

Función de las proteínas

VQ1 y VQ10

codificadas por genes inducibles
por **HIPOXIA, ÓXIDO NÍTRICO**
Y ESTRÉS OXIDATIVO en la
regulación del **desarrollo y**
las respuestas a estrés
en Arabidopsis thaliana

BEATRIZ GAYUBAS BALAGUER

Director: José León Ramos

Noviembre 2023



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA







UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

**Función de las proteínas VQ1 y VQ10
codificadas por genes inducibles por hipoxia,
óxido nítrico, y estrés oxidativo en la
regulación del desarrollo y las respuestas a
estrés en *Arabidopsis thaliana***

BEATRIZ GAYUBAS BALAGUER

DIRECTOR: JOSÉ LEÓN RAMOS

TUTOR: EDUARDO BUESO RÓDENAS

VALENCIA, NOVIEMBRE 2023



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Don José León Ramos, Doctor en Ciencias Químicas e Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de Valencia.

CERTIFICA:

Que el trabajo con título “Función de las proteínas VQ1 y VQ10 codificadas por genes inducibles por hipoxia, óxido nítrico, y estrés oxidativo en la regulación del desarrollo y las respuestas a estrés en *Arabidopsis thaliana*”, ha sido realizado por Beatriz Gayubas Balaguer, graduada en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia, bajo su dirección y constituye su Memoria de Tesis para optar al grado de Doctora en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia, a noviembre de 2023.

LEON
RAMOS JOSE
- 28867680N

Firmado digitalmente por LEON
RAMOS JOSE - 28867680N
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES,
serialNumber=IDCES-28867680N,
givenName=JOSE, sn=LEON
RAMOS, cn=LEON RAMOS JOSE -
28867680N
Fecha: 2023.11.14 09:50:19 +01'00'

Dr. José León Ramos



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Para mis padres y Paula

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), el oxígeno molecular (O₂) y el óxido nítrico (NO) son factores comunes en las respuestas a diferentes tipos de estrés en las plantas. En los últimos años, las condiciones ambientales adversas han aumentado debido al cambio climático y, entre ellas, las fuertes lluvias que provocan anegaciones o inundaciones en los campos suponen un grave problema para el desarrollo y el futuro de la agricultura. Estas inundaciones provocan que la planta se enfrente a condiciones de hipoxia severas y a la re-oxigenación que ocurre cuando se retira el agua. Es importante, por tanto, conocer los factores genéticos y moleculares que modulan las respuestas de las plantas a la hipoxia u otros tipos de estrés abiótico para hacer frente a estas situaciones. La familia de proteínas VQ de *Arabidopsis thaliana* incluye cinco miembros codificados por genes que se inducen en respuesta a la hipoxia, al NO y al estrés oxidativo. Dos de ellos, *VQ1* y *VQ10*, codifican dos proteínas con una gran homología de secuencia y estructura, que no poseen actividad transcripcional. En este trabajo, se describe que *VQ1* y *VQ10* interactúan entre sí y con ellas mismas, y con las otras tres proteínas VQ y cuatro factores de transcripción WRKY cuyos genes también se inducen en respuesta a hipoxia, NO y estrés oxidativo. Un rastreo de doble híbrido de levadura de una genoteca de *Arabidopsis* utilizando *VQ1* como cebo permitió identificar alrededor de 300 proteínas interactoras de *VQ1* y probablemente también de *VQ10*, sugiriendo que ambas proteínas tienen patrones similares de interacción proteína-proteína. *VQ1* y *VQ10* son proteínas citoplásmicas y nucleares, por lo que la identificación de casi 50 proteínas cloroplásticas que interactúan con *VQ1* en el cloroplasto sugiere que estas interacciones deben ocurrir en el citoplasma. En el rastreo se identificó la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS), una enzima clave para la biosíntesis de isoprenoides, la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas. Al co-inmunoprecipitar DXS y *VQ1* o *VQ10* se observó que *VQ1* y sobre todo *VQ10* favorecieron la monomerización de DXS en un ambiente reductor. A partir de la identificación de un mutante hipermórfico *vq10-H* se ha procedido a caracterizar algunas de las funciones reguladoras ejercidas por *VQ10*. El análisis transcriptómico comparado de *vq10-H* y plantas silvestres Col-0 permitió identificar la regulación ejercida por *VQ10* en el desarrollo de las raíces, en las respuestas a NO y estrés oxidativo, así como una potencial función reguladora del procesamiento alternativo de ARNs. La sobreexpresión de *VQ10* provocó el aumento de la elongación de la raíz primaria, y de la división y elongación celular en la raíz. También provocó una mayor tolerancia al estrés oxidativo, una menor sensibilidad al NO, y una mayor eficiencia fotosintética en comparación con las plantas silvestres. En conjunto, el trabajo realizado en esta Tesis sugiere que algunas funciones reguladoras de *VQ1* y *VQ10* en el desarrollo y las respuestas a estrés de las plantas podría estar basado en mecanismos de regulación redox.

SUMMARY

Reactive oxygen species (ROS), molecular oxygen (O₂), and nitric oxide (NO) are common factors in diverse plant stress responses. In the past few years, adverse environmental conditions have increased due to climate change, including heavy rains leading to waterlogging or flooding in fields, posing a serious problem for agriculture's development and future. Floods impose severe hypoxia conditions to plants to be later re-oxygenated when water recedes. Therefore, it is essential to understand the genetic and molecular factors that modulate plant responses to hypoxia and other abiotic stresses to address these situations. The VQ-motif containing protein family in *Arabidopsis thaliana* includes five members encoded by genes induced in response to hypoxia, NO, and oxidative stress. Two of them, *VQ1* and *VQ10*, encode two proteins with significant sequence and structural homology, lacking transcriptional activity. In this study, it is described that VQ1 and VQ10 interact with each other and themselves, as well as with the other three VQ proteins and four WRKY transcription factors whose genes are also induced in response to hypoxia, NO, and oxidative stress. A yeast two-hybrid screening of an Arabidopsis library using VQ1 as bait allowed us identifying almost 300 VQ1-interacting proteins, that likely also interact with VQ10, suggesting that their homology can be extended to protein-protein interaction patterns. VQ1 and VQ10 are cytoplasmic and nuclear proteins, so the identification of nearly 50 chloroplast proteins interacting with VQ1 in the chloroplast suggests that these interactions may be occurring in the cytoplasm. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS), a key enzyme in isoprenoid biosynthesis, photosynthesis, and plant growth, was identified in the screening. Co-immunoprecipitation of DXS with VQ1 or VQ10 showed that VQ1 and, particularly, VQ10 promoted the monomerization of DXS under reducing conditions. Based on the identification of a hypermorphic *vq10-H* mutant, some of the regulatory functions exerted by VQ10 have been characterized. Comparative transcriptomic analysis of the hypermorphic *vq10-H* mutant and Col-0 wild type plants allowed us identifying the regulation exerted by VQ10 in root development, in responses to NO and oxidative stress, as well as in the alternative splicing of RNAs. Overexpression of *VQ10* led to increased primary root elongation, and increased root cell division and elongation. It also triggered an enhanced oxidative stress tolerance, reduced sensitivity to NO, and enhanced photosynthetic efficiency compared to wild type plants. Altogether, the work carried out in this thesis suggest that some of the regulatory functions exerted by VQ1 and VQ10 on development and stress responses in plants, could be based on redox mechanisms.

RESUM

Les espècies reactives d'oxigen (ROS), l'oxigen molecular (O₂) i l'òxid nítric (NO) són factors comuns en les respostes a diferents tipus d'estrés en les plantes. En els últims anys, les condicions ambientals adverses han augmentat a causa del canvi climàtic i, entre elles, les fortes pluges que provoquen inundacions als camps suposen un greu problema per al desenvolupament i el futur de l'agricultura. Aquestes inundacions provoquen que la planta s'enfronte a condicions d'hipòxia severes i a la re-oxigenació que ocorre quan es retira l'aigua. És important, per tant, conèixer els factors genètics i moleculars que modulen les respostes de les plantes a l'hipòxia o altres tipus d'estrés abiòtic per a fer front a aquestes situacions. La família de proteïnes VQ d'*Arabidopsis thaliana* inclou cinc membres codificats per gens que s'indueixen com a resposta a l'hipòxia, al NO i a l'estrès oxidatiu. Dos d'ells, *VQ1* i *VQ10*, codifiquen dues proteïnes amb una gran homologia de seqüència i estructura, que no posseeixen activitat transcripcional. En aquest treball, es descriu que *VQ1* i *VQ10* interaccionen entre si i amb elles mateixes, i amb les altres tres proteïnes VQ i quatre factors de transcripció WRKY, els gens dels quals també s'indueixen com a resposta a hipòxia, NO i estrès oxidatiu. Un rastreig amb la tècnica del doble híbrid en llevat d'una genoteca d'*Arabidopsis* utilitzant *VQ1* com a esquer va permetre identificar al voltant de 300 proteïnes interactores de *VQ1* i probablement també de *VQ10*, suggerint que ambdues proteïnes tenen patrons similars d'interacció proteïna-proteïna. *VQ1* i *VQ10* són proteïnes citoplasmàtiques i nuclears, de manera que la identificació de gairebé 50 proteïnes cloroplàstiques que interaccionen amb *VQ1* en el cloroplast suggereix que aquestes interaccions han d'ocórrer al citoplasma. En el rastreig es va identificar la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfat sintasa (DXS), un enzim clau per a la biosíntesi d'isoprenoides, la fotosíntesi i el creixement de les plantes. En co-immunoprecipitar DXS i *VQ1* o *VQ10* es va observar que *VQ1* i sobretot *VQ10* van afavorir la monomerització de DXS en un ambient reductor. A partir de la identificació d'un mutant hiper mòrfic *vg10-H* s'ha procedit a caracteritzar algunes de les funcions reguladores exercides per *VQ10*. L'anàlisi transcriptòmic comparat de *vg10-H* i plantes silvestres Col-0 va permetre identificar la regulació exercida per *VQ10* en el desenvolupament de les arrels, en les respostes a NO i estrès oxidatiu, així com una potencial funció reguladora del processament alternatiu d'ARNs. La sobreexpressió de *VQ10* va provocar l'augment de l'elongació de l'arrel primària, i de la divisió i elongació cel·lular a l'arrel. També va provocar una major tolerància a l'estrès oxidatiu, una menor sensibilitat al NO, i una major eficiència fotosintètica en comparació amb les plantes silvestres. En conjunt, el treball realitzat en aquesta Tesi suggereix que algunes funcions reguladores de *VQ1* i *VQ10* en el desenvolupament i les respostes a estrés de les plantes podria estar basat en mecanismes de regulació redox.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. SEÑALIZACIÓN POR OXÍGENO Y ÓXIDO NÍTRICO (NO) EN LAS RESPUESTAS A ESTRÉS ABIÓTICO EN PLANTAS	1
1.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)	1
1.2. ESTRÉS NITROSATIVO, ÓXIDO NÍTRICO (NO) Y ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO (RNS)	4
1.3. ESTRÉS POR HIPOXIA Y RE-OXIGENACIÓN EN PLANTAS.....	8
2. PROTEÍNAS CON DOMINIO VALINA-GLUTAMINA (VQ) EN PLANTAS	14
2.1. PROTEÍNAS VQ EN LA REGULACIÓN DEL DESARROLLO.....	16
2.2. PROTEÍNAS VQ EN LA DEFENSA CONTRA PATÓGENOS Y PLAGAS	17
2.3. PROTEÍNAS VQ EN LAS RESPUESTAS A ESTRÉS ABIÓTICO	19
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. MATERIAL BIOLÓGICO	27
1.1. MATERIAL VEGETAL.....	27
1.2. MATERIAL MICROBIOLÓGICO	28
2. MANIPULACIÓN Y CRECIMIENTO DE ARABIDOPSIS	28
2.1. ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS	28
2.2. MEDIOS Y CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO	28
2.3. CRUCE DE PLANTAS Y SELECCIÓN	29
2.4. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA MEDIANTE INMERSIÓN FLORAL Y SELECCIÓN DE LOS TRANSFORMANTES	29
2.5. TRATAMIENTOS	30
2.5.1. HIPOXIA EN CÁMARA	30
2.5.2. ÓXIDO NÍTRICO	30
2.5.3. HIPOXIA Y RE-OXIGENACIÓN POR INUNDACIÓN.....	31
2.5.4. GERMINACIÓN BAJO ESTRÉS OXIDATIVO.....	31
2.5.5. DESETIOLACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILAS	31
2.6. TINCIÓN GUS.....	32
2.7. TINCIÓN CON YODURO DE PROPIDIO.....	32
2.8. ESTIMACIÓN DE LA EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA.....	32

2.9. ANÁLISIS DE ISOPRENOIDES	32
3. MANIPULACIÓN Y CRECIMIENTO DE <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i>	33
3.1. MEDIOS Y CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO	33
3.2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA TRANSITORIA MEDIANTE AGROINFILTRACIÓN	33
3.3. VISUALIZACIÓN DE LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GFP Y RFP	34
4. MANIPULACIÓN Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS.....	34
4.1. MEDIOS Y CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> Y <i>TUMEFACIENS</i>	34
4.2. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES PARA LA TRANSFORMACIÓN	34
4.3. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	35
5. MANIPULACIÓN Y CRECIMIENTO DE LEVADURAS	35
5.1. MEDIOS Y CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO	35
5.2. TRANSFORMACIÓN Y GENERACIÓN DE LEVADURAS DIPLOIDES MEDIANTE APAREAMIENTO	36
5.3. ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO DE LEVADURA (Y2H).....	37
5.4. RASTREO DE GENOTECA DE DOBLE HÍBRIDO DE LEVADURA (Y2H) MEDIANTE APAREAMIENTO	37
6. AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	38
6.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	38
6.1.1. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE ARABIDOPSIS.....	38
6.1.2. EXTRACCIÓN DE ARN DE ARABIDOPSIS.....	39
6.1.3. EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO DE BACTERIAS	39
6.1.4. EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO DE LEVADURAS	39
6.1.5. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE PRODUCTOS DE PCR O DE GELES DE AGAROSA	39
6.2. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	40
6.3. ANÁLISIS DE CALIDAD DE ARN	40
6.4. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	40
6.4.1. AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE PCR.....	40
6.4.2. ELECTROFORESIS DE ADN O ARN EN GEL DE AGAROSA	43
6.4.3. RETROTRANSCRIPCIÓN (RT) DEL ARN	43

6.4.4. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR).....	43
6.4.5. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO.....	44
6.4.6. SECUENCIACIÓN SANGER DE ADN.....	44
6.4.7. DIGESTIÓN DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	44
6.4.8. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS MEDIANTE TECNOLOGÍA GATEWAY	44
6.4.9. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES amiARN.....	46
7. AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.....	46
7.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	46
7.1.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.....	46
7.1.2. INMUNOPRECIPITACIÓN Y CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS MARCADAS.....	46
7.2. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.....	46
7.2.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.....	46
7.2.2. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS CON SDS-PAGE.....	47
7.2.3. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....	47
8. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>	48
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	49
RESULTADOS I.....	53
1. IDENTIFICACIÓN DE GENES <i>VQ</i> Y <i>WRKY</i> INDUCIBLES POR NO, HIPOXIA Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	53
2. LOS GENES <i>VQ1</i> Y <i>VQ10</i> PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DEL DESARROLLO DE LA PLANTA Y EN LAS RESPUESTAS A ESTRÉS.....	56
3. INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS <i>VQ</i> Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN <i>WRKY</i> REGULADOS POR HIPOXIA, NO Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	60
4. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INTERACTORAS DE <i>VQ1</i>	61
5. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS <i>VQ1</i> Y <i>VQ10</i>	63
6. <i>VQ1</i> Y <i>VQ10</i> INTERACCIONAN CON PROTEÍNAS CLOROPLÁSTICAS.....	66
7. <i>VQ1</i> Y <i>VQ10</i> PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN REDOX DE LA OLIGOMERIZACIÓN DE <i>DXS</i>	68
RESULTADOS II.....	75
1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES <i>VQ10</i> Y <i>WRKY33</i>	75
2. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN PLANTAS <i>vsq10-HEN</i> NORMOXIA Y EN HIPOXIA.....	77

3. ANÁLISIS DEL PROCESAMIENTO ALTERNATIVO DE ARNs EN PLANTAS <i>vq10-H</i> EN NORMOXIA Y EN HIPOXIA	85
4. FENOTIPOS DE PLANTAS <i>vq10-H</i> y <i>VQ10OX</i> RELACIONADOS CON EL DESARROLLO	87
5. FENOTIPOS DE PLANTAS <i>vq10-H</i> y <i>VQ10OX</i> RELACIONADOS CON LA RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO	92
6. EFECTO REGULADOR DE VQ1 Y VQ10 EN PROCESOS FOTOSINTÉTICOS	98
DISCUSIÓN.....	105
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	117
CONCLUSIONES	121
BIBLIOGRAFÍA.....	125
ANEXOS.....	151

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modo de acción de ROS en la célula ante una situación de estrés.	3
Figura 2. Señalización de NO basada en la degradación de los factores de transcripción ERFVII en la ruta N-degrón.....	6
Figura 3. Hipoxia en la naturaleza debido a una situación de anegamiento o inmersión completa por inundación.	9
Figura 4. Mecanismos de la célula en respuesta al estrés por hipoxia.	13
Figura 5. Árbol filogenético de la familia de proteínas VQ en <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
Figura 6. Participación de las proteínas VQ y los factores de transcripción WRKY en procesos de desarrollo a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta.	17
Figura 7. Participación de las proteínas VQ y los factores de transcripción WRKY en la resistencia de las plantas contra patógenos e insectos.	19
Figura 8. Participación de las proteínas VQ y los factores de transcripción WRKY en las respuestas a factores de estrés abiótico.	20
Figura 9. Regulación de los genes que codifican proteínas VQ y factores de transcripción WRKY en respuesta a estrés oxidativo desencadenado por ozono, hipoxia (Hipox), y NO.....	54
Figura 10. Secuencia de aminoácidos y modelo de estructura tridimensional de las proteínas VQ1 y VQ10.....	57
Figura 11. Factores de desarrollo y de estrés que provocan la inducción de la expresión de <i>VQ1</i> y <i>VQ10</i>	58
Figura 12. Evolución de la expresión de <i>VQ1</i> y <i>VQ10</i> en respuesta a un pulso de NO y en respuesta a hipoxia.	59
Figura 13. Ensayo de doble híbrido de levadura (Y2H) de interacciones de proteínas de VQ1 y VQ10 con otras proteínas VQ y WRKY inducibles por hipoxia, NO y estrés oxidativo.....	61
Figura 14. Análisis de términos GO de las proteínas interactoras de VQ1 identificadas en el rastreo de Y2H con una genoteca de <i>Arabidopsis Mate&Plate</i>	62
Figura 15. Ensayos de Y2H para comprobar la interacción de VQ1 y VQ10 con proteínas interactoras de VQ1 identificadas en la genoteca de Y2H, seleccionadas al azar.....	63
Figura 16. Localización subcelular de las proteínas VQ1 y VQ10 con la GFP fusionada en N- o C-terminal.	64
Figura 17. Co-localización de las proteínas VQ1 y VQ10.	65

Figura 18. Co-inmunoprecipitación de las proteínas HA-VQ1 y HA-VQ10 con GFP-DXS.....	68
Figura 19. Las proteínas VQ1 y VQ10 no alteran la agregación o el estado de oligomerización de DXS en los cloroplastos.	69
Figura 20. Regulación redox del estado de oligomerización de DXS por parte de las proteínas VQ1 y VQ10.....	70
Figura 21. Caracterización molecular del mutante <i>vq1</i> y del mutante hiper-mórfico <i>vq10-H</i>	76
Figura 22. Reducción de la expresión del gen <i>WRKY33</i> en el mutante <i>wrky33</i> (GK_324G011).	77
Figura 23. Análisis del transcriptoma completo comparando plantas silvestres Col-0 contra plantas mutantes <i>vq10-H</i>	80
Figura 24. Análisis de los transcritos de genes situados por debajo del locus <i>VQ10</i> de plantas Col-0 y <i>vq10-H</i> en normoxia.....	81
Figura 25. Enriquecimiento de términos GO de procesos biológicos de los DEGs identificados específicamente en Col-0 en hipoxia en el análisis transcriptómico.	83
Figura 26. Enriquecimiento de términos GO de procesos biológicos de los DEGs identificados específicamente en <i>vq10-H</i> en hipoxia en el análisis transcriptómico.	84
Figura 27. Identificación de eventos de AS diferencial al comparar plantas Col-0 y <i>vq10-H</i> en normoxia o hipoxia, así como comparando normoxia con hipoxia en plantas silvestres Col-0.....	86
Figura 28. Generación y caracterización molecular de plantas transgénicas que sobreexpresan los genes <i>VQ1</i> o <i>VQ10</i> bajo el control de dos promotores 35S..	88
Figura 29. Tasa de división celular en plantas con fondo genético Col-0 y <i>vq10-H</i> que expresan el marcador de división celular <i>cycB1:GUS</i>	89
Figura 30. Elongación de la raíz primaria y tamaño del meristemo de la raíz en plantas Col-0, <i>vq10-H</i> y <i>VQ10ox</i>	90
Figura 31. Interacción funcional entre VQ10 y WRKY33 en la división celular y el desarrollo de la planta.	91
Figura 32. Tolerancia a estrés oxidativo en la germinación de semillas de Col-0, <i>vq10-H</i> y <i>VQ10ox</i>	93
Figura 33. Sensibilidad de los hipocótilos de plántulas Col-0, <i>vq10-H</i> y <i>VQ10ox</i> al óxido nítrico (NO).	93
Figura 34. Inducción de los genes de respuesta a la hipoxia <i>LBD41</i> , <i>PDC1</i> , <i>ADH1</i> y <i>L-LDH</i> en plantas Col-0, <i>vq10-H</i> y <i>VQ10ox</i>	95
Figura 35. Tolerancia a la re-oxigenación tras la hipoxia en plantas inundadas Col-0, <i>vq10-H</i> y <i>VQ10ox</i>	96

Figura 36. Patrón de 3-nitrotirosina (A) unida a proteína y (B) libre en plantas Col-0, <i>vg10-H</i> y <i>VQ10ox</i>	97
Figura 37. Generación y caracterización molecular de plantas con expresión reducida de <i>VQ1</i> , <i>VQ10</i> o <i>VQ1</i> y <i>VQ10</i> a la vez generadas mediante tecnología de expresión de microARNs artificiales (amiARN).	98
Figura 38. Estimación de la eficiencia fotosintética de plantas con expresión aumentada (panel superior, verde) o reducida (panel inferior, marrón) de <i>VQ1</i> y <i>VQ10</i>	99
Figura 39. Efectos de cambios en la expresión de <i>VQ1</i> y <i>VQ10</i> en la desetiología de plantas.....	100
Figura 40. Efectos de cambios en la expresión de <i>VQ1</i> y <i>VQ10</i> en el contenido relativo de distintos isoprenoides en plantas.	101
Figura 41. Modelo la regulación redox del estado de oligomerización de DXS mediado por la actividad 1-Cis peroxirredoxina de las proteínas <i>VQ1</i> y <i>VQ10</i>	109

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos usados en esta Tesis.....	41
Tabla 2. Características de las proteínas VQ y los factores de transcripción WRKY codificadas por genes co-regulados por hipoxia, NO y estrés oxidativo.....	56
Tabla 3. Proteínas interactoras de <i>VQ1</i> con localización cloroplástica.	67
Tabla 4. Genes diferencialmente expresados en plantas <i>vg10-H</i> en comparación con plantas Col-0 en normoxia.....	78
Tabla 5. Genes diferencialmente expresados en plantas <i>vg10-H</i> en comparación con plantas Col-0 en hipoxia.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

¹O₂	Oxígeno singlete	Cl₂	Cloro gaseoso
3-nitroY	3-nitrotirosina	CO₂	Dióxido de carbono
A	Adenina	Co-IP	Co-inmunoprecipitación
A.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Col-0	Columbia 0
tumefaciens		Cox	Cisteína oxidada
A3SS	Sitios alternativos 3'	Ct	Umbral de ciclos de qPCR
A5SS	Sitios alternativos 5'	cycB1	Ciclina B1
A₆₄₇	Absorbancia a 647 nm	Cyt	Citocromo
A₆₆₃	Absorbancia a 663 nm	DDO	Doble <i>Dropout</i>
ABA	Ácido abscísico	DEGs	Genes diferencialmente expresados
ABCA8	<i>ABC transporter A family member 8</i>	DEPC	Piropcarbonato de dietilo
ABI5	<i>ABA insensitive 5</i>	DHAR	Dehidroascorbato reductasa
ACT2	Actina 2	DOB	<i>Dropout base</i>
AD	Dominio de activación	Dr.	Doctor
Ade	Adenina	DTT	Ditiotreitol
ADH	Alcohol deshidrogenasa	dTTP	Timidina trifosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico	dUTP	2'-deoxiuridina, 5'-trifosfato
ADNc	ADN complementario	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ADP	Adenosín difosfato	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
AGI	<i>Arabidopsis Genome Initiative</i>	ERF	Factor de respuesta a etileno
AGL42	<i>Agamous-like 42</i>	ERFVII	Grupo VII de los ERFs
Agrobacterium	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Et	Etileno
amiARNs	microARNs artificiales	F	Fenilalanina
amiR	microARN artificial	F2	Segunda generación filial
ANAC	<i>Abcisic-acid-responsive NAC domain containing protein</i>	F3	Tercera generación filial
APX	Ascorbato peroxidasa	F4	Cuarta generación filial
Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Fig.	Figura
ARF-2A	<i>ADP-ribosylation factor 2-A</i>	FPKM	<i>Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads</i>
ARN	Ácido ribonucleico	FT	Factor de transcripción
ARNm	ARN mensajero	FTSH8	<i>FTSH protease 8</i>
ARN-Sec	Secuenciación de ARN	Fv/Fm	Rendimiento cuántico máximo del PSII
AS	Procesamiento alternativo	G	Glicina
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GABA	Ácido γ-aminobutírico
ATEs	Arginiltransferasas	GAL4	Galactosidasa 4
ATP	Adenosina trifosfato	GC	Guanilato ciclasa
BASTA	Glufosinato de amonio	GFP	Proteína fluorescente verde
BD	Dominio de unión al ADN	GK	GABI-Kat
Botrytis	<i>Botrytis cinerea</i>	GK1	<i>Guanylate kinase 1</i>
BSA	Albúmina de suero bovino	<i>Gm</i>	<i>Glycine max</i>
C	Cisteína	GMPC	Guanosín monofosfato cíclico
C_a	Clorofila a	GO	<i>Gene Ontology</i>
Ca²⁺	Ion calcio	GPX	Glutación peroxidasa
CaCl₂	Cloruro de calcio	GR	Glutación reductasa
CaMBP25	<i>Calmodulin (CAM)-binding protein of 25 kDa</i>	GRX	Glutarredoxinas
CAT	Catalasa	GSH	Glutación reducido
C_b	Clorofila b	GSNO	Glutación S-nitrosilado
CDS	Secuencia de ADN codificante	GST	Glutación S-transferasa
Cis	Cisteína	GTP	Guanosina trifosfato
Cit	Citoplasma		
Cl	Cloroplasto		

GUS	β -glucuronidasa	MVQ1	<i>MPK3/6-targeted VQP 1</i>
H	Hipoxia	MXE	Exones mutuamente exclusivos
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno	N	Normoxia
HA	Hemaglutinina de la influenza humana	N.	<i>Nicotiana benthamiana</i>
HCl	Ácido clorhídrico	<i>benthamiana</i>	
HEI10	<i>Homologue of Human Enhancer of cell Invasion 10</i>	N₂	Nitrógeno gas
Hipox	Hipoxia	NAC	NAM/ATAF/CUC
His	Histidina	NaCl	Cloruro de sodio
HISTAT	<i>Hierarchical Indexing for Spliced Alignment of Transcripts</i>	NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia	NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
HRE	<i>Hypoxia responsive ERF</i>	NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
HRGs	Genes de respuesta a hipoxia	NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Centre</i>
HRP	Peroxidasa de rábano	NDHL	<i>NADH dehydrogenase-like complex L</i>
HSF	<i>Heat Shock Factor</i>	Ni:NOR	Nitrito-óxido nítrico reductasa
IBMCP	Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas	NIA	Nitrato reductasa
ICMEL2	<i>Isoprenylcysteine methyltransferase-like 2</i>	NO	Óxido nítrico
IGg	Inmunoglobulina G	NO₂⁻	Nitrito
IP	Inmunoprecipitación	NO₃⁻	Nitrato
IP5P10	<i>Type I inositol polyphosphate 5-phosphatase 10</i>	NOFNiR	Nitrito reductasas formadoras de NO
JA	Ácido jasmónico	NOS	NO sintasa
JAV1	<i>Jasmonate-associated motif gene 1</i>	NR	Nitrato reductasa
JAZ	<i>Jasmonate-zim-domain protein</i>	Nuc	Núcleo
LB	Medio Luria-Bertani	O₂	Oxígeno molecular
LBD41	<i>LOB domain-containing protein 41</i>	O₂⁻	Superóxido
LDH	Lactato deshidrogenasa	OD₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
Leu	Leucina	OFUT4	<i>O-fucosyltransferase 4</i>
M	Metionina	OH⁻	Hidroxilo
Ma	<i>Musa acuminata</i>	Oligo(dT)₁₈	Secuencia monocatenaria de desoxitimina (dT)
MAP quinasas	Quinasas activadas por mitógenos	ONOO⁻	Peroxinitrito
MAPs	Metionina aminopeptidasas	Os	<i>Oryza sativa</i>
MDHAR	Monodehidroascorbato reductasa	ox	Sobreexpresado
mECT	Cadena de transporte electrónico mitocondrial	P	Peso fresco de material vegetal
Mem	Membrana	p	P valor
MEP	Metileritritol 4-fosfato	PAPP5	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 5</i>
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanesulfónico	PCOs	Cisteína oxidasas de plantas
MGT7	<i>Magnesium transporter 7</i>	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Mit	Mitocondria	PCR1	<i>Plant cadmium resistance 1</i>
MKS1	<i>MAP kinase substrate 1</i>	PDA	<i>Photometric Diode Array</i>
MPK	MAP quinasa	PDC	Piruvato descarboxilasa
MRD1	<i>Mto 1 responding down 1</i>	Pe	<i>Phyllostachys edulis</i>
MS	Medio Murashige y Skoog	PEG	Polietilenglicol
MS-MES	Medio MS con tampón MES	PER	Peroxidasa
MV	Metil viológeno	PER1	1-Cis peroxirredoxina 1
		PHR1	<i>Phosphate starvation response 1</i>
		PI4KG3	<i>Phosphoinositide 4-kinase gamma 3</i>
		PIF	<i>Phytochrome interacting factor</i>
		PRA1F4	<i>Prenylated RAB acceptor1.F4</i>

PRT6	Proteólisis 6 E3 ubiquitina ligasa	T2	Segunda generación de transformantes
PRX	Peroxirredoxina	T3	Tercera generación de transformantes
PSII	Fotosistema II	TAE	Tris-Acetato-EDTA
PTMs	Modificaciones postraduccionales	T-DNA	ADN de transferencia
PTP1	<i>Protein tyrosine phosphatase 1</i>	TE	Tris-EDTA
QDO	Cuádruple <i>Dropout</i>	TIP41L	<i>TAP42 interacting protein of 41 kDa like</i>
QQS	<i>Qua-Quine Starch</i>	Toc75	<i>Translocon outer membrane complex 75</i>
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real	Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
RAB	<i>Ras-associated binding</i>	Trp	Triptófano
RAP2	<i>Related to AP2</i>	TRX	Tiorredoxina
Redox	Reducción-oxidación	T-TBS	Tween-Tris-tampón salino
RFP	Proteína fluorescente roja	Ub	Ubiquitina
RI	Retención de intrones	UDG	Uracil-ADN glicosilasa
RIN	Número de integridad del ARN	UDP	Uridina difosfato
RIP2	<i>ROP interactive partner 2</i>	UPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
RIP4	<i>ROP interactive partner 4</i>	UPLC-MS/MS	Espectrometría de masas en tándem acoplado a UPLC
RNS	Especies reactivas de nitrógeno	UTR	Region no traducida
ROP2	<i>RHO-related protein from plants 2</i>	UV	Ultravioleta
ROS	Especies reactivas de oxígeno	V	Volumen de medida
RT	Retrotranscripción	VQ	Valina-glutamina
RT-PCR	PCR de transcripción inversa	vq10-H	Alelo hipermórfico del mutante <i>vq10</i>
Rubisco	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa	X-gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido
S	Serina	X-α-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil α-D-galactopiranosido
SA	Ácido salicílico	Y2H	Doble híbrido de levadura
SAIL	<i>Syngenta Arabidopsis Insertion Library</i>	Zm	<i>Zea mays</i>
SD	Medio <i>Synthetic Defined</i>	α	alfa
SDS	Dodecilsulfato sódico	α-	anti-beta
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida de SDS	β	beta
SE	Exclusión de exones	δ	delta
sex	<i>starch excess</i>	λ	lambda
SIB1	<i>Sigma factor binding protein1</i>	φPSII	Rendimiento cuántico efectivo del PSII
SI	<i>Solanum lycopersicum</i>		
SOD	Superóxido dismutasa		
SYN2	<i>Sister chromatid cohesion 1 protein 2</i>		
T	Treonina		
T0	Generación parental de transformantes		
T1	Primera generación de transformantes		



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. SEÑALIZACIÓN POR OXÍGENO Y ÓXIDO NÍTRICO (NO) EN LAS RESPUESTAS A ESTRÉS ABIÓTICO EN PLANTAS

1.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

En el entorno natural, las plantas están continuamente expuestas a estreses abióticos como temperaturas extremas, estrés salino, sequía o inundaciones, y su frecuencia ha aumentado debido al cambio climático. Estos factores de estrés ambiental afectan negativamente al crecimiento, desarrollo y productividad de las plantas, lo cual supone un gran impacto en la agricultura provocando grandes pérdidas económicas a nivel mundial. Estas condiciones adversas alteran el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), acelerando su producción y acumulación hasta tal punto que causan estrés oxidativo (Chaki et al., 2020; Hasanuzzaman & Fujita, 2022).

Los principales orgánulos productores de ROS son los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas, aunque también pueden producirse en el apoplasto o por medio de oxidasas (Apel & Hirt, 2004; Corpas et al., 2015; Vranová et al., 2002). De hecho, la vida en presencia de oxígeno está íntimamente ligada a la producción de ROS, ya que son generadas como un subproducto de procesos energéticos tan esenciales como la fotosíntesis o la respiración (Van Breusegem & Dat, 2006). Las rutas metabólicas en los orgánulos son sensibles a los cambios en las condiciones ambientales, y tienen que alterarse para mantener un equilibrio constante entre la generación y el consumo de energía (Suzuki et al., 2012). Las alteraciones en el metabolismo del carbono y el balance energético en condiciones de estrés pueden ocurrir tanto en cloroplastos como en mitocondrias (Baxter et al., 2007; Takahashi & Murata, 2008), y se requiere una gran coordinación metabólica para mantener el flujo de energía entre estos orgánulos en todas las condiciones de crecimiento para evitar la generación excesiva de ROS y el daño oxidativo (Suzuki et al., 2012).

A pesar de que estos orgánulos tienen sistemas para controlar la producción de ROS, los cambios en su homeostasis son inevitables (Foyer & Noctor, 2005). Cuando el aumento en ROS es relativamente pequeño, su capacidad antioxidante es suficiente para restablecer el balance entre la producción y la eliminación de ROS, restableciendo así la homeostasis redox. Pero bajo condiciones de estrés, este equilibrio redox se ve perturbado y se acumula una mayor cantidad de ROS (Dat et al., 2000; Mittler et al., 2004; Polle, 2001). En estas condiciones, la tasa de fijación de carbono se ve limitada, lo que provoca un aumento de la fotoinhibición que dirige a los fotosistemas a la sobreproducción de superóxido y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Foyer & Noctor, 2005). De manera similar, durante la exposición al ozono, la entrada del gas a través de los estomas y su acumulación en el apoplasto da lugar a la generación y acumulación de

ROS, lo que produce lesiones similares a las de una respuesta hipersensible (Pellinen et al., 1999; Rao & Davis, 2001).

Para mantener el balance y la coordinación de estas actividades metabólicas, las células necesitan un control muy riguroso que incluye regulación redox de proteínas, fosforilación reversible de proteínas, activación de rutas de señalización por parte de genes de respuesta a ROS y regulación de las propias ROS mediante enzimas y moléculas antioxidantes (Chibani et al., 2010; Dietz, 2011; Foyer et al., 2009; Foyer & Noctor, 2009; Martí et al., 2009; Miller et al., 2010; Mittler et al., 2004; Noctor et al., 2007; Pfannschmidt et al., 2009). Los sistemas antioxidantes pueden ser enzimáticos y basados en la actividad de superóxido dismutasa (SOD), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), glutatión S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPX) y peroxidasa (PER), así como no enzimáticos basados en metabolitos como ascorbato, glutatión, tocoferoles, flavonoides, carotenoides y prolina (Hasanuzzaman et al., 2019, 2020; Wituszynska & Karpinski, 2013). Asimismo, estos desajustes pueden afectar al intercambio de señales entre cloroplastos y mitocondrias con el núcleo o inducir la activación de señales sistémicas (Karpinski et al., 1999; Woodson & Chory, 2008). La propagación de ROS de célula a célula como molécula señalizadora permite poner a la planta en situación de alerta, mejorando su aclimatación ante una situación de estrés. Una vez desencadenada la sobreproducción de ROS en una célula, se acumulan en el apoplasto y esta acumulación es percibida por las células vecinas, que a su vez aumentan su propia producción de ROS. De esta forma, las ROS pueden viajar por toda la planta durante la señalización sistémica, cambiando el estado de las diferentes células y tejidos vegetales de un estado de crecimiento y desarrollo normal a un estado de alerta por estrés, desencadenando así la inhibición del crecimiento y desarrollo, y dirigiendo recursos desde los procesos normales hacia el metabolismo relacionado con las respuestas a estrés, la aclimatación y la defensa (Devireddy et al., 2018; Fichman et al., 2019; Fichman & Mittler, 2020; Mittler et al., 2011; Suzuki et al., 2013; Zandalinas et al., 2019). Las ROS también funcionan como moléculas señalizadoras mediante la oxidación de residuos de cisteína en las proteínas mediada por el H_2O_2 , afectando a su estructura y función y regulando así rutas de señalización celular e iniciando la regulación redox (König et al., 2012; Mittler, 2017; Schieber & Chandel, 2014) de manera similar a la señalización mediada por peroxirredoxinas (PRX), tiorredoxinas (TRX) y glutarredoxinas (GRX) (König et al., 2012; Perkins et al., 2015). Las reacciones redox mediadas por estos componentes no solo permiten alterar la conformación y propiedades de las proteínas efectoras para regular directamente ciertos procesos celulares, sino también para la formación transitoria o permanente de complejos proteicos basados en la formación de puentes disulfuro intermoleculares (Arsova et al., 2010; Balmer et al., 2004; König et al., 2012; Muthuramalingam et al., 2009; Schwarz et al., 1997).

Cuando la concentración de ROS en la célula supera la capacidad de las enzimas antioxidantes y se perturba la homeostasis redox, ya se habla de estrés oxidativo (Chaki et al., 2020; Van Breusegem & Dat, 2006). Cuando el estrés oxidativo es de baja intensidad tiende a promover la adaptación de la planta al entorno adverso, pero cuando

se experimenta estrés de grado medio o alto tienden a inhibir el desarrollo y crecimiento o a provocar muerte celular, respectivamente. Las ROS que se generan, como el H_2O_2 , el oxígeno singlete (1O_2), los radicales superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^-), son extremadamente reactivas y tóxicas, y pueden desencadenar daños como la oxidación de proteínas, la peroxidación lipídica y roturas y mutaciones en el ADN (Chaki et al., 2020; Hasanuzzaman et al., 2020; Hasanuzzaman & Fujita, 2022).

No obstante, además de desencadenar respuestas a estrés, tal y como se resume en la figura 1, se ha demostrado también que las ROS desempeñan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por ejemplo, participan en la germinación, la floración, así como en el desarrollo del meristemo apical del tallo y la raíz, los pelos radiculares, los tubos polínicos, las hojas y las raíces laterales (Mittler, 2017; Noctor et al., 2018).

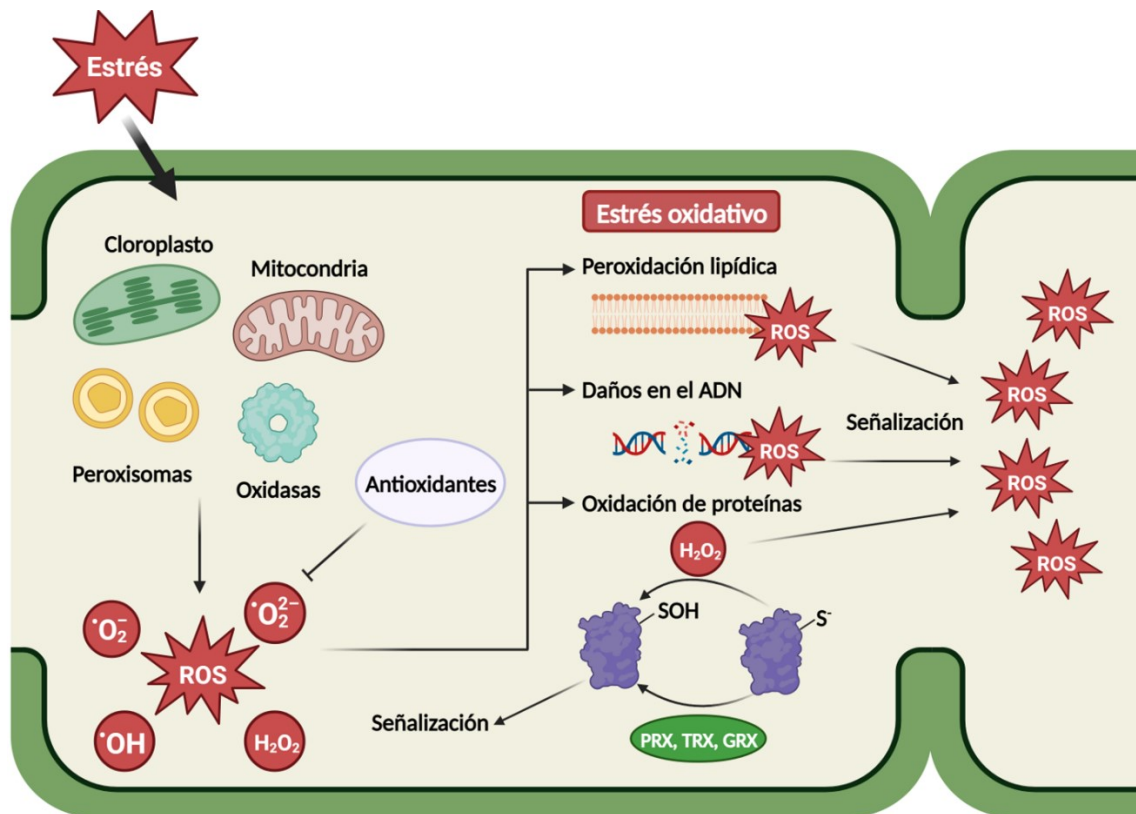


Figura 1. Modo de acción de ROS en la célula ante una situación de estrés. Cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y oxidasas aceleran la producción de ROS, alterando su homeostasis. Los distintos sistemas antioxidantes normalmente consiguen mitigar la sobreproducción de ROS, pero cuando ésta supera la capacidad antioxidante de la célula se genera estrés oxidativo, que provoca peroxidación lipídica, daños en el ADN y oxidación de proteínas. Esta situación de estrés lleva a la señalización sistémica célula a célula y a la señalización redox. Esta figura ha sido creada con BioRender.

