prx B	0,01169	0,07181
Q9LD55	AT4G11420	TIF3A1	0,01214	0,06227
Q42601	AT1G29900	CARB	0,04344	0,06197
O23627	AT1G29880		0,02489	0,06036
P38418	AT3G45140	LOX2	0,02204	0,05966
Q5GM68	AT2G42600	PPC2	0,04703	0,05840
P55230	AT1G27680	APL2	0,00594	0,05809
Q8LAS8	AT2G41530	SFGH	0,01408	0,05340
P29517	AT4G20890	TUBB9	0,04301	0,05327
Q9SZX3	AT4G24830		0,02758	0,05275
O23715	AT2G27020	PAG1	0,04757	0,04919
Q8RWD5	AT3G48860	SCD2	0,00211	0,04916
Q9LR30	AT1G23310	GGAT1	0,01878	0,04758
Q9LYG3	AT5G11670	NADP-ME2	0,01549	0,04591
P28769	AT3G20050	CCT1	0,04122	0,04451
Q9LDZ0	AT5G09590	HSP70-10	0,00937	0,04313
Q9ZNZ7	AT5G04140	GLU1	0,03025	0,04012
Q9FFC0	AT5G22880	H2B	0,04004	0,03785
O49160	AT3G56150	TIF3C1	0,03391	0,03622
Q9S818	AT3G51240	F3H	0,01175	0,02780
Q9SDS7	AT1G12840	VHA-C	0,03737	-0,03161
Q9FGR0	AT5G51660	CPSF160	0,01123	-0,03699
O04905	AT5G26667	PYR6	0,04632	-0,04761
Q0WUV7	AT1G75910	EXL4	0,01449	-0,05967
Q9C713	AT1G66530		0,02361	-0,06089
Q84WV2	AT1G75940	BGLU20	0,03165	-0,06096
Q84WM7	AT1G69940	PPME1	0,00704	-0,06475
Q9FNA3	AT5G13690	NAGLU	0,02667	-0,06750
O22941	AT2G41790	PXM16	0,02283	-0,07211
P49572	AT2G04400	IGPS	0,04259	-0,07761
Q9M8S8	AT3G02870	VTC4	0,01043	-0,07905

ANEXOS

Q8L831	AT1G79690	NUDT3	0,03026	-0,07919
Q8L7C9	AT1G78370	GSTU20	0,02082	-0,08012
Q9FFD2	AT5G16510	RGP5	0,02081	-0,08063
P32826	AT3G10410	SCPL49	0,04802	-0,08533
Q9ZRW8	AT1G78380	GSTU19	0,0456	-0,08891
Q9M0I2	AT4G28250	EXPB3	0,04097	-0,09284
O81416	AT4G02290	AtGH9B13	0,03159	-0,09647
O81644	AT2G41740	VLN2	0,00584	-0,09707
Q949P3	AT2G17340		0,03308	-0,10379
O04922	AT2G31570	GPX2	0,04899	-0,10642
Q8RY11	AT3G05350	APP2	0,03978	-0,10859
Q9C5C2	AT5G25980	TGG2	0,02892	-0,11185
P48491	AT3G55440	CTIMC	0,01533	-0,11721
Q9LXK7	AT3G43270	PME32	0,00804	-0,11732
Q67XZ3	AT1G55120	CWINV3	0,01327	-0,12313
Q9FKP0	AT5G17870	PSRP6	0,03456	-0,12974
Q9C9W4	AT1G67990	TSM1	0,00832	-0,12996
Q9CA28	AT1G68540	TKPR2	0,01702	-0,13031
Q1H583	AT1G54000	GLL22	0,04908	-0,13117
Q9LLR6	AT5G59310	LTP4	0,00594	-0,13261
O65398	AT1G11840	ATGLX1	0,00775	-0,13285
Q8VYA5	AT2G37340	RS2Z33	0,03956	-0,13896
Q93YW8	AT4G18970		0,01696	-0,15324
F4JTE7	AT4G25840	GPP1	0,04645	-0,15799
Q9FX93	AT1G49650	CXE4	0,03687	-0,16675
Q9SB42	AT4G25210	GEBPL	0,03931	-0,16729
Q9FYG4	AT1G67290	GLOX1	0,00602	-0,16770
Q9FUS6	AT1G27130	GSTU13	0,00133	-0,17567
O49432	AT4G20050	QRT3	0,03607	-0,17577
Q9FX94	AT1G49660	CXE5	0,0234	-0,17661
O82122	AT5G24770	VSP2	0,04852	-0,18474
Q9SGZ8	AT1G78020	FLZ6	0,00972	-0,19020
Q9LQ12	AT1G62940	4CLL1	0,00055	-0,19690
Q94K01	AT4G31770	DBR1	0,04574	-0,20434
P0DKJ6	AT1G20120		0,04795	-0,21816
Q9ZVJ5	AT2G38740	SGPP	0,04651	-0,22063
O23674	AT1G02050	PKSA	0,01137	-0,22391
P18612	AT5G15960	KIN1	0,0008	-0,23139
Q1PF50	AT2G18080	EDA2	0,01305	-0,25932
Q9ZU32	AT2G01350	QPT	0,0169	-0,26776
Q9C7S6	AT1G72290	WSCP	0,04899	-0,26955
O64470	AT2G19070	SHT	0,0123	-0,28245
AOA8T2AB90			0,02318	-0,29326
P43255	AT4G14110	CSN8	0,04218	-0,32226
Q9LXV0	AT5G12890	UGT92A1	0,01495	-0,32992
AOA8T2A6J5			0,01639	-0,46332
Q9LK22	AT3G27310	PUX1	0,03236	-0,46442
Q9ZPY1	AT2G46580	PPOX2	0,00626	-0,50731
AOA8T1Y298			0,02068	-0,75895
Q9SR33	AT3G09300	ORP3B	0,03677	-1,01259
Q9FH82	AT5G45280	PAE11	0,01263	-∞

