

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 |