1.2. ESTRÉS NITROSATIVO, ÓXIDO NÍTRICO (NO) Y ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO (RNS)

El óxido nítrico (NO) es una pequeña molécula gaseosa y un radical libre que desempeña roles clave en la fisiología de los organismos vivos. En mamíferos, juega un papel regulador en procesos como la neurotransmisión, la respuesta inflamatoria y las enfermedades cardiovasculares (Schmidt & Walter, 1994). En las plantas, el NO se considera una importante molécula señalizadora que regula múltiples procesos de desarrollo y fisiológicos (Domingos et al., 2015; Hancock, 2020). Por ejemplo, durante la polinización y el crecimiento del tubo polínico (Reichler et al., 2009; Šírová et al., 2011), la germinación de las semillas (Arc et al., 2013), el desarrollo de las raíces (Correa-Aragunde et al., 2004; Lombardo et al., 2006), o el control de la apertura estomática (Gayatri et al., 2013; Neill et al., 2008). También desempeña un papel fundamental en las respuestas a estrés en las plantas (Fancy et al., 2017). En mamíferos, se conoce perfectamente que el NO es sintetizado en su mayoría por las NO sintasas (NOS), percibido por las guanilato ciclasas (GC) y señalizado a través de múltiples vías (León & Costa-Broseta, 2020). Sin embargo, ni su biosíntesis, ni su percepción, ni sus mecanismos de señalización se conocen completamente en las plantas (Astier et al., 2018).

La síntesis de NO en las plantas se ve aumentada por el estrés, y se han descrito dos rutas principales para ello: reductora y oxidativa (Astier et al., 2018). La vía más estudiada es la reductora, que parte de nitrato (NO_3^-) que se reduce primero a nitrito (NO_2^-) y posteriormente a NO. La enzima que cataliza ambas reacciones de reducción es la nitrato reductasa (NR), de la cual existen dos isoformas en *Arabidopsis thaliana*: NIA1 y NIA2 (Cheng et al., 1991). Sin embargo, la NR es una enzima multifuncional fundamental para la asimilación y el metabolismo del nitrógeno, con lo que esta conversión de nitrito a NO solo ocurre en situaciones específicas, como de alta concentración de nitrito y baja concentración de nitrato o en entornos ácidos (Rockel et al., 2002; Yamasaki et al., 1999; Yamasaki & Sakihama, 2000). A pesar de ello, esta actividad secundaria de la NR resulta muy importante para la fisiología de las plantas (Astier et al., 2018). La reacción de síntesis de NO por la vía reductora también puede ser catalizada a partir de nitrito por nitrato reductasas formadoras de NO (NOFNiR) u otras enzimas dependientes de cofactor de molibdeno (Chamizo-Ampudia et al., 2016; Havemeyer et al., 2006); a través de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (mECT) (Gupta et al., 2005); o a partir de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) por la nitrito-óxido nítrico reductasa (Ni:NOR) (Stöhr et al., 2001; Stöhr & Ullrich, 2002). Todas estas reacciones alternativas a la NR solo pueden darse en condiciones anaeróbicas, lo cual evidencia que los niveles de O_2 determinan también la cantidad de NO sintetizado por la planta (León & Costa-Broseta, 2020).

Existen evidencias de que las plantas también podrían sintetizar NO mediante oxidación de manera similar a los mamíferos. Sin embargo, aún no se ha identificado la enzima responsable de la actividad similar a la NOS en plantas superiores (Jeandroz et al., 2016; Santolini et al., 2017; León & Costa-Broseta, 2020). Solo se ha descrito una enzima NOS hasta la fecha en el reino vegetal en algas (Foresi et al., 2015). Posteriormente, se han buscado en plantas superiores genes y proteínas con secuencias, motivos clave o

estructura tridimensional similares a las NOS (Hancock & Neill, 2019; Jeandroz et al., 2016). No obstante, los datos obtenidos llevan a pensar que no existen enzimas NOS en plantas superiores (León & Costa-Broseta, 2020).

Aunque la biosíntesis de NO genera cierta controversia, la forma en que las plantas perciben el NO es aún menos conocida. La percepción de NO en animales se realiza a través de GC solubles inducibles por NO que sintetizan el segundo mensajero guanósil monofosfato cíclico (GMPc) (Friebe & Koesling, 2003; Russwurm & Koesling, 2004). Sin embargo, la existencia de una vía de señalización NO-GMPc funcional en plantas es incierta (Astier et al., 2018). En ausencia de un receptor GC para NO, las plantas parecen detectarlo principalmente a través de la interacción química con metales cofactores o con residuos de aminoácidos de proteínas que experimentan modificaciones postraduccionales (PTMs) desencadenadas por el NO (Astier & Lindermayr, 2012). Hasta la fecha solo se ha descrito un mecanismo de percepción del NO basado en la degradación de factores de transcripción (FT) del grupo VII de la familia de los factores de respuesta a etileno (ERFVII) a través de un proceso proteolítico dependiente de la secuencia aminoterminal denominado ruta del N-degrón (Gibbs et al., 2014). Esta ruta proteolítica que se inicia con la eliminación del residuo de metionina N-terminal de los ERFVIIs por Metionina aminopeptidasas (MAPs), continua con la oxidación específica del residuo C2 que queda expuesto desde tiol a ácido sulfénico, en un proceso catalizado por cisteína oxidasas de plantas (PCOs) y que depende estrictamente de NO y el O₂ y que justifica el funcionamiento de este proceso como sensor de NO y O₂. Posteriormente, los ERFVII oxidados sufren procesos sucesivos de arginilación, poli-ubiquitinación, y degradación mediada por el proteasoma que resultan en el control de los niveles de ERFVII (Gibbs et al., 2014). Los ERFVII comprenden cinco proteínas: tres expresadas constitutivamente (RAP2.12, RAP2.2 y RAP2.3) y dos inducibles por hipoxia (HRE1 y HRE2). Esta ruta actúa como un sensor de NO y O₂ en las respuestas a condiciones de baja disponibilidad de O₂, así como sensor general de estrés abiótico (Gibbs et al., 2014; Pucciariello & Perata, 2017; Vicente et al., 2017). De hecho, esta proteólisis de los ERFVII solo ocurre en condiciones de normoxia, y se desactiva con niveles bajos de O₂ (Pucciariello & Perata, 2017), pero también depende de la producción de NO, ya que la degradación de los ERFVII en normoxia se bloquea cuando no se produce suficiente NO en la planta (Gibbs et al., 2014). En la figura 2 se representa con más detalle el funcionamiento de esta vía de señalización del NO.

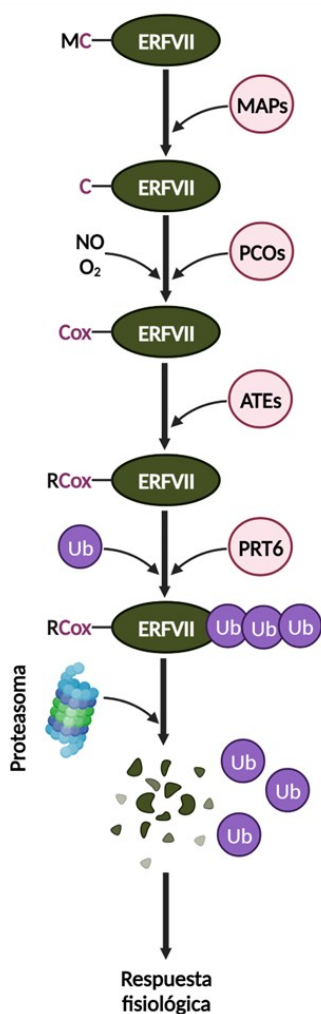


Figura 2. Señalización de NO basada en la degradación de los factores de transcripción ERFVII en la ruta de N-degrón. Primero, se elimina la metionina de los ERFVII por una MAP, exponiendo el residuo de cisteína desestabilizador a una oxidación específica y directa mediada por las PCOs, el NO y el O₂. Después, se transfiere una arginina al residuo N-terminal de los ERFVII por medio de las enzimas ATE, y esto supone una señal para la proteólisis 6 E3 ubiquitina ligasa (PRT6) para la ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma de los ERFVII (Gibbs et al., 2014; Weits et al., 2014). M, metionina; C, cisteína, Cox, cisteína oxidada; R, arginina; MAPs, metionina aminopeptidasas; PCOs, oxidación de cisteína de plantas; ATEs, arginiltransferasas; PRT6, proteólisis 6 E3 ubiquitina ligasa 6; Ub, ubiquitina. Esta figura ha sido creada usando BioRender.

Los niveles intracelulares de NO son el resultado del equilibrio entre la síntesis y la eliminación, que está controlada por varias enzimas. El NO puede reaccionar con el glutatión reducido (GSH) para formar glutatión S-nitrosilado (GSNO), que actúa como reservorio de NO y como donador para la nitrosilación de proteínas (Jahnová et al., 2019). Sin embargo, el GSNO no solo es un reservorio de NO, sino que ambas moléculas actúan conjuntamente en respuestas a estrés y desarrollo (Yun et al., 2016). Un mecanismo redox basado en la acción de TRX que reducen las proteínas S-nitrosiladas también afecta a la homeostasis de NO, ya que lo libera junto con la proteína no nitrosilada (Mata-Pérez & Spoel, 2019). El NO también puede eliminarse reaccionando con ROS dando lugar a otras especies reactivas de nitrógeno (*Reactive Nitrogen Species, RNS*) de entre las que es

especialmente relevante su reacción con el radical O_2^- para la formación de peroxinitrito ($ONOO^-$) (Vandelle and Delledonne, 2011; Gaupels et al., 2011). El NO puede reaccionar químicamente con oxígeno para formar nitrito y nitrato, y también puede regularse a través del ciclo de las fitoglobinas que pueden re-oxidar el NO hasta nitrato (Gupta et al., 2011; Igamberdiev et al., 2011; Trevisan et al., 2011).

El NO es un gasotransmisor y molécula señalizadora cuyo modo de acción más relevante se basa en la inducción de PTMs en las proteínas diana. Cuando el NO reacciona con proteínas puede alterar su actividad, su localización subcelular, su función, estructura o estabilidad, y cuando la proteína afectada es un FT, lo más probable es que se induzcan cambios en el transcriptoma (Grün et al., 2006; Palmieri et al., 2008; Castillo et al., 2018). Un estudio sobre el efecto de la S-nitrocisteína en el transcriptoma de *Arabidopsis* reveló alrededor de 700 FT potencialmente involucrados en múltiples procesos fisiológicos (Imran et al., 2018). La regulación ejercida por el NO se basa principalmente en PTMs directamente derivadas de NO como la S-nitrosilación de tioles y aminas, nitración de tirosina, triptófano y fenilalanina, o activadas secundariamente como la ubiquitinación de lisinas, la fosforilación de serina, treonina y tirosina, y la oxidación de tirosina y tioles (Gow et al., 2004; Hess & Stamler, 2012). Entre ellas, la S-nitrosilación de cisteínas y la nitración de tirosinas son las más estudiadas (Astier & Lindermayr, 2012). La S-nitrosilación es una modificación redox que consiste en la unión covalente reversible del NO al grupo tiol de un residuo de cisteína específico de una proteína diana (Astier et al., 2011). El GSNO parece ser uno de los principales donadores de la actividad transnitrosilasa en plantas (Wang et al., 2006; Yu et al., 2012). La nitración de residuos de tirosina de proteínas específicos, formando una 3-nitrotirosina (3-nitroY), es probablemente la principal reacción irreversible causada por agentes nitrantes como el $ONOO^-$ (Lozano-Juste et al., 2011; León & Costa-Broseta, 2020), y puede desencadenar cambios conformacionales que conducen a la activación o, más comúnmente, a la inhibición de las proteínas diana (Bayden et al., 2011). Las PTMs relacionadas con el NO y los cambios conformacionales correspondientes de las proteínas modificadas parecen promover su posterior poli-ubiquitinación y degradación por el proteasoma (Castillo et al., 2015), vinculando así el NO con esta vía de degradación. El NO también puede interactuar reversiblemente con los metales del centro hemo de las metaloproteínas para formar complejos metal-nitrosilo, induciendo cambios conformacionales que comprometen el funcionamiento de la proteína afectada (Astier & Lindermayr, 2012; Ford, 2010). Las fitoglobinas son las proteínas vegetales mejor caracterizadas sometidas a la nitrosilación de metales (Gupta et al., 2011). También se ha demostrado que la nitración de ácidos grasos por el NO forma parte de la señalización de NO en las plantas (Mata-Pérez et al., 2017).

Bajo condiciones de estrés, RNS y ROS pueden causar estrés nitrosativo y oxidativo, respectivamente. A menudo ambos tipos de estrés coinciden temporal y espacialmente en la planta dando lugar a condiciones de estrés nitro-oxidativo. ROS y RNS tienen una rigurosa interacción metabólica que regula las respuestas al estrés nitro-oxidativo en las plantas. Un buen ejemplo de la interacción entre RNS y ROS es la del radical O_2^- y el NO para generar $ONOO^-$, un potente agente nitrante que puede mediar en este caso la

nitrosación de tirosina en proteínas (Vandelle & Delledonne, 2011; Gaupels et al., 2011), lo que podría ser un buen biomarcador de estrés nitrosativo en plantas superiores (Corpas et al., 2007). Esta reacción entre NO y O_2^- para formar ONOO⁻, junto con el sistema de eliminación de ROS, determina la homeostasis de ROS y RNS, y las respuestas fisiológicas de desarrollo, metabólicas y defensivas (Molassiotis & Fotopoulos, 2011). Además, la expresión génica inducida por NO y ozono se superpone en gran medida en Arabidopsis (Ahlfors et al., 2009). Se ha demostrado experimentalmente que la aplicación exógena de NO y/o H_2O_2 afecta directamente a la nitrosilación y carbonilación de proteínas, lo que sugiere un vínculo entre la señalización oxidativa y nitrosativa y las PTMs (Jasid et al., 2008; Tanou et al., 2009). Dado que ROS y RNS señalizan diferentes procesos durante la vida de la planta, es esencial comprender bien la red oxidativa y nitrosativa en diferentes condiciones ambientales y descubrir nuevos componentes que participen en este sistema. El estrés nitro-oxidativo es común en muchos factores de estrés biótico y abiótico. Entre los factores de estrés abiótico, las condiciones ambientales provocadas por el cambio climático han alterado los regímenes de precipitaciones, aumentando los episodios de lluvias torrenciales que anegan e inundan los campos de cultivo. En estas condiciones las plantas primero son sometidas a condiciones de hipoxia y, más tarde cuando el agua se retira, a episodios de re-oxigenación que, entre otros efectos, provocan estrés nitro-oxidativo.

1.3. ESTRÉS POR HIPOXIA Y RE-OXIGENACIÓN EN PLANTAS

Durante las últimas décadas, el cambio climático ha provocado temperaturas extremas y también condiciones extremas relacionadas con el estrés hídrico como sequías e inundaciones. Estas inundaciones provocadas por la alteración de los regímenes de lluvia debido al cambio climático suponen un gran problema para la agricultura. Tal como se esquematiza en la Figura 3, los efectos pueden ser diferentes dependiendo de cómo se dé la inundación, afectando solo a las raíces (anegamiento) o también a las partes aéreas de la planta (inmersión parcial o completa) (Sasidharan et al., 2017). Cuando las plantas están anegadas y no pueden respirar debido al exceso de agua en el suelo, la absorción de nutrientes a través de las raíces, la conductancia de los estomas, y la asimilación de dióxido de carbono (CO_2) en la parte aérea de la planta, se reducen (Jethva et al., 2022). En las plantas inundadas, la disminución de O_2 debida a su menor disponibilidad en el agua en comparación con el aire limita su crecimiento y provoca daño celular (León et al., 2021). Estos efectos aumentan conforme más tiempo se encuentran las plantas sumergidas y con las altas temperaturas, ya que el consumo de O_2 debido a la respiración de la planta aumenta (Deutsch et al., 2015). Además, el estado de desarrollo en el que se encuentren las plantas sumergidas es crítico para el grado de daño, ya que las transiciones en el desarrollo como por ejemplo la germinación de las semillas, el crecimiento post-germinativo, o la floración, son notablemente más sensibles a la baja disponibilidad de O_2 (Considine et al., 2017; Le Gac & Laux, 2019).

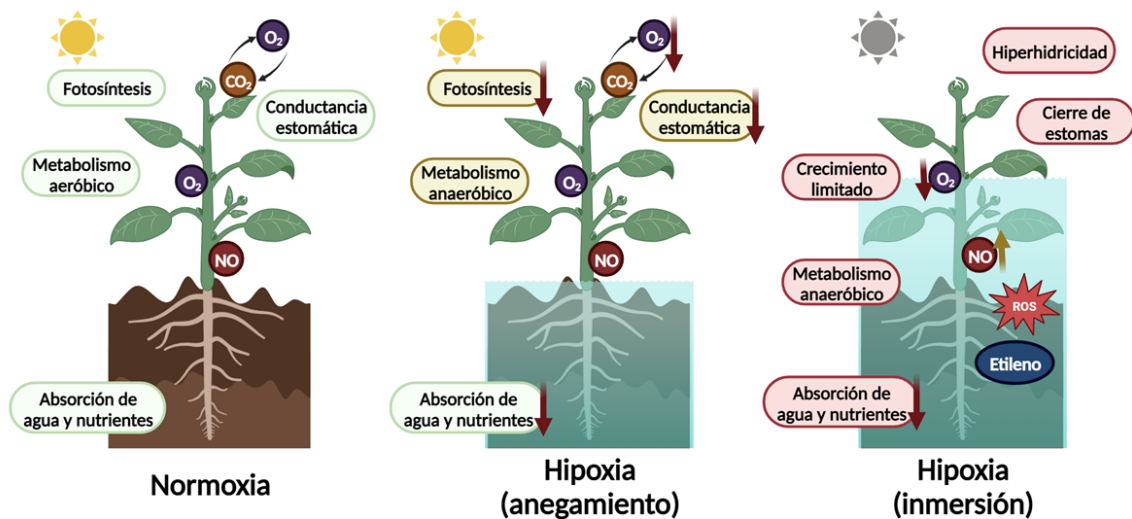


Figura 3. Hipoxia en la naturaleza debido a una situación de anegamiento o inmersión completa por inundación. Cuando las plantas están anegadas debido a un exceso de agua en el suelo se pasa de un metabolismo aeróbico a metabolismo anaeróbico, la absorción de agua y nutrientes por parte de las raíces se ve reducida, junto con la fotosíntesis, la conductancia estomática, y el intercambio de gases en la parte aérea de la planta. La inmersión completa provoca hiperhidricidad, cierre estomático, inhibición del intercambio de gases y mantiene a la planta en condiciones reducidas de luz y con metabolismo anaeróbico, lo cual limita su crecimiento. La señalización por los bajos niveles de O_2 provoca también aumento del NO , etileno y especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta figura ha sido creada usando BioRender.

Los episodios de hipoxia experimentados por los seres vivos son siempre transitorios o intermitentes, y luego sufren un proceso de re-oxigenación que los devuelve a las condiciones normales de O_2 (León et al., 2021). Aunque esto ha sido ampliamente estudiado en modelos animales, se sabe mucho menos sobre esta transición en plantas. Debido a su naturaleza sésil, las plantas han desarrollado estrategias que les permiten sobrevivir en condiciones de inmersión después de intensas lluvias (Phukan et al., 2016), y también perciben la transición de la hipoxia a la normoxia, cuando el agua deja de cubrir las plantas (Tamang & Fukao, 2015). El estrés que sufren las plantas durante la re-oxigenación causa fotoinhibición y una generación excesiva de ROS y RNS , lo cual conduce al daño celular (Jethva et al., 2022). Aunque se han realizado muchos estudios en plantas durante la hipoxia, se sabe mucho menos sobre los eventos fisiológicos y moleculares que ocurren durante la re-oxigenación tras la hipoxia (León et al., 2021).

Las plantas también experimentan hipoxia durante el desarrollo, sin necesidad de encontrarse en situaciones de estrés. Aunque la hipoxia inducida por estrés se ha estudiado mucho más que la respuesta a la hipoxia relacionada con el desarrollo, esta baja disponibilidad de O_2 es una señal importante en procesos como la meiosis (Kelliher & Walbot, 2012), la germinación de semillas (Gibbs et al., 2014), y la fotomorfogénesis (Abbas et al., 2015). También parece ser importante en la regulación de las transiciones en el desarrollo preservando la integridad del genoma y manteniendo la quiescencia en las zonas meristemáticas (Considine et al., 2017). Las células proliferativas e indiferenciadas de los meristemas actúan en nichos permanentemente hipóxicos en los

cuales la disponibilidad de O₂ determina el crecimiento activo (Weits et al., 2021). Por ejemplo, la señalización dependiente de O₂ parece controlar el momento de la brotación en la vid (Meitha et al., 2018). Además, la hipoxia también es una condición natural en algunos tejidos u órganos de almacenamiento en las plantas, como los frutos (Cukrov, 2018; Rolletschek, 2002; Xiao et al., 2018), la punta y la estela de la raíz (Armstrong & Beckett, 1987; Gibbs et al., 1998), o las semillas de algunas especies (Al-Ani et al., 1985; Raymond et al., 1985). Se ha planteado que la señalización desde nichos hipóxicos hacia los tejidos circundantes es necesaria para alcanzar la tolerancia inducida por la aclimatación del órgano o de toda la planta a la hipoxia (Armstrong et al., 2019).

Las plantas responden al estrés por hipoxia sobre todo a través de dos estrategias alternativas: la estrategia de escape, que promueve el crecimiento de ciertos órganos para escapar de la condición de inmersión y alcanzar un estado de normoxia, y la estrategia de quiescencia, que consiste en ralentizar el crecimiento y así ahorrar recursos metabólicos, lo que resulta útil cuando el estrés es persistente (Nakamura & Noguchi, 2020). En plantas de arroz parcialmente sumergidas, la estrategia de escape requiere una reprogramación metabólica que implica el metabolismo central del carbono y aminoácidos (Fukushima et al., 2020). Las plantas brasicáceas (Brassicaceae) enfrentan eficazmente la crisis energética causada por el estrés por hipoxia controlando rigurosamente su metabolismo energético, mejorando así su tolerancia y adaptación (Hwang et al., 2020). Por tanto, las plantas han desarrollado adaptaciones fisiológicas y morfológicas que permiten su supervivencia en condiciones de bajo nivel de O₂ (Jethva et al., 2022). Las adaptaciones morfológicas incluyen la formación de raíces laterales, aerénquima radicular o raíces adventicias, y elongación de internodo o peciolo, todas ellas dirigidas a restablecer el intercambio de gases (Fukao & Bailey-Serres, 2004). A nivel fisiológico, las limitaciones en la disponibilidad de O₂ conducen a la activación del metabolismo anaeróbico, en el cual el suministro de adenosina trifosfato (ATP) y nicotinamida adenina dinucleótido oxidado (NAD⁺) depende únicamente de la fermentación glucolítica, siendo además el contenido de ATP celular extremadamente bajo en estas condiciones (Bailey-Serres & Voeselek, 2008; Jethva et al., 2022). La reprogramación del metabolismo de la planta en hipoxia conduce finalmente a la acidificación celular y a la acumulación de equivalentes de reducción, causando una generación excesiva de ROS y RNS que pueden provocar daño celular (Hebelstrup & Møller, 2015). Para prevenir el daño celular en condiciones de hipoxia, las células vegetales ejecutan diversas respuestas a estrés que incluyen la reorientación metabólica, la regulación hormonal, cambios en la biogénesis mitocondrial, y la reprogramación de la expresión génica (Jethva et al., 2022). Esto último incluye la sobreexpresión de genes necesarios para satisfacer la demanda energética de la célula a través de la glucólisis fermentativa, como por ejemplo la alcohol deshidrogenasa (ADH) y la piruvato descarboxilasa (PDC), mientras que se inicia la disminución de la transcripción de genes asociados con vías que consumen ATP, como el metabolismo de lípidos, el metabolismo secundario, y el transporte, señalización y regulación redox. Durante la glucólisis fermentativa, la ADH, PDC y la lactato deshidrogenasa (LDH) median la acumulación de etanol y lactato (Jethva et al., 2022). Por tanto, en condiciones de bajo nivel de O₂, se

observa un aumento en la expresión y actividad de estas proteínas, así como acumulación de etanol, lo que las ha convertido en buenos y muy utilizados marcadores de la respuesta a la hipoxia en las plantas (Jethva et al., 2022; León et al., 2021).

La disponibilidad de O₂ es determinante para el metabolismo de todos los seres vivos. De hecho, se ha propuesto recientemente que el O₂, en lugar de la glucosa, el NADPH o el ATP, es la molécula que proporciona mayor energía en animales y plantas y es crucial para mantener formas de vida complejas (Schmidt-Rohr, 2020). La respiración de las plantas se ve afectada dramáticamente por la disminución de O₂, ya que es el aceptor final de electrones de la mETC (Gibbs & Greenway, 2003). Las mitocondrias dirigen cambios a nivel transcriptómico, proteómico, metabolómico y de actividad enzimática no solo durante la hipoxia, sino también durante la re-oxigenación (Shingaki-Wells et al., 2014). Existe un mecanismo de homeostasis que detecta la falta de azúcar, reduce la transcripción desencadenada por la hipoxia para reducir el consumo de energía y preservar las reservas de carbono para el crecimiento cuando se vuelve a la normoxia (Cho et al., 2021). Bajo condiciones hipóxicas, se produce una acumulación de ROS en las mitocondrias, que pueden cruzar la membrana mitocondrial y liberarse al citosol (Hamanaka & Chandel, 2009), y en el apoplasto por medio de las NADPH oxidasas (Sagi & Fluhr, 2006). Las mitocondrias actúan en la generación de NO en hipoxia, pero también son diana de las acciones reguladoras del NO (Igamberdiev et al., 2014). En hipoxia, el NO, tal y como se ha descrito anteriormente, puede ser sintetizado como resultado de una reacción secundaria de la actividad de la nitrato reductasa en el citoplasma (Chamizo-Ampudia et al., 2017; León & Costa-Broseta, 2020; Lozano-Juste & León, 2010), o como un subproducto de la mETC (Gupta & Igamberdiev, 2011; León & Costa-Broseta, 2020). Sin embargo, los niveles reales de NO dentro de las células no solo están controlados por la disponibilidad de O₂ (Pucciariello & Perata, 2017), sino que también se reducen significativamente por sequestradores de NO. Entre ellos se encuentran las fitoglobinas, que modulan las respuestas a la hipoxia reguladas por NO y también funcionan como un sistema de ahorro energético en condiciones limitadas de O₂ (Vishwakarma et al., 2018). La sobreexpresión de las fitoglobinas atenúa las respuestas de las plantas a las condiciones de hipoxia y anoxia (Andrzejczak et al., 2020; Cochrane et al., 2017; Fukudome et al., 2019). La hipoxia, además de provocar la inhibición de la exportación de azúcares y la asimilación de nitrógeno, también conduce a una disminución en la tasa fotosintética, provocada por la disminución en la conductancia estomática, la reducción del área foliar, y menor contenido de clorofila (Jethva et al., 2022).

Se conocen ya varias rutas de señalización que participan en las respuestas desencadenadas por la hipoxia o la anoxia, y en ellas están involucradas la elevación de las concentraciones de Ca²⁺ citosólico (Igamberdiev & Hill, 2018), el etileno (Voeselek & Sasidharan, 2013), el NO (Pucciariello & Perata, 2017), y la acumulación de ROS y RNS (Hebelstrup & Møller, 2015; Pucciariello & Perata, 2017). Los pulsos de Ca²⁺ que se generan y se propagan durante la hipoxia permiten la activación de varias enzimas y genes que contribuyen en respuestas adaptativas a nivel celular, de tejido y de planta (Shabala et al., 2014; Wang et al., 2016). Por ejemplo, el Ca²⁺ participa en la activación de

la glutamato descarboxilasa que inicia la vía del ácido γ -aminobutírico (GABA) (Jethva et al., 2022). Además, el Ca^{2+} inicia la transcripción de ADH y PDC, ambos involucrados en la fermentación (Subbaiah et al., 1994). Otro aspecto importante es que las ROS son capaces de activar los canales de Ca^{2+} ubicados en la membrana plasmática (Hedrich, 2012). Una de las rutas de señalización más importantes y estudiadas es la ruta del N-degrón (Gibbs et al., 2014). Esta ruta proteolítica consiste en la degradación por el proteasoma de los ERFVII, tal y como se ha descrito anteriormente (Fig. 2). Sin embargo, esta degradación de los FT ERFVII se produce en condiciones de normoxia gracias a la percepción del NO y el O_2 (Gibbs et al., 2014). Cuando hay escasez de O_2 , las cisteínas no se oxidan y los ERFVII se estabilizan, viajan al núcleo e inducen la transcripción de genes de respuesta a la hipoxia, algunos de los cuales codifican enzimas del metabolismo anaeróbico (Pucciariello & Perata, 2017). Además, el etileno que se forma en hipoxia promueve también la estabilización de los ERFVII (Hartman et al., 2019). En *Arabidopsis*, RAP2.12 y RAP2.2 son los dos ERFVII que activan de manera redundante el núcleo central de la respuesta anaeróbica (Bui et al., 2015). RAP2.12, en concreto, se encuentra almacenado en la membrana plasmática, y la disminución de los niveles de O_2 y ATP provoca su liberación y translocación al núcleo (Schmidt & van Dongen, 2019). Los ERFVII pueden interactuar con otros ERFVII o con otros FT para regular la expresión génica en respuesta a la hipoxia. La proteína LBD41 (*LOB domain-containing protein 41*) funciona como un represor transcripcional en *Arabidopsis*, y su expresión se induce muy significativamente en respuesta a hipoxia por medio de los ERFVII (Jethva et al., 2022; Mustroph et al., 2009).

Tal como se resume en la Figura 4, además de los ERFVII, hay otras familias de FT que participan en la reprogramación transcripcional bajo hipoxia, como los factores NAM/ATAF/CUC (NAC), WRKY, *Heat Shock Factor* (HSF) y MYB (Banti et al., 2010; Bui et al., 2020; Jethva et al., 2022; Klecker et al., 2014; Tang et al., 2021). Un estudio reciente en *Arabidopsis* reveló que WRKY33 y WRKY12 actúan aguas arriba de la expresión génica dependiente de ERFVII en hipoxia, y activan la expresión de *RAP2.12* (Tang et al., 2021). Los FT NAC localizados en el retículo endoplasmático, como ANAC017 y ANAC013, facilitan la señalización retrógrada mitocondrial para inducir la expresión génica (De Clercq et al., 2013; Ng et al., 2013). En concreto ANAC017 induce la transcripción de los genes de *WRKY40* y *WRKY45* (Meng et al., 2020). En la señalización por hipoxia mediada por el cloroplasto cabe destacar el papel de PHR1 (*Phosphate starvation response 1*), que se activa en respuesta a hipoxia tras la disminución de la fotosíntesis y regula principalmente genes relacionados con galactolípidos (Klecker et al., 2014).

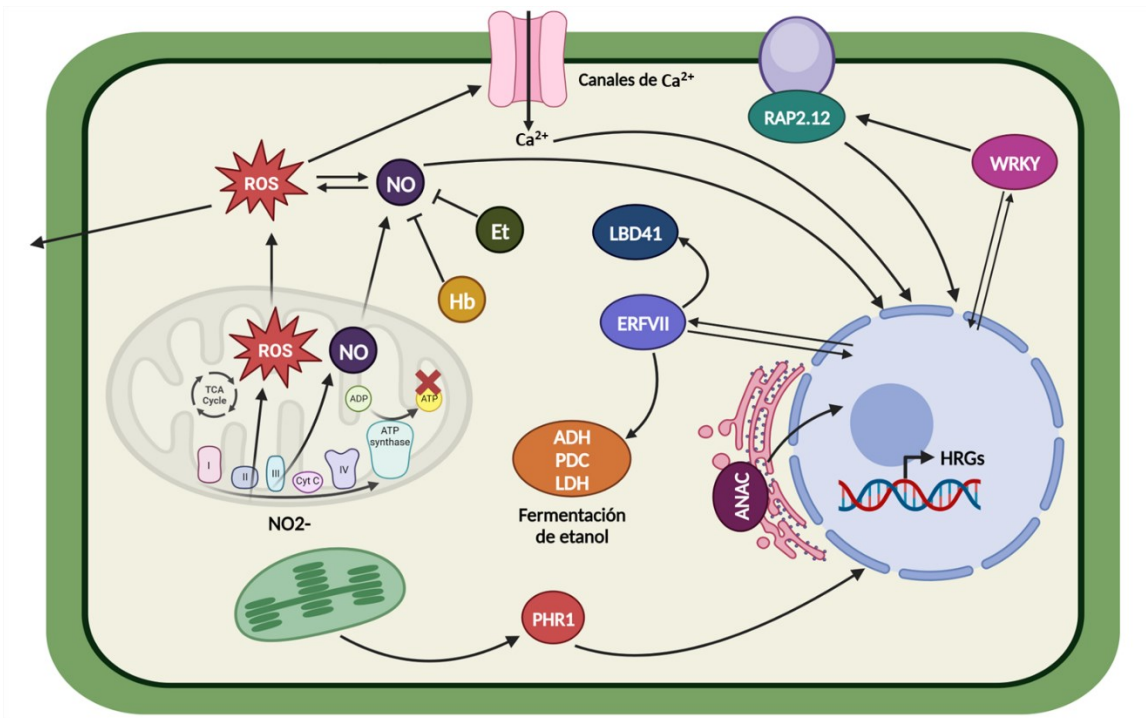


Figura 4. Mecanismos de la célula en respuesta al estrés por hipoxia. La mitocondria genera ROS y NO que pueden ser transportados al citosol y al apoplasto para regular las respuestas a la hipoxia. La señalización al núcleo ejercida por ROS, el NO, el Ca²⁺, los ERFVII y otros FT (WRKYs, ANACs, MYBs como PHR1) provocan la transcripción de genes de respuesta a hipoxia (HRGs), como los que codifican para LBD41, o para ADH, PDC y LDH que contribuyen al cambio a un metabolismo anaeróbico basado en la fermentación del etanol. A su vez, las ROS controlan los canales de Ca²⁺, los niveles de NO intracelular son mitigados por la acción de fitoglobinas (Hb) y etileno (Et) y los bajos niveles de ATP promueven la liberación de RAP2.12 de la membrana para su traslocación al núcleo. El conjunto de estos mecanismos permite la supervivencia de la célula y, por tanto, de la planta. Esta figura ha sido creada con BioRender.

Normalmente, en la naturaleza, después del periodo de hipoxia sucede un periodo de reexposición a la normoxia que para las plantas supone un estrés que puede ser tan o incluso más grave que el provocado por la deficiencia de O₂ (Yeung et al., 2019). La re-oxigenación restaura el metabolismo aeróbico en las células vegetales para satisfacer la alta demanda de energía. Sin embargo, la actividad acelerada de la respiración mitocondrial estimula la generación excesiva de ROS (Garczarska et al., 2004; Jethva et al., 2022; Pavelic et al., 2000). Esta gran acumulación de ROS es un efecto combinado del aumento en su generación debido a una mayor presión de electrones en las cadenas de transporte electrónico de cloroplastos y mitocondrias, y de la reducción de la capacidad de eliminación de ROS (Jethva et al., 2022). Por tanto, los daños generados tras la hipoxia están principalmente asociados con el estrés oxidativo, que lleva a la oxidación de membranas, proteínas, ADN y carbohidratos (Blokhina et al., 2000; Jethva et al., 2022). Además de un aumento repentino en la concentración de O₂, también se produce durante la re-oxigenación un aumento de la intensidad de luz que puede provocar daños en el fotosistema II (PSII) (Pospíšil, 2009). Por otra parte, también se produce una disminución en la conductividad del agua y estrés por deshidratación, ya que las raíces pierden capacidad para absorber agua (Fukao et al., 2011). Por lo tanto, el cierre de

estomas mediado por ABA juega un papel importante para prevenir la pérdida de agua por transpiración en las hojas durante la re-oxigenación (Alpuerto et al., 2016; Yeung et al., 2018). Otros factores que afectan a la planta durante la re-oxigenación son la acumulación de compuestos tóxicos que provocan peroxidación lipídica, y la senescencia (Blokhina et al., 2000; Jethva et al., 2022). Por lo tanto, entre las estrategias de supervivencia de las plantas durante la recuperación de la anoxia o hipoxia están la inducción de eliminadores de ROS, enzimas antioxidantes y genes de respuesta a sequía para superar el estrés oxidativo y la deshidratación. También se requiere la interacción balanceada entre las fitohormonas ácido jasmónico (JA) y etileno (Jethva et al., 2022). Sin embargo, hasta ahora se han realizado muy pocas investigaciones sobre la adaptación a la fase de re-oxigenación, en comparación con la fase de hipoxia o anoxia, y es necesario ampliar el conocimiento para en un futuro poder dirigir una recuperación más eficiente después de situaciones de inundación. La identificación de genes que se induzcan por hipoxia y que además estén co-regulados por NO y estrés oxidativo podría ser la clave para identificar factores reguladores decisivos en la interfase entre el estrés por hipoxia y el estrés por re-oxigenación.

2. PROTEÍNAS CON DOMINIO VALINA-GLUTAMINA (VQ) EN PLANTAS

Las proteínas con dominio valina-glutamina (VQ) son un grupo de proteínas que contienen el motivo FxxxVQxxTG, cuyo núcleo central está compuesto por los aminoácidos valina y glutamina y que da nombre a la familia de proteínas VQ (Cheng et al., 2012; Xie et al., 2010). Este grupo proteico fue identificado por primera vez en *Arabidopsis*, en la que se identificó una familia multigénica de 34 miembros (Cheng et al., 2012; Morikawa et al., 2002; Xie et al., 2010), que se pueden clasificar en diez grupos por homología de secuencia (Jing & Lin, 2015) (Fig. 5). Posteriormente, se han identificado en muchas otras especies de plantas como arroz (Kim et al., 2013; Li et al., 2021a), soja (Wang et al., 2014, 2019; Zhou et al., 2016), vid (Wang et al., 2015b), col china (Zhang et al., 2015), maíz (Song et al., 2016), plátano (Ye et al., 2016), bambú (Wang et al., 2017), fresa (Garrido-Gala et al., 2019; Zhong et al., 2018), manzana (Dong et al., 2018), planta de té (Guo et al., 2018), eucalipto (Yan et al., 2019), tabaco (Liu et al., 2020), leguminosas (Ling et al., 2020) y trigo (Zhang et al., 2022a). El tamaño de las familias de proteínas VQ varía desde siete miembros identificados en *Selaginella moellendorffii* hasta 74 en *Glycine max* (Jiang et al., 2018). La mayoría de los genes de la familia VQ en las diferentes especies de plantas no tienen intrones y codifican proteínas relativamente pequeñas con menos de 300 aminoácidos (Yuan et al., 2021). Solo se han encontrado tres genes VQ que codifican proteínas de más de 1000 aminoácidos, que son *OsVQ34* en arroz, y *PeVQ13* y *PeVQ48* en bambú (Kim et al., 2013; Wang et al., 2017). La proteína más pequeña es *ZmVQ27* en maíz, con solo 61 aminoácidos (Song et al., 2016). Aunque inicialmente se pensaba que las proteínas VQ solo estaban presentes en plantas (Jing & Lin, 2015), posteriormente se han identificado también en genomas de bacterias, hongos y animales inferiores, pero no en algas (Jiang et al., 2018).

En este grupo de proteínas, la integridad del motivo VQ parece ser esencial para ejercer su actividad reguladora, como ya se ha comprobado por ejemplo para VQ4/MVQ1 y VQ29 (Li et al., 2014b; Weyhe et al., 2014), probablemente porque su regulación a menudo depende de la interacción con FT como los WRKY (Cheng et al., 2012). Además, esta interacción funcional entre proteínas VQ y FT WRKY a veces está regulada por fosforilación reversible catalizada por quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas) (Pecher et al., 2014; Weyhe et al., 2014). La mayoría de las proteínas VQ poseen actividad transcripcional, actuando como activadoras o represoras (Li et al., 2014a). De las proteínas VQ de *Arabidopsis*, solo cinco de ellas no mostraron esta actividad transcripcional: VQ1, VQ10, VQ25, VQ22 y VQ27 (Li et al., 2014a).

Una característica muy importante pero todavía poco estudiada de las proteínas VQ es su localización subcelular. Según análisis *in silico*, estas proteínas tendrían una localización predominantemente nuclear. Sin embargo, otras proteínas VQ podrían localizarse, además de en el núcleo, en los cloroplastos, en las mitocondrias o en el citoplasma (Cheng et al., 2012; Guo et al., 2018; Jing & Lin, 2015; Kim et al., 2013).