ANEXO XII. Términos GO representativos de las proteínas diferencialmente expresadas el sobreexpresor 35S:DVL8 con respecto al silvestre Col-0.

ID	DESCRIPCIÓN GO	PROTEÍNAS
GO:1901566	Proceso biosintético de compuestos organonitrogenados	DCP1 ATPMEPCRA ERF1-2 PDF1A RPL27AB GGAT1 CARB PDH-E1 BETA DAD1 HEMA1 4CLL1 TSM1 QPT IGPS SHT HEME2 PPOX2 ZFN1 RPL4A ADK1 RPL13B RPL24B TIF3C1 PSRP5 APG3 RRF RPL1 TUFA TIF3A1 GPP1 DAP RPL4D GLU1 RPS15D PSRP6 PAT1 IPUT1 PYR6 RPP1C RPS28C RPS4 ATPB RPS8
GO:0043603	Proceso metabólico de la amida celular	DCP1 ATPMEPCRA ERF1-2 PDF1A RPL27AB GSTU13 PDH-E1 BETA GGCT2
GO:0043604	Proceso biosintético de la amida	DCP1 ATPMEPCRA ERF1-2 PDF1A RPL27AB PDH-E1 BETA 4CLL1 TSM1 SHT ZFN1 RPL4A RPL13B RPL24B TIF3C1 PSRP5 APG3 RRF RPL1 TUFA TIF3A1 RPL4D RPS15D PSRP6 IPUT1 RPP1C RPS28C RPS4 RPS8
GO:0006518	Proceso metabólico de péptidos	DCP1 ATPMEPCRA ERF1-2 PDF1A RPL27AB GSTU13 GGCT2
GO:0006412	Traducción	DCP1 ATPMEPCRA ERF1-2 PDF1A RPL27AB
GO:0043043	Proceso biosintético de péptidos	ZFN1 RPL4A RPL13B RPL24B TIF3C1 PSRP5 APG3 RRF RPL1 TUFA TIF3A1 RPL4D RPS15D PSRP6 RPP1C RPS28C RPS4 RPS8
GO:0009056	Procesos catabólicos	DCP1 ATPMEPCRA ATGLX1 CLPR2 GGAT1
GO:1901575	Proceso catabólico de sustancias orgánicas	GSTU13 PDH-E1 BETA GGCT2
GO:0044248	Procesos catabólicos celulares	DCP1 ATGLX1 CLPR2 GGAT1 GSTU13 GGCT2
GO:0046686	respuesta al ion cadmio	ATGLX1 GSTU13 GSTU19 ARF3 PAG1 SFGH ADK1 CTIMC TUFA SBP1 TUBB9 FSD1 HSP70-9 HSP70-10 NADP-ME2
GO:0010038	Respuesta al ion metal	ATGLX1 GSTU13 GSTU19 ARF3 PAG1 SFGH ADK1 CTIMC TUFA SBP1 TUBB9 FSD1 HSP70-9 HSP70-10 NADP-ME2 VSP2
GO:0044283	Proceso biosintético de pequeñas moléculas	GGAT1 CARB PDH-E1 BETA LOX1 IGPS PPOX2 VTC4 ADK1 LOX2 CTIMC GPP1 DAP GLU1 NDC1 PAT1
GO:0010035	Respuesta a sustancias inorgánicas	ATGLX1 GSTU13 GSTU19 NIR1 ARF3 PAG1 SFGH ADK1 CTIMC TUFA SBP1 TUBB9 FSD1 HSP70-9 HSP70-10 NADP-ME2 KIN1 VSP2 LSM5 TIL LTP4
GO:0043436	Proceso metabólico del oxoácido	ATGLX1 AEE9 GGAT1 GSTU13 CARB PDH-E1 BETA LOX1 4CLL1 BGLU20 QPT IGPS NIR1 ATHOL1 VTC4 LOX2 CTIMC DAP GLU1 NADP-ME2 ZHD8 PAT1 TGG2
GO:0006082	Proceso metabólico de ácidos orgánicos	ATGLX1 AEE9 GGAT1 GSTU13 CARB PDH-E1 BETA LOX1 4CLL1 BGLU20 QPT IGPS NIR1 ATHOL1 VTC4 LOX2 CTIMC DAP GLU1 NADP-ME2 ZHD8 PAT1 TGG2
GO:0044281	Proceso metabólico de de pequeñas moléculas	ATGLX1 AEE9 GGAT1 GSTU13 CARB PDH-E1 BETA LOX1 4CLL1 BGLU20 QPT IGPS NIR1 SFGH ATHOL1 PPOX2 VTC4 ADK1 LOX2 CTIMC GPP1 DAP GLU1 NDC1 NADP-ME2 ZHD8 RGP5 PAT1 TGG2 PYR6 ATPB