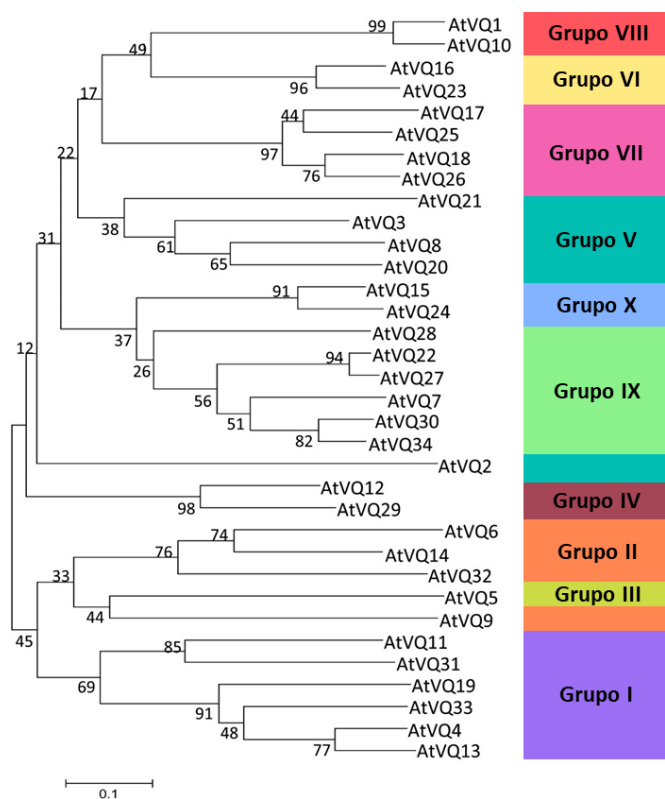


Figura 5. Árbol filogenético de la familia de proteínas VQ en *Arabidopsis thaliana*. La familia de proteínas VQ está compuesta por 34 miembros, y su clasificación en diez grupos por homología de secuencia según Jing & Lin (2015). El árbol fue adaptado de Cheng et al. (2012).

Las proteínas VQ tienen funciones reguladoras muy diversas, incluyendo defensa contra estreses bióticos (Chen et al., 2018; Jiang & Yu, 2016; Lai et al., 2011; Wang et al., 2015a; Xie et al., 2010; Yan et al., 2018) y abióticos (Cheng et al., 2020; Hu et al., 2013b; Perruc

et al., 2004; Song et al., 2016), y procesos de desarrollo (Lei et al., 2017; Li et al., 2014b; Pan et al., 2018; Wang et al., 2010). Sin embargo, la mayoría de sus funciones en plantas siguen sin conocerse. En los siguientes apartados se describirán las funciones de las diferentes proteínas VQ conocidas hasta la fecha, muchas veces en asociación funcional con factores WRKY, tanto en el desarrollo y crecimiento de la planta como en las respuestas a diferentes tipos de estrés, para intentar comprender el modo de acción de este grupo de proteínas y descubrir posibles nuevas funciones.

2.1. PROTEÍNAS VQ EN LA REGULACIÓN DEL DESARROLLO

Las proteínas VQ regulan procesos de desarrollo a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta, como la germinación de la semilla o del polen, el tamaño de la planta, la fotomorfogénesis y la senescencia foliar. En la primera fase del ciclo de vida de la planta, que es la germinación y el desarrollo de la semilla, HAIKU1/VQ14 ha sido caracterizada como un componente de la llamada ruta HAIKU, que controla la primera fase de crecimiento del endospermo de la semilla (García et al., 2003), promoviéndolo (Wang et al., 2010).

Posteriormente, tanto en la regulación del crecimiento vegetativo como en procesos reproductivos como la floración o la germinación del polen, también participan algunas de las proteínas VQ. La proteína VQ8, que va dirigida al cloroplasto, es importante en la regulación del crecimiento, ya que el mutante *vq8-1* muestra retraso en el crecimiento y hojas de color verde pálido durante todo su ciclo de vida (Cheng et al., 2012). La sobreexpresión de *VQ17*, *VQ18* o *VQ22* también provoca un mal desarrollo en las plantas (Cheng et al., 2012), lo cual sugiere que las proteínas VQ pueden promover o reprimir el desarrollo. VQ29 se ha visto que funciona como un regulador negativo de la fotomorfogénesis (Li et al., 2014b). Por otra parte, la expresión heteróloga de *VQ21* de *Arabidopsis* o la sobreexpresión de *VQ29* retrasan el tiempo de floración, alterando o sin alterar el crecimiento vegetativo, respectivamente (Cheng et al., 2012; Gargul et al., 2015), lo cual sugiere que las funciones específicas de los genes *VQ* también pueden desajustar otros procesos de desarrollo. Además, la sobreexpresión heteróloga de algunos genes *VQ* de soja en *Arabidopsis* conlleva alteración de la morfología de las hojas, de la floración y del establecimiento de las semillas (Zhou et al., 2016), lo que indica que las funciones reguladoras del desarrollo de las proteínas VQ estarían conservadas entre especies. VQ20 regula el desarrollo del polen actuando junto con WRKY2 y WRKY34 en un proceso que depende del motivo VQ (Lei et al., 2017), mediante la regulación negativa de la expresión de *MYB97*, *MYB101* y *MYB120* (Lei et al., 2018).

Cuando el ciclo de vida de la planta está llegando a su fin y comienza el proceso de senescencia, las proteínas VQ también podrían estar actuando en la regulación, ya que la sobreexpresión del gen de maíz *ZmVQ52* en *Arabidopsis* acelera la senescencia foliar (Yu et al., 2019).

Algunos de los procesos relacionados con el desarrollo de la planta que están regulados por las proteínas VQ están también relacionados con fitohormonas. Por ejemplo, en

arroz, OsVQ13 regula positivamente la señalización de JA activando la ruta de señalización de OsMPK6-OsWRKY45, que regula el tamaño del grano y la resistencia a *Xanthomonas* (Uji et al., 2019). Por otro lado, VQ18 y VQ26 controlan la germinación de semillas en *Arabidopsis* regulando negativamente la señalización de ABA mediada por ABI5 (*ABA insensitive 5*) (Pan et al., 2018). Sin embargo, ni la dormancia de las semillas, ni la senescencia foliar, ni la tolerancia a la sequía regulada por ABA están reguladas por VQ18 y VQ26 (Pan et al., 2018), lo cual es indicativo de una regulación muy específica.

En la figura 6 se resumen los procesos conocidos en los que están involucradas las proteínas VQ y los FT WRKY como reguladores de diferentes procesos durante todo el ciclo de vida de la planta.

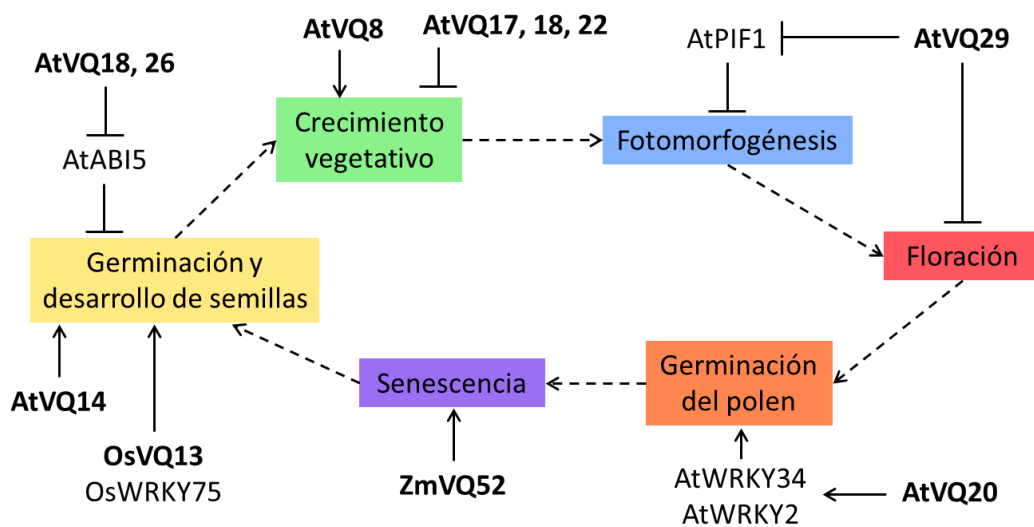


Figura 6. Participación de las proteínas VQ y los factores de transcripción WRKY en procesos de desarrollo a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta. Las proteínas VQ o WRKY de diferentes especies de plantas (*At*, *Arabidopsis thaliana*; *Os*, *Oryza sativa*; *Zm*, *Zea mays*) pueden llevar a cabo una regulación positiva (líneas de flechas) o negativa (líneas con extremos romos).

2.2. PROTEÍNAS VQ EN LA DEFENSA CONTRA PATÓGENOS Y PLAGAS

Durante la última década, en diversas publicaciones se ha mostrado la función de las proteínas VQ como reguladores importantes en la defensa contra patógenos y plagas en plantas. La primera de ellas identificó a SIB1/VQ23 como un activador de la resistencia a *Pseudomonas syringae* mediada por ácido salicílico (SA) y JA (Xie et al., 2010). Esta proteína, junto con SIB2/VQ16, WRKY33 y WRKY57 también activa la resistencia contra el patógeno necrótrofo *Botrytis cinerea* a través de las proteínas JAZ1 y JAZ5 (Jiang & Yu, 2016; Lai et al., 2011). Por el contrario, VQ20 actúa como regulador negativo de la resistencia contra patógenos tanto biótrosos como necrótrofos (Cheng et al., 2012). MKS1/VQ21, en cambio, regula positivamente la defensa contra patógenos biótrosos mediada por SA, pero actúa de forma negativa en la defensa contra patógenos

necrótrofos regulada por JA (Andreasson et al., 2005; Petersen et al., 2010). La regulación de la resistencia a *Botrytis* por parte de VQ21 también requiere la interacción con WRKY33 a través del motivo VQ (Petersen et al., 2010). Los distintos complejos VQ-WRKY no solo permiten a la planta diferenciar varios patógenos, sino también diferenciar entre defensa y desarrollo. El silenciamiento del gen JAV1/VQ22 aumenta significativamente la respuesta regulada por JA ante patógenos necrótrofos e insectos formando complejos con WRKY28 y WRKY51, pero no altera el desarrollo dependiente de JA (Hu et al., 2013a). También se ha descrito que plantas con pérdida de función de los genes *VQ12* y *VQ29* son resistentes a *Botrytis*, mientras que plantas que sobreexpresan *VQ12* y *VQ29* son susceptibles (Wang et al., 2015a), lo cual sugiere que estas dos proteínas podrían ser reguladores negativos de la defensa contra *Botrytis*. Además, la inactivación de *VQ29* aumentó significativamente la susceptibilidad de la planta ante *Peronospora parasitica* durante las últimas etapas de la infección (Le Berre et al., 2017). Existen otras combinaciones de complejos VQ-WRKY involucradas también en regular la resistencia contra *Botrytis*. VQ10 interacciona directamente con WRKY8 y regulan positivamente la resistencia basal de la planta (Chen et al., 2018). En tabaco, la mitad de los 59 genes *VQ* identificados fueron inducidos significativamente en respuesta a la infección de *Ralstonia solanacearum* (Liu et al., 2020), y en fresa, las proteínas homólogas de las proteínas de defensa VQ de *Arabidopsis* están reguladas en respuesta a la infección del hongo ascomiceto *Colletotrichum acutatum* (Garrido-Gala et al., 2019).

Los roles de las proteínas VQ en las respuestas defensivas de las plantas probablemente se deben a su capacidad para interactuar con múltiples FT WRKY, que en *Arabidopsis* están regulados por la fosforilación mediada por MAP quinasa y la posterior degradación de las proteínas VQ (Pecher et al., 2014; Weyhe et al., 2014). También parece haber mecanismos reguladores similares en arroz (Li et al., 2014a) y en cucurbitáceas (Jiao et al., 2018). En conjunto, la participación de las proteínas VQ en la regulación de la defensa contra patógenos es compleja y específica, probablemente a través de mecanismos combinatorios que involucran otras proteínas y también a través de la interacción funcional con diversas rutas hormonales. Estos mecanismos parecen funcionar también en plantas atacadas por insectos. La herida desencadena rápidamente la entrada de calcio, la fosforilación dependiente de calmodulina de JAV1/VQ22, el desmantelamiento del complejo JAV1-JAZ8-WRKY51 y la activación de la biosíntesis de JA para la defensa de la planta (Yan et al., 2018). En soja, la represión de *GmVQ58* confiere resistencia al gusano *Spodoptera litura* Fabricius (Li et al., 2020).

En resumen, hay un conjunto de proteínas VQ que pueden regular diferentes patosistemas mediante procesos específicos que funcionan a través de una compleja red de interacciones con los FT WRKY (Fig. 7). Estos complejos suelen estar regulados por PTMs como la fosforilación reversible.

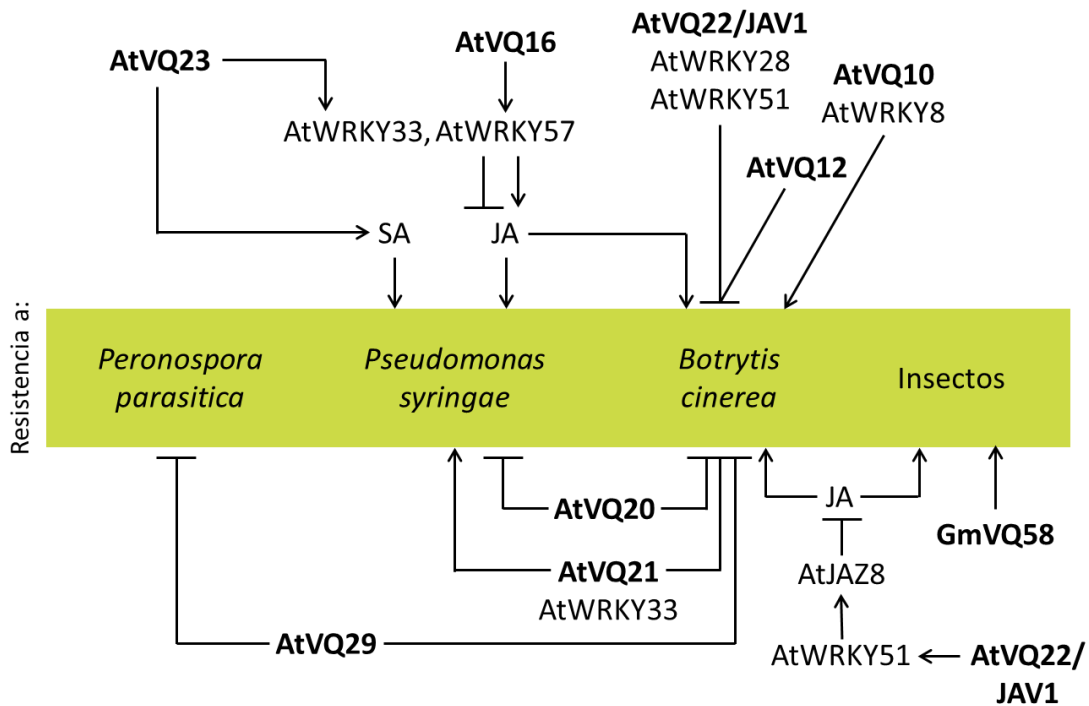


Figura 7. Participación de las proteínas VQ y los factores de transcripción WRKY en la resistencia de las plantas contra patógenos e insectos. Patógenos biótrofos (*Peronospora parasitica* y *Pseudomonas syringae*), y necrótrofos (*Botrytis cinerea*). Las proteínas VQ y WRKY de *Arabidopsis thaliana* (At) o de *Glycine max* (Gm) pueden llevar a cabo una regulación positiva (líneas de flechas) o negativa (líneas con extremos romos).

2.3. PROTEÍNAS VQ EN LAS RESPUESTAS A ESTRÉS ABIÓTICO

La mayoría de la información sobre las funciones de las proteínas VQ en respuesta al estrés abiótico en plantas está relacionada con el estrés osmótico. La expresión de *AtCaMBP25/VQ15* se induce en plántulas de *Arabidopsis* expuestas a deshidratación, bajas temperaturas o alta salinidad (Perruc et al., 2004). La proteína VQ9 puede actuar como represor del FT WRKY8 para mantener un balance apropiado entre las rutas de señalización reguladas por WRKY8 y el inicio de la tolerancia al estrés salino (Hu et al., 2013b). En bambú, *PeVQ28* y WRKY83 interaccionan en el núcleo, y la sobreexpresión de *PeVQ28* en *Arabidopsis* produce una mayor resistencia al estrés salino y mayor sensibilidad a ABA (Cheng et al., 2020). Además de respuestas a estrés osmótico, las proteínas VQ también regulan respuestas a temperaturas extremas. Por ejemplo, en los frutos del plátano, *MaVQ5* podría actuar como represor de *MaWRKY26* en la activación de la biosíntesis de JA en respuesta al estrés por frío (Ye et al., 2016). Por otra parte, la sobreexpresión del gen de tomate *SIVQ6* en *Arabidopsis* disminuye la termotolerancia (Ding et al., 2019). Además, recientemente se ha publicado que varios de los genes de la familia VQ en trigo inducen o reprimen su expresión en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico (Zhang et al., 2022a). En la figura 8 se resumen las principales funciones reguladoras ejercidas por las proteínas VQ en la respuesta de las plantas a estreses abióticos.

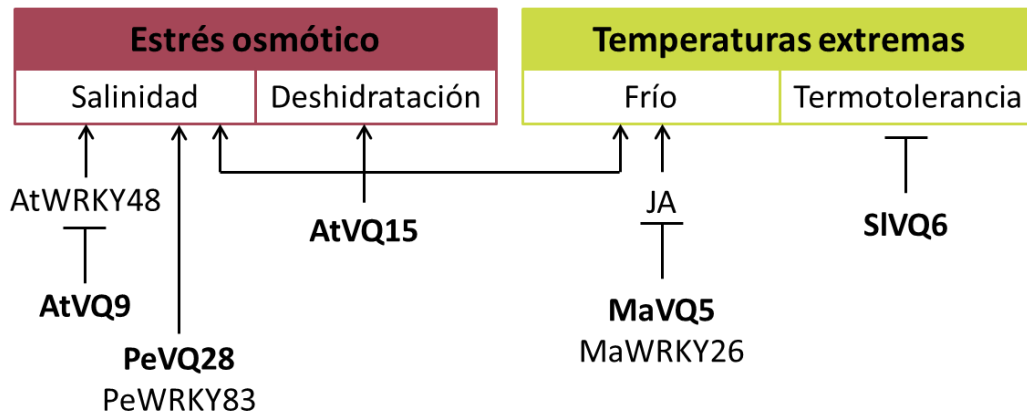


Figura 8. Participación de las proteínas VQ y los factores de transcripción WRKY en las respuestas a factores de estrés abiótico. Las proteínas VQ y WRKY de diferentes especies vegetales (At, *Arabidopsis thaliana*; Pe, *Phyllostachys edulis*; Ma, *Musa acuminata*; Sl, *Solanum lycopersicum*) pueden llevar a cabo una regulación positiva (líneas de flechas) o negativa (líneas con extremos romos).

A pesar de que se ha descrito el papel de las proteínas VQ en muchos procesos de respuesta a estrés en plantas que implican la acumulación y participación de ROS y RNS, no se ha reportado hasta la fecha una regulación ejercida por las proteínas VQ específicamente en respuesta a estrés nitro-oxidativo. En el trabajo desarrollado durante esta Tesis se han identificado a algunas de las proteínas VQ de *Arabidopsis* como reguladores de las respuestas a estrés nitro-oxidativo, documentando el efecto de dichas condiciones sobre su expresión génica, y también identificando procesos específicos que se regulan mediante la alteración de algunos de los genes VQ.




OBJETIVOS

OBJETIVOS

El principal objetivo del trabajo presentado en esta Tesis es la caracterización de los mecanismos moleculares implicados en la función reguladora de las proteínas VQ1 y VQ10, que, al igual que la función de muchas otras proteínas de la familia VQ, todavía se desconoce. Para conseguirlo, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.** Analizar el modo de acción regulador de las proteínas VQ1 y VQ10 mediante la caracterización de sus interacciones físicas y funcionales con proteínas VQ, con factores de transcripción WRKY y con otras proteínas no relacionadas.
- 2.** Estudiar la regulación ejercida por VQ1 y VQ10 sobre el desarrollo y las respuestas a estrés, poniendo énfasis en el estrés oxidativo, la hipoxia y el NO, y su implicación en la función del cloroplasto.



**MATERIALES
Y
MÉTODOS**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* para los ensayos de expresión transitoria, y plantas de *Arabidopsis thaliana* para realizar las transformaciones genéticas estables y con ellas numerosos ensayos de esta Tesis. Se utilizó el ecotipo Columbia 0 (Col-0) de *Arabidopsis* como planta control y fondo genético en los ensayos realizados en esta Tesis con esta especie modelo. Las semillas de las líneas mutantes *vq1* (SALK_050884C), y *vq10-H* (SAIL_23_A10C1) se obtuvieron del *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC). Las semillas del mutante *wrky33* (GK_324B11) fueron donadas por el Profesor Imre Somssich (*Max Planck Institute for Plant Breeding Research*, Alemania). La línea reportera *cycB1;1:GUS* en fondo Col-0 (Colon-Carmona et al., 1999), cuyas semillas fueron donadas por el Dr. David Alabadí (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Valencia, España), se utilizó para generar líneas reporteras en los fondos mutantes *vq10-H* y *wrky33* (Tabla A1) mediante cruces genéticos con plantas de estos genotipos, selección con kanamicina y posterior genotipado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos (Tabla 1). Se realizaron cruces genéticos entre las líneas *vq10-H* y *wrky33* y la selección de las líneas dobles mutantes generadas se realizó mediante genotipado por PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 1) y posterior fenotipado.

Las plantas con expresión reducida de *VQ1* y *VQ10* se obtuvieron mediante la tecnología de microARNs artificiales (amiARNs) (Tabla A1) (Carbonell, 2019), clonando los amiARNs específicos para *VQ1*, *VQ10* o para los dos, diseñados con la herramienta P-SAMS (*Plant Small RNA Maker Suite*), en los vectores pMDC123SB-AtMIR390a-B/c y pMDC32B-AtMIR390a-B/c (Fig. A1), donados por el Dr. Alberto Carbonell (IBMCP, Valencia, España), y transformando *Agrobacterium tumefaciens* con las construcciones resultantes. Después, se transformaron genéticamente plantas Col-0 mediante el método de inmersión floral con las *Agrobacterium* transformadas (Clough & Bent, 1998), y se seleccionaron los transformantes utilizando glufosinato de amonio (BASTA) o higromicina.

Las líneas que sobreexpresan versiones etiquetadas con HA (Hemaglutinina de la influenza humana) de *VQ1* y *VQ10* (Tabla A1) se generaron clonando sus secuencias de ADN codificantes (CDS) en el vector pAlligator2 (Fig. A2) (Bensmihen et al., 2004), transformando *A. tumefaciens* con las construcciones correspondientes, y posteriormente plantas Col-0 mediante inmersión floral con dichas construcciones (Clough & Bent, 1998). La selección de líneas homocigotas se llevó a cabo mediante visualización de las semillas con una lupa de fluorescencia (MZ16F Leica MacroFluo), gracias a la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) en la semilla, dirigida por el promotor específico *pAt2s3*.

1.2. MATERIAL MICROBIOLÓGICO

Para producir y replicar los plásmidos necesarios para los clonajes se utilizaron las cepas de *E. coli* DH5 α y ccdB3.1. Para la transformación de plantas (transformación estable de *A. thaliana* y transformación transitoria de *N. benthamiana*) se utilizó la cepa C58C1 de *A. tumefaciens*. Y para los ensayos de doble híbrido de levadura se utilizaron dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* Y187 y Y2HGold.

2. MANIPULACIÓN Y CRECIMIENTO DE ARABIDOPSIS

2.1. ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS

Previamente al cultivo y el crecimiento *in vitro* de plántulas de Arabidopsis, se esterilizaron las semillas mediante distintos tratamientos: (i) incubándolas durante 3h en una atmósfera con cloro gaseoso (Cl₂), generado al añadir 3% (v/v) de ácido clorhídrico a una solución de hipoclorito de sodio; (ii) embebiéndolas primero en una solución con etanol al 70% (v/v) y Tween-20 al 0,01% (v/v) en agitación durante 20 min, después en una solución de hipoclorito de sodio al 30% (v/v) y Tween-20 al 0,02% (v/v) con agitación durante un máximo de 10 min, y por último lavándolas 5 veces con agua miliQ estéril; y (iii) embebiéndolas en una solución de etanol al 70% (v/v) y Tween-20 al 0,05% (v/v) en agitación durante 20 min, y después en etanol 70% (v/v) para dejarlas secar en una superficie estéril.

2.2. MEDIOS Y CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO

El cultivo *in vitro* de Arabidopsis se realizó en placas Petri con medio Murashige y Skoog (MS) o medio MS con tampón MES (MS-MES) (Duchefa) estéril suplementado con un 1% (p/v) de sacarosa y 8 g/l de microagar, con pH ajustado a 5,7. Para la selección de las líneas *cycB1;1:GUS* en los fondos mutantes correspondientes se suplementó el medio con 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina (Tabla A1). Para la selección de las líneas amiARN para *VQ1*, *VQ10* o ambos *VQ1* y *VQ10*, el medio se suplementó con 10 $\mu\text{g/ml}$ de BASTA o con 20 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina, dependiendo del plásmido utilizado para la transformación (Tabla A1). Además, el medio MS se suplementó también con 50 $\mu\text{g/ml}$ de cefotaxima en el caso de la selección de transformantes primarios para evitar contaminación de *Agrobacterium*. Tras su siembra, las semillas se estratificaron durante 3-4 días a 4°C en oscuridad para sincronizar la germinación. Posteriormente, las plántulas se cultivaron en horizontal en cámaras de cultivo *in vitro* con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (día largo) a 20-23°C, en condiciones de luz blanca con intensidad 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y de 60% de humedad relativa. Para los ensayos de elongación de raíz, tinción de Lugol, y tinción de yoduro de propidio, las placas se cultivaron en vertical. El cultivo en tierra tanto de semillas como de plántulas se realizó sobre un sustrato compuesto por turba, perlita y vermiculita (2:1:1), con un fotoperiodo de día largo a 20-23°C, en condiciones de luz blanca a 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad y de 60% de humedad relativa. Solo en el caso de los ensayos de hipoxia por inundación, las plantas se

cultivaron bajo un fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad (día corto), durante los días previos al tratamiento.

2.3. CRUCE DE PLANTAS Y SELECCIÓN

Tanto el doble mutante *vq10-H/wrky33*, como las líneas *cycB1;1:GUS (vq10-H)* y *cycB1;1:GUS (wrky33)* (Tabla A1), se obtuvieron mediante cruces genéticos con plantas de 1 mes de los genotipos correspondientes. Para realizar los cruces, se seleccionaron capullos de flores no auto-fertilizados del parental femenino y se emascularon para ser polinizados mecánicamente con polen del parental masculino. En el caso de los dobles mutantes, la selección de líneas homocigotas se realizó mediante genotipado por PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 1). En el caso de las líneas reportadoras *cycB1;1:GUS (vq10-H)* y *cycB1;1:GUS (wrky33)*, se seleccionaron primero para el transgén con medio MS-MES suplementado con kanamicina y posteriormente se genotiparon mediante PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 1) para los distintos fondos genéticos mutantes. Este procedimiento se realizó a lo largo de 3 o 4 generaciones hasta obtener líneas homocigotas estables.

2.4. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA MEDIANTE INMERSIÓN FLORAL Y SELECCIÓN DE LOS TRANSFORMANTES

La obtención de plantas transgénicas se realizó transformando plantas Col-0 de 1 mes crecidas en tierra mediante el método de inmersión floral (generación parental de transformantes, T0) (Clough & Bent, 1998). Para ello, dos días antes de la transformación, se inocularon *Agrobacterium* transformadas con un plásmido binario en 10 ml de medio Luria-Bertani (LB) suplementado con rifampicina y el antibiótico correspondiente a la resistencia conferida por el plásmido binario utilizado. Tras dejarlo crecer durante 24 h a 28°C en agitación, este cultivo se utilizó para inocular 200 ml del mismo medio, y se dejó crecer otras 24h a 28°C en agitación. Antes de transformar se recogieron las bacterias por centrifugación a 7000 rpm durante 10 min, y se resuspendieron en 250 ml de solución de transformación (sacarosa 5% (p/v) y Silwet L-77 0,02% (v/v)). Por último, se sumergieron los ápices florales en esta solución durante 30 s y, posteriormente, se cubrieron las plantas con bolsas de plástico para mantener la humedad durante 24-48h. Después de aproximadamente 1 mes, se recogieron las semillas de la primera generación de transformantes (T1).

Para la selección de plantas transformadas, las semillas T1 obtenidas se sembraron en alta densidad en placas Petri con medio MS suplementado con cefotaxima y el antibiótico correspondiente a la resistencia conferida por el plásmido binario utilizado para la transformación. Tras el periodo de estratificación y cultivo *in vitro*, se seleccionaron los individuos resistentes al antibiótico y se transfirieron a tierra para recoger las semillas de la segunda generación de transformantes (T2). Se sembraron 100 semillas T2 en placas Petri con medio MS-MES suplementado con el antibiótico correspondiente para la selección y, tras el periodo de estratificación y cultivo *in vitro*, se

seleccionaron las líneas transgénicas cuya segregación fuera próxima a un porcentaje de un 75% de individuos resistentes y un 25% de individuos susceptibles al antibiótico de selección. Este porcentaje de segregación es indicativo de que hay una única inserción del transgén según la segunda ley de Mendel. Plantas resistentes de las líneas seleccionadas se transfirieron a tierra y se cultivaron hasta recoger semillas de la tercera generación de transformantes (T3). Estas semillas T3 volvieron a sembrarse en las mismas condiciones que las semillas T2, y se seleccionaron aquellas líneas que presentaran un 100% de individuos resistentes al antibiótico. Este porcentaje es indicativo de que las líneas presentan una única inserción del transgén en homocigosis. En el caso de las líneas transgénicas que expresan HA-VQ1 y HA-VQ10, la selección se realizó por fluorescencia en la semilla, conferida por GFP bajo el control del promotor específico *pAt2s3* (Tabla A1). Para ello, la selección de las semillas se hizo observándolas bajo una lupa de fluorescencia (MZ16F Leica MacroFluo) y eliminando el antibiótico de selección de los medios de cultivo descritos anteriormente.

2.5. TRATAMIENTOS

2.5.1. HIPOXIA EN CÁMARA

Los ensayos de hipoxia se realizaron en una cámara de metacrilato con una entrada para nitrógeno gas (N₂) y un sensor de oxígeno (O₂) conectado a un controlador ProOx Model 110 (BioSpherix, NJ, USA). El sistema permite controlar el porcentaje de O₂ dentro de la atmósfera de la cámara gracias al controlador que dirige la entrada de N₂ dependiendo de la concentración de O₂ que se quiera alcanzar y mantener. Plántulas de 12 días cultivadas *in vitro* se incubaron en la cámara con un 1% de O₂ y con baja intensidad de luz (20 μmol m⁻² s⁻¹) o en oscuridad durante el tiempo indicado. Se recogieron muestras antes y después del tratamiento y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para la posterior extracción de ARN o proteínas.

2.5.2. ÓXIDO NÍTRICO

Plántulas de 12 días cultivadas *in vitro* se sometieron a un pulso de NO mediante la incubación en una cámara de metacrilato cerrada herméticamente en la cual se había inyectado 300 ppm de NO (Linde AG, Germany). Las plántulas control se incubaron en las mismas condiciones en aire sin NO suplementado. Tras el tratamiento, se recogieron muestras tanto tratadas como control y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para extraer ARN.

Para estudiar la sensibilidad al NO, se realizaron ensayos de inhibición de la elongación del hipocotilo por NO en plantas cultivadas escotomorfogénicamente (Castillo et al., 2018). Semillas a las que se les había inducido la germinación por exposición a 6 h en luz después del periodo de estratificación, se incubaron en la cámara de metacrilato sellada con 300 ppm de NO, y crecieron en oscuridad

dentro de la cámara durante 4 días. Las plántulas control se incubaron en las mismas condiciones en aire sin NO suplementado. La longitud del hipocotilo se midió para cada plántula de cada genotipo y condición usando ImageJ2/Fiji.

2.5.3. HIPOXIA Y RE-OXIGENACIÓN POR INUNDACIÓN

Los ensayos se realizaron con plantas cultivadas en pastillas de sustrato (Jiffy Group), durante 1 mes en condiciones de día corto, sumergiéndolas 15 cm por debajo de la superficie del agua durante 5 días en tanques llenos de agua pre-equilibrados a 21°C en penumbra (intensidad de luz de menos de $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Tras sacarlas del agua, las plantas se re-oxigenaron durante 15 días en condiciones de día largo, y se evaluó el nivel de daño sufrido para cada una de ellas en base a una escala cualitativa con 3 niveles de daño: plantas no dañadas, plantas vivas pero dañadas y plantas muertas.

2.5.4. GERMINACIÓN BAJO ESTRÉS OXIDATIVO

Para comprobar la tolerancia al estrés oxidativo, semillas de la misma edad de distintos genotipos se sembraron en placas de 24 pocillos conteniendo agua suplementada con 0,1 mM de metil viológeno (paraquat) o sobre agua como control. Las semillas se mantuvieron en condiciones de cultivo *in vitro* y los porcentajes de germinación se calcularon a los 5 días tras la siembra, tomando como indicador de la germinación la protrusión radicular.

2.5.5. DESETIOLACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILAS

Para analizar la respuesta tras la desetiología se cuantificó la cantidad de clorofilas. Tras el periodo de estratificación, las semillas se expusieron a la luz durante 6 h para inducir la germinación, después crecieron las plántulas *in vitro* durante 3 días en oscuridad, y se sacaron a la luz para producir desetiología. Tras 24 h de desetiología, se cuantificó la cantidad de clorofilas para cada genotipo mediante espectrofotometría. Para ello, se pesó el material vegetal del que iban a extraerse los pigmentos (20-100 mg) y se extrajeron incubándolo durante 4-5 h a 4°C en oscuridad y agitación con acetona 80% (v/v). Tras la extracción, se midió la absorbancia a 647 y 663 nm con un espectrofotómetro de placas Multiskan GO (Thermo Scientific) usando el SkanIt Software v.7.1 (Thermo Scientific). La concentración de clorofila a (C_a) y b (C_b) se calculó aplicando las fórmulas $C_a(\mu\text{g/mL}) = (12,21 \cdot A_{663} - 2,81 \cdot A_{647})/L$ y $C_b(\mu\text{g/mL}) = (20,13 \cdot A_{647} - 5,03 \cdot A_{663})/L$ (Porra et al., 1989), derivadas de la ley de Lambert-Beer, donde L es la longitud atravesada por la luz en el medio. Finalmente, la concentración total de clorofilas se calculó normalizando cada muestra con el volumen de medida (V) y el peso fresco de material vegetal (P): $C_a + C_b \cdot (V/P)$.

2.6. TINCIÓN GUS

Para el análisis de la actividad β -glucuronidasa (GUS) de las líneas *cycB1;1:GUS* en los distintos fondos genéticos, plántulas de 5 días cultivadas *in vitro* se sumergieron en tampón de tinción frío (50 mM tampón fosfato pH 7,2, 0,2% (v/v) Triton X-100, 2mM ferrocianuro potásico y 2mM ferricianuro potásico) suplementado con 2 mM del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido (X-gluc), se infiltraron al vacío durante 20 min y se incubaron a 37°C durante 16-24 h. Posteriormente, las plántulas se destiñeron con lavados sucesivos con etanol 70% (v/v) y se observaron y fotografiaron con un microscopio Leica DM5000.

2.7. TINCIÓN CON YODURO DE PROPIDIO

Para analizar la longitud del meristemo radicular, las raíces de plántulas cultivadas *in vitro* en vertical durante 5 días se tiñeron con yoduro de propidio. Las raíces se colocaron en contacto con una solución de 10 μ g/ml de yoduro de propidio durante 5 min y se visualizaron y fotografiaron con un microscopio confocal AxioObserver Zeiss LSM 780 con excitación a 561 nm y un rango de emisión de 578-670 nm. La longitud del meristemo radicular se determinó a partir de las fotos contando el número de células del córtex desde el centro quiescente hasta la primera célula que duplicaba su tamaño con respecto a la anterior (Perilli & Sabatini, 2010).

2.8. ESTIMACIÓN DE LA EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA

La eficiencia fotosintética se estimó con parámetros derivados de medidas de la fluorescencia de la clorofila en plántulas de 12-15 días crecidas *in vitro* con un Handy FluorCam FC 1000-H usando el software FluorCam7. Para ello, tras incubar las plántulas en oscuridad durante 20 min, estas fueron sometidas a pulsos de luz actínica de 21 PAR de intensidad. Se midieron el rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II (Φ PSII), y el rendimiento cuántico máximo del PSII (Fv/Fm).

2.9. ANÁLISIS DE ISOPRENOIDES

El análisis de isoprenoides mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) fue realizado por el Servicio de Metabolómica del IBMCP. Los carotenoides, clorofilas y tocoferoles fueron extraídos en tubos Eppendorf de 2 ml a partir de 4 mg de tejido de hojas liofilizado, usando 375 μ l de metanol como disolvente para la extracción y 25 μ l de una solución de 10% (p/v) de cantaxantina en cloroformo (Sigma) como patrón interno. El tejido fue lisado con bolas de vidrio de 4 mm añadidas en los tubos, machacando durante 1 min a 30 Hz en un TissueLyser II (QIAGEN, Venlo, Netherlands) y la extracción se realizó añadiendo 400 μ l de Tris-NaCl a pH 7,5 y 800 μ l de cloroformo. Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 5 min a 13000 rpm y la fase orgánica fue transferida a un nuevo tubo y evaporada usando un sistema de SpeedVac (Eppendorf Concentrator plus, Hamburg, Germany). Después, los metabolitos extraídos fueron disueltos en 200 μ l de

acetona, filtrados con filtros de 0,2 μm y después introducidos en viales de vidrio ámbar de 2 ml. Por último, se inyectaron alícuotas de 10 μl de cada muestra en un sistema HPLC de Agilent Technologies serie 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Se utilizó una columna C30 de fase reversa (YMC Carotenoid, 250 \times 4.6 mm \times 3 μm , YMC CO., Kyoto, Japan), con tres fases móviles de metanol (disolvente A), agua/metanol (20/80 (v/v)) con 0,2% (p/v) de acetato de amonio (disolvente B), y tert-metil butil éter (disolvente C). Los metabolitos fueron separados siguiendo el siguiente gradiente: 95% A, 5% B isocráticamente durante 12 min, 80% A, 5% B, 15% C 12 min, seguido de un gradiente lineal de hasta 30% A, 5% B, y 65% C durante 30 min. El flujo se mantuvo a 1 ml/min. El equipo de HPLC estaba acoplado a un detector PDA (*Photometric Diode Array*) (Santa Clara, CA, USA) que permite la detección del espectro de absorción ultravioleta-visible completo de los diferentes metabolitos. Las áreas de los picos de las clorofilas y de los carotenoides fueron determinadas a 650 nm y 472 nm, respectivamente, usando el software Agilent ChemStation. Se utilizó un detector de fluorescencia a 330 nm para la identificación de tocoferoles.

3. MANIPULACIÓN Y CRECIMIENTO DE *NICOTIANA BENTHAMIANA*

3.1. MEDIOS Y CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO

El cultivo de *N. benthamiana* se realizó en tierra sobre un sustrato compuesto por turba, perlita y vermiculita (1:1:1) con un fotoperiodo de día largo a 20-23°C, en condiciones de luz blanca a 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad y de 60% de humedad relativa.

3.2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA TRANSITORIA MEDIANTE AGROINFILTRACIÓN

Los ensayos de expresión transitoria se realizaron agroinfiltrando hojas de plantas de *N. benthamiana* de 1 mes con *Agrobacterium* transformadas con los plásmidos binarios correspondientes. Un día antes de la transformación, se inocularon las *Agrobacterium* transformadas en medio LB suplementado con rifampicina y el antibiótico correspondiente a la resistencia conferida por el plásmido binario utilizado. Tras el cultivo durante toda la noche a 28°C en agitación, se midió la densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) del cultivo con un espectrofotómetro WPA Biowave II (Biochrom), se recogieron las bacterias centrifugando a 4500 rpm durante 10 min, y se resuspendieron en solución de agroinfiltración estéril a pH 5,6 (10 mM MES, 10 mM MgCl_2 y 100 μM acetosiringona) hasta conseguir una OD_{600} de 0,1. Tras incubar los cultivos durante 2-3 h a temperatura ambiente se utilizaron para agroinfiltrar la zona del envés de hojas de *N. benthamiana* usando una jeringuilla de 1 ml. Todos los ensayos de transformación transitoria en *N. benthamiana* se realizaron co-infiltrando las *Agrobacterium* transformadas con nuestras construcciones junto con *Agrobacterium* transformadas con el plásmido *p19*.

3.3. VISUALIZACIÓN DE LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GFP Y RFP

Para comprobar la localización subcelular de las proteínas VQ1 y VQ10 se utilizaron versiones etiquetadas con GFP y/o proteína fluorescente roja (RFP). Para ello, se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con *Agrobacterium* transformadas con los plásmidos que contenían las construcciones *35S:GFP:VQ1*, *35S:GFP:VQ10*, *35S:VQ1:GFP*, *35S:VQ10:GFP*, *35S:VQ1:RFP* y *35S:VQ10:RFP* (Tabla A1). También se comprobó si había variaciones en el patrón de localización subcelular de DXS agroinfiltrando hojas de *N. benthamiana* con los plásmidos *35S:DXS:GFP*, donado por el Dr. Manuel Rodríguez-Concepción (IBMCP, Valencia, España), y las construcciones *35S:HA:VQ1* o *35S:HA:VQ10* (Tabla A1). Pasados 3-4 días después de la agroinfiltración, se visualizaron y fotografiaron discos de hojas agroinfiltradas con un microscopio confocal AxioObserver Zeiss LSM 780, con excitación a 488 nm y un rango de emisión de 490-527 nm para GFP, y con excitación a 561 nm y un rango de emisión de 588-634 nm para RFP. Además, la clorofila de los cloroplastos emite auto-fluorescencia con ambas longitudes de onda de excitación en un rango de 674-715 nm.

4. MANIPULACIÓN Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS

4.1. MEDIOS Y CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO DE *E. COLI* Y *A. TUMEFACIENS*

Todas las bacterias se cultivaron en medio LB estéril líquido (20 g/l), o sólido suplementándolo con 15 g/l de agar. Para la selección de bacterias transformadas, el medio se suplementó con el antibiótico correspondiente a la resistencia del plásmido utilizado en cada transformación. En el caso de los cultivos de *Agrobacterium*, el medio se suplementó siempre con 50 µg/ml de rifampicina. *E. coli* se cultivó a 37°C durante 16-24 h y *Agrobacterium* a 28°C durante 48 h, ambas en agitación a 2000 rpm en el caso de los cultivos líquidos.

4.2. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES PARA LA TRANSFORMACIÓN

Para preparar células competentes de *E. coli*, se preparó un cultivo saturado a partir de una colonia previamente aislada por triple estría que se inoculó en 3 ml de medio LB y se incubó a 37°C en agitación. Al día siguiente, se inoculó 1 ml de este cultivo en 100 ml de medio LB en un matraz Erlenmeyer para optimizar la aireación del cultivo y se incubó a 37°C en agitación hasta que alcanzó una OD₆₀₀ de 0,4. Después, las bacterias se recogieron por centrifugación a 4°C durante 15 min a 3500 rpm, se resuspendieron en 50 ml de cloruro de calcio (CaCl₂) 50 mM, y volvieron a centrifugarse en las mismas condiciones. El sedimento se resuspendió en 1 ml de una solución de 10% (v/v) de glicerol y 50 mM de CaCl₂, se prepararon alícuotas de 50 µl, y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para ser conservadas a -80°C.

En el caso de *A. tumefaciens*, se cultivó una colonia previamente aislada por triple estría en 3 ml de medio LB con rifampicina a 28°C en agitación en un matraz Erlenmeyer de 100 ml para optimizar la aireación del cultivo. Al día siguiente, se inoculó 1 ml de este cultivo en 500 ml del mismo medio en un matraz Erlenmeyer de 1L y se incubó en las mismas condiciones durante 3 h hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,5-1. Después se incubó el cultivo durante 10 min en hielo, se recogieron las bacterias por centrifugación a 4°C durante 10 min a 5000 rpm, se resuspendieron en 40 ml de cloruro de sodio (NaCl) 150 mM, y volvieron a centrifugarse en las mismas condiciones. El sedimento se resuspendió en CaCl₂ 20 mM, se distribuyó en alícuotas de 50 µl, y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para ser conservadas a -80°C.

4.3. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Las células competentes de *E. coli* y *A. tumefaciens* se transformaron mediante choque térmico. Para *E. coli*, se descongeló una alícuota de células competentes en hielo durante 15 min y se le añadió 1-5 µg de ADN plasmídico. La mezcla se incubó 30 min en hielo y luego 30 s a 42°C antes de volver al hielo. Después, se añadieron ~500 µl de medio LB y se incubó durante 1h a 37°C en agitación. Por último, las células se cultivaron en placas Petri con medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente a la resistencia del plásmido utilizado en la transformación y se incubaron a 37°C durante 16-24 h. En el caso de *A. tumefaciens*, se descongeló una alícuota de células competentes en hielo durante 15 min y se le añadió ~1 µg de ADN plasmídico. La mezcla se incubó 5 min a 37°C, luego se congeló 1 min en nitrógeno líquido, se descongeló otra vez en hielo y se incubó 2-3 h a 28°C en agitación tras añadir 500 µl de medio LB. Por último, las células se cultivaron durante 48 h a 28°C en placas Petri con medio LB con rifampicina y el antibiótico correspondiente a la resistencia del plásmido utilizado.

Alternativamente, *Agrobacterium* fue transformado por electroporación. Para ello, tras descongelar una alícuota de células competentes en hielo, se les añadió ~1 µg de ADN plasmídico y se incubaron de nuevo en hielo durante 5-10 min. Después, se añadió la mezcla en una cubeta de electroporación previamente enfriada en hielo, se sometió a una descarga eléctrica de 1800 V con un electroporador Eppendorf® 2510 (Sigma-Merck) y se incubó 2-3 h a 28°C en agitación tras añadir 1 ml de medio LB. Por último, las células se cultivaron en placas Petri tal y como se ha descrito previamente.

5. MANIPULACIÓN Y CRECIMIENTO DE LEVADURAS

5.1. MEDIOS Y CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO

Las levaduras se cultivaron en un medio SD (*Synthetic Defined*) compuesto por medio DOB (*Dropout base*, MP Biomedicals) y suplemento DO -Ade/-His/-Leu/-Trp (Takara Bio), líquido o sólido suplementado con 20 g/l de agar. Además, el medio SD se suplementó con 20 µg/ml de los aminoácidos correspondientes: adenina, histidina, leucina y triptófano para el cultivo de las levaduras sin transformar (SD); adenina,

histidina y leucina para la selección de las Y2HGold transformadas con el plásmido pGBKT7-GW (SD/-Trp); adenina, histidina y triptófano para la selección de las Y187 transformadas con el plásmido pGADT7-GW (SD/-Leu); y adenina e histidina para la selección de las levaduras diploides transformadas con ambos plásmidos pGBKT7-GW y pGADT7-GW (SD/Doble *Dropout* (DDO)). Para la selección de interacciones entre proteínas se utilizó medio SD libre de aminoácidos suplementados (SD/Cuádruple *Dropout* (QDO)). En el caso del rastreo de genoteca, los medios se suplementaron con 50 µg/ml de kanamicina o 40 µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil α-D-galactopiranosido (X-α-Gal) cuando fue necesario. Los cultivos se incubaron a 28°C durante 2-5 días, con agitación a 2000 rpm en el caso de los cultivos líquidos.

5.2. TRANSFORMACIÓN Y GENERACIÓN DE LEVADURAS DIPLOIDES MEDIANTE APAREAMIENTO

En primer lugar, se realizó un cultivo saturado de 5 ml a partir de una colonia previamente aislada por triple estría en medio SD líquido y se dejó crecer a 28 °C en agitación. A los dos días, se inoculó 1 ml del cultivo saturado en 50 ml del mismo medio en un matraz Erlenmeyer para favorecer la aireación y se incubó en las mismas condiciones durante 16-24 h. Después, se recogieron las levaduras por centrifugación durante 5 min a 4500 rpm, se resuspendieron en agua miliQ estéril, y se centrifugaron en las mismas condiciones. El sedimento volvió a resuspenderse en agua miliQ estéril y se prepararon alícuotas de 1 ml. Para cada transformación, una alícuota se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 533 µl de polietilenglicol (PEG) 45% (p/v), 72 µl de acetato de litio 1M, 10 µl de ADN de esperma de salmón a 2 mg/ml (calentado previamente a 95°C durante 5 min), 1 µg de ADN plasmídico y agua miliQ estéril hasta llegar a un volumen final de 700 µl. El pellet se resuspendió hasta obtener una mezcla homogénea, se incubó durante al menos 30 min a 28°C en agitación, y luego 15 min a 42°C, invirtiendo el tubo cada 5 min para evitar la sedimentación. Por último, se recogieron centrifugando 5 min a 5000 rpm, se resuspendieron en 100 µl de agua miliQ estéril y se cultivaron en placas Petri con medio SD/-Leu o SD/-Trp (dependiendo de qué cepa de levadura se transforme y con qué plásmido) a 28°C durante 2-3 días.

Para generar levaduras diploides transformadas mediante apareamiento, primero se aisló por triple estría una colonia de cada una de las levaduras haploides transformadas en cada caso, siempre una Y2HGold transformada con un pGBKT7-GW y una Y187 transformada con un pGADT7-GW. Las colonias aisladas crecieron en placas Petri con medio SD/-Leu o SD/-Trp durante 2-3 días a 28°C, y se cultivaron las dos juntas en 500 µl de medio SD a 28°C durante 16-24 h en agitación. Después, se recogieron por centrifugación durante 5 min a 5000 rpm, se resuspendieron en 100 µl de agua miliQ estéril, y se cultivaron en placas Petri con medio SD/DDO a 28°C durante 2-3 días.

5.3. ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO DE LEVADURA (Y2H)

Para comprobar interacciones entre proteínas se utilizó el sistema de doble híbrido de levadura. El sistema consiste en expresar una proteína fusionada al dominio de unión al ADN de Gal4 (*binding domain*, BD) y otra proteína fusionada al dominio de activación de Gal4 (*activation domain*, AD), de manera que cuando las dos proteínas interactúan, el BD y el AD de Gal4 se aproximan lo suficiente como para activar la transcripción de ciertos genes en las levaduras diploides que les permiten crecer en un medio de selección SD/QDO. Para llevar a cabo esta comprobación, se partió de un cultivo saturado de una levadura diploide que contenía construcciones hechas con los plásmidos pGBKT7-GW (BD) y pGADT7-GW (AD) y las proteínas de interés (Tabla A1), a partir del cual se realizaron diluciones seriadas 1:10 y se utilizaron para realizar goteos sobre placas Petri con medio SD/QDO y SD/DDO como control. Las placas se incubaron a 28°C durante 2-3 días. Como control de auto-activación, para evitar obtener falsos positivos, se utilizaron en los goteos levaduras diploides que contenían el plásmido con cada una de las proteínas fusionadas junto con el otro plásmido vacío correspondiente (*GAL4-BD:Ø* o *GAL4-AD:Ø*).

5.4. RASTREO DE GENOTECA DE DOBLE HÍBRIDO DE LEVADURA (Y2H) MEDIANTE APAREAMIENTO

Con el objetivo de encontrar posibles proteínas interactoras de VQ1, se realizó un rastreo basado en la generación de levaduras diploides mediante apareamiento y el sistema de doble híbrido de levadura. Para ello se utilizó una genoteca normalizada Mate & Plate™ (Takara Bio) de proteínas de Arabidopsis transformadas en Y187 y una levadura Y2HGold transformada con el plásmido pGBKT7-GW-VQ1 (*GAL4-BD:VQ1*) (Tabla A1) y se siguió el protocolo de Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System (Takara Bio), con algunas modificaciones.

Antes de proceder al rastreo, se comprobó que la construcción *GAL4-BD:VQ1* por sí sola no auto-activaba la transcripción de los genes de selección en levaduras diploides transformadas también con el plásmido pGADT7-GW vacío (*GAL4-AD:Ø*). Para ello, se cultivaron las levaduras en placas Petri con medio SD/QDO y con SD/DDO como control, se incubaron a 28°C durante 2-3 días y se comprobó que en SD/DDO lograban crecer, pero en SD/QDO no. Para el rastreo, se preparó un cultivo saturado de Y2HGold transformada con pGBKT7-GW-VQ1 inoculando una colonia aislada en 50 ml de SD/-Trp e incubándolo a 28°C en agitación. Tras 16-24 h, cuando el cultivo alcanzó una OD₆₀₀ de ~0,8, las levaduras se recogieron por centrifugación a 4500 rpm 5 min y se resuspendieron en 4-5 ml de SD/-Trp. Paralelamente, se descongeló a temperatura ambiente una alícuota de 1 ml de la genoteca de Arabidopsis Mate & Plate™ (Takara Bio) de Y187 y se mezcló con los 4-5 ml de Y2HGold transformada con pGBKT7-GW-VQ1 y con 45 ml de medio 2X SD suplementado con 50 µg/ml de kanamicina en un matraz de 1 l. La mezcla se incubó a 30°C durante 16-24 h en agitación a 30-50 rpm, se recogieron las levaduras por centrifugación a 4500 rpm durante 10 min, y se resuspendieron en 10 ml de 0,5X SD con kanamicina. A partir de este cultivo, se cultivaron

100 µl de diluciones seriadas 1:10 en placas Petri con medio SD/-Trp, SD/-Leu y SD/DDO para calcular la eficiencia del apareamiento y la cantidad de levaduras diploides rastreadas, según está descrito en el protocolo de Takara Bio. El cultivo restante se plaqueó en 55 pacas Petri de 150 mm con medio SD/QDO, que se incubaron a 28°C durante 5 días. Las colonias rastreadas se recomprobó cultivándolas en medio SD/QDO suplementado con 40 µg/ml de X-α-Gal en las mismas condiciones. Finalmente, para identificar las proteínas interactoras de VQ1, se realizó PCR de colonia con oligonucleótidos específicos para el pGADT7 (Fig. A3, Tabla 1) de las colonias positivas, se purificaron y se secuenciaron los productos de PCR.

Tras identificar mediante secuenciación las posibles proteínas interactoras de VQ1, se comprobaron algunas de ellas mediante Y2H. Para ello, se purificaron los plásmidos de las levaduras diploides positivas y con ellos se transformaron células de *E. coli*. Las bacterias fueron cultivadas en placas Petri con medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina para que solo crecieran las células que hubieran incorporado el plásmido pGADT7 procedente de la genoteca (Fig. A3). Los plásmidos se purificaron, se comprobaron mediante secuenciación con oligonucleótidos específicos (Tabla 1) y se utilizaron para transformar Y187 y comprobar la interacción mediante Y2H, generando previamente las levaduras diploides con las Y2HGold transformadas con pGBKT7-GW-VQ1, pGBKT7-GW-VQ10 y el pGBKT7-GW vacío (Fig. A4) como control de auto-activación.

6. AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

6.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

6.1.1. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE ARABIDOPSIS

Para extraer ADN genómico se partió de material vegetal congelado en nitrógeno líquido que se trituró y se homogeneizó con un homogeneizador de varilla Heidolph RZR 2051 control con 400 µl de un tampón de extracción (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 0,5% (v/v) de dodecilsulfato sódico (SDS)). Las muestras se centrifugaron a máxima velocidad durante 5 min, se separó el sobrenadante, y se le añadió un volumen de isopropanol. La mezcla se centrifugó en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante, y el precipitado se lavó con etanol 70% (v/v). Se volvió a centrifugar de la misma manera, se eliminó el etanol, y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente. Pasados 15-30 min, el precipitado se disolvió en 100 µl de agua miliQ estéril. Las muestras se almacenaron a 4°C.

6.1.2. EXTRACCIÓN DE ARN DE ARABIDOPSIS

La extracción y purificación de ARN total a partir de material vegetal (plántulas de Arabidopsis) se realizó con el kit NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel). Las muestras de ARN se almacenaron a -80°C.

6.1.3. EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO DE BACTERIAS

Para la extracción y purificación de ADN plasmídico de bacterias transformadas, se cultivó una colonia de la bacteria en 4 ml de LB suplementado con el antibiótico correspondiente a la resistencia conferida por el ADN plasmídico utilizado. La extracción se realizó a partir del cultivo usando el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). El ADN purificado se almacenó a -20°C.

6.1.4. EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO DE LEVADURAS

Para la extracción de ADN plasmídico de levaduras transformadas, se cultivó una colonia de la levadura de interés en 3 ml de medio SD selectivo a 28°C en agitación. Al día siguiente, las levaduras se recogieron por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min y se les añadieron 200 µl de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% (v/v) SDS, 2% (v/v) Triton X-100) y bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec Products) hasta cubrir el sedimento. La mezcla se agitó en un vórtex durante 10 min, se le añadieron 400 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se agitó de nuevo en vórtex otros 3 min, y se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min. Se separó la fase acuosa del sobrenadante y se le añadió 1 volumen de tampón Tris-EDTA (TE) (10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA), 1 volumen de isopropanol y un 8% (v/v) de acetato de sodio 3M pH 5,2. Tras mínimo 20 min de incubación a -20°C, se centrifugó la mezcla 5 min a velocidad máxima, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol 70% (v/v). Volvió a centrifugarse de la misma manera, se descartó el sobrenadante, y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. Tras 15-30 min, se resuspendió en 20 µl de tampón TE. Las muestras se almacenaron a -20°C.

6.1.5. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE PRODUCTOS DE PCR O DE GELES DE AGAROSA

Para purificar productos de PCR se utilizó el kit de limpieza de PCR ChargeSwitch™ (Invitrogen) y para purificar fragmentos de ADN separados mediante gel de agarosa se utilizó el kit de extracción NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) o el kit QIAEX™ II Gel Extraction (QIAGEN).

La purificación de productos de PCR para su posterior secuenciación se realizó con el reactivo ExoSAP-IT™ (Applied Biosystems). Se añadieron 2 µl de reactivo por cada 5 µl de producto de PCR y se incubó la mezcla a 37°C durante 15 min y otros 15 min a 80°C.

6.2. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La concentración de ácidos nucleicos se cuantificó utilizando un espectrofotómetro ND1000 (NanoDrop Technologies) o un NanoDrop™ One/One^c (Thermo Scientific).

6.3. ANÁLISIS DE CALIDAD DE ARN

La calidad del ARN total extraído y purificado se analizó midiendo el número de integridad del ARN (RIN) en un 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc.).

6.4. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

6.4.1. AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE PCR

Para genotipado por PCR, PCR de colonia u otros objetivos, se amplificaron los fragmentos de ADN mediante PCR utilizando la ADN polimerasa NZYtaq II (Nzytech) con sus reactivos y protocolo correspondientes. Para los genotipados por PCR se utilizó como molde 1 µl de ADN genómico y para las PCR de colonia se transfirió una mínima masa de una colonia de levadura a 1 volumen de agua miliQ estéril al cual se le añadió 1 volumen de la mezcla de reactivos para la PCR. Las PCRs se realizaron en un termociclador de 96 pocillos Veriti™ (Applied Biosystems) con un programa de 3 min de iniciación a 95°C, 30-35 ciclos de desnaturalización (30 s a 94°C), anillamiento (30 s a temperatura variable según la temperatura de fusión de los oligonucleótidos utilizados) y extensión (30-60 s dependiendo del tamaño del ADN a amplificar a 72°C), y 5 min de elongación final a 72°C. En el caso de las PCRs de colonia de levadura, se utilizó un programa de 1 min de iniciación a 94°C y 30 ciclos de 10 s a 98°C y 3 min a 68°C. Para la amplificación de CDS a partir de ADN complementario (ADNc) en la construcción de plásmidos, se utilizó la ADN polimerasa Phusion™ High-Fidelity (Thermo Scientific) con su tampón y protocolo correspondiente. Se utilizó un programa similar al descrito anteriormente, que consistía en un primer paso de 30 s a 98°C, 30 ciclos de desnaturalización (15 s a 98°C), anillamiento y extensión, y 10 min de elongación final a 72°C. Todos los productos de PCR que no se utilizaron inmediatamente después fueron almacenados a -20°C. Los oligonucleótidos utilizados se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados en esta tesis.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Loci	Aplicación
amiR-VQ1-F	TGTATTGCCACCGTACCCCTTGACCCATGAT GATCACATTCGTTATCTATTTTTGGGTCAA GGGGACGGTGGCAA	AT1G17147	Clonaje amiARN-VQ1
amiR-VQ1-R	AATGTTGCCACCGTCCCTTGACCCAAAAA ATAGATAACGAATGTGATCATCATGGGTCA AGGGTACGGTGGCAA	AT1G17147	Clonaje amiARN-VQ1
amiR-VQ1&10-F	TGTATATCGAACTCCGTCGTCTCTGATGAT GATCACATTCGTTATCTATTTTTTCAGAGA CGACTGAGTTCGATA	AT1G17147 AT1G78410	Clonaje amiARN-VQ1, VQ10
amiR-VQ1&10-R	AATGTATCGAACTCAGTCGTCTCTGAAAA AATAGATAACGAATGTGATCATCATCAGA GACGACGGAGTTCGATA	AT1G17147 AT1G78410	Clonaje amiARN-VQ1, VQ10
amiR-VQ10-F	TGTATCGTCCCCATTGCTCCTCTGATGATG ATCACATTCGTTATCTATTTTTTCAGGAGGA CGCATGGGGACGA	AT1G78410	Clonaje amiARN-VQ10
amiR-VQ10-R	AATGTCGTCCCCATGCGTCCTCCTGAAAAA ATAGATAACGAATGTGATCATCATCAGGAG GACGAATGGGGACGA	AT1G78410	Clonaje amiARN-VQ10
VQ1-F	ATGCTGCAGGAGTGAGATCTG	AT1G17147	Clonaje <i>VQ1</i>
VQ1-R	TCAATGGTCTGACCAAAGATTATAC	AT1G17147	Clonaje <i>VQ1</i>
VQ1nostop-R	ATGGTCTGACCAAAGATTATAC	AT1G17147	Clonaje <i>VQ1</i>
VQ10-F (*1 en Fig. 22B, C)	ATGCTGGAAGAGGGAAAGTG	AT1G78410	Clonaje <i>VQ10</i>
VQ10-R (*4 en Fig. 22B, C)	TCAATATTCTGACCATAGTTTATACAATTC	AT1G78410	Clonaje <i>VQ10</i>
VQ10nostop-R	ATATTCTGACCATAGTTTATA	AT1G78410	Clonaje <i>VQ10</i>
VQ24-F	ATGGCGTCGTCGGAGGGATTAG	AT3G56880	Clonaje <i>VQ24</i>
VQ24-R	TCACATAACTTTCCATGATTCGAGTG	AT3G56880	Clonaje <i>VQ24</i>
VQ27-F	ATGGCCAACTCTAACAACGAC	AT4G15120	Clonaje <i>VQ27</i>
VQ27-R	CTAAGAATAATATACCGTTTTTCTCGG	AT4G15120	Clonaje <i>VQ27</i>
VQ32-F	ATGGATGATCAGAGTAATCGTGG	AT5G46780	Clonaje <i>VQ32</i>
VQ32-R	CTATTGATTTTTCCATAATGGACTAAGC	AT5G46780	Clonaje <i>VQ32</i>
WRKY18-F	ATGGACGGTTCTTCGTTTCTCG	AT4G31800	Clonaje <i>WRKY18</i>
WRKY18-R	TCATGTTCTAGATTGCTCCATTAAC	AT4G31800	Clonaje <i>WRKY18</i>
WRKY33-F	ATGGCTGCTTCTTTCTTACAATGG	AT2G38470	Clonaje <i>WRKY33</i>
WRKY33-R	TCAGGGCATAAACGAATCGAAAAATG	AT2G38470	Clonaje <i>WRKY33</i>
WRKY40-F	ATGGATCAGTACTCATCCTCTTTG	AT1G80840	Clonaje <i>WRKY40</i>
WRKY40-R	CTATTTCTCGGTATGATTCTGTTGATAC	AT1G80840	Clonaje <i>WRKY40</i>
WRKY75-F	ATGGAGGGATATGATAATGGGTCTG	AT5G13080	Clonaje <i>WRKY75</i>
WRKY75-R	CTAGAAAAGAAGAGTAGATTTGCATTTG	AT5G13080	Clonaje <i>WRKY75</i>
GABI-Kat	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC	T-DNA	Genotipado GABI-Kat
LB3 (*a en Fig. 22B, C)	TAGCATCTGAATTTTATAACCAATCTCGA TACAC	T-DNA	Genotipado SAIL
LBb1.3 (*a en Fig. 22B, C)	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	T-DNA	Genotipado SALK

VQ1-RP (*2 en Fig. 22B, C)	GGGGAGATTCAAAGGCATAC	AT1G17147	Genotipado <i>vq1</i>
VQ1-LP (*1 en Fig. 22B, C)	TTTACAGTGGCTACCACTGGC	AT1G17147	Genotipado <i>vq1</i>
VQ10-RP (*5 en Fig. 22B, C)	CGCATATACTTGGGCTTCATG	AT1G78410	Genotipado <i>vq10-H</i>
VQ10-LP	TTGTTTTAAGTTTACCGTTGCTG	AT1G78410	Genotipado <i>vq10-H</i>
pWRKY33-4	TTCAGTCCCTCTCTTTTCTCGAT	AT2G38470	Genotipado <i>wrky33</i>
pWRKY33-5	TCCACTTTCTTCTTCGTTGGA	AT2G38470	Genotipado <i>wrky33</i>
qVQ1-F	CGGTGGCAAAGATTCATCACAGC	AT1G17147	qRT-PCR
qVQ1-R	ATCGAACTCCGTCGTCTCTACACC	AT1G17147	qRT-PCR
qVQ10-F (*3 en Fig. 22B, C)	TTCGACGGCCGTTGTTACGATG	AT1G78410	qRT-PCR
qVQ10-R (*2 en Fig. 22B, C)	GTGGAGCTGTCTGGTATCTTCACC	AT1G78410	qRT-PCR
qWRKY33-F	CTCTCCTTCCACTTGTTTCAGTCC	AT2G38470	qRT-PCR
qWRKY33-R	CTGTGGTTGGAGAAGCTAGAACG	AT2G38470	qRT-PCR
qLBD41-F	TGAAGCGCAAGCTAACGCA	AT3G02550	qRT-PCR
qLBD41-R	ATCCCAGGACGAAGGTGATTG	AT3G02550	qRT-PCR
qPDC1-F	CGATTATGGCACTAACCGGATT	AT4G33070	qRT-PCR
qPDC1-R	TGTTCCACCACCGCCTGATAAC	AT4G33070	qRT-PCR
qDA2-F	ATGACTGGCGAGATGGAATATG	AT1G78420	qRT-PCR
qDA2-R	GGGCGGGAATGTTGTCTAA	AT1G78420	qRT-PCR
qRIP2-F	CTCAAACAGCAGTTGGCTAAAG	AT1G78430	qRT-PCR
qRIP2-R	GAGTGTTTCGGTTTCTTGGATTC	AT1G78430	qRT-PCR
qADH1-F	GCCATGAAGCTGGAGGGATT	AT1G77120	qRT-PCR
qADH1-R	ACTCCCCACATTCTCCGGTA	AT1G77120	qRT-PCR
qL-LDH-F	CTGGCTCGTACTATCCTCCG	AT4G17260	qRT-PCR
qL-LDH-R	CAGCAACCACACCATTCTT	AT4G17260	qRT-PCR
qTIP41L-F	GTGAAAACACTGTTGGAGAGAAGCAA	AT4G34270	qRT-PCR referencia
qTIP41L-R	TCAACTGGATACCCCTTTCGCA	AT4G34270	qRT-PCR referencia
qACT2-F	TTGTTCCAGCCCTCGTTTGT	AT3G18780	qRT-PCR referencia
qACT2-R	TGTCTCGTGGATTCCAGCAG	AT3G18780	qRT-PCR referencia
M13-R	CAGGAAACAGCTATGACC	pCR8/GW/ TOPO, pGBKT7-GW	Secuenciación pCR8/GW/TOPO, pGBKT7-GW
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	pGADT7-GW pGBKT7-GW	Secuenciación pGADT7-GW pGBKT7-GW
35S-seq	CCTTCGCAAGACCCTTCTCTA	pAlligator2	Secuenciación pAlligator2
NosT-R	GCAAGACCGGCAACAGGATTCAATC	pAlligator2	Secuenciación pAlligator2, pMDC43
attR2	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGG	attR2	Secuenciación amiARN y pGWB454

M13-F	TGTA AACGACGGCCAGT	pCR8/GW/ TOPO	Secuenciación pCR8/GW/TOPO
attR1	GTTGTACAAAAAGCAGGCT	attR1	Secuenciación pMDC83
3'pGADT7	GTGAACTTGC GGGGTTTTTCAGTATCTACG ATT	pGADT7	Secuenciación y PCR
5'pGADT7	CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAA CCC	pGADT7	Secuenciación y PCR

6.4.2. ELECTROFORESIS DE ADN O ARN EN GEL DE AGAROSA

La electroforesis en gel de agarosa se utilizó para separar el ADN por tamaño o para comprobar la integridad del ARN. El gel se compone de un 2-3% (p/v) de agarosa y 10 mg/ml de bromuro de etidio en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X (40 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial y 1 mM EDTA, pH 8,5). La electroforesis se corrió a 90-100V en el caso del ADN y a 80V para el ARN, y se visualizó el gel con un transiluminador UV ENDURO™ GDS Touch (Labotaq).

6.4.3. RETROTRANSCRIPCIÓN (RT) DEL ARN

Para obtener ADNc, se realizó retrotranscripción (RT) del ARN mensajero (ARNm) a partir de muestras de ARN total purificado. Se utilizó 1 µg de ARN al que se le añadieron 3 µM de oligo(dT)₁₈ y 0,5 mM de una mezcla de dNTPs y agua miliQ tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC) hasta un volumen final de 16 µl, y se incubó a 65°C durante 5 min. Tras enfriarse durante 5 min en hielo, se le añadieron a la mezcla 2 µl de tampón de reacción 10X de Nzytech, 1 µl (40 U) de inhibidor de ribonucleasa (Nzytech) y 1 µl (200 U) de transcriptasa reversa (RT) M-MuLV sin actividad ARNasa H (Nzytech), y se incubó a 50°C durante 70 min y luego se paró la reacción incubándola a 85°C durante 5 min. El ADNc resultante se almacenó a -20°C.

6.4.4. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)

Los niveles de expresión de los genes de interés se cuantificaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Las reacciones se realizaron utilizando 5 µl de NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (Nzytech), 0,2 µM de cada uno de los oligonucleótidos específicos (Tabla 1), 2 µl de ADNc diluido 1:2 y agua miliQ estéril hasta un volumen final de 10 µl. Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos MicroAmp™ Fast Optical (Applied Biosystems) en un termociclador Quant Studio 3 (Applied Biosystems) siguiendo el programa 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, y 15 s a 95°C, 1 min a 60°C y otros 15 s a 95°C para obtener la curva de disociación). Los resultados fueron analizados con el QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.5.2 y los niveles relativos de expresión génica se calcularon a partir de los valores Ct utilizando la fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, siendo $\Delta\Delta Ct = (Ct_{gen} - Ct_{gen\ referencia})_{muestra\ prueba} - (Ct_{gen} - Ct_{gen\ referencia})_{muestra\ control}$.

6.4.5. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

Se realizó un análisis transcriptómico mediante ARN-Sec (Secuenciación de ARN, BGI Tech Solutions) de plantas Col-0 y *vq10-H* de 12 días cultivadas *in vitro* en condiciones de normoxia o incubadas al 1% de O₂ durante 4 h (hipoxia). Las librerías fueron preparadas con ARNm enriquecidos con oligo(dT)₁₈ obtenidos a partir de ARN total con RIN > 8. El ARN se fragmentó, luego se generó la primera cadena del ADNc mediante RT con hexámeros al azar, y la segunda cadena del ADNc con dUTPs en vez de dTTPs. Los ADNc sintetizados fueron sometidos a reparación de extremos y se adeniló el extremo 3' para permitir la unión de los adaptadores. Después, la cadena marcada con dUTPs se degradó mediante uracil-ADN glicosilasa (UDG) y se generó la librería de ADNc a partir de amplificación del resto de cadenas por PCR. Tras desnaturalizar el producto de PCR, el ADNc de cadena simple se cicló mediante ADN ligasa y un oligonucleótido, se sintetizaron las nanoesferas de ADN y, finalmente, se secuenció con una plataforma DNBSEQ™ propia de BGI. Los datos crudos se filtraron con el software SOAPnuke v.1.5.2 (con los parámetros *-l 15 -q 0.2 -n 0.05*) desarrollado por BGI. Los datos de lecturas ya limpios se guardaron en formato FASTQ y el alineamiento con el genoma de referencia se realizó con el software *Hierarchical Indexing for Spliced Alignment of Transcripts* (HISTAT) v.2.0.4, con los parámetros: *--sensitive --no-discordant --no-mixed -I 1 -X 1000 -p 8 --rna-strandness RF*.

6.4.6. SECUENCIACIÓN SANGER DE ADN

Los plásmidos (200 ng/μl) y los productos de PCR (10 ng/μl) fueron secuenciados por el Servicio de Secuenciación del IBMCP utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 1) con un secuenciador Abi 3130XL (Applied Biosystems) usando el kit de secuenciación de ciclos BigDye™ Terminator v3.1 (Applied Biosystems).

6.4.7. DIGESTIÓN DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

La digestión de ADN con enzimas de restricción se realizó añadiendo al ADN 0,5 μl (2 U) de la enzima correspondiente (Thermo Scientific), 2 μl (1X) del tampón indicado para cada enzima (Thermo Scientific), y agua miliQ estéril hasta un volumen final de 20 μl. La mezcla se incubó a 37°C 1 h, y luego se desactivó la reacción incubándola a 65°C o a 80°C, según la enzima, durante 20 min. El ADN producto de la digestión fue analizado en gel de agarosa o guardado a -20°C.

6.4.8. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS MEDIANTE TECNOLOGÍA GATEWAY

Para realizar los ensayos de Y2H, se generaron las construcciones clonando las CDS de *VQ1*, *VQ10*, *VQ24*, *VQ27*, *VQ32*, *WRKY18*, *WRKY33*, *WRKY40*

y *WRKY75* en los plásmidos pGADT7-GW y pGBKT7-GW (Tabla A1, Fig. A4) (pGADT7 y pGBKT7 modificados para clonaje Gateway), cedidos por el Dr. David Alabadí (IBMCP, Valencia, España). En primer lugar, se amplificaron las CDS a partir de ADNc mediante PCR Phusion con oligonucleótidos específicos (Tabla 1). Para clonar las CDS en el vector de entrada pCRTM8/GW/TOPOTM (Invitrogen) (Fig. A5), se les añadió una adenina (A) protuberante en el extremo 3' incubándolas con polimerasa Taq 10 min a 72°C. Se purificaron los fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa y se introdujeron en el vector de entrada incubando 4,2 µl del producto de la PCR anterior con 1 µl de solución salina y 0,8 µl del pCRTM8/GW/TOPOTM (Invitrogen) a temperatura ambiente durante 2 h. Con los plásmidos resultantes se transformó *E. coli*, se purificaron los ADNs plasmídicos a partir de estas, y se digirieron con la enzima *EcoRI* para comprobar la presencia del inserto, y con *MluI*, *XbaI* o *SacI* para comprobar la direccionalidad del inserto en algunos casos. Después, los plásmidos se secuenciaron con los oligonucleótidos correspondientes (Tabla 1), y se clonaron las CDS correctas en los vectores de destino por recombinación mediante Gateway. Para ello, se incubaron 100 ng de los vectores de entrada y de destino con 2 µl de la enzima GatewayTM LR ClonaseTM II (Invitrogen) y 5 µl de tampón TE a 25°C durante al menos 1 h. Para parar la reacción se incubó la mezcla con 2 µl de proteinasa K a 37°C 10 min y se utilizó para transformar *E. coli* y purificar los plásmidos a partir de estas. Para comprobar que las construcciones estaban bien, los plásmidos fueron digeridos con *XhoI*, *HindIII*, *EcoRI*, *NotI*, *EcoRV*, *XbaI*, *PvuII* o *SacI*, y por último fueron comprobados por secuenciación con oligonucleótidos específicos (Tabla 1).

Las construcciones *35S:HA:VQ1* y *35S:HA:VQ10* (Tabla A1) se generaron clonando las CDS, previamente introducidas en el vector de entrada pCRTM8/GW/TOPOTM (Invitrogen) (Fig. A5), en el vector de destino pAlligator2 (Bensmihen *et al.*, 2004) (Fig. A2) mediante recombinación Gateway. Se siguió un procedimiento similar al anteriormente descrito, pero con algunas particularidades. Dado que los dos vectores de entrada y de destino cuentan con el mismo gen de resistencia para su selección en bacteria, se tuvieron que linealizar los vectores de entrada mediante digestión con la enzima *PvuI* o *XhoI* antes de la recombinación Gateway. Para comprobar que las construcciones estaban bien, los plásmidos fueron digeridos con la enzima *BsmBI*.

Las construcciones *35S:GFP:VQ1*, *35S:GFP:VQ10*, *35S:VQ1:GFP* y *35S:VQ10:GFP* (Tabla A1) se generaron subclonando las CDS previamente introducidas en el vector de entrada pCRTM8/GW/TOPOTM (Invitrogen) (Fig. A5), en los vectores de destino pMDC43 y pMDC83 (Fig. A6), respectivamente. Se siguió el procedimiento descrito anteriormente, pero la comprobación de las construcciones mediante digestión se llevó a cabo con la enzima *EcoRI*. Las construcciones *35S:VQ1:RFP* y *35S:VQ10:RFP* (Tabla A1) se generaron de manera similar pero utilizando como vector de destino el pGWB454 (Fig. A7), donado por el Dr. Manuel Rodríguez-Concepción (IBMCP, Valencia, España).

6.4.9. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES amiARN

Los plásmidos para expresar las construcciones de amiARN para *VQ1*, *VQ10* o ambos (Tabla A1) se generaron introduciendo las secuencias de los sARNs específicos en los vectores pMDC123SB-AtMIR390a-B/c y pMDC32B-AtMIR390a-B/c (Fig. A1), donados por el Dr. Alberto Carbonell (IBMCP, Valencia, España), tal y como se describe en Carbonell (2019). La comprobación de las construcciones por digestión se realizó con las enzimas *XbaI* y *HindIII* o *PvuI* y *NcoI*, y por secuenciación con el oligonucleótido attR2 (Tabla 1).

7. AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

7.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

7.1.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

Para obtener extractos de proteína total se trituró el material vegetal congelado con nitrógeno líquido y al polvo resultante se le añadió un tampón compuesto por 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 10% (v/v) de glicerol, 10 mM ditioneitol (DTT), 1% (v/v) de un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Merck), y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). La mezcla se centrifugó a 4°C a velocidad máxima durante 15 min y se separó el extracto de proteínas presente en el sobrenadante. Alternativamente, el tampón de extracción se preparó con distintas concentraciones de DTT para variar las condiciones rédox.

7.1.2. INMUNOPRECIPITACIÓN Y CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS MARCADAS

Los extractos de proteínas de hojas de *N. benthamiana* co-agroinfiltradas para expresar transitoriamente HA-VQ1 o HA-VQ10 junto con DXS1-GFP se utilizaron para comprobar la interacción *in planta* de estas proteínas mediante co-inmunoprecipitación (Co-IP). Las inmunoprecipitaciones se realizaron con el kit de bolas magnéticas anti-GFP M-270 GFP-Trap® (ChromoTek) y un separador magnético DynaMag™-2 (Life Technologies).

7.2. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

7.2.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

La concentración de proteína total en los extractos se determinó utilizando reactivo de Bradford (Bradford, 1976), midiendo la absorbancia a 595 nm y cuantificando con una curva de calibrado de albúmina de suero bovino

(BSA), en un espectrofotómetro de placas Multiskan GO (Thermo Scientific), usando el SkanIt Software v.7.1 (Thermo Scientific).

7.2.2. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS CON SDS-PAGE

Las proteínas extraídas se separaron por peso molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de SDS (SDS-PAGE) con geles del 10% (v/v) de acrilamida (7,5% (v/v) en el caso de los geles utilizados para separar DXS-GFP). Se calculó la cantidad de proteína (en μg) a cargar, se mezcló con tampón de carga Laemmli 6X (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 4% (v/v) SDS, 0,2% (p/v) de azul de bromofenol, 30% (v/v) de glicerol y concentraciones variables de DTT según las condiciones redox deseadas) y se incubaron a 95°C durante 5 min para su desnaturalización antes de cargarlas en el gel. La electroforesis se llevó a cabo en tampón de electroforesis (250 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1,92 M de glicina) a 100 V durante 90 min.

7.2.3. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Los niveles de proteínas naturalmente presentes en los extractos o proteínas marcadas se analizaron mediante Western Blot. Las proteínas separadas previamente por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina y 20% (v/v) de metanol) con un sistema de transferencia semi-seca Pierce™ (Thermo Scientific) a 50 mA por gel durante 90 min o transferencia en líquido Mini Trans-Blot® (Bio-Rad) para proteínas de mayor peso molecular a 30 V y a 4°C durante 16-24 h. La membrana se tiñó con Ponceau S y se digitalizó como control de carga de las muestras. Tras bloquear la membrana durante toda la noche a 4°C con Tween-Tris-tampón salino (T-TBS) (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl y 0,1% (v/v) de Tween-20) suplementado con un 5% (p/v) de leche desnatada en polvo, se incubó durante 4-6 h a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente, se lavó 3 veces con tampón T-TBS y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente. Tras 3 nuevos lavados con tampón T-TBS se detectaron las proteínas utilizando los reactivos Amersham™ ECL™ Prime (Cytiva) en un lector de imágenes por quimioluminiscencia ImageQuant™ 800 (Cytiva). Los anticuerpos utilizados fueron: el anticuerpo primario anti-GFP monoclonal Living Colors™ (Takara Bio, 1:20000) con un anticuerpo secundario anti-IGg de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (GE HealthCare, 1:10000), y el anticuerpo primario anti-RFP monoclonal (Agrisera, 1:1000) con un anticuerpo secundario anti-IGg de ratón acoplado a HRP (GE HealthCare, 1:10000). Alternativamente, para visualizar las proteínas HA-VQ1 y HA-VQ10, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-HA-HRP (Thermo Scientific, 1:1000) incubando la membrana durante 1h a temperatura ambiente inmediatamente después del bloqueo.

7.2.4. DETERMINACIÓN DE 3-NITROTIROSINA LIBRE EN EXTRACTOS DE PROTEÍNA TOTAL MEDIANTE UPLC-MS/MS

La determinación de 3-nitroY libre fue realizado por el Servicio de Metabolómica del IBMCP según el método descrito por Berton et al. (2012), utilizando espectrometría de masas en tándem acoplado a cromatografía líquida de alta resolución (UPLC-MS/MS). Se midió la 3-nitroY libre en extractos de proteína total de plántulas de 14 días de *Arabidopsis Col-0*, *vq10-H* y *VQ10ox* previamente tratadas con NO, o sin tratar como control.

8. ANÁLISIS *IN SILICO* Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Los plásmidos utilizados y obtenidos en los clonajes fueron analizados utilizando la plataforma Benchling (<https://www.benchling.com/>) y las secuencias de aminoácidos obtenidas fueron analizadas con ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>). Los alineamientos fueron realizados con Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) o con la herramienta BLAST de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los oligonucleótidos para qRT-PCR fueron diseñados usando la herramienta PrimerQuest™ de IDT (<https://eu.idtdna.com/pages>), y todos los oligonucleótidos fueron analizados con la herramienta OligoAnalyzer™ de IDT (<https://eu.idtdna.com/pages>) y la herramienta PatMatch de TAIR10 (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>) para comprobar su especificidad.