ANEXOS

GO:0019752	Proceso metabólico de ácido carboílico	ATGLX1 AEE9 GGAT1 CARB PDH-E1 BETA LOX1 4CLL1 QPT IGPS VTC4 LOX2 CTIMC DAP GLU1 NADP-ME2 PAT1
GO:0019637	Proceso metabólico de organofosfatos	CARB PDH-E1 BETA 4CLL1 QPT PPOX2 VTC4 ADK1 CTIMC NADP-ME2 IPUT1 PYR6 ATPB
GO:0009117	Proceso metabólico de nucleótidos	CARB PDH-E1 BETA 4CLL1 QPT ADK1 CTIMC PYR6 ATPB
GO:0006753	Proceso metabólico del nucleósido fosfato	
GO:0090407	Proceso biosintético de organofosfatos	CARB PDH-E1 BETA 4CLL1 QPT PPOX2 VTC4 ADK1 CTIMC PYR6 ATPB
GO:0055086	Proceso metabólico de moléculas pequeñas que contiene nucleobase	CARB PDH-E1 BETA 4CLL1 QPT ADK1 CTIMC RGP5 PYR6 ATPB
GO:0009165	Proceso biosintético de nucleótidos	CARB PDH-E1 BETA 4CLL1 QPT ADK1 PYR6 ATPB
GO:1901293	Proceso biosintético de nucleósido fosfato	
GO:0009260	Proceso biosintético de ribonucleótidos	CARB PDH-E1 BETA 4CLL1 ADK1 PYR6 ATPB
GO:0044085	Biogénesis de componentes celulares	PKSA TRM112A 4CLL1 TKPR2 CSI3 EMB2763 SHT RS2Z33 VLN2 RPL24B TIF3C1 PSRP5 RPL1 TIF3A1 CSN8 QRT3 NAP1
GO:0022607	Ensamblaje de componentes celulares	PKSA 4CLL1 TKPR2 SHT RS2Z33 VLN2 RPL24B TIF3C1 PSRP5 TIF3A1 CSN8 QRT3 NAP1
GO:0045229	Organización de la estructura de encapsulamiento externo	PKSA ATPMEPCRA 4CLL1 TKPR2 PPME1 CEL1 CSI3 SHT PME32 AtGH9B13 QRT3 EXPB3 RGP5 PAE11 HST
GO:0010584	Formación de la exina del polen	PKSA 4CLL1 TKPR2 SHT QRT3
GO:0010208	Ensamblaje de la pared del polen	
GO:0010927	Ensamblaje de componentes celulares involucrados en morfogénesis	
GO:0032989	Morfogénesis de componentes celulares	
GO:0080110	Proceso de biosíntesis de la esporopolenina	PKSA 4CLL1 TKPR2
GO:0098754	Detoxificación	GSTU13 GSTU20 GSTU19 GPX2 SFGH BAS1 PER39 FSD1 2-Cys Prx B
GO:0016145	Proceso catabólico del S-glycoside	GSTU13 BGLU20 ATHOL1 TGG2
GO:0019759	Proceso catabólico del glicosinolato	
GO:0006790	Proceso metabólico de compuestos sulfurados	GSTU13 PDH-E1 BETA GGCT2
GO:0044273	Proceso catabólico de compuestos sulfurados	GSTU13 GGCT2
GO:0022613	Biogénesis de complejos ribonucleoproteicos	TRM112A EMB2763 RS2Z33 RPL24B TIF3C1 RPL1 TIF3A1 LA1 RPS15D XPO1 RPS10C RPS28C
GO:0042254	Biogénesis de ribosomas	TRM112A EMB2763 RPL24B RPL1 LA1 RPS15D XPO1 RPS10C RPS28C