Las búsquedas de información sobre genes, proteínas y sus anotaciones se realizaron utilizando las bases de datos TAIR10 (<https://www.arabidopsis.org/>), Araport (<https://www.araport.org/>) y UniProt (<https://www.uniprot.org/>). La búsqueda de mutantes de *Arabidopsis* se realizó a través de la plataforma T-DNA Express SIGnAL (<http://signal.salk.edu/>).

Para analizar el enriquecimiento de categorías funcionales se utilizaron las herramientas del Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org>) y PANTHER (<http://go.pantherdb.org/>). La comparación de perfiles transcriptómicos disponibles públicamente en bases de datos se realizó con la base de datos de ARN-Sec de *Arabidopsis* (<http://ipf.sustech.edu.cn/pub/athrna/>). Los diagramas de Venn fueron realizados comparando listas de genes con Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>). Los oligonucleótidos para obtener los sARNs artificiales específicos para *VQ1*, *VQ10* o para los dos fueron diseñados con la herramienta P-SAMS (<http://p-sams.carringtonlab.org/>). Las predicciones de unión al ADN se realizaron con DNABIND (<https://dnabind.szilab.org/>), los aminoácidos con probabilidad de participar en la unión proteína-ARN fueron analizados utilizando las plataformas DRNApred (<http://biomine.cs.vcu.edu/servers/DRNApred/>) y PPRint (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/pprint/submit.html>), las posibles interacciones entre proteínas se decretaron mediante la base de datos *Arabidopsis* Interaction Viewer (http://bar.utoronto.ca/interactions/cgi-bin/arabidopsis_interactions_viewer.cgi), la predicción de sitios de unión proteína-proteína fue realizada mediante el algoritmo iFrag

(<http://sbi.imim.es/web/index.php/research/servers/iFrag>), la predicción de péptidos diana se realizó con iPSORT (<https://ipsort.hgc.jp/>), y la predicción de localización subcelular con Plant-mSubP (<http://bioinfo.usu.edu/Plant-mSubP/>). Los modelos 3D de estructura de proteínas se obtuvieron mediante la base de datos AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). La predicción de los residuos de C involucrados en la formación de puentes disulfuro fue realizada con la herramienta DIPro de SCRATCH Protein Predictor (<https://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>).

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores de niveles de expresión, longitud de raíz e hipocotilo, tamaño del meristemo radicular y de células elongadas, % de germinación, Φ PSII, contenido de clorofila y de isoprenoides son la media de los resultados de al menos tres réplicas biológicas \pm el error estándar. La significación estadística fue analizada utilizando la prueba *t* de Student desapareada para comparar los datos de cualquier genotipo mutante con los del genotipo silvestre Col-0, o datos de cualquier condición con los del control sin tratar. El valor se consideró estadísticamente significativo a partir de un p -valor $\leq 0,05^*$, y también se representaron los valores $p < 0,01^{**}$ y $p < 0,001^{***}$. Los análisis estadísticos y la visualización gráfica de los datos fueron realizados con el software GraphPad Prism.



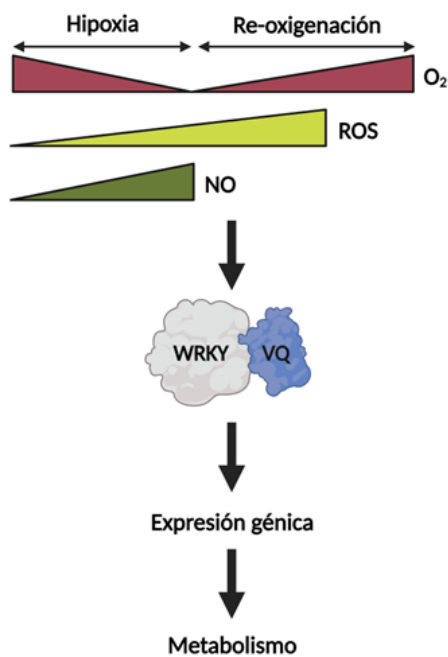
RESULTADOS I

RESULTADOS I

1. IDENTIFICACIÓN DE GENES *VQ* Y *WRKY* INDUCIBLES POR NO, HIPOXIA Y ESTRÉS OXIDATIVO

El O₂ y el NO tienen efectos reguladores fundamentales en la respuesta de las plantas a un gran número de estreses ambientales y, junto con ROS y RNS, son moléculas señalizadoras determinantes para el desarrollo de las plantas y en sus respuestas al estrés (Van Breusegem & Dat, 2006; Suzuki et al., 2012; Fancy et al., 2017; León & Costa-Broseta, 2020). Entre estos factores de estrés, durante la hipoxia y la posterior re-oxigenación que experimentan las plantas al estar sumergidas o anegadas se producen tanto NO como ROS y RNS que junto al O₂ juegan diversos e interconectados papeles reguladores (Pucciariello & Perata, 2017). Las plantas normalmente crecen y se desarrollan en un ambiente atmosférico normóxico caracterizado por contener un 21% de oxígeno. Sin embargo, a veces se ven expuestas a condiciones hipóxicas y, dado que no tienen transportadores específicos de O₂ como la hemoglobina en los animales que permitan el transporte entre diferentes órganos o tejidos de la planta, dependen de la difusión entre células o del transporte pasivo a través del tejido vascular como mecanismos de transporte de oxígeno (Armstrong et al., 2019). Después del periodo de hipoxia, cuando el agua desaparece, las plantas experimentan una rápida re-oxigenación que provoca la producción y el metabolismo de ROS y NO (León et al., 2021).

La respuesta a estrés por hipoxia ocurre principalmente gracias a la señalización del O₂ y el NO, que permite la activación de FT como los ERFVII, que al translocarse al núcleo inducen la transcripción de los llamados genes de respuesta a la hipoxia (*LBD41*, *ADH*, *PDC*, *LDH*) o de otros FT de la familia *ERF*, *WRKY*, *ANAC* o *MYB* (Bui et al., 2020; Hsu et al., 2013; Jethva et al., 2022; Klecker et al., 2014; Pucciariello & Perata, 2017; Schmidt & van Dongen, 2019; Tang et al., 2021). Las proteínas VQ y WRKY están codificadas por grandes familias multigénicas comúnmente asociadas con las respuestas de las plantas a estreses abióticos y bióticos (Jiang et al., 2018; Li et al., 2020; Liu et al., 2020; León et al., 2021). El genoma de *Arabidopsis* incluye 34 y más de 70 genes que codifican proteínas VQ y FT WRKY, respectivamente. Además, las proteínas de estas dos familias interactúan frecuentemente entre ellas (Cheng et al., 2012).



AGI loci	Proteína	Ozono	Hipox	NO
AT1G17147	VQ1	*		
AT1G21320	VQ2			
AT1G21326	VQ3			
AT1G28280	VQ4_MVQ1			
AT1G32585	VQ5			
AT1G32610	VQ6_MVQ8			
AT1G35830	VQ7			
AT1G68450	VQ8			
AT1G78310	VQ9			
AT1G78410	VQ10	*		
AT1G80450	VQ11_MVQ5			
AT2G22880	VQ12			
AT2G33780	VQ13_MVQ2			
AT2G35230	VQ14_IKU1			
AT2G41010	VQ15_CAMB25			
AT2G41180	VQ16_SIB2			
AT2G42140	VQ17			
AT2G44340	VQ18			
AT3G15300	VQ19_MVQ4			
AT3G18360	VQ20			
AT3G18690	VQ21_MKS1			
AT3G22160	VQ22_JAV1			
AT3G56710	VQ23_SIB1			
AT3G56880	VQ24	*		
AT3G58000	VQ25			
AT3G60090	VQ26			
AT4G15120	VQ27	*		
AT4G20000	VQ28			
AT4G37710	VQ29			
AT4G39720	VQ30			
AT5G08480	VQ31_MVQ6			
AT5G46780	VQ32_MVQ7	*		
AT5G53830	VQ33_MVQ3			
AT5G65170	VQ34			

AGI loci	Proteína	Ozono	Hipox	NO
AT2G04880	WRKY1			
AT5G56270	WRKY2			
AT2G03340	WRKY3			
AT1G13960	WRKY4			
AT1G62300	WRKY6			
AT4G24240	WRKY7			
AT5G46350	WRKY8			
AT1G68150	WRKY9			
AT1G55600	WRKY10_MINI3			
AT4G31550	WRKY11			
AT2G44745	WRKY12			
AT4G39410	WRKY13			
AT1G30650	WRKY14			
AT2G23230	WRKY15			
AT5G45050	WRKY16			
AT2G24570	WRKY17			
AT4G31800	WRKY18	*		
AT4G12020	WRKY19			
AT4G26640	WRKY20			
AT2G30590	WRKY21			
AT4G01250	WRKY22			
AT2G47260	WRKY23			
AT5G41570	WRKY24			
AT2G30250	WRKY25			
AT5G07100	WRKY26			
AT5G52830	WRKY27			
AT4G18170	WRKY28			
AT4G23550	WRKY29			
AT5G24110	WRKY30			
AT4G22070	WRKY31			
AT4G30935	WRKY32			
AT2G38470	WRKY33	*		
AT4G26440	WRKY34			
AT2G34830	WRKY35			
AT1G69810	WRKY36			
AT5G22570	WRKY38			
AT3G04670	WRKY39			
AT1G80840	WRKY40	*		
AT4G11070	WRKY41			
AT4G04450	WRKY42			
AT2G46130	WRKY43			
AT2G37260	WRKY44_DSL1			
AT3G01970	WRKY45			
AT2G46400	WRKY46			
AT4G01720	WRKY47			
AT5G49520	WRKY48			
AT5G43290	WRKY49			
AT5G26170	WRKY50			
AT5G64810	WRKY51			
AT5G45260	WRKY52_SLH1			
AT4G23810	WRKY53			
AT2G40750	WRKY54			
AT2G40740	WRKY55			
AT1G64000	WRKY56			
AT1G69310	WRKY57			
AT3G01080	WRKY58			
AT2G21900	WRKY59			
AT2G25000	WRKY60			
AT1G18860	WRKY61			
AT5G01900	WRKY62			
AT1G66600	WRKY63			
AT1G66560	WRKY64			
AT1G29280	WRKY65			
AT1G80590	WRKY66			
AT1G66550	WRKY67			
AT3G62340	WRKY68			
AT3G58710	WRKY69			
AT3G56400	WRKY70			
AT1G29860	WRKY71			
AT5G15130	WRKY72			
AT5G28650	WRKY74			
AT5G13080	WRKY75	*		

Figura 9. Regulación de los genes que codifican proteínas VQ y factores de transcripción WRKY en respuesta a estrés oxidativo desencadenado por ozono, hipoxia (Hipox), y NO. Transcritos más expresados (rojo) y menos expresados (azul) identificados en plantas Col-0 tratadas con ozono (Xu et al., 2015), en respuesta a hipoxia y re-oxigenación (Lee & Bailey-Serres, 2019), y en plantas expuestas a un pulso de NO (Castillo et al., 2018; León et al., 2020). Los genes marcados con asteriscos se inducen por ozono, hipoxia y NO.

Se realizó un análisis *in silico* con distintos sets de datos transcriptómicos de plantas de *Arabidopsis* tratadas con ozono (Xu et al., 2015), con NO exógeno (Castillo et al., 2018; León et al., 2020) y en respuesta a hipoxia y re-oxigenación (Lee & Bailey-Serres, 2019) para identificar genes que estuviesen co-regulados por los tres factores. El ozono, como generador de estrés oxidativo, se ha utilizado para estudiar el papel de ROS en la muerte celular, la señalización en la respuesta a estrés y la regulación de la expresión génica (Vainonen & Kangasjärvi, 2015). Se identificó un grupo de cinco genes *VQ* (*VQ1*, *VQ10*, *VQ24*, *VQ27* y *VQ32*) y cuatro genes *WRKY* (*WRKY18*, *WRKY33*, *WRKY40* y *WRKY75*) diferencialmente expresados en respuesta a la hipoxia, al estrés oxidativo generado por ozono, o tras tratamiento con NO (Fig. 9).

Estos datos sugieren que este grupo de proteínas *VQ* y *WRKY* podrían desempeñar una acción reguladora coordinada en las respuestas a hipoxia o a otros tipos de estrés. Además, esta acción reguladora podría depender de la interacción entre estas proteínas. Sin embargo, aunque ya existen muchas evidencias de la coordinación entre las proteínas *VQ* y los FT *WRKY* para regular las respuestas a diferentes tipos de estrés (León et al., 2021), esta interacción siempre depende de la localización y de las características de cada proteína.

La Tabla 2 muestra un resumen de algunas características moleculares de este grupo de proteínas *VQ* y *WRKY* seleccionadas, que se han descrito previamente o se han analizado en esta Tesis mediante predicciones *in silico*. Las 4 proteínas *WRKY* identificadas unen ADN y regulan la transcripción comportándose, por tanto, como FT (Birkenbihl et al., 2012; Chen & Chen, 2002; Rishmawi et al., 2014; Xu et al., 2006). Sin embargo, las herramientas de predicción indican que ninguna de las proteínas *VQ* tiene la capacidad de unir ADN, aunque dos de ellas, *VQ24* y *VQ32*, son capaces de actuar regulando la transcripción en ensayos *in vitro* con genes reportadores (Jing & Lin, 2015). Además, se ha predicho que pueden estar localizadas en el núcleo, al igual que los FT *WRKY* (Tabla 2). Las otras tres proteínas *VQ* que no poseen actividad transcripcional tendrían una localización subcelular diferente al núcleo según las predicciones, pudiendo estar localizadas en el citoplasma, los cloroplastos y la membrana celular (Tabla 2). A su vez, todas las proteínas *VQ* y *WRKY* son capaces de unirse a otras proteínas y dos de ellas, *VQ1* y *VQ10*, podrían unirse al ARN según predicciones *in silico* (Tabla 2). Estos datos sugieren que algunas de las proteínas *VQ* seleccionadas podrían regular la transcripción o realizar otras funciones reguladoras no relacionadas con la transcripción junto con FT *WRKY* o independientemente de ellos.

Tabla 2. Características de las proteínas VQ y los factores de transcripción WRKY codificadas por genes co-regulados por hipoxia, NO y estrés oxidativo. ^(a)La predicción de unión al ADN se realizó con DNABIND (<https://dnabind.szilab.org/>). ^(b)Los aminoácidos con probabilidad de estar involucrados en la unión proteína-ARN fueron analizados con DRNApred (<http://biomine.cs.vcu.edu/servers/DRNApred/>) y PPRInt (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/pprint/submit.html>). ^(c)La interacción positiva entre proteínas fue propuesta según la base de datos Arabidopsis Interaction Viewer (http://bar.utoronto.ca/interactions/cgi-bin/arabidopsis_interactions_viewer.cgi). ^(d)Según Birkenbihl et al. (2012), Chen & Chen (2002), Jing & Lin (2015), Rishmawi et al. (2014) y Xu et al. (2006). ^(e)La predicción de péptidos señal fue realizada con iPSORT (<https://ipsort.hgc.jp/>). ^(f)La predicción de localización subcelular fue realizada con Plant-mSubP (<http://bioinfo.usu.edu/Plant-mSubP/>). Mit, mitocondria; Cl, cloroplasto; Cit, citoplasma; Nuc, núcleo; Mem, membrana.

AGI loci	Proteína	Proteína-ADN ^(a)	Proteína-ARN ^(b)	Proteína-Proteína ^(c)	Regulación de la Transcripción ^(d)	Péptido señal ^(e)	Localización subcelular ^(f)
AT1G17147	VQ1	NO	SÍ	SÍ	NO	Mit	Cit/Nuc/Cl
AT1G78410	VQ10	NO	SÍ	SÍ	NO	NO	Cit/Nuc/Cl
AT3G56880	VQ24	NO	NO	SÍ	SÍ	NO	Nuc
AT4G15120	VQ27	NO	NO	SÍ	NO	Cl	Mem/Cl/Nuc
AT5G46780	VQ32	NO	NO	SÍ	SÍ	NO	Nuc
AT4G31800	WRKY18	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	Nuc
AT2G38470	WRKY33	SÍ	NO	SÍ	SÍ	Mit	Nuc
AT1G80840	WRKY40	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	Nuc
AT5G13080	WRKY75	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	Nuc

2. LOS GENES *VQ1* Y *VQ10* PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DEL DESARROLLO DE LA PLANTA Y EN LAS RESPUESTAS A ESTRÉS

De entre los 5 genes *VQ* y los 4 genes *WRKY* cuya expresión aumenta en respuesta a NO, hipoxia y estrés oxidativo, se decidieron estudiar más a fondo los genes *VQ1* y *VQ10*. Este par de genes codifican dos proteínas cortas, con una gran homología de secuencia aminoacídica (Fig. 10A) y de estructura (Fig. 10B), y forman un clado separado del resto en el árbol filogenético de la familia de proteínas VQ (Fig. 5). Estos datos sugieren que estas dos proteínas podrían ser funcionalmente redundantes. Además, los análisis predictivos de sus características (Tabla 2) sugieren que su modo de acción podría ser diferente al resto de proteínas VQ.

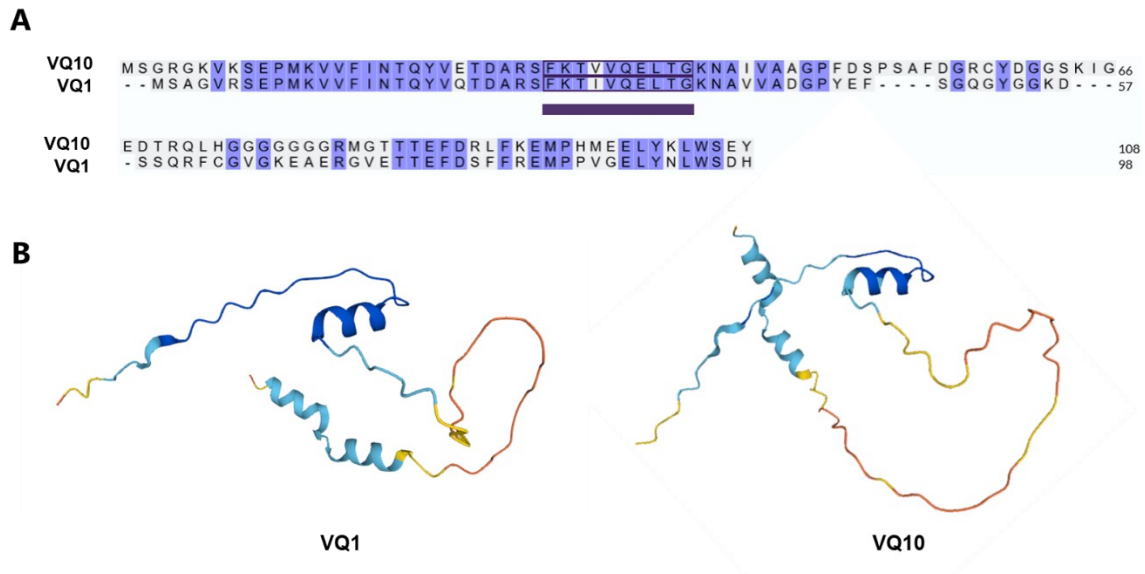


Figura 10. Secuencia de aminoácidos y modelo de estructura tridimensional de las proteínas VQ1 y VQ10. A. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de VQ1 y VQ10 con los aminoácidos conservados destacados en violeta y el motivo VQ subrayado en violeta oscuro. Las proteínas VQ1 y VQ10 están compuestas por 98 y 108 aminoácidos, respectivamente. **B.** La estructura 3D de las proteínas fue generada con AlphaFold, y está formada por tres hélices alfa y un bucle desordenado.

Una búsqueda realizada en la base de datos de ARN-Sec de Arabidopsis (<http://ipf.sustech.edu.cn/pub/athrna/>) indicó que los genes *VQ1* y *VQ10* estaban regulados por múltiples factores de desarrollo, ambientales y nutricionales, algunos comunes en ambos genes y otros específicos de cada gen (Fig. 11). Los datos *in silico* indicaron que la máxima expresión de *VQ1* durante el desarrollo se encontraba en raíces tanto de 5 días después de la germinación como de 3 y 4 semanas, y la de *VQ10* en hojas maduras, incluso en hojas de 40 días cuando ya se ha iniciado el proceso de senescencia (Fig. 11). En la respuesta a estreses abióticos, tanto *VQ1* como *VQ10* muestran su máxima expresión en respuesta a estrés oxidativo provocado por tratamiento de ozono (Fig. 11). El estrés hídrico, la radiación ultravioleta (UV), el estrés osmótico, la herida, o la deficiencia de nutrientes también aumentan la expresión de *VQ1* y *VQ10*, aunque en menor medida (Fig. 11).

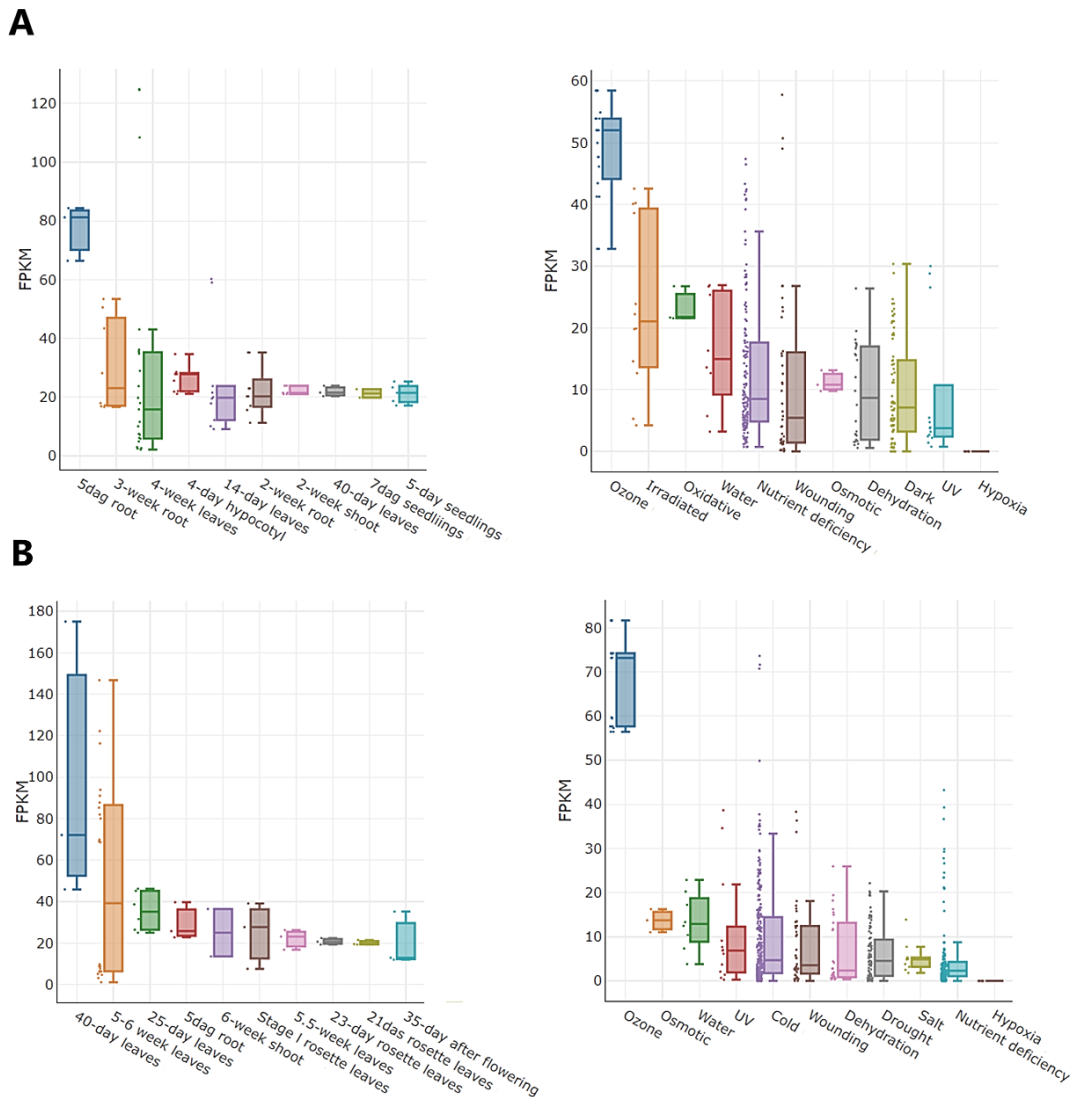


Figura 11. Factores de desarrollo y de estrés que provocan la inducción de la expresión de VQ1 y VQ10. Las gráficas son el resultado de una búsqueda *in silico* de condiciones en las que la expresión de **(A)** VQ1 y **(B)** VQ10 aumentase, y fueron realizadas a partir de datos públicos de la base de datos Arabidopsis ARN-Sec (<http://ipf.sustech.edu.cn/pub/athrna/>).

Además, se confirmó mediante un experimento de tratamiento con NO que *VQ1* y *VQ10* aumentaban su expresión tras el tratamiento, alcanzando conjuntamente un pico a los 30 min (Fig. 12A). Ambos genes también alcanzaron un pico de expresión de los 30 a los 45 min tras la exposición a una atmósfera hipóxica conteniendo un 1% de O₂ y precediendo a la inducción de típicos genes de respuesta a hipoxia como *LBD41* y *PDC1* (Fig. 12B).

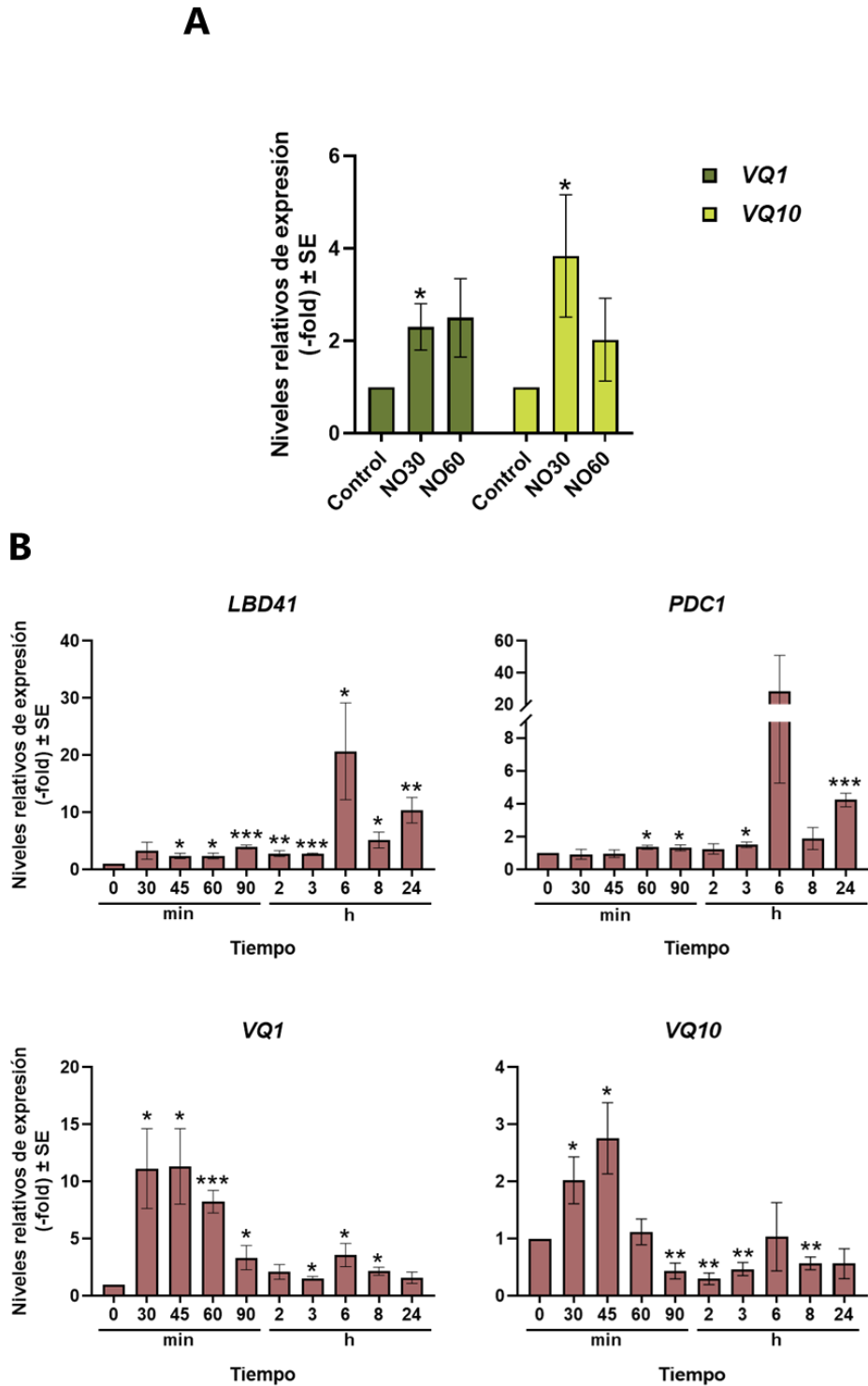


Figura 12. Evolución de la expresión de VQ1 y VQ10 en respuesta a un pulso de NO y en respuesta a hipoxia. **A.** Niveles relativos de expresión de VQ1 y VQ10 en plantas 30 y 60 minutos después de la aplicación de un pulso de NO de 300 ppm. Las muestras control se recogieron al mismo tiempo, pero sin aplicar NO. **B.** Niveles relativos de expresión de VQ1, VQ10 y los genes de respuesta a hipoxia LBD41 y PDC1 en plantas tras ser expuestas a una hipoxia del 1% de O₂ en oscuridad durante distintos tiempos. Todos los niveles de expresión fueron analizados por qRT-PCR usando oligonucleótidos específicos (Tabla 1) a partir de ARN de plántulas procedentes de tres experimentos independientes. Los valores representan la media \pm el error estándar (SE) y el valor estadístico fue calculado con *t* de Student comparando cada condición en cada tiempo con el control no tratado a tiempo 0. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3. INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS VQ Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN WRKY REGULADOS POR HIPOXIA, NO Y ESTRÉS OXIDATIVO

El hecho de que las proteínas VQ1 y VQ10 tuviesen características diferentes del resto de proteínas VQ (Tabla 2) (Jing & Lin, 2015), junto con la gran homología y conservación de su secuencia aminoacídica y su estructura 3D (Fig. 10) nos llevó a pensar que el modo de acción de VQ1 y VQ10 podría estar basado en su interacción con otras proteínas. Para comprobarlo, en primer lugar, se realizó un ensayo de doble híbrido de levadura (Y2H) utilizando VQ1 y VQ10 como cebo, junto con el conjunto de proteínas VQ y FT WRKY identificados previamente como inducibles por hipoxia, NO y ozono (Fig. 9). De este modo se confirmó que VQ1 y VQ10 eran capaces de interactuar entre ellas y consigo mismas, y también con las proteínas VQ24, VQ27 y VQ32 y con los FT WRKY18, WRKY33, WRKY40 y WRKY75 (Figura 13). Las interacciones de VQ1 y VQ10 con WRKY33 solo se detectaron al usar WRKY33 como cebo y las proteínas VQ como presa, al igual que la interacción de VQ10 con VQ27 solo se detectó al usar VQ27 como cebo y VQ10 como presa (Fig. 13B). También se observó que usando VQ24 y WRKY40 como cebo eran capaces de auto-activar la transcripción (Fig. 13B). Cabe destacar que las interacciones de VQ1 y VQ10 con WRKY18 y WRKY40 presentaron una afinidad más baja que el resto (Fig. 13). Estos datos sugieren que VQ1 y VQ10 podrían ser capaces de formar homo y heterodímeros entre ellas y con otras proteínas VQ, además de interactuar con FT WRKY, probablemente modulando su actividad transcripcional a través de la formación de heterodímeros o de complejos de orden superior.

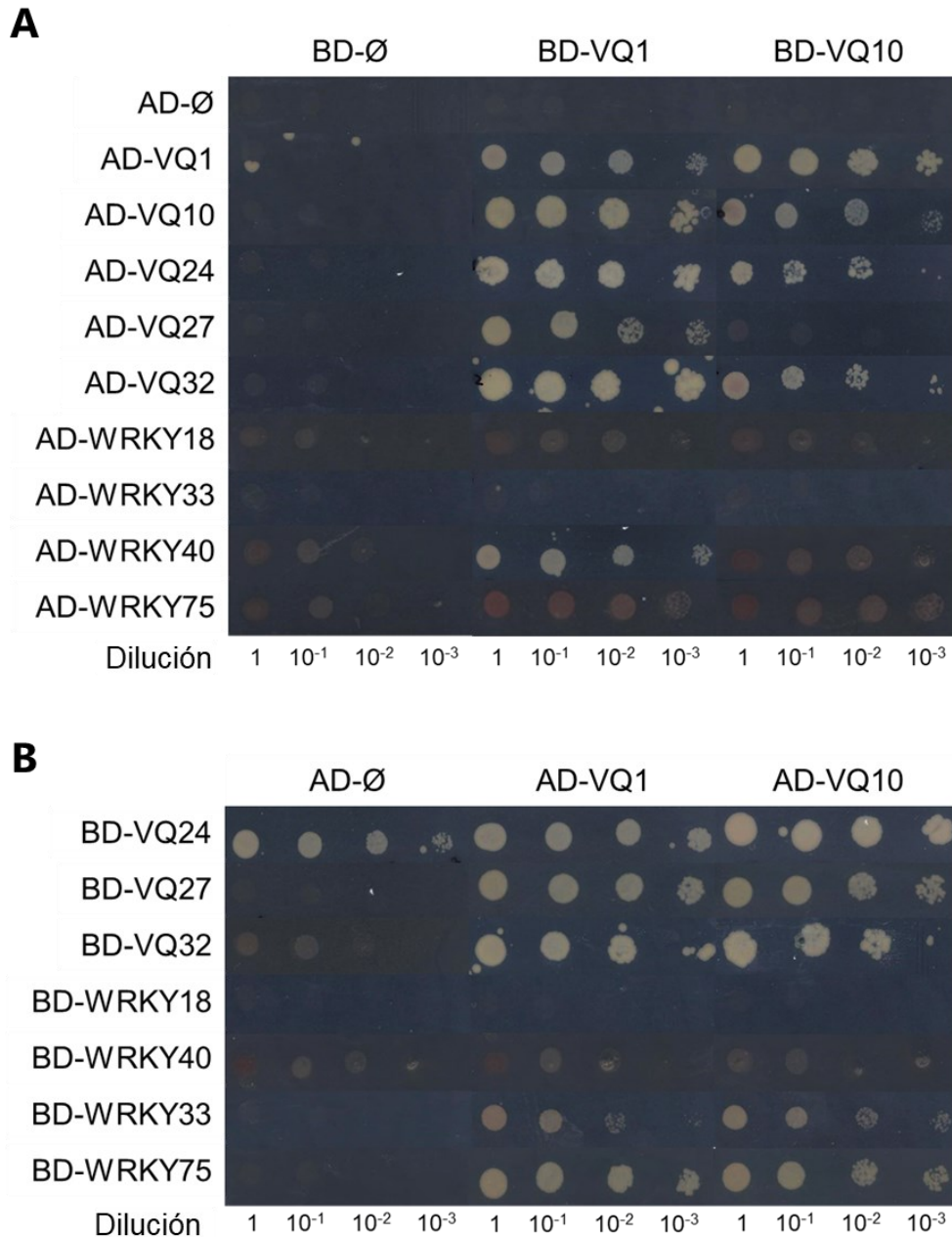


Figura 13. Ensayo de doble híbrido de levadura (Y2H) de interacciones de proteínas de VQ1 y VQ10 con otras proteínas VQ y WRKY inducibles por hipoxia, NO y estrés oxidativo. Los ensayos fueron realizados **(A)** utilizando clones con VQ1 y VQ10 fusionados al dominio de unión al ADN de la galactosidasa 4 (GAL4) (BD) y las otras proteínas para comprobar su interacción fusionadas al dominio de activación, o **(B)** fusionando VQ1 y VQ10 al AD y el resto de las proteínas al BD. Los controles de auto-activación fueron realizados usando los plásmidos vacíos (∅) conteniendo el BD o el AD.

4. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INTERACTORAS DE VQ1

Para comprobar si la capacidad de interacción proteína-proteína de VQ1 y VQ10 era específica para con otras proteínas VQ y los FT WRKY o no, y también para tratar de averiguar su función, se realizó un rastreo de Y2H utilizando una genoteca normalizada de Arabidopsis Mate&Plate y VQ1 como proteína cebo. El rastreo permitió identificar 504 clones positivos que tras secuenciarlos se correspondieron con 289 proteínas presa

diferentes que podrían interactuar con VQ1. Se realizó un análisis de términos GO (*Gene Ontology*) de las proteínas y entre ellas se encontraron proteínas con localizaciones subcelulares muy diferentes: 47 proteínas cloroplásticas, 34 nucleares, 31 citoplásmicas, 28 mitocondriales y 23 proteínas asociadas a endomembrana (Fig. 14A, Tabla Supl. 1). En el análisis se encontró un gran enriquecimiento de procesos biológicos relacionados con metabolismo, en concreto con el metabolismo del carbono, el nitrógeno y el azufre incluyendo azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos, y también relacionados con procesos celulares como la fotosíntesis, ensamblaje de proteínas y de componentes celulares (Fig. 14B, Tabla A3).

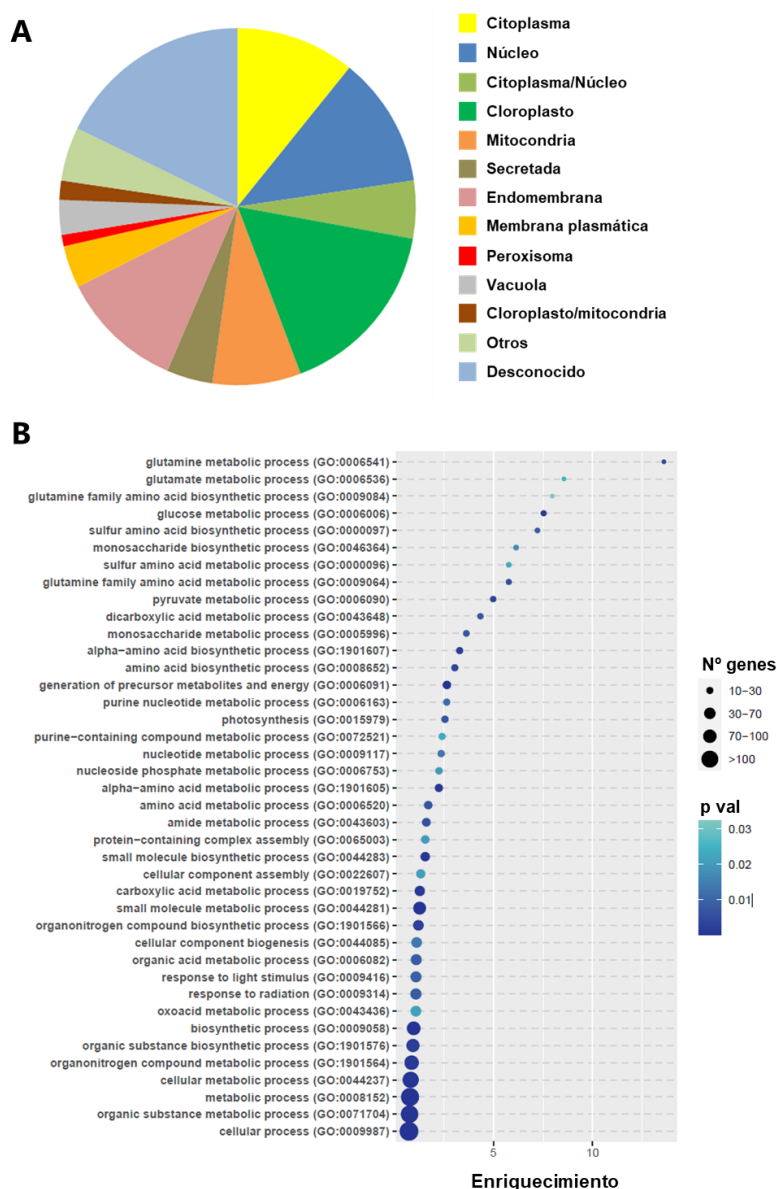


Figura 14. Análisis de términos GO de las proteínas interactoras de VQ1 identificadas en el rastreo de Y2H con una genoteca de Arabidopsis Mate&Plate. A. Análisis de términos GO de componentes celulares. B. Análisis de términos GO de procesos celulares. Los análisis fueron realizados con PANTHER (<http://go.pantherdb.org/>).

Con el objetivo de validar los resultados del rastreo, se volvieron a analizar por Y2H algunas interacciones usando como presa proteínas con diferentes localizaciones subcelulares seleccionadas al azar y VQ1 y VQ10 como cebo. El resultado fue que todas las interacciones testadas fueron confirmadas, excepto para UBC19 que presentaba auto-activación de la transcripción (Fig. 15). No solo eso, además todas estas interacciones confirmadas para VQ1 también fueron detectadas para VQ10 (Fig. 15), sugiriendo que ambas proteínas podrían ser también homólogas en términos de interacción proteína-proteína.

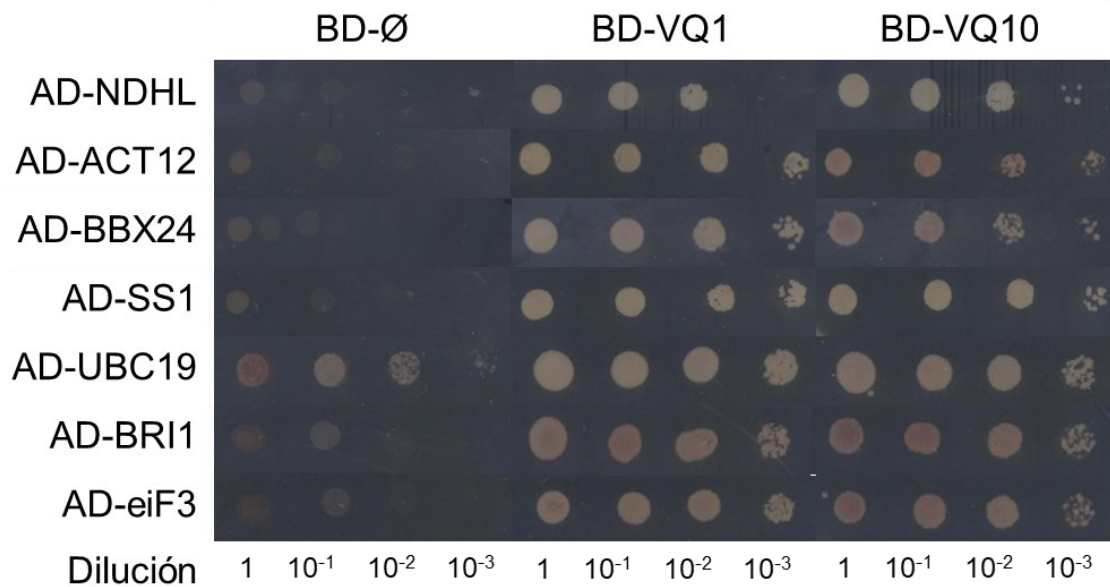


Figura 15. Ensayos de Y2H para comprobar la interacción de VQ1 y VQ10 con proteínas interactoras de VQ1 identificadas en la genoteca de Y2H, seleccionadas al azar. Todas las interacciones confirmadas para VQ1 fueron también identificadas para VQ10. Los controles de auto-activación fueron realizados usando los plásmidos vacíos (∅) conteniendo el BD. NDHL, *NADH dehydrogenase like complex L*; ACT12, actina 12; BBX24, *B-box zinc finger protein 24*; SS1, *Starch synthase 1*; UBC19, *Ubiquitin-conjugating enzyme E2 19*; BRI1, *Brassinosteroid insensitive 1*; eiF3, *Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J*.

5. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS VQ1 Y VQ10

Los predictores de localización subcelular ya sugirieron que VQ1 y VQ10 están localizadas en el citoplasma, el núcleo y los cloroplastos (Tabla 2). Sin embargo, debido a la identificación de tantos posibles interactores de VQ1 con diferentes localizaciones subcelulares y a que nunca se había comprobado experimentalmente cual era realmente la localización subcelular de VQ1 y VQ10, se concluyó que era necesario verificarla. Para ello, se transformaron transitoriamente plantas de *N. benthamiana* con construcciones que expresan versiones de VQ1 y VQ10 fusionadas a las proteínas fluorescentes GFP o RFP en sus extremos N- y C-terminal (Tabla A1), para localizarlas mediante microscopía confocal. Todas las versiones de las proteínas de fusión fueron identificadas por Western Blot (Fig. 16A) y se vio por microscopía confocal que su localización subcelular era el núcleo y el citoplasma (Fig. 16B). A pesar de que se analizaron las proteínas VQ1 y VQ10

fusionando la GFP no solo en N-terminal sino también en C-terminal para no truncar un posible péptido señal, potencialmente localizado en el extremo N-terminal, nunca se detectó localización cloroplástica.

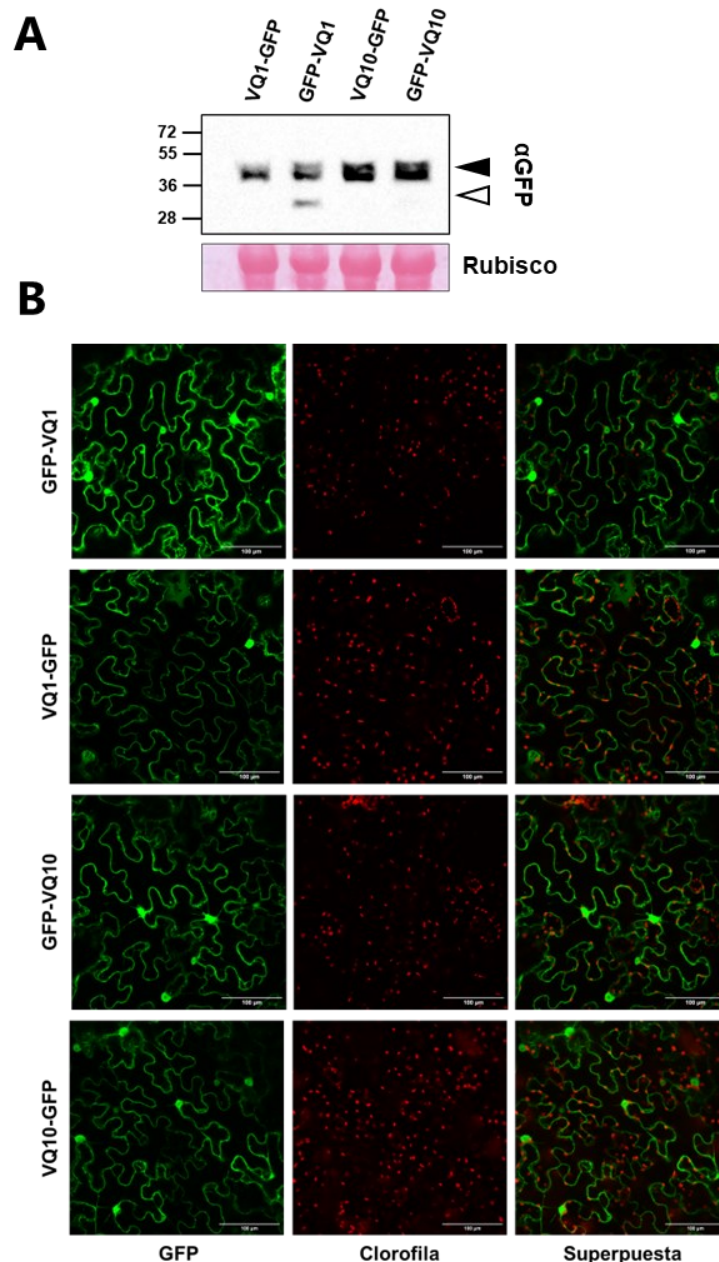


Figura 16. Localización subcelular de las proteínas VQ1 y VQ10 con la GFP fusionada en N- o C-terminal. **A.** Análisis Western Blot usando un anticuerpo monoclonal anti-GFP (α -GFP) sobre extractos de proteína total obtenidos de hojas de plantas de *N. benthamiana*. A la derecha se muestra la posición de las proteínas VQ1 y VQ10 con la GFP fusionada están marcadas por un triángulo negro y la GFP libre con un triángulo blanco. A la izquierda se muestra la posición de los marcadores de peso molecular en kDa. La rubisco se representa debajo en la misma membrana teñida con Ponceau S. **B.** Imágenes de microscopio confocal de hojas de *N. benthamiana* transformadas transitoriamente con plásmidos que expresan las proteínas VQ1 y VQ10 fusionadas a GFP en N- y C-terminal (verde). También se representa la autofluorescencia de la clorofila (rojo) y la superposición de los dos canales (Superpuesta). La escala (barra blanca en la parte inferior derecha de las imágenes) representa 100 μ m.

Haciendo uso del algoritmo iFrag, se predijo que la interacción VQ1-VQ10 previamente detectada por Y2H (Fig. 13A) también podría ocurrir *in planta* por medio del motivo VQ y sus aminoácidos flanqueantes (Fig. 17A). Esta interacción *in planta* se confirmó en citoplasma y núcleo co-infiltrando las versiones de VQ1 y VQ10 fusionadas a distintas proteínas fluorescentes en *N. benthamiana*, previamente identificadas por Western Blot (Fig. 16A; Fig. 17B, C).

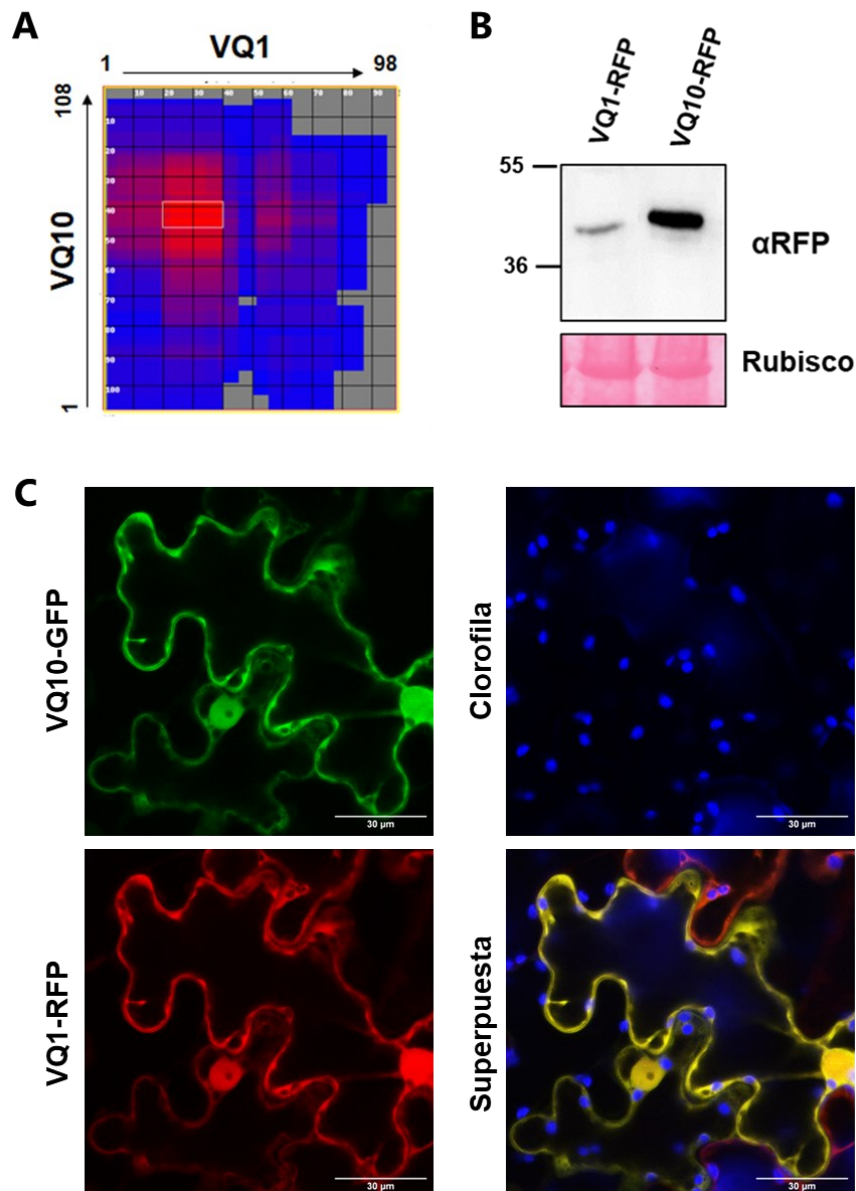


Figura 17. Co-localización de las proteínas VQ1 y VQ10. **A.** Predicción del sitio de unión proteína-proteína de VQ1 con VQ10 realizada con iFrag (<http://sbi.imim.es/web/index.php/research/servers/iFrag>). **B.** Análisis Western Blot usando un anticuerpo monoclonal anti-RFP (α -RFP) sobre extractos de proteína total de hojas de plantas de *N. benthamiana* transformadas transitoriamente con plásmidos que expresan las proteínas VQ1 y VQ10 fusionadas a RFP en C-terminal. A la izquierda se muestra la posición de los marcadores de peso molecular en kDa. La rubisco se representa debajo en la misma membrana teñida con Ponceau S. **C.** Imágenes de microscopio confocal de hojas de las mismas plantas, mostrando VQ1-RFP en rojo, VQ10-GFP en verde, la auto-fluorescencia de la clorofila en azul, y la superposición de los canales (Superpuesta). La escala (barra blanca en la parte inferior derecha de las imágenes) representa 30 μ m.

6. VQ1 Y VQ10 INTERACCIONAN CON PROTEÍNAS CLOROPLÁSTICAS

Los resultados del rastreo de Y2H permitió identificar un alto número de proteínas con localización cloroplástica que interaccionan con VQ1 y potencialmente también con VQ10 (Fig. 14, 15). De entre las 47 proteínas cloroplásticas identificadas en el rastreo, 28 eran enzimas, 14 eran proteínas esenciales para el ensamblaje, mantenimiento y protección de los fotosistemas I y II, y 4 eran transportadores de metabolitos o proteínas al cloroplasto (Tabla 3). Este hallazgo sugería que VQ1 y seguramente también VQ10 podrían ser importantes en la regulación de la función de los cloroplastos.

Para esclarecer esta hipótesis, se seleccionó una de las proteínas interactoras de VQ1 con localización cloroplástica de las obtenidas en el rastreo de Y2H para comprobar que la interacción también ocurría *in planta*: la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS). DXS es una enzima clave en el metabolismo de los cloroplastos y participa en la biosíntesis de moléculas tan importantes como terpenos, isoprenoides, clorofilas, carotenoides y hormonas (Estévez et al., 2001; Rodríguez-Concepcion, 2016). La predicción de interacciones proteína-proteína utilizando iFrag entre DXS y VQ1 o VQ10 señaló que ambas proteínas VQ podrían interaccionar a través de su respectivo dominio VQ y sus aminoácidos flanqueantes con tres dominios diferentes de la proteína DXS (Figura 18A). Se comprobó la interacción *in planta* de DXS con VQ1 y VQ10 mediante Co-IP en hojas de *N. benthamiana* co-infiltradas con construcciones que expresan VQ1 o VQ10 etiquetadas con hemaglutinina (HA) en el extremo N-terminal (HA-VQ1 y HA-VQ10), y con DXS-GFP (Tabla A1). Utilizando anticuerpos anti-GFP se precipitó la proteína DXS-GFP junto con las proteínas HA-VQ1 y HA-VQ10, confirmando así las interacciones *in planta* (Fig. 18B). Tanto en el *input* como al precipitar la proteína, se observaron dos formas de DXS-GFP: formas oligoméricas de alto peso molecular que superan los 250 kDa, y formas de 105 kDa que se corresponden con el tamaño del monómero DXS-GFP (Fig. 18B).

Tabla 3. Proteínas interactoras de VQ1 con localización cloroplástica.

AGI loci	Símbolo	Anotación
AT1G70760	NDHL	<i>CRR23_NdhL_inorganic carbon transport protein-related</i>
AT3G04790	RPI3	<i>Ribose 5-phosphate isomerase, type A protein</i>
AT5G66055	AKRP	<i>AKRP_ ankyrin repeat protein</i>
AT2G32640	F4ITT3;Q0WVA1	<i>LCYB Lycopene beta/epsilon cyclase protein</i>
AT5G24300	SSY1	<i>ATSS1_ Starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic</i>
ATCG00490	RBL	<i>RBCL_ ribulose-bisphosphate carboxylases</i>
AT5G53330	Q8LG11	<i>Ubiquitin-associated/translation elongation factor EF1B protein</i>
AT1G79530	G3PP1	<i>GAPCP-1_glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of plastid 1</i>
AT3G23640	Q93Y12/F4J460	<i>HGL1_heteroglycan glucosidase 1/protein kinase-related</i>
AT3G06200	GMK3	<i>Guanylate kinase 3, chloroplastic</i>
AT3G13390	Q9LJF2	<i>L-ascorbate oxidase pectinesterase-like protein pollen-specific protein-like</i>
AT5G52320	Q9FHC8	<i>CYP96A4_cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 4</i>
AT1G64510	RR6	<i>PRPS6_Translation elongation factor EF1B/ribosomal protein S6 family protein</i>
AT4G24460	CLT2	<i>CLT2/CRT (chloroquine-resistance transporter)-like transporter 2</i>
AT3G59870	Q9M1Y7	<i>Uncharacterized protein</i>
AT1G30510	FNRR2	<i>ATRFNR2_Ferredoxin--NADP reductase, root isozyme 2, chloroplastic</i>
AT5G14260	Q8VZB5	<i>Rubisco methyltransferase family protein</i>
AT3G54050	F16P1	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase 1, chloroplastic/HCEF1_high cyclic electron flow 1</i>
AT5G19620	OEP80	<i>ATOEP80_TOC75-V_outer envelope protein of 80 kDa</i>
AT5G04590	Q9LZ66;SIR	<i>SIR_sulfite reductase</i>
AT3G54210	RK17	<i>PRPL17_Ribosomal protein L17 family protein</i>
AT5G16390	BCCP1;F4KE21	<i>BCCP_CAC1A_chloroplastic acetylcoenzyme A carboxylase 1</i>
AT5G65840	Q8L5Y8	<i>Thioredoxin superfamily protein</i>
AT2G36250	FTZ21	<i>ATFTSZ2-1_Tubulin/FtsZ family protein</i>
AT3G32930	Q9LHC4	<i>6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase</i>
AT2G33590	O22809	<i>AtCRL1_NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein</i>
AT3G26900	SKL1	<i>ATSKL1_shikimate kinase like 1</i>
AT5G50100	Y5010	<i>DCC1_Putative thiol-disulphide oxidoreductase DCC</i>
AT2G34860	PSA2	<i>PHOTOSYSTEM I ASSEMBLY 2, chloroplastic</i>
AT1G74070	CP26B	<i>Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein</i>
AT1G56500	SOQ1	<i>SUPPRESSOR OF QUENCHING 1, chloroplastic</i>
AT4G17560	RK191	<i>50S Ribosomal protein L19-1</i>
AT1G19800	TGD1	<i>ABCI14_TGD1_trigalactosyldiacylglycerol 1</i>
AT5G12040	NILP3	<i>Omega-amidase, chloroplastic_Nitrilase/cyanide hydratase/N-acyltransferase</i>
AT4G15560	DXS	<i>AtCLA1_DEF_DXPS2_DXS_DXS1_Deoxyxylulose-5-phosphate synthase</i>
AT1G74880	NDHO	<i>NDH-O_NdhO_NAD(P)H:plastoquinone dehydrogenase complex subunit O</i>
AT3G01480	CYP38	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase_ATCYP38_cyclophilin 38, chloroplastic</i>
AT4G32770	TOCC;VTE1	<i>VTE1/SDX1_tocopherol cyclase/ vitamin E deficient 1/ sucrose export defective 1</i>
AT4G32520	GLYP3	<i>AtSHMT3_serine hydroxymethyltransferase 3</i>
AT1G34000	OHP2	<i>Light-harvesting complex-like protein OHP2, chloroplastic/one-helix protein 2</i>
AT2G26340	F4IUI9;F4IUJ0	<i>Uncharacterized protein</i>
AT2G30170	P2C26	<i>PBCP_Protein phosphatase 2C protein 26</i>
AT1G75460	Q9FWT4	<i>ATP-dependent protease La (LON) domain protein</i>
AT4G31990	B9DG21;F4JTH0	<i>AAT3_ASP5_ATAAT1_aspartate aminotransferase 5</i>
AT1G76450	PPD3	<i>Photosystem II reaction center PsbP domain-containing protein 3, chloroplastic</i>
AT5G07020	MPH1	<i>Maintenance of PSII under high light 1 MPH1 proline-rich family protein</i>
AT1G13270	F4HQQ8;MAP1B	<i>MAP1B_methionine aminopeptidase 1B chloroplastic</i>

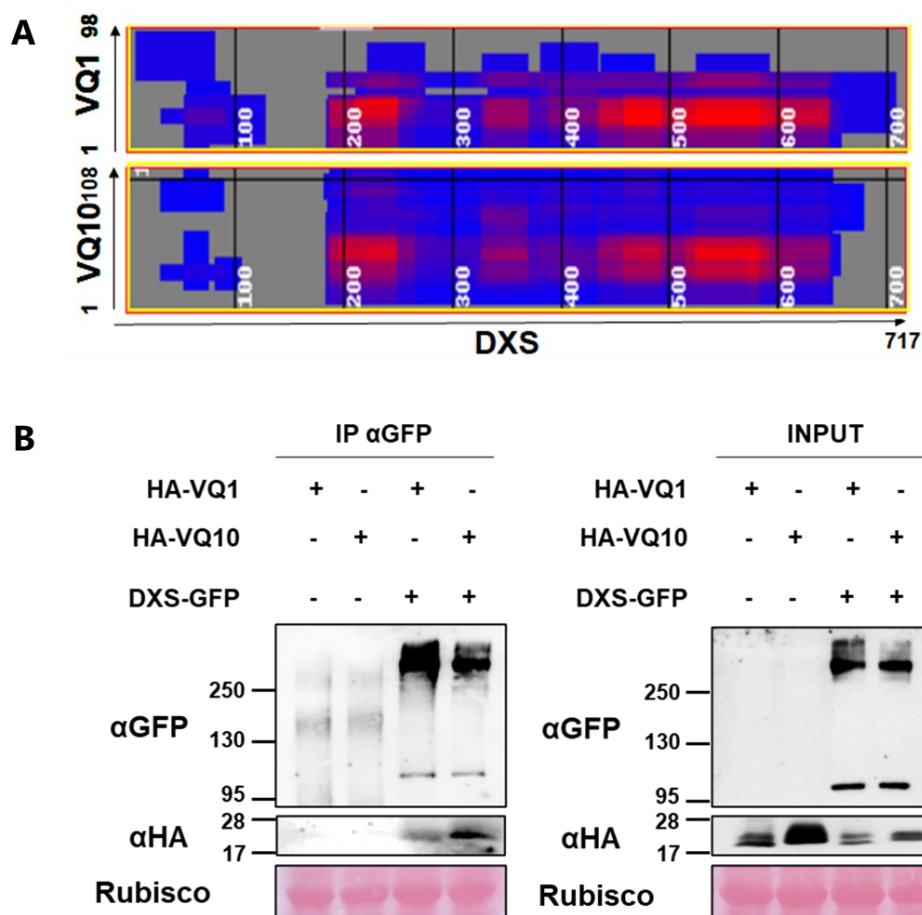


Figura 18. Co-inmunoprecipitación de las proteínas HA-VQ1 y HA-VQ10 con GFP-DXS. **A.** Predicción *in silico* de la interacción entre DXS y VQ1 o VQ10 realizada con el algoritmo iFrag (<http://sbi.imim.es/web/index.php/research/servers/iFrag>). **B.** Se usaron hojas de plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas para extraer proteína total (input) y para inmunoprecipitar (IP) las proteínas con bolas magnéticas cubiertas con anticuerpo α GFP. Se detectaron el monómero de DXS de 105 kDa y formas oligoméricas de alto peso molecular de más de 250 kDa. Las proteínas fueron detectadas mediante Western Blot con los anticuerpos indicados. A la izquierda se muestra la posición de los marcadores de peso molecular en kDa. La rubisco se representa debajo en la misma membrana teñida con Ponceau S.

7. VQ1 Y VQ10 PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN REDOX DE LA OLIGOMERIZACIÓN DE DXS

En un estudio reciente realizado por Di et al. (2023) se ha descrito que la función de DXS está controlada por un mecanismo de dimerización/monomerización que está a su vez controlado con procesos de agregación de proteínas que dependen de la disponibilidad de algunos sustratos de la ruta del metileritritol 4-fosfato (MEP). Para analizar si las interacciones VQ-DXS alteraban de alguna manera la localización subcelular o el estado de agregación de DXS-GFP, se realizó un análisis de microscopía confocal mediante co-infiltración de DXS-GFP sin o con HA-VQ1 o HA-VQ10. La interacción de DXS con las proteínas VQ a simple vista no dio como resultado un patrón de fluorescencia claramente alterado de DXS-GFP (Fig. 19).

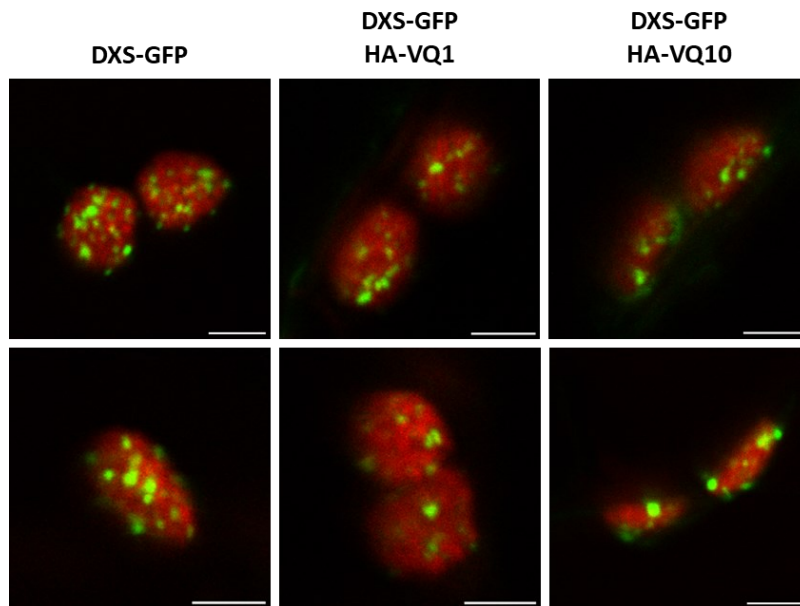


Figura 19. Las proteínas VQ1 y VQ10 no alteran la agregación o el estado de oligomerización de DXS en los cloroplastos. Imágenes de microscopio confocal de cloroplastos de hojas de *N. benthamiana* transformadas transitoriamente con plásmidos que expresan las construcciones indicadas. La escala (barra blanca en la parte inferior derecha de cada imagen) representa 3 μm .

La oligomerización de DXS que se descubrió al precipitar la proteína (Fig. 18B) podría ser resultado del control redox de los grupos tiol de las cisteínas. La proteína DXS contiene 12 residuos de cisteína (C). Se realizó un análisis predictivo *in silico* del estado redox de las cisteínas de DXS que propuso a las cisteínas 23 y 42 como susceptibles de formar puentes disulfuro (Fig. 20A). Además, observando la estructura 3D de DXS, los residuos C23 y C42 estaban ubicados en un bucle desordenado en la parte externa de la proteína a una distancia el uno del otro que hacen difícil la formación de puentes disulfuro intramoleculares (Fig. 20B). Por lo tanto, es probable que estos residuos C estén involucrados en la formación de puentes disulfuro intermoleculares que podrían ocurrir con proteínas diferentes o también con otras moléculas de DXS, desencadenando así el proceso de oligomerización. La formación de este tipo de puentes disulfuro en otras proteínas sometidas a control redox está catalizada por peroxiredoxinas (Dietz, 2011; Perkins et al., 2015). Aunque esta formación de puentes disulfuro suele depender de las 2-Cis peroxiredoxinas, que contienen dos residuos C (peroxidática y resolutive) que participan en el proceso (Liebthal et al., 2020; Muthuramalingam et al., 2009), éste también puede darse por medio de 1-Cis peroxiredoxinas (Lee et al., 2000; Stacy et al., 1996). Hasta la fecha, PER1 (1-Cis peroxiredoxina 1) es la única 1-Cis peroxiredoxina que se ha identificado en *Arabidopsis* (Haslekås et al., 1998). Ambas proteínas VQ1 y VQ10 contienen un solo residuo C, el C63 y el C58, respectivamente, y los dos tienen potencial para formar puentes disulfuro y también se encuentran ubicadas en un bucle desordenado al observar la estructura 3D de las proteínas (Fig. 20A, B). Teniendo en cuenta esta información, se propuso la hipótesis de que VQ1 y VQ10 pudieran funcionar como nuevas 1-Cis peroxiredoxinas no identificadas previamente, actuando sobre DXS controlando su oligomerización y agregación mediante un mecanismo de tipo redox.

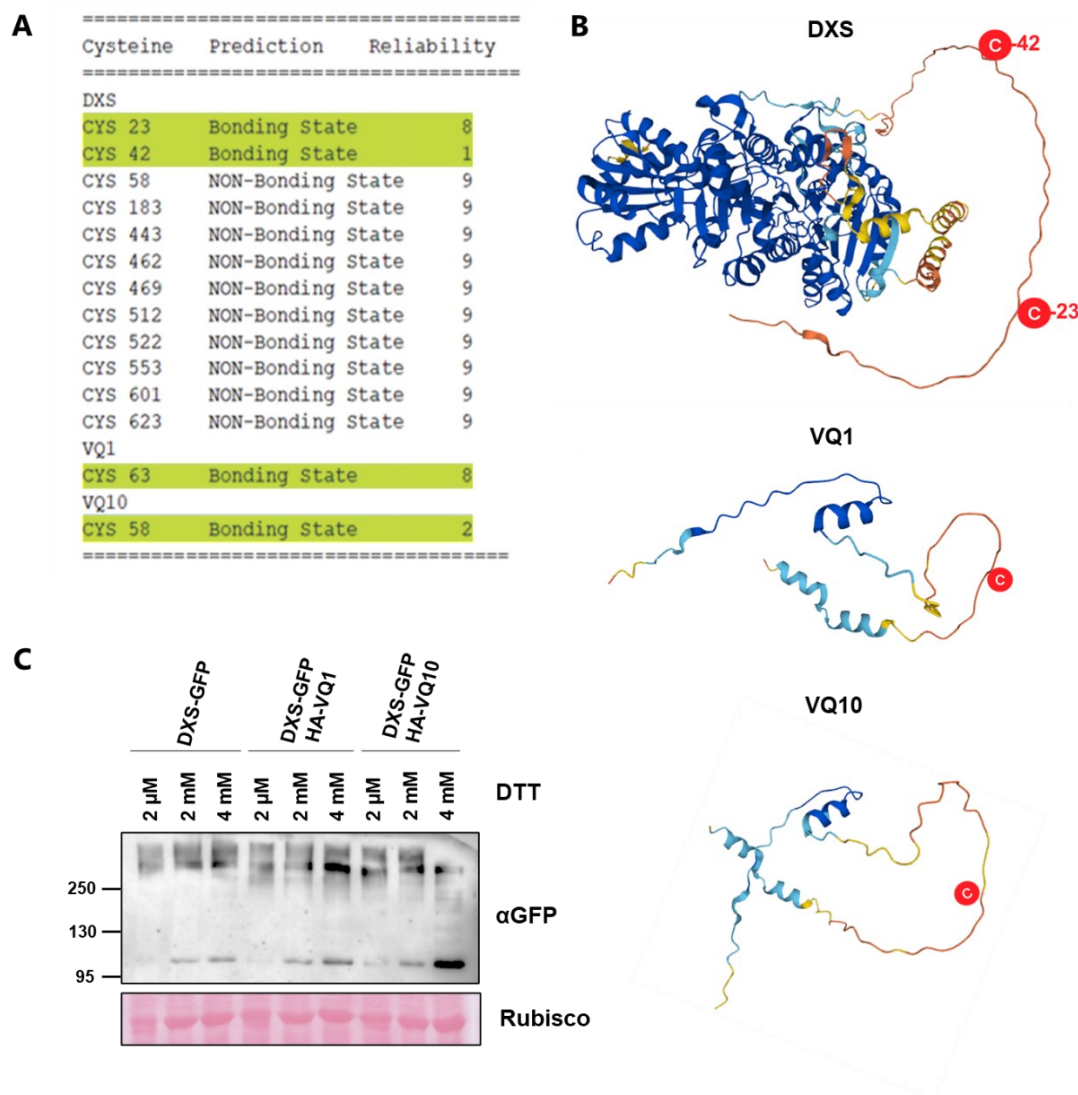


Figura 20. Regulación redox del estado de oligomerización de DXS por parte de las proteínas VQ1 y VQ10. A. Predicción de los residuos de cisteína (Cys, C) involucrados en la formación de puentes disulfuro realizada con la herramienta DIPro de SCRATCH Protein Predictor (<https://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>). **B.** Modelos 3D de la estructura de las proteínas DXS, VQ1 y VQ10 realizados con AlphaFold, mostrando la posición de los residuos de C que podrían formar puentes disulfuro, C23 y C42 en DXS, y C63 y C58 en VQ1 y VQ10, respectivamente. **C.** Extractos de proteína total de hojas de *N. benthamiana* transformadas transitoriamente con las construcciones indicadas que fueron suplementados con las concentraciones de DTT indicadas y analizadas por Western Blot con un anticuerpo monoclonal anti-GFP (α -GFP). A la izquierda se muestra la posición de los marcadores de peso molecular en kDa. La rubisco se representa debajo en la misma membrana teñida con Ponceau S.

Para estudiar esta hipótesis, se comprobó si sucedían cambios en la proporción oligómero/monómero de DXS al co-expresarla junto con VQ1 o VQ10 y alterando a la vez el entorno redox de las proteínas. El estado redox del medio fue alterado añadiendo concentraciones crecientes del agente reductor DTT, que ayuda a romper puentes disulfuro favoreciendo que las proteínas estén en un ambiente reductor. Se observó, como era de esperar, que al aumentar la concentración de DTT también aumentó la cantidad de monómero DXS tanto expresando la proteína DXS sola como co-

expresándola con VQ1 y con VQ10 (Fig. 20C). No obstante, este aumento en la forma monomérica de DXS fue ligeramente mayor al co-expresarla con VQ1 y mucho mayor al co-expresarla con VQ10 (Fig. 20C). Los resultados de este ensayo sugieren que VQ1 y VQ10 sí que podrían estar ejerciendo un control redox sobre otras proteínas como en este caso DXS, favoreciendo o no la formación de oligómeros dependiendo del estado redox en que se encuentren. Aunque estos resultados resultan prometedores, se debe continuar investigando esta hipótesis más a fondo para determinar de qué manera las proteínas VQ1 y VQ10 podrían regular el estado redox de DXS u otras proteínas susceptibles de regulación redox y también cuál sería la función de la alteración de estas proteínas diana.



RESULTADOS II

RESULTADOS II

*Gran parte de los resultados presentados en este apartado están incluidos en el artículo: "Gayubas, B., Castillo, M., Ramos, S., & León, J. (2023). Enhanced meristem development, tolerance to oxidative stress and hyposensitivity to nitric oxide in the hypermorphic *vq10-H* mutant in *AtVQ10* gene. *Plant, Cell & Environment*. <https://doi.org/10.1111/pce.14685>". Este artículo de investigación ha sido publicado en *Plant, Cell & Environment* el 31 de julio de 2023. Todos los resultados y figuras que aparecen a continuación provienen del trabajo de la doctoranda en colaboración con los otros autores.*

1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES *VQ10* Y *WRKY33*

Se examinaron los bancos de semillas mutantes de *Arabidopsis* con el fin de identificar y obtener mutantes de pérdida de función para *VQ1* y *VQ10*. Sin embargo, los mutantes SALK_050884C y SAIL_23_A10C1 para *VQ1* (AT1G17147) y *VQ10* (AT1G78410), respectivamente, que estaban anotados en la web T-DNA Express SIGnAL (<http://signal.salk.edu/>) como inserciones de ADN de transferencia (T-DNA) en el exón, en realidad se comprobó que estaban insertados en la región 3'-UTR (Fig. 21A-C). Para el mutante de *VQ10* (SAIL_23_A10C1), se confirmó que la inserción estaba localizada en la región 3'-UTR mediante PCR con ADN genómico de plantas silvestres Col-0 y mutantes utilizando oligonucleótidos específicos de la secuencia codificante y la región 3'-UTR de *VQ10* (Fig. 21B, C). Estas inserciones de T-DNA no dieron como resultado la reducción de los transcritos de *VQ1* y *VQ10*, sino que, para el mutante de *VQ1* se mantuvieron similares a los de Col-0 y para el mutante de *VQ10* se produjo un aumento en los niveles de expresión del gen en comparación con los obtenidos en plantas Col-0 (Fig. 21D). El aumento en los niveles de transcrito *VQ10* se produjo tanto en plantas mutantes homocigotas como heterocigotas (Fig. 21D), por tanto, este alelo mutante se corresponde con un mutante hipermórfico y se le denominó *vq10-H*.

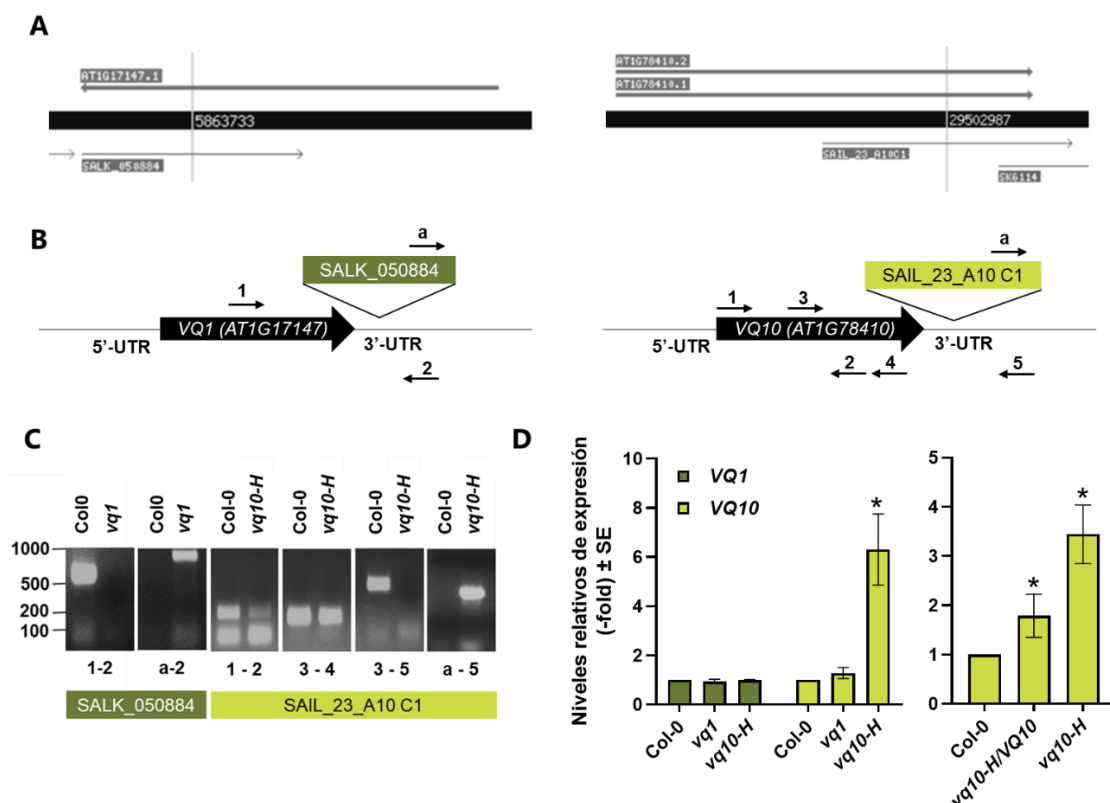


Figura 21. Caracterización molecular del mutante *vq1* y del mutante hipermórfico *vq10-H*. **A.** Anotación de las inserciones de T-DNA SALK_050884 (izquierda) y SAIL_23_A10C1 (derecha) en la web T-DNA Express SIGnAL (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). **B.** Anotación real de las inserciones SALK_050884 (izquierda) y SAIL_23_A10C1 (derecha), ambas localizadas en el extremo 3'-UTR del gen, y no en el exón. **C.** Genotipado por PCR de las inserciones de T-DNA indicadas usando oligonucleótidos específicos (Tabla 1). Se muestra el ADN teñido con bromuro de etidio en los geles de agarosa para cada genotipo y combinaciones de oligonucleótidos. A la izquierda se muestra el marcador de pesos moleculares en pares de bases. **D.** Niveles relativos de expresión de *VQ1* y *VQ10* analizados por qRT-PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 1) a partir de ARN procedente de plántulas (panel izquierdo) y plantas (panel derecho) de los genotipos indicados de tres experimentos independientes. Los valores representan la media \pm el error estándar (SE), y el valor estadístico fue calculando con *t* de Student comparando cada genotipo mutante con el control silvestre Col-0. * $p < 0.05$.

El hecho de que las proteínas VQ y WRKY estén funcionalmente conectadas, y puesto que se había descrito que WRKY33 es capaz de interactuar con VQ10 (Cheng et al., 2012), se seleccionó también un mutante de pérdida de función para *WRKY33* (GK_324G011) y se confirmó que en este mutante había una notable disminución de los niveles de transcrito *WRKY33* en comparación con Col-0 (Fig. 22). No se observó ningún fenotipo de desarrollo obvio en las plantas heterocigotas u homocigotas mutantes.

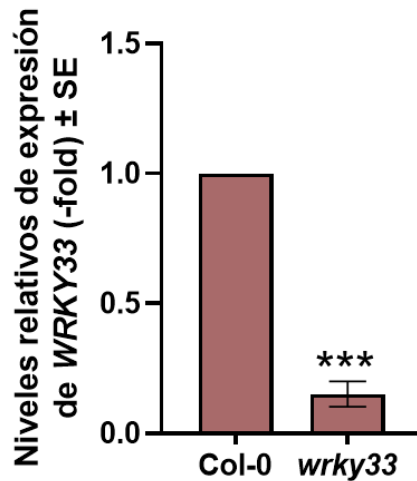


Figura 22. Reducción de la expresión del gen *WRKY33* en el mutante *wrky33* (GK_324G011). Los niveles de expresión de *WRKY33* fueron analizados por qRT-PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 1) a partir de ARN procedente de plántulas de los genotipos indicados de tres experimentos independientes. Los valores representan la media \pm el error estándar (SE), y el valor estadístico fue calculando con *t* de Student comparando el genotipo mutante con el control silvestre Col-0. *** $p < 0.001$.

2. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN PLANTAS *vq10-H* EN NORMOXIA Y EN HIPOXIA

Tal y como se ha descrito anteriormente, *VQ10*, junto con *VQ1*, experimenta una inducción temprana en respuesta a hipoxia (Fig. 12B). Por lo tanto, se decidió estudiar más a fondo el efecto de la mutación hipermórfica *vq10-H* en el transcriptoma de *Arabidopsis* mediante un análisis transcriptómico con plantas Col-0 y *vq10-H* cultivadas bien en normoxia o en normoxia y después sometidas a un tratamiento de hipoxia del 1% de O₂ durante 4 horas, cuando ya se ha inducido la expresión de *VQ10* (Fig. 12).

Tabla 4. Genes diferencialmente expresados en plantas *vg10-H* en comparación con plantas Col-0 en normoxia.