ANEXO XIII. Proteínas diferencialmente expresadas y comunes al análisis proteómico del décuple mutante *dvl3 dvl5 dvl6 dvl1 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf19 rtf11*, el sobreexpresor *dvl1-1D* y 35S:DVL8, todas ellas comparadas con el silvestre Col-0.

Se indica el ID de la proteína con su correspondiente ID del gen y nombre. Si no existe una equivalencia entre los ID de proteína obtenidos en la base de datos Uniprot_Swissprot y los ID de genes de la base de datos del TAIR, no aparece ID del gen. También se indica los valores del *Log. Fold Change* de los 3 experimentos y la categoría GO a la que pertenecen los genes comunes a los 3 experimentos. Décuple mutante *dvl3 dvl5 dvl6 dvl1 dvl4 rtf19 dvl8 dvl11 rtf11 dvl19* = x10 dvl. En rojo aparecen destacadas las proteínas expresadas al alza y en verde las expresadas a la baja con respecto al silvestre (WT).

ID Proteína	ID Gen	Nombre	Log. Fold Change			Categoría GO
			x10 dvl	<i>dvl1-1D</i>	35S:DVL8	
A0A8T2A6J5			-0,1846	-0,2246	-0,4633	
O23674	AT1G02050	PKSA	-0,1803	-0,2674	-0,2239	GO:0010584 GO:0010208 GO:0010927 GO:0032989 GO:0080110 GO:0044085 GO:0022607 GO:0045229
O64470	AT2G19070	SHT	-0,2451	-0,1748	-0,2825	GO:1901566 GO:0043604 GO:0010584 GO:0010208 GO:0010927 GO:0032989 GO:0043603 GO:0044085 GO:0022607 GO:0045229 GO:0010584
P38418	AT3G45140	LOX2	-0,0636	0,1388	0,0597	GO:0044281 GO:0019752 GO:0006082 GO:0044283 GO:0016053 GO:0043436
Q8LGC6	AT1G33040		0,1978	0,2540	0,2093	
Q9CA28	AT1G68540	TKPR2	-0,1254	-0,0987	-0,1303	GO:0010584 GO:0010208 GO:0010927 GO:0032989 GO:0080110 GO:0044085 GO:0022607 GO:0045229
Q9CAC1	AT1G70710	CEL1	∞	∞	∞	GO:0005975 GO:0016052 GO:0009056 GO:1901575 GO:0045229
Q9SJF3	AT1G08370	DCP1	0,1030	0,0879	0,0934	GO:1901566 GO:0043604 GO:0031086 GO:0031087 GO:0110156 GO:0110154 GO:0009056 GO:1901575 GO:0043603 GO:0043604 GO:0006412 GO:0043043 GO:0006518 GO:0043043 GO:0044248
Q9ZU32	AT2G01350	QPT	-0,2160	-0,1836	-0,2678	GO:0044281 GO:1901566 GO:0055086 GO:0009056 GO:1901575 GO:0019752 GO:0006082 GO:0043436 GO:0009165 GO:0009117 GO:0006753 GO:0055086 GO:0019637 GO:0090407 GO:1901293
A0A8T1YZ98			-0,5960		-0,7590	
P55231	AT4G39210	APL3	0,5890		0,6597	
Q84WV2	AT1G75940	BGLU20	-0,2466		-0,0610	
Q9FGF0	AT5G64460		0,2324		0,2914	
Q9SF85	AT3G09820	ADK1	0,1250		0,1235	