Gen ID	log2 (N_ <i>vg10-H</i> / N_Col-0)	Qvalor (N_ <i>vg10-H</i> / N_Col-0)	AGI loci	Símbolo	Anotación
838053	20,76613368	1,93E-04	AT1G14880	PCR1	<i>Plant cadmium resistance 1 mRNA binding</i>
820580	18,98297671	0,001731463	AT3G13710	PRA1F4	<i>PRA1 family protein F4</i>
832491	3,18145054	5,89E-22	AT5G24240	PI4KG3	<i>Phosphatidylinositol 4-kinase gamma 3</i>
844177	2,57997084	1,81E-05	AT1G78410	VQ10	<i>VQ motif-containing protein 10</i>
833584	1,06386330	0,025503809	AT5G35940	JAL41	<i>Jacalin-related lectin 41</i>
824787	0,97190745	1,56E-10	AT3G56210	AT3G56210	<i>ARM repeat superfamily protein</i>
837385	0,94576733	0,00215803	AT1G08630	THA1	<i>Probable low-specificity L-threonine aldolase 1</i>
814893	0,91153060	3,58E-12	AT2G03640	AT2G03640	<i>Nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein with RNA binding (RRM-RBD-RNP motifs) domain-containing protein</i>
825789	0,83597885	7,12E-04	AT4G04570	CRK40	<i>Cysteine-rich receptor-like protein kinase 40</i>
837543	0,74039743	5,34E-04	AT1G10070	BCAT2	<i>Branched-chain-amino-acid aminotransferase 2, chloroplastic</i>
839953	0,55391453	0,028722471	AT1G30730	AT1G30730	<i>Berberine bridge enzyme-like 11</i>
824247	-0,75256829	6,78E-10	AT3G50830	COR413PM2	<i>Cold-regulated 413 plasma membrane protein 2</i>
830433	-1,02564465	0,003607343	AT5G05500	AT5G05500	<i>Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein</i>
828707	-1,06840368	0,003945081	AT4G26010	PER44	<i>Peroxidase 44</i>
829795	-1,08378124	6,85E-05	AT4G36430	PER49	<i>Peroxidase 49</i>
822298	-1,08960034	0,006485982	AT3G26830	CYP71B15	<i>Bifunctional dihydrocamalexate synthase/camalexin synthase</i>
816328	-1,09788076	0,011702354	AT2G18150	PER15	<i>Peroxidase 15</i>
830378	-1,09798462	0,02263454	AT5G04960	PME46	<i>Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 46</i>
821191	-1,58733542	0,009483399	AT3G02410	ICMEL2	<i>Isoprenylcysteine methylesterase-like 2</i>
828367	-2,02380048	2,60E-09	AT4G22710	CYP706A2	<i>Cytochrome P450 - like protein</i>
842720	-2,03090349	0,009054174	AT1G64160	DIR5	<i>Dirigent protein 5</i>
841784	-2,23419992	4,69E-24	AT1G53490	HEI10	<i>Homologue of Human Enhancer of cell Invasion 10</i>
822807	-3,54278892	3,23E-29	AT3G30720	QQS	<i>Qua-quine starch</i>
844179	-4,40638518	3,58E-12	AT1G78430	ICR4/RIP4	<i>Interactor of constitutive active ROPs 4</i>
844181	-4,60077117	1,80E-04	AT1G78450	AT1G78450	<i>Uncharacterized protein</i>
841783	-5,54931626	3,80E-69	AT1G53480	MRD1	<i>Mto 1 responding down 1</i>

Tabla 5. Genes diferencialmente expresados en plantas *vg10-H* en comparación con plantas Col-0 en hipoxia.

Gen ID	log ₂ (H_ <i>vg10-H</i> / H_Col-0)	Qvalor (H_ <i>vg10-H</i> / H_Col-0)	AGI loci	Símbolo	Anotación
28721171	7,079812613	1,73E-04	AT5G17522	AT5G17522	<i>Phosphoglucosamine mutase family protein</i>
832491	2,946139166	1,06E-06	AT5G24240	PI4KG3	<i>Phosphatidylinositol 4-kinase gamma 3</i>
844177	2,608878402	0,040576348	AT1G78410	VQ10	<i>VQ motif-containing protein 10</i>
841143	1,990209844	0,044361776	AT1G47395	AT1G47395	<i>Uncharacterized protein</i>
825789	1,789238638	5,86E-06	AT4G04570	CRK40	<i>Cysteine-rich receptor-like protein kinase 40</i>
833584	1,395578323	1,39E-04	AT5G35940	JAL41	<i>Jacalin-related lectin 41</i>
838211	1,386767786	5,67E-06	AT1G16410	CYP79F1	<i>Cytochrome p450 79f1</i>
842897	1,33059402	2,40E-04	AT1G65860	FMOGS-OX1	<i>Flavin-containing monooxygenase FMO GS-OX1</i>
824787	1,241749284	2,15E-15	AT3G56210	AT3G56210	<i>ARM repeat superfamily protein</i>
6241166	1,118719896	0,006955817	AT1G24800	AT1G24800	<i>F-box family protein</i>
6241166	1,118719896	0,006955817	AT1G24881	AT1G24881	<i>F-box family protein</i>
6241166	1,118719896	0,006955817	AT1G25055	AT1G25055	<i>F-box family protein</i>
6241166	1,118719896	0,006955817	AT1G25150	AT1G25150	<i>F-box family protein</i>
6241166	1,118719896	0,006955817	AT1G25211	AT1G25211	<i>F-box family protein</i>
827936	1,010923172	0,048858445	AT4G00970	CRK41	<i>Cysteine-rich receptor-like protein kinase 41</i>
822167	0,982167204	0,040576348	AT3G25760	AOC1	<i>Allene oxide cyclase 1</i>
820901	0,975593159	2,25E-05	AT3G16530	AT3G16530	<i>Legume lectin family protein</i>
821508	0,828590691	0,03811801	AT3G19710	BCAT4	<i>Branched-chain aminotransferase4</i>
824625	0,72698753	0,040576348	AT3G54600	DJ1F	<i>DJ-1 protein homolog F</i>
827011	0,688209597	7,86E-04	AT4G13770	CYP83A1	<i>Cytochrome P450 83A1</i>
824247	-0,812677938	9,31E-05	AT3G50830	COR413PM2	<i>Cold-regulated 413-plasma membrane 2</i>
821017	-1,669837325	6,88E-04	AT3G17520	AT3G17520	<i>Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein</i>
839408	-2,553669157	0,024218691	AT1G03790	SOM	<i>Zinc finger CCCH domain-containing protein 2</i>
822807	-3,506653821	5,04E-23	AT3G30720	QQS	<i>Qua-quine starch</i>
844185	-3,561238151	1,69E-05	AT1G78490	CYP708A3	<i>Cytochrome P450, family 708, subfamily A, polypeptide 3</i>
844179	-3,593109435	5,86E-06	AT1G78430	ICR4/RIP4	<i>Interactor of constitutive active ROPs 4</i>
841783	-6,820621928	4,72E-39	AT1G53480	MRD1	<i>Mto 1 responding down 1</i>
820580	-6,936168591	2,20E-04	AT3G13710	PRA1F4	<i>PRA1 family protein F4</i>

En general, el efecto de la hipoxia en la expresión diferencial de los genes fue mucho mayor que el efecto de las mutaciones (Fig. 23A, B). El número de genes diferencialmente expresados (DEGs) que se identificaron comparando las plantas *vg10-H* con las plantas silvestres fue de solo 26 genes en normoxia y 24 en hipoxia (Tablas 4 y 5). Sin embargo, se identificaron miles de DEGs al comparar plantas en condiciones de normoxia con plantas en hipoxia en cada genotipo (Fig. 23B). Las tablas con todos los DEGs identificados se encuentran publicadas y disponibles para su descarga en el material suplementario de Gayubas et al. (2023).

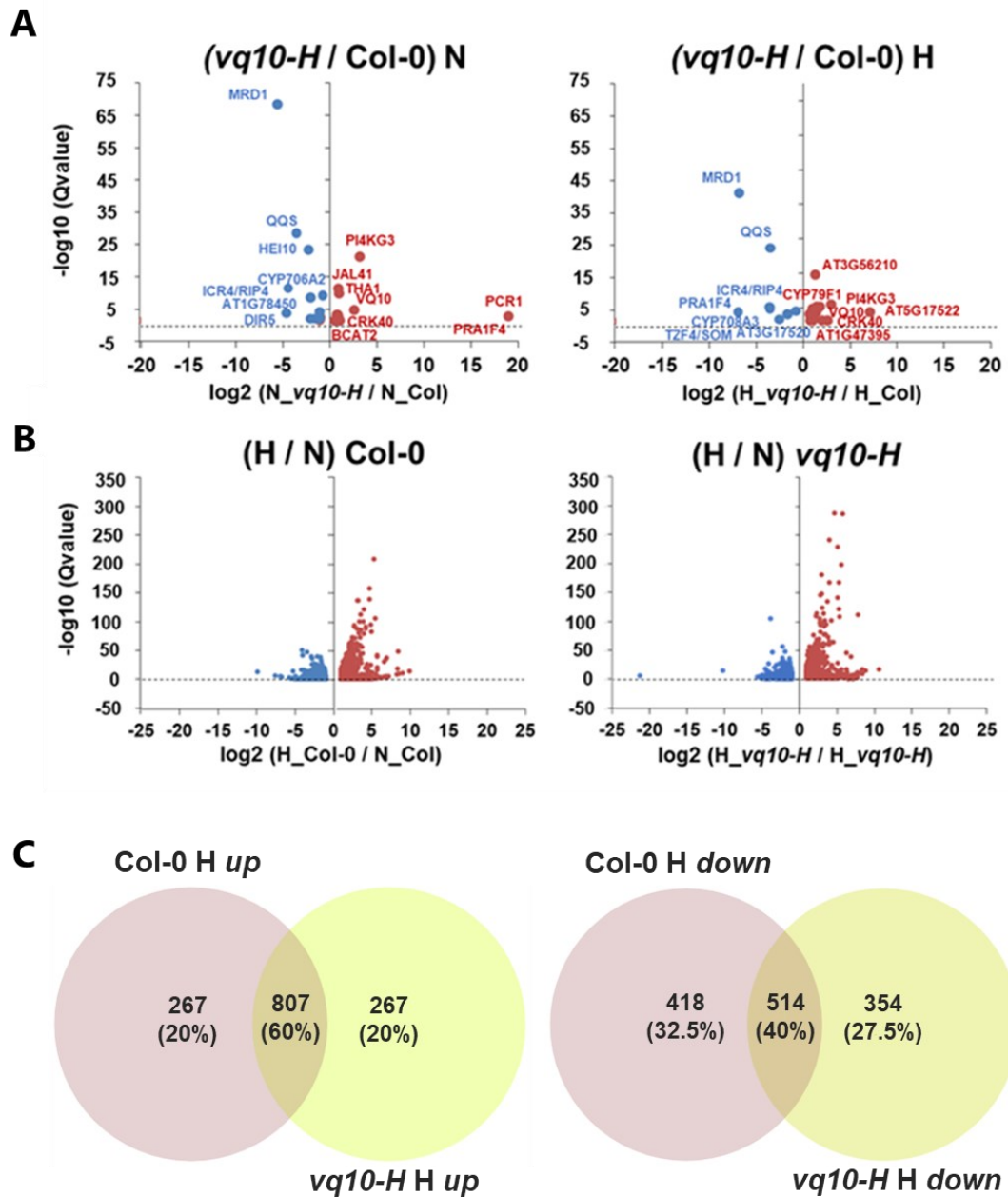


Figura 23. Análisis del transcriptoma completo comparando plantas silvestres Col-0 contra plantas mutantes *vq10-H*. *Volcano plots* mostrando: **A.** genes diferencialmente expresados (DEGs) sobreexpresados (rojo) o menos expresados (azul) al comparar plantas *vq10-H* con plantas Col-0 en normoxia (N, panel izquierdo) o en hipoxia (H, panel derecho); **B.** DEGs con mayor expresión (rojo) y menor expresión (azul) identificados al comparar hipoxia con normoxia en plantas Col-0 (panel izquierdo) y plantas *vq10-H* (panel derecho). **C.** Diagramas de Venn mostrando la intersección entre los genes más expresados en hipoxia (*up*, diagrama izquierdo) y menos expresados en hipoxia (*down*, diagrama derecho) en plantas Col-0 y *vq10-H*. Los diagramas de Venn fueron creados usando Venny (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

En las plantas *vq10-H*, con niveles altos de expresión de *VQ10*, se identificaron varios loci cercanos al de *VQ10* (*AT1G78410*) en el cromosoma 1 cuya expresión estaba fuertemente disminuida tanto en normoxia como en hipoxia (Tablas 4 y 5). Este conjunto de genes incluía *AT1G78430*, *AT1G78450* Y *AT1G78490*. Al analizar más a fondo los datos del

análisis transcriptómico, se comprobó que este grupo de genes reprimidos estaba conformado por 9 loci entre *AT1G78420* y *AT1G78500* con muy pocos, pero algunos transcritos expresados (Fig. 24), lo que indica que esta represión no está causada por una delección consecuencia de la inserción del T-DNA, sino que está regulada por algún factor desconocido que podría estar relacionado con *VQ10*. Se comprobó por PCR de transcripción inversa (RT-PCR) que los dos genes más cercanos ubicados aguas abajo de *VQ10*, *DA2* y *RIP2* (*ROP interactive partner 2*), se expresan, pero están reprimidos en el fondo *vq10-H* en comparación con las plantas silvestres (Fig. 24).

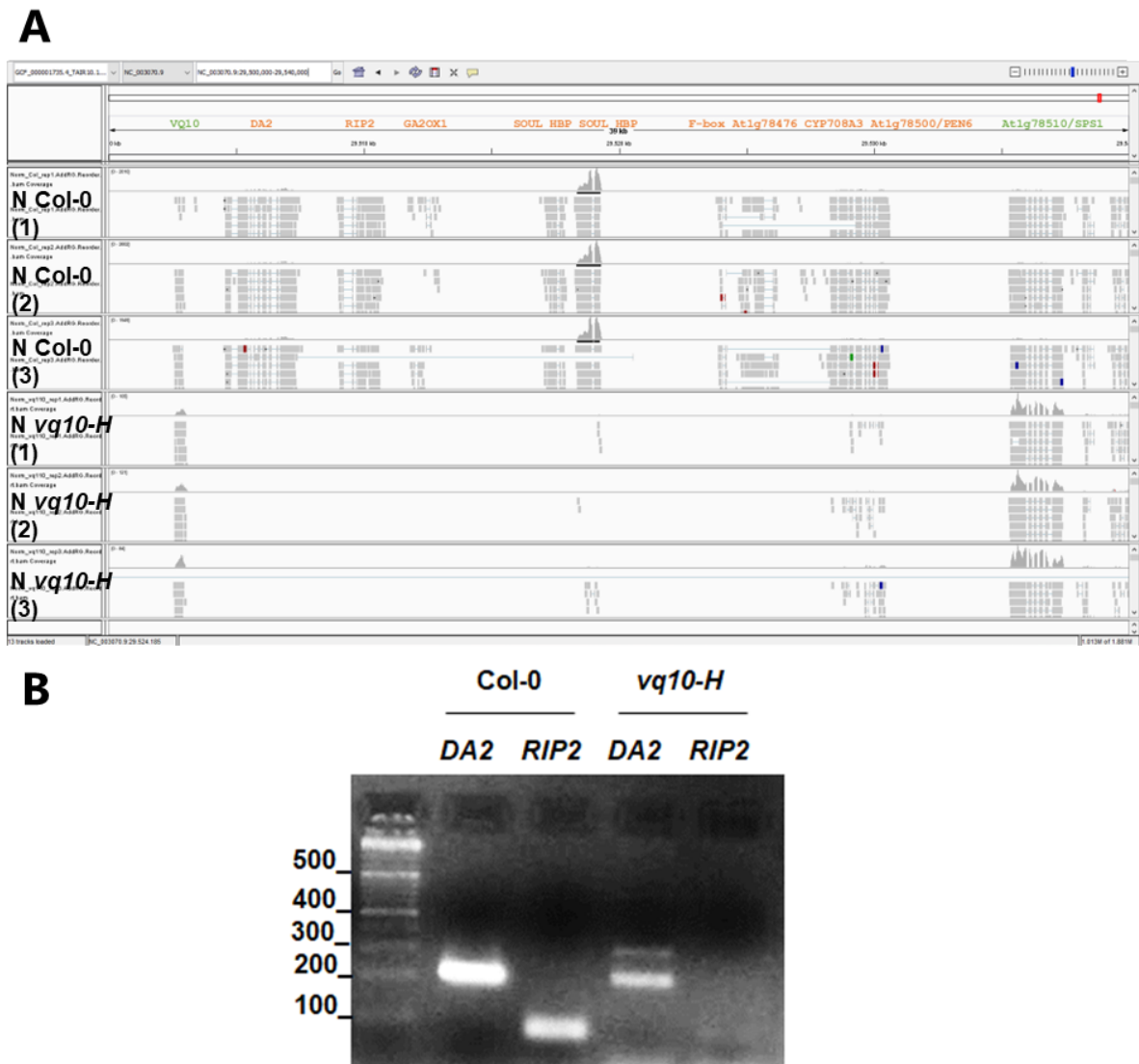


Figura 24. Análisis de los transcritos de genes situados por debajo del locus *VQ10* de plantas Col-0 y *vq10-H* en normoxia. A. Lecturas en tres réplicas biológicas independientes de Col-0 (los 3 cuadros superiores) y de *vq10-H* (los 3 cuadros inferiores) en los loci aguas abajo de *VQ10* (*AT1G78410*), marcados en naranja. **B.** Los niveles de los transcritos de *DA2* (*AT1G78420*) y *RIP2* (*AT1G78430*) situados inmediatamente aguas abajo de *VQ10* fueron medidos por RT-PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 1). Se muestra el ADN teñido con bromuro de etidio en los geles de agarosa para cada genotipo y combinaciones de oligonucleótidos. A la izquierda se muestra el marcador de pesos moleculares en pares de bases.

Entre los genes con expresión más reducida en las plantas *vq10-H* (Tablas 4 y 5) se identificaron: *MRD1* (*Mto 1 responding down 1*), cuyo mutante *mto1-1* sobreacumula metionina soluble y está involucrado en promover la defensa mediada por ácido salicílico (SA) (Singh et al., 2022); *HEI10* (*homologue of Human Enhancer of cell Invasion 10*), que codifica una proteína ZMM necesaria para la formación del entrecruzamiento cromosómico de clase I (Morgan et al., 2021); *QQS* (*Qua-Quine Starch*), que codifica un importante regulador del contenido en almidón que está presumiblemente involucrado en regular la distribución de carbono/nitrógeno en *Arabidopsis* (Li et al., 2015) mediante un proceso en el que los FT PIF (*Phytochrome interacting factor*) tienen un papel muy relevante (Lee et al., 2023); y finalmente, *ICMEL2* (*Isoprenylcysteine methyltransferase-like 2*), que codifica una isoprenilcisteína metiltransferasa que desmetila proteínas que podrían estar involucradas en regular la sensibilidad y la señalización por ABA (Lan et al., 2010). Cabe destacar también que los genes *PER15*, *PER44* y *PER49*, que codifican peroxidasas posiblemente involucradas en respuestas relacionadas con estrés oxidativo, también están menos expresadas en plantas *vq10-H* en comparación con plantas Col-0 en normoxia. Solo unos pocos genes como *PCR1* (*Plant cadmium resistance 1*), *PRA1F4* (*Prenylated RAB acceptor1.F4*) y *PI4KG3* (*Phosphoinositide 4-kinase gamma 3*) están más expresados en plantas *vq10-H* en normoxia (Tabla 4). Estos genes codifican proteínas relacionadas con resistencia al cadmio, un receptor RAB (Ras-associated binding) involucrado en tráfico de proteínas en endomembranas (Lee et al., 2017), y una fosfoinositol 4-quinasa que participa en respuestas a estrés abiótico y transición floral (Akhter et al., 2016), respectivamente. *PI4KG3* también está más expresado y *QQS*, *RIP4* (*ROP interactive partner 4*) y *MRD1* menos expresados en plantas *vq10-H* en comparación con plantas Col-0 en hipoxia (Tabla 5), lo cual sugiere que estos genes están regulados por VQ10 independientemente de la disponibilidad de O₂. Sin embargo, *PRA1F4*, que estaba significativamente más expresado en normoxia en plantas *vq10-H*, fue el gen con expresión más reducida en hipoxia (Tablas 4 y 5). *PRA1F4* parece estar involucrada en la salida del aparato de Golgi (Lee et al., 2017), lo cual sugiere que VQ10 podría tener un papel en la regulación del tráfico de proteínas por endomembrana de manera positiva dependiendo de la disponibilidad de O₂.

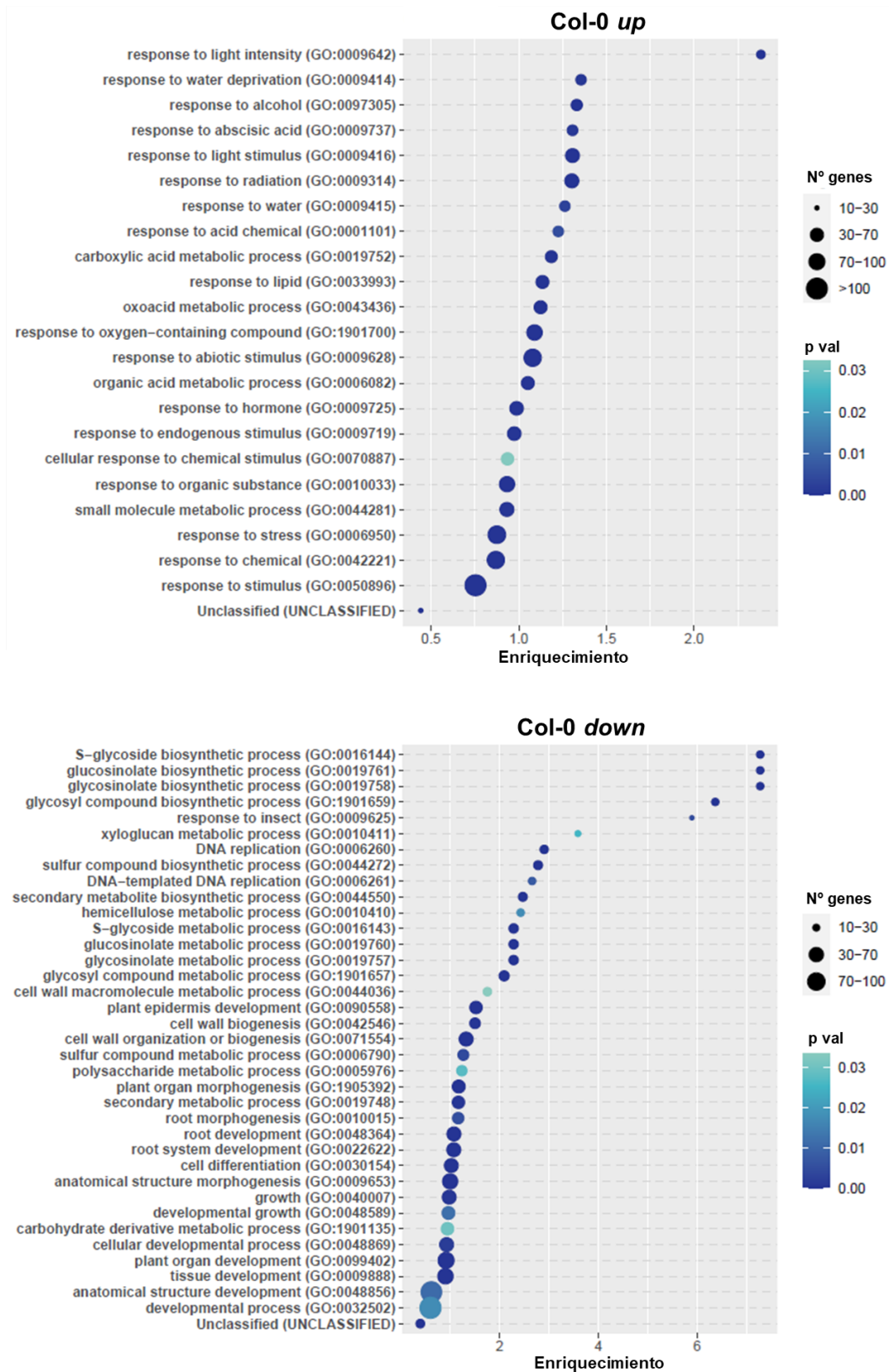


Figura 25. Enriquecimiento de términos GO de procesos biológicos de los DEGs identificados específicamente en Col-0 en hipoxia en el análisis transcriptómico. Se representan en el panel superior los DEGs más expresados (*up*) y en el panel inferior los DEGs menos expresados (*down*). El tamaño de las burbujas indica el número de genes identificados para cada término GO, y el p valor (p val) de los análisis de enriquecimiento génico corresponde a la escala de color representada a la derecha. Los análisis fueron realizados con PANTHER (<http://go.pantherdb.org/>).

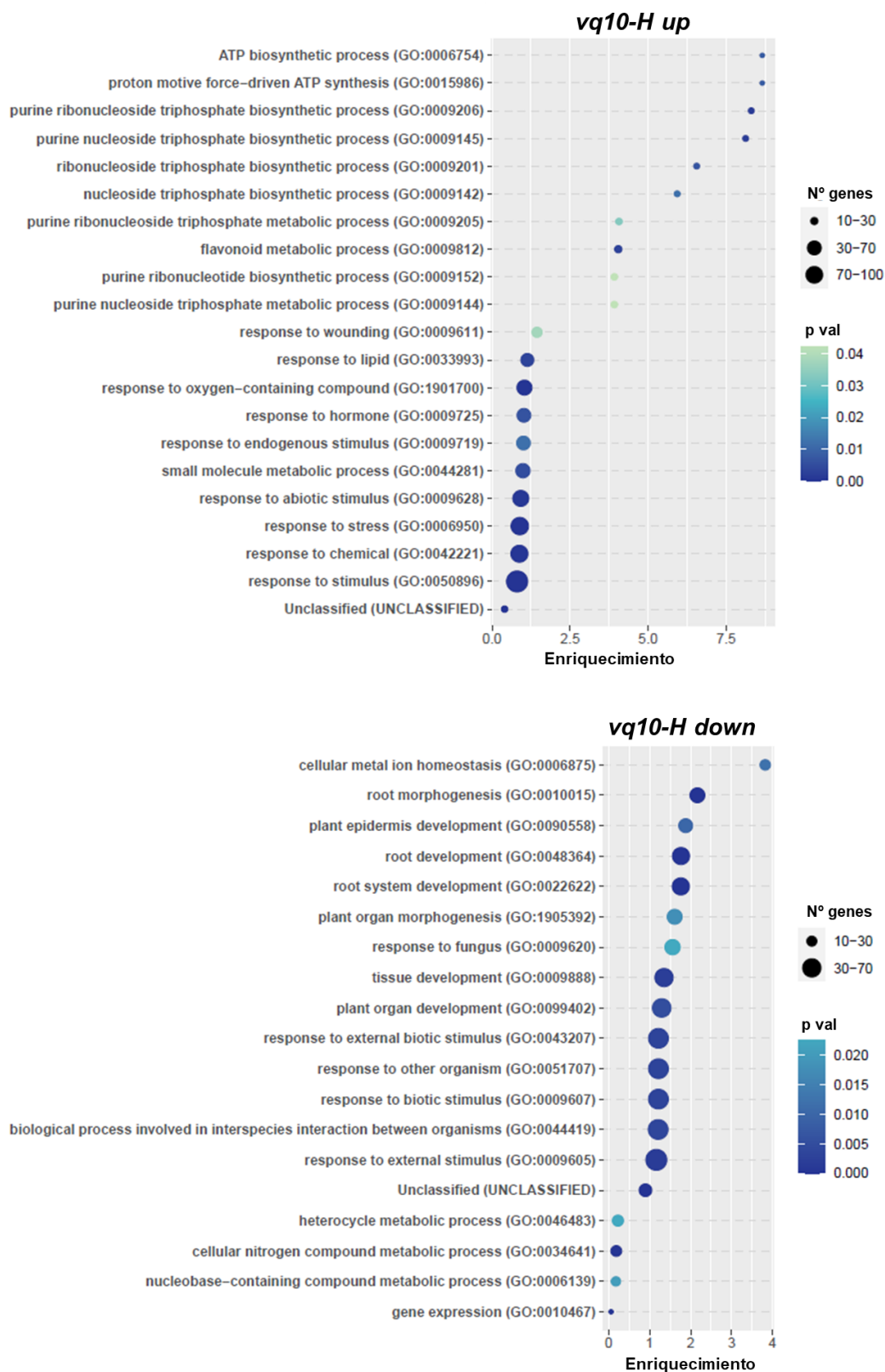


Figura 26. Enriquecimiento de términos GO de procesos biológicos de los DEGs identificados específicamente en *vq10-H* en hipoxia en el análisis transcriptómico. Se representan en el panel superior los DEGs más expresados (*up*) y en el panel inferior los DEGs menos expresados (*down*). El tamaño de las burbujas indica el número de genes identificados para cada término GO, y el p valor (p val) de los análisis de enriquecimiento génico corresponde a la escala de color representada a la derecha. Los análisis fueron realizados con PANTHER (<http://go.pantherdb.org/>).

A diferencia del limitado impacto de la mutación *vq10-H* en la expresión génica, la comparación de hipoxia y normoxia en plantas Col-0 y *vq10-H* permitió la identificación de unos 1000 DEGs más expresados y otros 1000 DEGs menos expresados (Figura 23C). Cabe destacar que alrededor del 60% de los DEGs más expresados y el 40% de los menos expresados en respuesta a hipoxia fueron comunes en plantas Col-0 y *vq10-H* (Figura 23C), indicando que hay un conjunto invariable de genes regulados por la hipoxia en ambos genotipos y por tanto no regulados por VQ10. No obstante, varios cientos de genes estaban específicamente más o menos expresados por hipoxia en plantas Col-0 o *vq10-H*, los cuales podrían ser posibles dianas de regulación de VQ10. Entre los 267 genes inducidos por hipoxia solo en plantas Col-0, el análisis de términos GO mostró una sobre-representación de genes de categorías funcionales relacionadas con respuestas a la intensidad de luz, sequía y ABA (Fig. 25). Entre los 418 genes reprimidos por hipoxia solo en plantas Col-0, la biosíntesis de glucosinolatos, la respuesta a insectos, la replicación del ADN con ADN molde, la diferenciación celular, el desarrollo de la epidermis y la morfogénesis de la raíz fueron las categorías funcionales más sobre-representadas en el análisis de términos GO (Fig. 25). Estos genes podrían estar reprimidos por la hipoxia, pero activados por VQ10. Respecto a los 267 y 354 genes inducidos y reprimidos, respectivamente, por hipoxia solo en plantas *vq10-H*, son genes regulados por hipoxia con respuestas que podrían estar potenciadas o reprimidas por VQ10. Se encontró entre los genes inducidos un enriquecimiento de términos GO relacionados con síntesis de ATP impulsada por protones, procesos metabólicos de flavonoides, y respuesta a herida, lípidos, compuestos de oxígeno y hormonas, y entre los genes reprimidos, la homeostasis celular de iones metálicos, la morfogénesis de la raíz y el desarrollo de la epidermis (Fig. 26). Las tablas con los análisis de términos GO se encuentran publicadas y disponibles para descarga en el material suplementario de Gayubas et al. (2023).

3. ANÁLISIS DEL PROCESAMIENTO ALTERNATIVO DE ARNs EN PLANTAS *vq10-H* EN NORMOXIA Y EN HIPOXIA

El escaso impacto transcripcional del aumento de la expresión de *VQ10* en el mutante hipermórfico *vq10-H* en comparación con plantas silvestres Col-0 sugiere que la regulación ejercida por esta proteína podría ocurrir a nivel no transcripcional. De hecho, VQ10 es una de las pocas proteínas de la familia de proteínas VQ de Arabidopsis que no une ADN y no puede activar o reprimir un reportador transcripcional (Jing & Lin, 2015). Es más, las predicciones *in silico* presentadas anteriormente en la Tabla 2 apuntan a VQ10, junto con VQ1, como una posible proteína de unión a ARN. Las proteínas de unión a ARN normalmente funcionan regulando el procesamiento alternativo de ARN (AS, del inglés *alternative splicing*) (Meyer et al., 2015) y la traducción de proteínas en plantas (Wang et al., 2023). Por tanto, la actividad funcional de VQ10 podría estar relacionada con la regulación de la estabilidad del ARN, su localización, o el procesamiento metabólico. Para comprobar si VQ10 afecta al AS, los datos del análisis transcriptómico fueron utilizados para analizar los transcritos afectados por AS. Los datos fueron analizados para identificar exclusión de exones (*skipped exons*, SE), retención de intrones

(*retained introns*, RI), exones mutuamente exclusivos (*mutually exclusive exons*, MXE) y sitios alternativos 5' o 3' (*alternative 5' or 3' splice sites*, A5SS o A3SS). Todos los genes diana de los eventos de AS diferenciales significativos están publicados en el material suplementario de Gayubas et al. (2023).

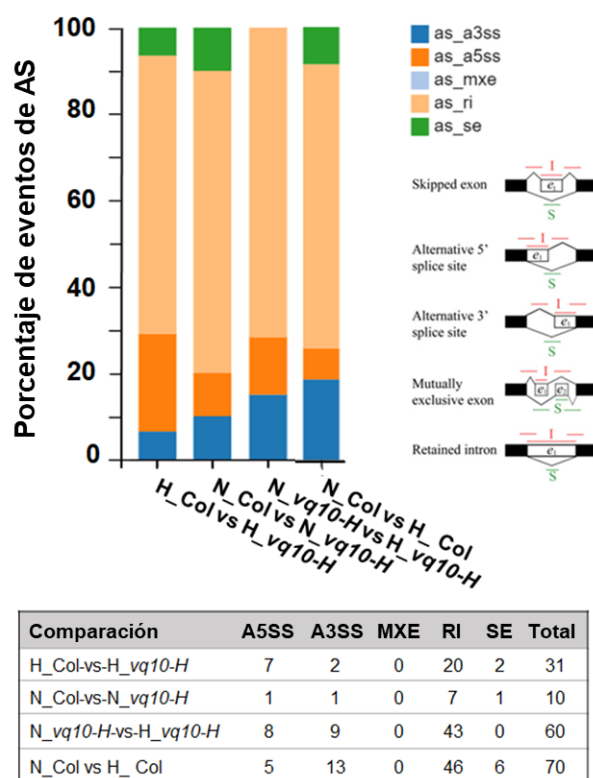


Figura 27. Identificación de eventos de AS diferencial al comparar plantas Col-0 y *vq10-H* en normoxia o hipoxia, así como comparando normoxia con hipoxia en plantas silvestres Col-0. Se analizaron exclusión de exones (*skipped exons*, SE), retención de intrones (*retained introns*, RI), exones mutuamente exclusivos (*mutually exclusive exons*, MXE) y sitios alternativos 5' o 3' (*alternative 5' or 3' splice sites*, A5SS o A3SS). El panel superior muestra el porcentaje de cada tipo de AS, y el número total de eventos está indicado en la tabla inferior.

En la figura 27 se resumen los eventos de AS identificados al comparar los genotipos *vq10-H* y Col-0 en normoxia o hipoxia. En normoxia, se identificaron eventos de AS diferencial significativos de A5SS, A3SS y SE en *PTP1* (*Protein tyrosine phosphatase 1*), *AGL42* (*Agamous-Like42*) y *AT5G41690*, y siete RI en *MGT7* (*magnesium transporter 7*), *AGL42*, *OFUT4* (*O-fucosyltransferase 4*), *GK1* (*Guanylate kinase 1*), *ABCA8* (*ABC transporter A family member 8*), *FTSH8* (*FTSH protease 8*) y *AT1G56520*. En hipoxia, se identificaron más eventos de AS diferencial estadísticamente significativos al comparar plantas Col-0 con plantas *vq10-H*: dos A3SS en *SYN2* (*sister chromatid cohesion 1 protein 2*) y *AT5G61310* (*cytochrome c oxidase subunit 5C*); siete A5SS, tres de ellos en *AT4G30820* (*cyclin-dependent kinase-activating kinase assembly factor-related*) y los otros cuatro en *IP5P10* (*type I inositol polyphosphate 5-phosphatase 10*), *PAPP5* (*serine/threonine-protein phosphatase 5*), *ARF-2A* (*ADP-ribosylation factor 2-A*) y

AT4G10430 (*TMPIT-like protein*); y dos SE en *AT5G44565* y *AT4G30820*. El número más grande de eventos de AS en hipoxia correspondió a RI, ya que se identificaron en 20 genes diana distintos. Algunos de ellos eran genes que codificaban proteínas con funciones reguladoras relevantes como los FT NFYB10 y bHLH23 o la proteína reguladora RAPTOR2, y un par de genes relacionados con el ciclo celular como *SHUGOSIN2* y un factor de ensamblaje de quinasa activador de quinasa dependiente de ciclina. El análisis de AS en las plantas Col-0 en hipoxia en comparación con las plantas en normoxia permitió identificar 70 eventos de AS diferencial (Fig. 27), respaldando aún más la relevancia del AS en la regulación de la expresión genética en condiciones de hipoxia. Cabe destacar que los genes *AGL42* y *MGT7* fueron los únicos con AS diferencial al comparar plantas Col-0 con plantas *vg10-H* en normoxia, y plantas Col-0 en normoxia con plantas Col-0 en hipoxia. Entre los genes con AS diferencial al comparar plantas Col-0 con plantas *vg10-H* en hipoxia, *AT4G30820*, que codifica una proteína relacionada con el factor de ensamblaje de quinasa activadora de quinasa dependiente de ciclina, *NFYB10*, *BHLH23*, y *AT3G54510*, *AT2G43465*, *AT3G65685* y *AT4G02550*, que codifican para un canal de Ca²⁺ activado por hiperosmolaridad, una proteína con dominio ASCH de unión a ARN, una UDP-glucosiltransferasa, y una proteína desconocida, respectivamente, también se identificaron al comparar el AS diferencial en plantas Col-0 en hipoxia con plantas Col-0 en normoxia.

4. FENOTIPOS DE PLANTAS *vg10-H* y *VQ10OX* RELACIONADOS CON EL DESARROLLO

Para evaluar si los posibles fenotipos de desarrollo de las plantas *vg10-H* estaban asociados con el aumento en la expresión de *VQ10*, se generaron plantas transgénicas *VQ10ox* que sobreexpresan *VQ10* bajo el control de un promotor *35S* (Fig. 28A, Tabla A1). Se comprobó en primer lugar que la disminución de la expresión de los genes *DA2* y *RIP2* detectada en *vg10-H* en el análisis transcriptómico (Fig. 24) también ocurría en las plantas *VQ10ox* (Fig. 28B), lo cual sugiere que el aumento en la expresión de *VQ10* es responsable de la represión del grupo de genes localizados por debajo de *VQ10* en el cromosoma 1. *DA2* y *RIP2* codifican dos proteínas relacionadas con la proliferación y la división celular (Xia et al., 2013; Hasi y Kakimoto, 2022), por tanto, la fuerte represión de ambos genes detectada en plantas *vg10-H* podría dar lugar a alteraciones en la división/proliferación celular. Para comprobarlo, plantas *vg10-H* se cruzaron con plantas que expresan el marcador de división celular *cycB1:GUS* en fondo Col-0 (Colon-Carmona et al., 1999) para generar plantas *cycB1:GUS(vg10-H)* (Tabla A1). Estas plantas mostraron una mayor tinción de β-glucuronidasa en la raíz en comparación con plantas *cycB1:GUS* (Fig. 29), lo que indica una mayor tasa de proliferación y división celular en el meristemo de la raíz. En cambio, la tasa de división celular no se vio alterada en el meristemo apical del tallo (Fig. 29).