ANEXOS

Q9SR33	AT3G09300	ORP3B	-0,7229		-1,0126
Q9SUD4	AT4G28050	TET7	0,6827		0,8854
O23523	AT4G16830	RGGA	0,0668	0,1038	
O65220	AT5G35100		0,3448	0,3502	
Q43316	AT5G08280	HEMC	0,0724	0,0737	
Q940M2	AT4G39660	AGT2	-0,0182	-0,0402	
Q9FF55	AT5G60640	PDIL1-4	-0,0627	-0,0659	
Q9SV73	AT4G12960	GILT	0,1279	0,1530	
Q9XEC4	AT4G04460	APA3	-0,1451	-0,1006	
Q9M076	AT4G32840	PFK6	-0,6630	-1,3428	
A0A8T1YB76				0,5143	0,5517
F4I718	AT1G77460	CSI3		0,7511	0,8627
F4IS91	AT2G03150	RSA1	∞	∞	
F4JZY1	AT5G41790	CIP1		0,8834	0,8202
O22886	AT2G40490	SFGH		0,0957	0,1388
O23715	AT2G27020	PAG1		0,0684	0,0492
P0DKJ6	AT1G20120			-0,2843	-0,2182
P19366	ATCG00480	ATPB		0,1120	0,1058
P21276	AT4G25100	FSD1		-0,2551	0,2935
P29514	AT5G12250	TUBB6		0,1316	0,1609
P33157	AT3G57260	BGL2		1,3647	1,1212
P34789	AT5G64140	RPS28C		0,2637	0,3119
P55230	AT1G27680	APL2		0,0621	0,0581
P56799	ATCG00380	RPS4		0,0710	0,1013
P56801	ATCG00770	RPS8		0,0903	0,1165
Q02166	AT5G17990	PAT1		0,2977	0,2788
Q06327	AT1G55020	LOX1		0,2250	0,1577
Q0WP12	AT2G43910	ATHOL1		0,0556	0,0750
Q1H583	AT1G54000	GLL22		-0,1684	-0,1312
Q1JPL7	AT1G11580	ATPMEPCR A		0,1494	0,2156
Q1PF50	AT2G18080	EDA2		-0,2524	-0,2593
Q42601	AT1G29900	CARB		0,0477	0,0620
Q84J75	AT5G12210	RGTB1		0,3066	0,2279
Q8GUM2	AT4G37910	HSP70-9		0,1060	0,1028
Q8GWB7	AT5G18480	IPUT1		0,5228	0,6184
Q8GXR9	AT5G08740	NDC1		0,0834	0,1245
Q8L770	AT1G09130			0,1695	0,1792
Q8LAS8	AT2G41530	SFGH		0,0882	0,0534
Q8LFJ5	AT1G22270	TRM112A		0,2864	0,2792
Q8VYA5	AT2G37340	RS2Z33		-0,1055	-0,1390
Q949P3	AT2G17340			-0,1455	-0,1038
Q9C5C2	AT5G25980	TGG2		-0,1483	-0,1119
Q9C6Z3	AT1G30120	PDH-E1 BETA		0,4414	0,3480
Q9C9W4	AT1G67990	TSM1		-0,1869	-0,1300
Q9FKB0	AT5G48870	LSM5		0,3200	0,2579
Q9FX93	AT1G49650	CXE4		-0,5686	-0,1668

Q9LLR6	AT5G59310	LTP4	-0,1281	-0,1326
Q9LPV8	AT1G12920	ERF1-2	0,3104	0,3825
Q9LQ12	AT1G62940	4CLL1	-0,2011	-0,1969
Q9LRZ6	AT3G25810	TPS24	0,1483	0,1580
Q9LV48	AT3G24550	PERK1	0,8223	0,8229
Q9LVT8	AT5G47210	RGGC	0,0941	0,1048
Q9LXV0	AT5G12890	UGT92A1	-0,1046	-0,3299
Q9LY66	AT3G63490	RPL1	0,0967	0,1088
Q9LYW9	AT5G03160	P58IPK	0,1079	0,1135
Q9LZM1	AT5G02100	ORP3A	1,1325	1,1317
Q9M0I2	AT4G28250	EXPB3	-0,1597	-0,0928
Q9M1X0	AT3G63190	RRF	0,0750	0,0751
Q9M2E2	AT3G61220		0,1498	0,1606
Q9SR70	AT3G10060	FKBP16-4	0,2339	0,1591
Q9XJ36	AT1G12410	CLPR2	0,1609	0,1537
Q9ZPY1	AT2G46580	PPOX2	-0,2091	-0,5073

ANEXO XIV. Figura suplementaria S2. Fenotipos de la sobreexpresión del gen *DVL11* en *Arabidopsis thaliana*.

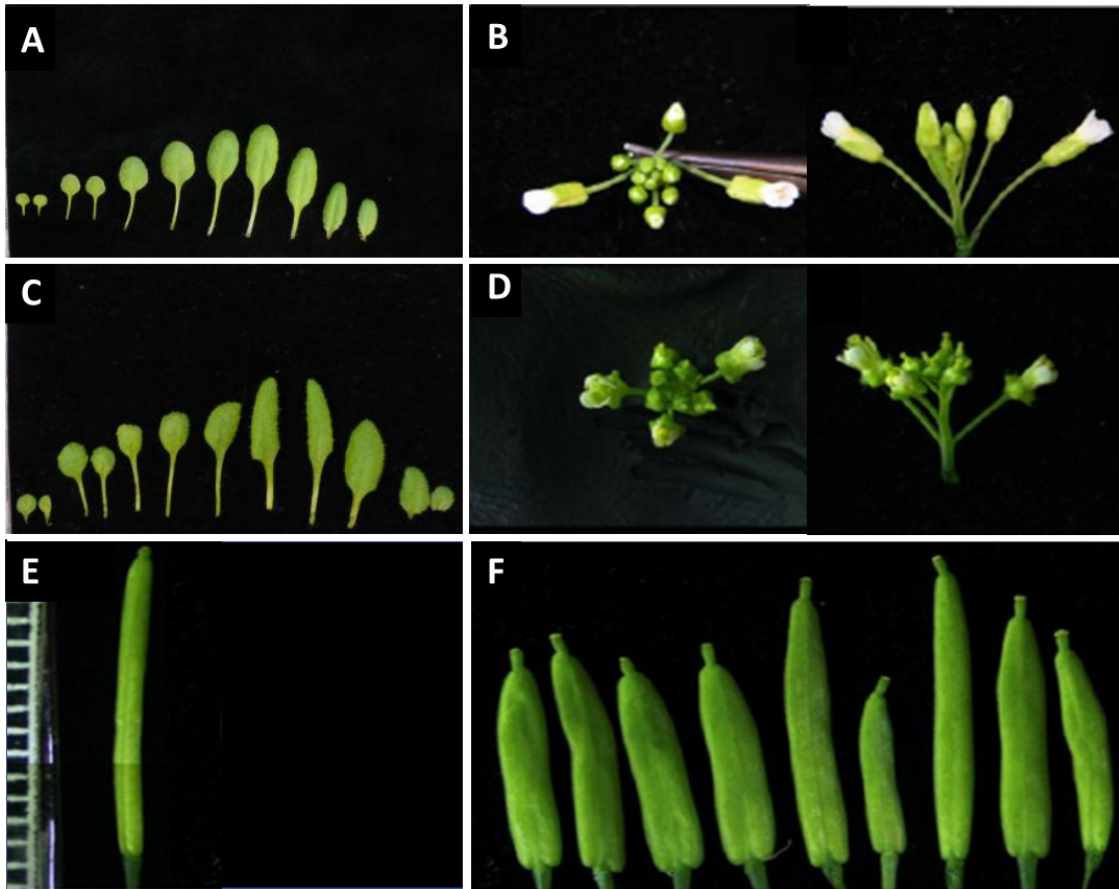


Figura S2. Fenotipos de la sobreexpresión del gen *DVL11* en *Arabidopsis thaliana*. Se muestran los fenotipos correspondientes a las plantas silvestres Col-0 (A, B y E) y a las plantas sobreexpresoras 35SS:DVL11 (C, D y F), en hojas de roseta de 15 días (A y C), en inflorescencias y flores en antesis (B y D) y en frutos formados (E y F). Modificado de Primo, 2013.

ANEXO XV. ABREVIATURAS

%: por ciento

°C: grados centígrados

µg: microgramos

µg/L: microgramos por litro

µg/ml: microgramos por mililitro

µl: microlitros

µM: micromolar

µmol: micromol

Arabidopsis: *Arabidopsis thaliana*

A. tumefaciens: *Agrobacterium tumefaciens*

BASTA: glufosinato de amonio

BiFC: Complementación Bimolecular de Fluorescencia

BSA: albúmina de suero bovino

Ca²⁺: calcio

cDNA: DNA complementario

CDS: secuencia codificante de un gen

cm: centímetros

Col-0: ecotipo Columbia

C-terminal: carboxilo terminal

Cys: cisteína

DEGs: genes diferencialmente expresados (*Differential Expressed Genes*)

DIA: adquisición independiente de datos

DMEM: medio Eagle modificado Dulbecco

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNasa: desoxirribonucleasa

dNTP: desoxinucleósidos trifosfato

DVL: DEVIL

E. Coli: *Escherichia Coli*

EDTA: etilen-diamino-tetraacetato sódico

EdU: 5-ethynyl-20-deoxyuridine

EndoH: Endoglicosidasa H

et al.: y otros.

F: directo (*Forward*)

FAA: etanol, ácido acético glacial, formaldehído

FDR: *False Discovery Rate*

FESEM: microscopio electrónico de barrido de emisión de campo

FR: rojo lejano (*Far Red*)

g: gramos

g/L: gramos por litro

GO: ontología génica (*Gene Ontology*)

GFP: proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

GUS: β-glucuronidasa

h: horas

lncRNA: RNA largo no codificante

Kan: kanamicina

kDa: kilodalton

LB: medio Luria-Bertani

LC-MS/MS: cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas

m: metro

M: molar

mA: miliamperio

Marchantia: *Marchantia polymorpha*

MES: ácido 4-morfolino-etano-sulfónico

mg: miligramos

ANEXOS

mg/ml: miligramos por mililitro

min: minutos

mRNA: RNA mensajero

miRNA: micro RNA

ml: mililitros

mm: milímetros

mM: milimolar

mRNA: RNA mensajero

MS: medio de Murashige y Skoog

nc: no cuantificable

ng: nanogramos

Nicotiana: *Nicotiana benthamiana*

nM: nanomolar

nm: nanomoles

N-terminal: amino terminal

OD: densidad óptica

o/n: incubación 16h (*over night*)

ORF: marco abiertos de lectura (*Open Reading Frame*)

OST: oligosacárido transferasa

padj: *p-value* ajustado

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*)

PEI: polietilenamina

pro: promotor

qRT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real

R: reverso (*Reverse*)

RNA: ácido ribonucleico

RNasa: ribonucleasa

RNA-seq: secuenciación de ARN

rpm: revoluciones por minuto

RPKM: lecturas por millón de kilobases

RTFL: ROTUNDIFOLIA

s: segundo

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

sgRNA: ARN de guía única

sORFs: pequeños marcos abiertos de lectura (*small Open Reading Frames*)

TAK-1: parental masculino de *Marchantia*

TBE: Tris-borato-EDTA

T-DNA: DNA de transferencia

TE: Tris-EDTA

ter: terminador

T1: Generación de transformante 1

T2: progenie de plantas T1

T3: progenie de plantas T2

UTR: región no traducida (*untranslated región*)

V: voltio

v/v: volumen por volumen

WT: plantas silvestres (*Wild Type*)

YFP: proteína amarilla fluorescente (*Yellow Fluorescent Protein*)

35S: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor