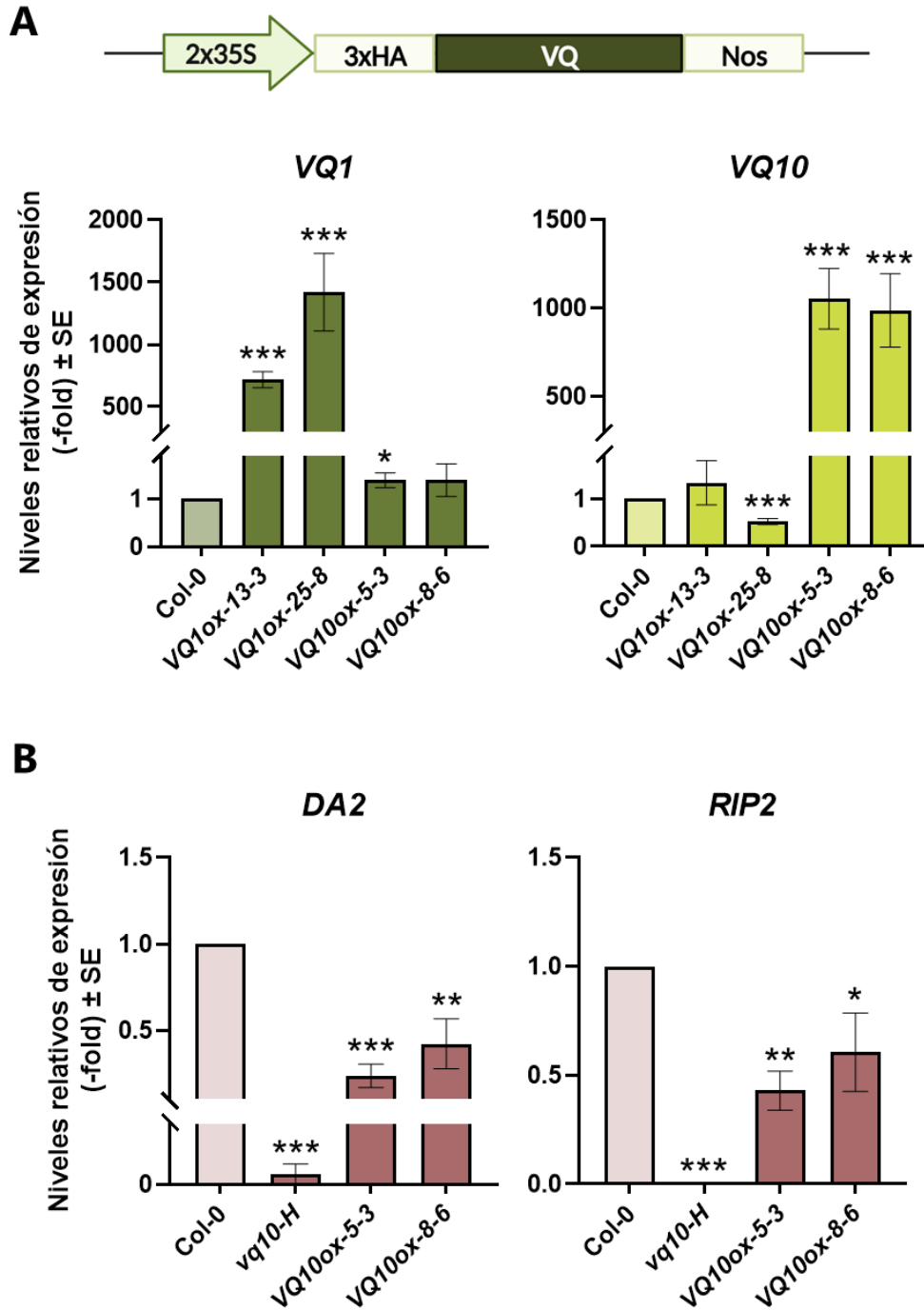


Figura 28. Generación y caracterización molecular de plantas transgénicas que sobreexpresan los genes *VQ1* o *VQ10* bajo el control de dos promotores 35S. A. Construcción y niveles de expresión de *VQ1* y *VQ10* en las líneas transgénicas *VQ1ox* y *VQ10ox* generadas. **B.** Comparación de la expresión de *DA2* y *RIP2* en plantas con niveles de expresión de *VQ10* elevados. Los niveles relativos de expresión de los genes indicados fueron analizados por qRT-PCR usando oligonucleótidos específicos (Tabla 1) a partir de ARN de plantas de los genotipos indicados provenientes de tres experimentos independientes. Los valores representan la media \pm el error estándar (SE) y el valor estadístico fue calculado con *t* de Student comparando cada genotipo con el genotipo silvestre Col-0. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

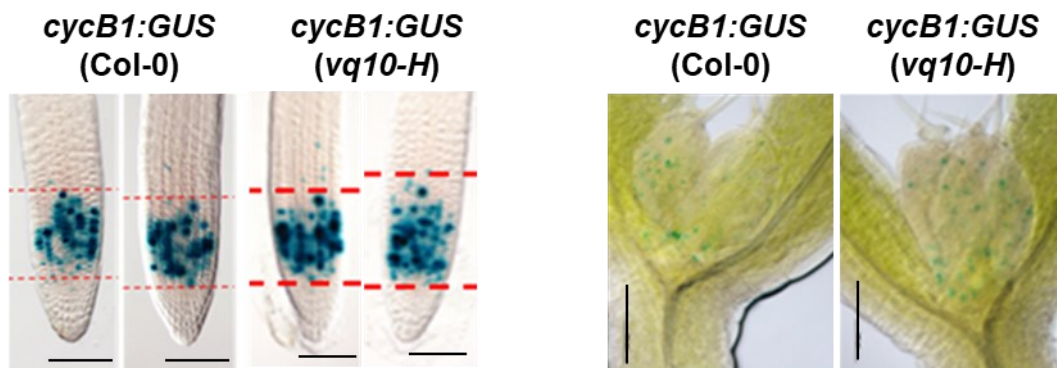


Figura 29. Tasa de división celular en plantas con fondo genético Col-0 y *vq10-H* que expresan el marcador de división celular *cycB1:GUS*. La división celular se observó a partir de la tinción de β -glucuronidasa (GUS) en el meristemo apical de la raíz (izquierda) o del tallo (derecha) de las plantas de los genotipos indicados. Las líneas discontinuas representan los límites de la tinción GUS en el meristemo de la raíz. La escala (barras negras) representa 100 μ m.

El aumento en la proliferación celular en el meristemo de la raíz relacionado con mayores niveles de expresión de *VQ10* (Fig. 29) podría alterar su crecimiento. Se midió la longitud de la raíz primaria en plántulas de 3 días cultivadas en vertical, y tanto las raíces de las plantas *vq10-H* como las de *VQ10ox* eran más largas en comparación con las de Col-0 (Fig. 30A). También se midió el tamaño del meristemo radicular en estas plántulas mediante tinción con yoduro de propidio, y los resultados mostraron que el aumento en la longitud de la raíz primaria está acompañado de un aumento en el tamaño del meristemo en *vq10-H* (Fig. 30B, C). Sin embargo, las plantas *VQ10ox* presentaron un meristemo de la raíz más corto que el de plantas Col-0 (Fig. 30B, C), lo cual en principio no encaja con el fenotipo de estas plantas de una longitud de raíz más larga que Col-0. Esto podría ser debido a una mayor elongación celular en partes superiores a la zona meristemática de la raíz. Por tanto, se midió la longitud de las primeras células en la zona de elongación de la raíz y se comprobó que las raíces de las plántulas *vq10-H* y *VQ10ox* presentaban una mayor elongación celular (Fig. 30D), lo cual podría explicar su fenotipo de raíz más larga (Fig. 30A).

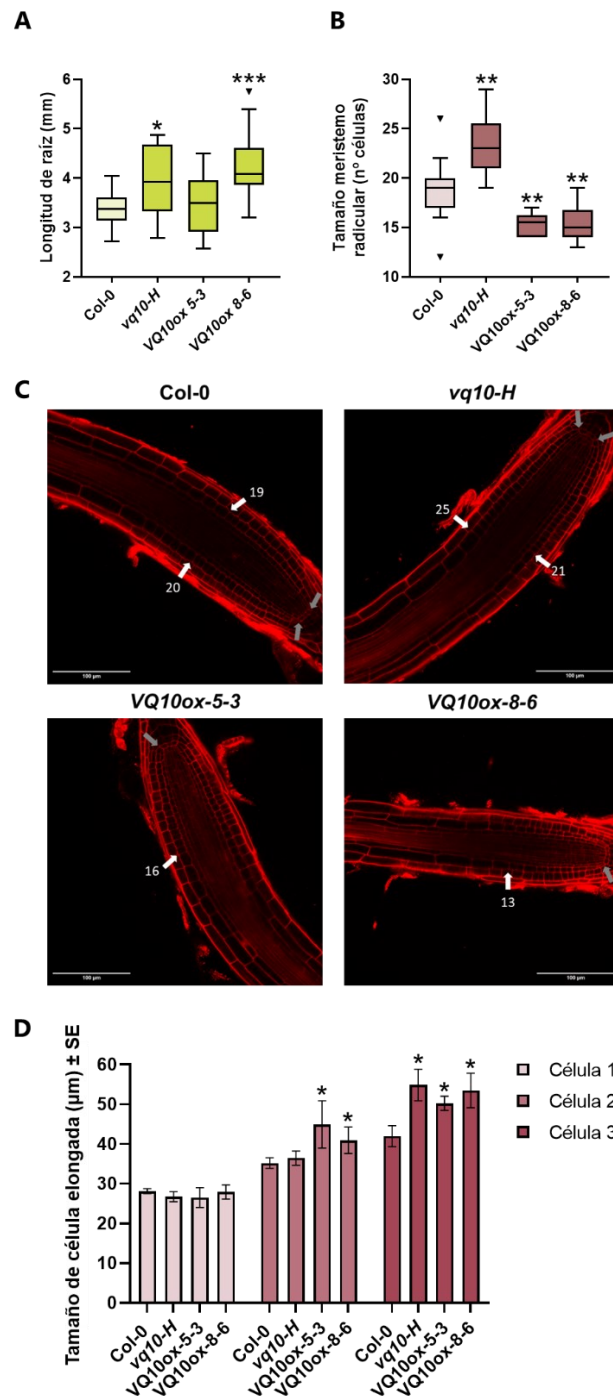


Figura 30. Elongación de la raíz primaria y tamaño del meristemo de la raíz en plantas Col-0, vq10-H y VQ10ox. **A.** La longitud de las raíces primarias de plántulas de los genotipos indicados fue medida en plántulas cultivadas en vertical a los 3 días post-germinación. Los gráficos de cajas representan valores de unas 20 raíces por genotipo. **B.** El tamaño del meristemo radicular se calculó a partir de raíces de plántulas de 4 días post-germinación, teñidas con yoduro de propidio. Los gráficos de cajas representan valores de tres experimentos independientes con alrededor de 10 raíces por genotipo y experimento. **C.** Imágenes de microscopio confocal mostrando el cálculo del tamaño del meristemo de la raíz (desde la flecha gris a la flecha blanca) en los genotipos indicados. El cálculo del número de células en el meristemo radicular se hizo según el método descrito por Perilli & Sabatini (2010). La escala (barra blanca en la parte inferior de las imágenes) representa 100 µm. **D.** Tamaño de las primeras tres células elongadas en la zona de elongación de la raíz de los genotipos indicados. El tamaño se calculó a partir de las mismas raíces utilizadas en (B) y utilizando ImageJ2/Fiji. Los valores son la media ± el error estándar (SE) de unas 10 plántulas por genotipo, y el valor estadístico fue calculando con *t* de Student comparando cada genotipo mutante con el control silvestre Col-0. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

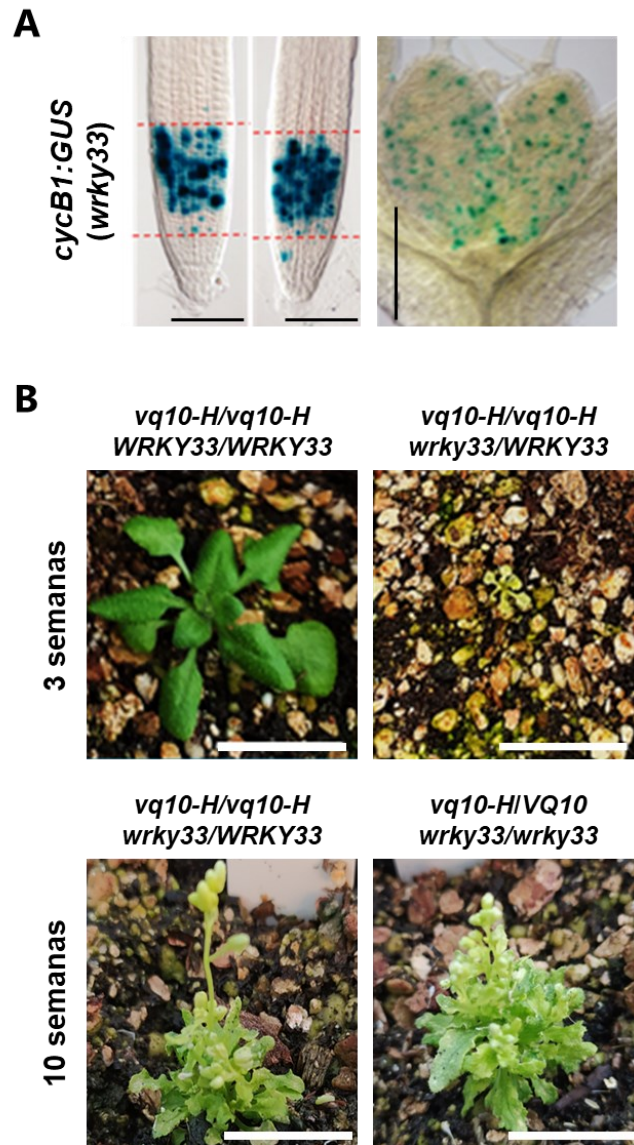


Figura 31. Interacción funcional entre VQ10 y WRKY33 en la división celular y el desarrollo de la planta. **A.** Tasa de división celular en plantas con fondo genético *wrky33* que expresan el marcador de división celular *cycB1:GUS*. La división celular se observó a partir de la tinción de β -glucuronidasa (GUS) en el meristemo apical de la raíz o del tallo. Las líneas discontinuas representan los límites de la tinción GUS en el meristemo de la raíz. La escala (barras negras) representa 100 μ m. **B.** Fenotipo de crecimiento de la parte aérea en plantas *vq10-H* (homocigotas o heterocigotas) con expresión elevada de *VQ10* en un fondo genético mutante *wrky33* (en homocigosis o heterocigosis). Las plantas de la F4 de 10 semanas acabaron mostrando un fenotipo enano y de hojas rizadas. La escala (barra blanca situada en la parte inferior derecha de las imágenes) representa 1 cm.

Dada la interacción funcional que existe entre VQ10 y WRKY33 (Cheng et al., 2012), se comprobó el patrón de tinción GUS en plantas con el marcador *cycB1:GUS* en fondo *wrky33* (Tabla A1). Se detectó una mayor tinción GUS tanto en el meristemo de la raíz como el meristemo apical del tallo en este fondo genético en comparación con Col-0 (Fig. 29, Fig. 31A), lo que indica que WRKY33 podría regular negativamente la división celular en ambas regiones meristemáticas, mientras que VQ10 sería un regulador positivo sólo en la raíz (Fig. 29). Dado que en muchos casos las proteínas VQ regulan la

expresión génica en coordinación con los FT WRKY (Cheng et al., 2012; Weyhe et al., 2014), se analizó el fenotipo de crecimiento en plantas con niveles de expresión alterados de ambos genes. Previamente, se publicó que la sobreexpresión simultánea de *VQ10* y *WRKY33* en *Arabidopsis* provoca una gran disminución en el tamaño de la roseta, mientras que las rosetas de las plantas que sobreexpresan cada uno de los genes por separado son normales (Cheng et al., 2012). Para comprobar si los fenotipos de división celular de las plantas con expresión alterada de *VQ10* o *WRKY33* mostrados anteriormente estaban o no relacionados, se realizaron cruces genéticos con las plantas *vq10-H* y *wrky33*. Al caracterizar la descendencia, no fue posible obtener plantas dobles mutantes homocigotas ni en la segunda generación filial (F2), ni en la tercera (F3), ni en la cuarta (F4). Sin embargo, sí que se obtuvieron plantas dobles mutantes heterocigotas que presentaban un fuerte fenotipo de crecimiento. Se trataba de plantas enanas, cloróticas y con hojas rizadas y muy pequeñas (Fig. 31B). Los genotipos que estaban detrás de este fuerte fenotipo eran combinaciones de una de las mutaciones en homocigosis y la otra en heterocigosis (*VQ10/vq10-H* con *wrky33/wrky33*, o *vq10-H/vq10-H* con *WRKY33/wrky33*). No se observaron estos fenotipos en los parentales mutantes simples homocigotos. Estos datos sugieren que *VQ10* podría actuar como un regulador importante en el desarrollo y crecimiento de las plantas, actuando junto con *WRKY33* en la división celular en los meristemos.

5. FENOTIPOS DE PLANTAS *vq10-H* Y *VQ10OX* RELACIONADOS CON LA RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO

Los datos del análisis transcriptómico revelaron varios DEGs que codifican peroxidasas y que estaban reprimidos en las plantas *vq10-H* en normoxia (Tabla 4). Con estos datos y los resultados del análisis *in silico* que mostraron a *VQ10* como inducido en respuesta a NO, hipoxia y ozono (Fig. 9), se decidió comprobar la respuesta al estrés oxidativo en las plantas con mayor expresión de *VQ10*. Por un lado, se evaluó la sensibilidad de las semillas *vq10-H* y *VQ10ox* al estrés oxidativo desencadenado por un tratamiento con metil viológeno (MV), también llamado comercialmente paraquat. Los resultados revelaron que las semillas *vq10-H* son significativamente más resistentes al estrés oxidativo que las semillas Col-0, con alrededor del 30% de las semillas *vq10-H* germinando tras 96 h en presencia de MV frente al 5% de semillas Col-0 germinadas (Fig. 32). El resultado se repitió con las semillas *VQ10ox*, que también fueron más resistentes al tratamiento (Fig. 32). En conjunto, estos resultados sugieren que esta mayor tolerancia al estrés oxidativo en la semilla durante el proceso de germinación se debe a una mayor expresión de *VQ10*.

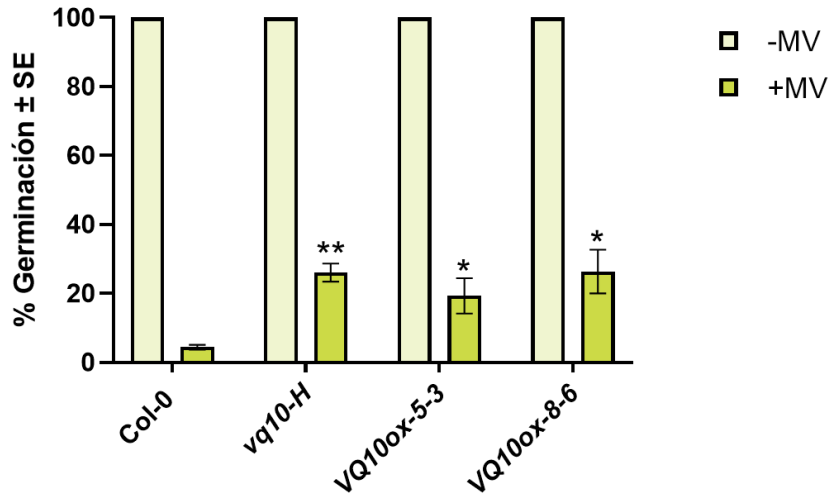


Figura 32. Tolerancia a estrés oxidativo en la germinación de semillas de Col-0, vq10-H y VQ10ox. El porcentaje de germinación fue calculado a los 5 días post-siembra a partir de tres experimentos independientes con 10-30 semillas por genotipo, condición y experimento, en semillas tratadas con 0.1 mM de metil viológeno (+MV) o sin tratar (-MV). El valor estadístico fue calculando con *t* de Student comparando el tratamiento con el control en cada genotipo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

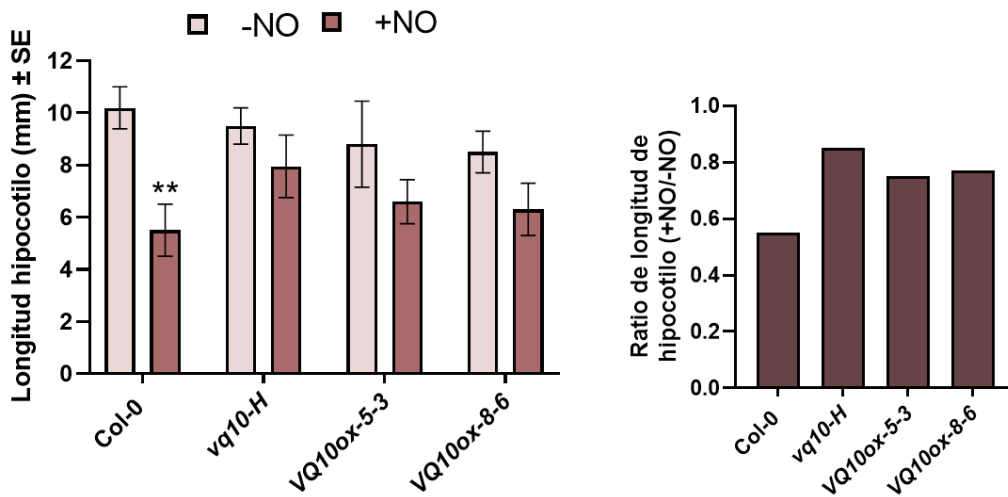


Figura 33. Sensibilidad de los hipocótilos de plántulas Col-0, vq10-H y VQ10ox al óxido nítrico (NO). La sensibilidad a NO se analizó mediante experimentos de acortamiento del hipocótilo usando plántulas etioladas incubadas en oscuridad durante 4 días en cámaras selladas con 300 ppm de NO (+NO) o sin NO como control (-NO). Los valores representan la media \pm el error estándar (SE) de alrededor de 25 individuos por genotipo y condición, y el valor estadístico fue calculando con *t* de Student comparando el tratamiento con el control en cada genotipo. ** $p < 0.01$.

Por otro lado, se comprobó la sensibilidad de las plantas Col-0, *vq10-H* y *VQ10ox* a un tratamiento de NO exógeno. Para ello, se midió la elongación de hipocótilos etiolados en presencia o ausencia de NO. En las plantas Col-0, la longitud de los hipocótilos se redujo en un 45% en presencia de NO (Fig. 33), mientras que en *VQ10ox* y sobre todo en *vq10-H* la reducción fue menor, de un 25% y un 15% en comparación con plantas no tratadas, respectivamente (Fig. 33). Estos resultados sugieren que las plantas con mayor expresión de *VQ10* toleran mejor el estrés nitro-oxidativo causado por el NO, quizás porque *VQ10* reprime la percepción del NO o tal vez porque participa en la regulación del metabolismo de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Dado que *VQ10* aumenta su expresión durante la hipoxia y lo hace a tiempos cortos (Fig. 9, Fig. 12B), se decidió comprobar si el aumento en los niveles de expresión de *VQ10* alteraba la expresión de los genes marcadores de hipoxia *LBD41*, *PDC1*, *ADH1* y *L-LDH*. Los resultados mostraron un aumento significativo en la expresión de *LBD41*, *PDC1* y *ADH1* tras la hipoxia, sin diferencias de inducción entre los distintos genotipos (Fig. 34). En el caso de *L-LDH*, la inducción tras la hipoxia fue menor en general en todos los genotipos en comparación con la del resto de genes marcadores y, además, ésta fue menor en *VQ10ox* con respecto a Col-0 (Fig. 34). Los niveles de expresión basal en normoxia de *LBD41* y *PDC1* se vieron alterados al modificar la expresión de *VQ10*, pero esta fue mayor en *vq10-H* y menor en *VQ10ox*, con respecto a Col-0 (Fig. 34), lo que sugiere que en el mutante *vq10-H* hay elementos reguladores alterados que no están presente en *VQ10ox* o a la inversa. Por otro lado, no se vieron diferencias significativas en los niveles de *ADH1* y *L-LDH* en normoxia entre las plantas Col-0 y las plantas *vq10-H* y *VQ10ox* (Fig. 34). En conjunto, estos resultados sugieren que *VQ10* no modifica significativamente la inducción de *LBD41*, *PDC1* y *ADH1* en la hipoxia, en cambio sí que parece reprimir la inducción de *L-LDH* tras el tratamiento (Fig. 34). En condiciones de normoxia, *VQ10* sí que podría regular la expresión de *LBD41* y *PDC1*, seguramente reprimiéndolos, ya que muestran una expresión reducida en las dos líneas transgénicas *VQ10ox* y, aunque en *vq10-H* su expresión sea mayor que en Col-0, en el mutante hipermórfico podrían estar actuando otros factores ajenos a *VQ10* que se desconocen.

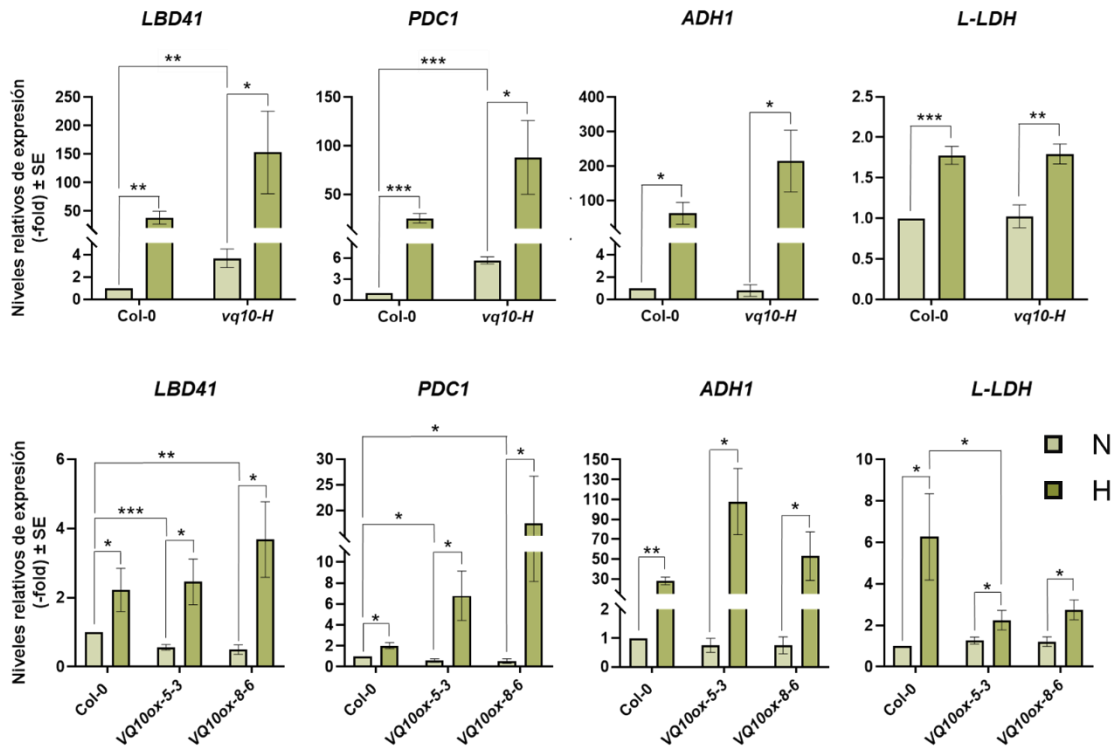


Figura 34. Inducción de los genes de respuesta a la hipoxia *LBD41*, *PDC1*, *ADH1* y *L-LDH* en plantas *Col-0*, *vq10-H* y *VQ10ox*. Los niveles relativos de expresión fueron analizados por qRT-PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 1) a partir de ARN procedente de tres experimentos independientes de plantas de las condiciones (N, normoxia; H, hipoxia con un 1% de O₂) y los genotipos indicados. Los valores representan la media ± el error estándar (SE), y el valor estadístico fue calculado con *t* de Student comparando cada condición en cada tiempo con el control no tratado a tiempo 0. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

Se comprobó también si las plantas *vq10-H* y *VQ10ox* toleraban la re-oxigenación tras hipoxia en plantas que habían estado sumergidas en agua y se comparó con plantas silvestres. Para ello, se cuantificó el daño detectado en las plantas después de 15 días de recuperación en luz tras estar sumergidas 4 días en oscuridad. Las plantas *VQ10ox* toleraron peor la hipoxia y posterior re-oxigenación en comparación con *Col-0* (Fig. 35). En cuanto a las plantas *vq10-H*, también resultaron ser levemente más susceptibles a la hipoxia y re-oxigenación que *Col-0* (Fig. 35).

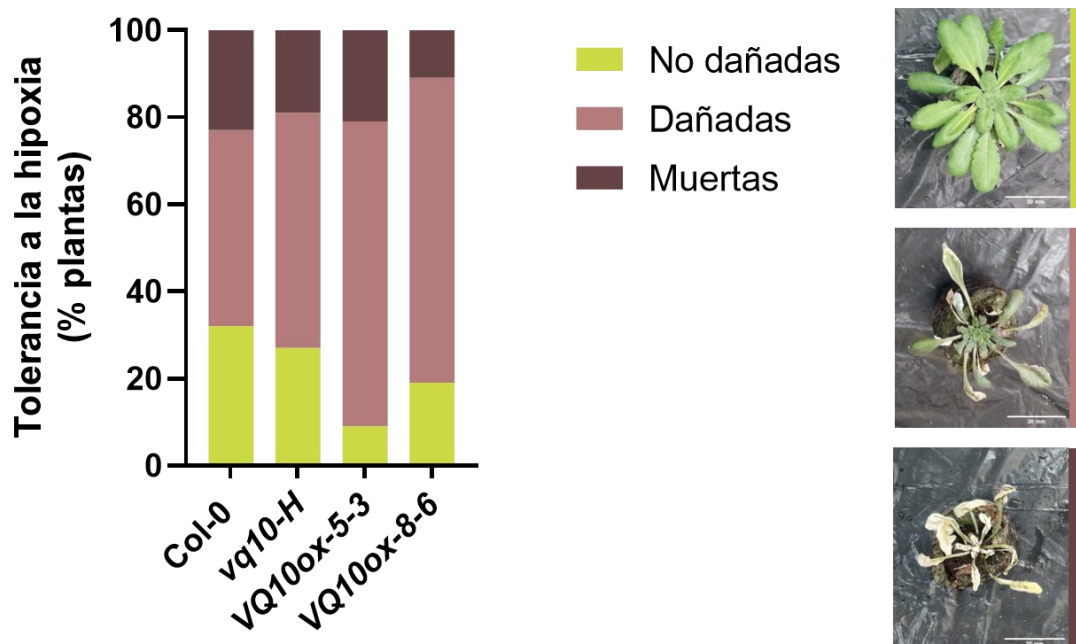


Figura 35. Tolerancia a la re-oxigenación tras la hipoxia en plantas inundadas Col-0, vq10-H y VQ10ox.

Las plantas de los genotipos indicados fueron sumergidas durante 5 días seguido de un periodo de recuperación en condiciones de luz estándar de 15 días. La cuantificación del daño causado por la hipoxia seguido de la re-oxigenación se realizó en base a una escala con tres niveles de daño: no dañadas (verde), dañadas (rosa), y muertas (marrón). El porcentaje de plantas con cada nivel de daño se calculó a partir de unas 10 plantas por genotipo. La escala (barra blanca en la parte inferior derecha de las imágenes) representa 30 mm.

Por último, para comprobar si los cambios en la tolerancia a la hipoxia/re-oxigenación, al estrés oxidativo en la germinación de semillas, y al NO en los ensayos de elongación de hipocótilos etiolados de las plantas con mayores niveles de expresión de *VQ10* se debían a una mayor tolerancia al estrés nitro-oxidativo, primero se midió el patrón de modificación de 3-nitroY en *vq10-H*, *VQ10ox* y Col-0 tras un tratamiento de NO. Aunque el patrón de proteínas que contienen 3-nitroY aumentó notablemente debido al tratamiento de NO, no se vieron diferencias entre genotipos (Fig. 36). Dado que el uso de 3-nitroY libre como marcador de estrés nitro-oxidativo suele usarse en mamíferos, aunque no es común en plantas, en esta Tesis se trató de desarrollar un método para determinar los niveles de 3-nitroY en plantas basado en UPLC-MS/MS. Los resultados obtenidos con este nuevo método fueron similares a los obtenidos para la nitrotirosina en proteínas, se vio un aumento en los niveles de 3-nitroY libre causado por el tratamiento de NO, pero no hubo diferencias entre genotipos ni en plantas tratadas ni en plantas no tratadas con NO (Fig. 36). Estos resultados sugieren que la tolerancia al estrés oxidativo que muestran las plantas *vq10-H* y *VQ10ox* no está directamente relacionada con PTMs como la nitración de tirosinas típicas del estrés nitro-oxidativo.

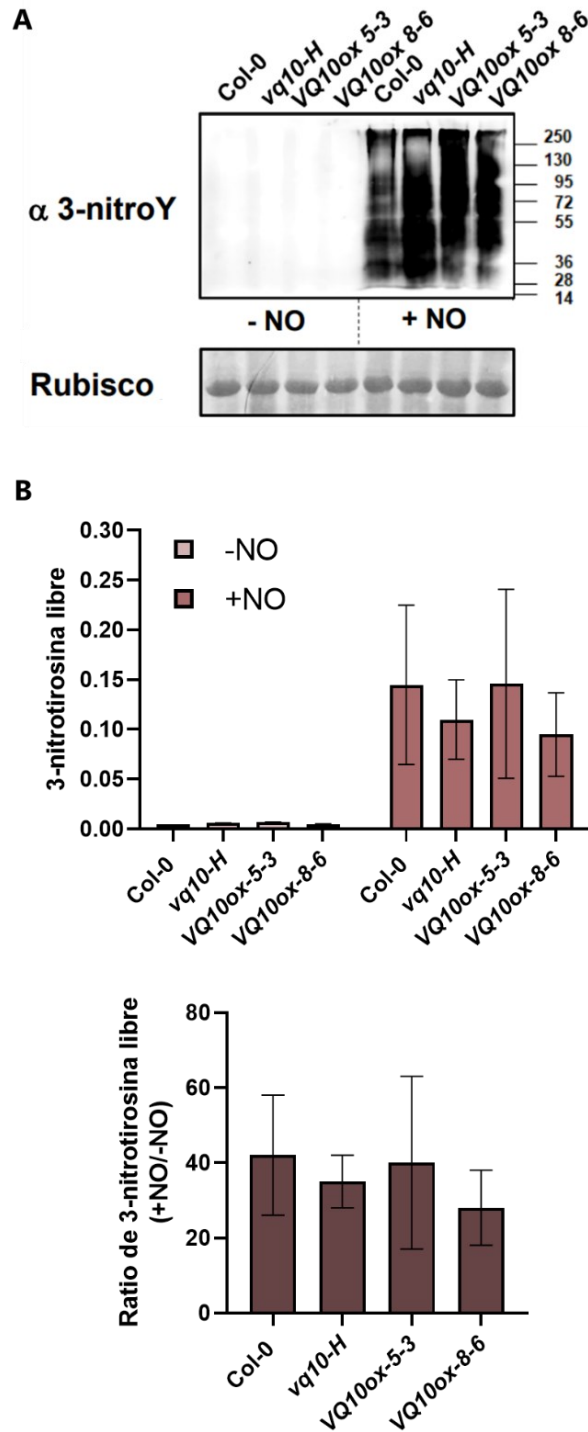


Figura 36. Patrón de 3-nitrotirosina (A) unida a proteína y (B) libre en plantas Col-0, *vq10-H* y *VQ10ox*. En (A) se muestran extractos de proteína total de plantas tratadas con NO (+NO) y plantas control sin tratar (-NO) de los genotipos indicados, analizados por Western blot con un anticuerpo anti-3-nitroY (α -3-nitroY). A la derecha se muestra la posición de los marcadores de peso molecular en kDa, y la ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) se muestra debajo en la misma membrana teñida con Ponceau S. Los valores mostrados en (B) representan la media de tres réplicas biológicas de los genotipos y las condiciones indicados \pm el error estándar (SE). No se observaron diferencias significativas.

6. EFECTO REGULADOR DE VQ1 Y VQ10 EN PROCESOS FOTOSINTÉTICOS

La interacción de VQ1 y VQ10 con proteínas cloroplásticas, algunas de las cuales son esenciales para el ensamblaje, mantenimiento y protección de los fotosistemas I y II (Tabla 3), sugiere que estas dos proteínas podrían estar involucradas en la modulación de la actividad fotosintética de las plantas. Para comprobarlo, se analizó la actividad fotosintética en plantas transgénicas que sobreexpresan *VQ1* o *VQ10* (Fig. 28A), y plantas con expresión reducida de *VQ1*, *VQ10*, o ambos a la vez, generadas mediante tecnología de expresión de microARNs artificiales (amiARN) específicos para cada diana (Fig. 37, Tabla A1) (Carbonell, 2019) y se comparó con la de plantas Col-0.

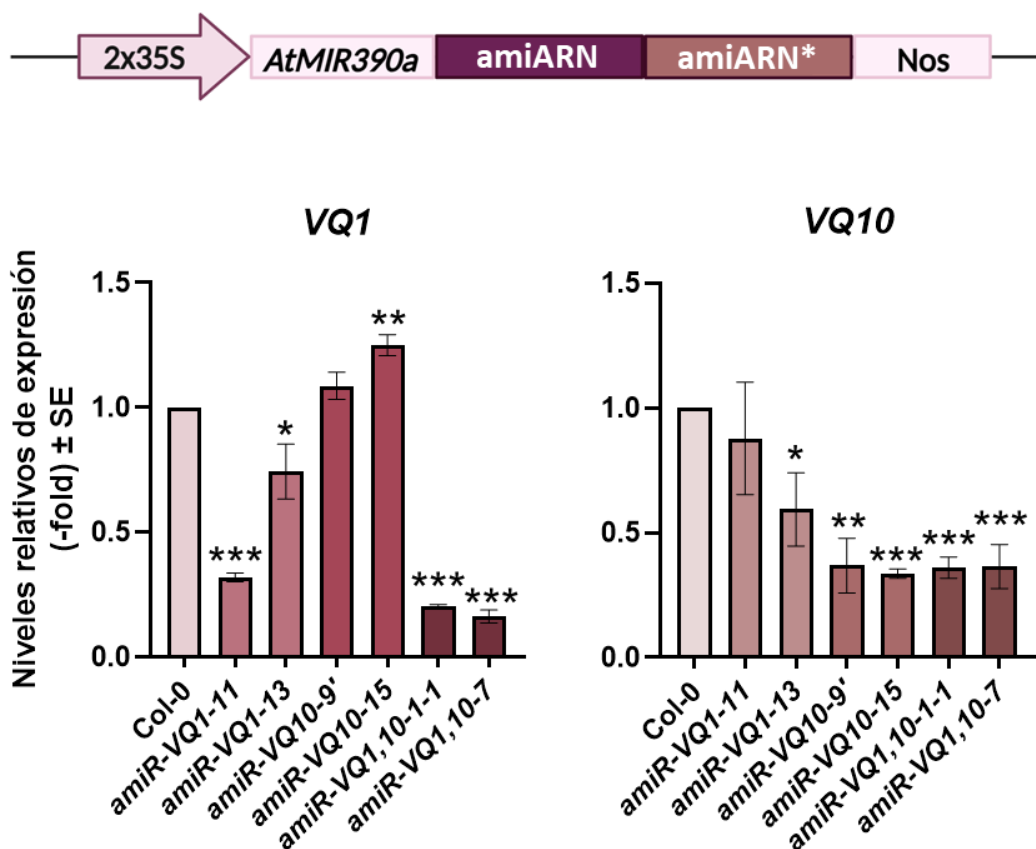


Figura 37. Generación y caracterización molecular de plantas con expresión reducida de *VQ1*, *VQ10* o *VQ1* y *VQ10* a la vez generadas mediante tecnología de expresión de microARNs artificiales (amiARN). Los niveles relativos de expresión de los genes indicados fueron analizados por qRT-PCR usando oligonucleótidos específicos (Tabla 1) a partir de ARN de plantas de los genotipos indicados provenientes de tres experimentos independientes. Los valores representan la media ± el error estándar (SE) y el valor estadístico fue calculado con *t* de Student comparando cada genotipo con el genotipo silvestre Col-0. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

Los resultados mostraron que las plantas que sobreexpresan *VQ1* o *VQ10* tienden a tener mayor eficiencia fotosintética (Φ PSII), aunque de manera más consistente las que sobreexpresan *VQ10* (*VQ10ox-5-3* y *VQ10ox-8-6*) que la línea *VQ1ox-25-8*, que sobreexpresa *VQ1* (Fig. 38). Por otro lado, las líneas amiARN tienden a tener un menor Φ PSII al compararlas con Col-0, de nuevo de manera más consistente aquellas con menor expresión de *VQ10* (*amiR-VQ10-9'* y *amiR-VQ10-15*) que en el resto (*amiR-VQ1-11* y *amiR-VQ1,10-7*) (Fig. 38). Ninguno de los genotipos mostró cambios en la actividad fotosintética máxima (Fv/Fm) respecto a Col-0 (Fig. 38), lo cual es un indicativo de que las plantas no están constitutivamente alteradas en su fotosíntesis.

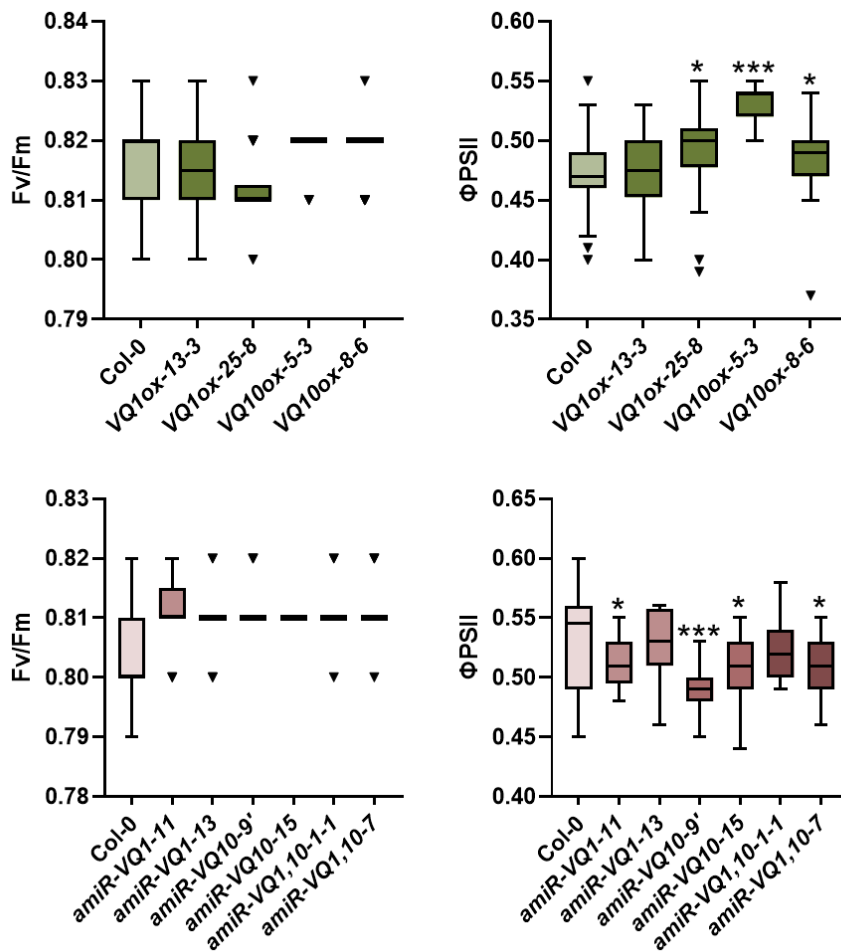


Figura 38. Estimación de la eficiencia fotosintética de plantas con expresión aumentada (panel superior, verde) o reducida (panel inferior, marrón) de *VQ1* y *VQ10*. El rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II (Φ PSII), y el rendimiento cuántico máximo del PSII (Fv/Fm) de plantas de los genotipos indicados se midieron sometiéndolas a un pulso de luz actínica de 21 PAR, tras estar incubadas en oscuridad durante 20 min. Los gráficos de cajas representan valores de hojas de unas 10-15 plantas por genotipo. El valor estadístico fue calculando con *t* de Student comparando cada genotipo con el control silvestre Col-0. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

También se comprobó si los cambios en la expresión de *VQ1* y *VQ10* podían alterar la síntesis de clorofilas durante el proceso de desetiología. Se observó que el contenido en clorofilas estaba parcialmente afectado tanto en las líneas con menor expresión de *VQ1* y *VQ10* (*amiR-VQ1,10-1-1* y *amiR-VQ1,10-7*) como en las líneas que sobreexpresan *VQ10* (*VQ10ox-5-3* y *VQ10ox-8-6*) (Fig. 39). Esta alteración se observó no solo a nivel fenotípico en plántulas tras 24 h de desetiología (Fig. 39) sino también al medir la cantidad de clorofilas (Fig. 39).

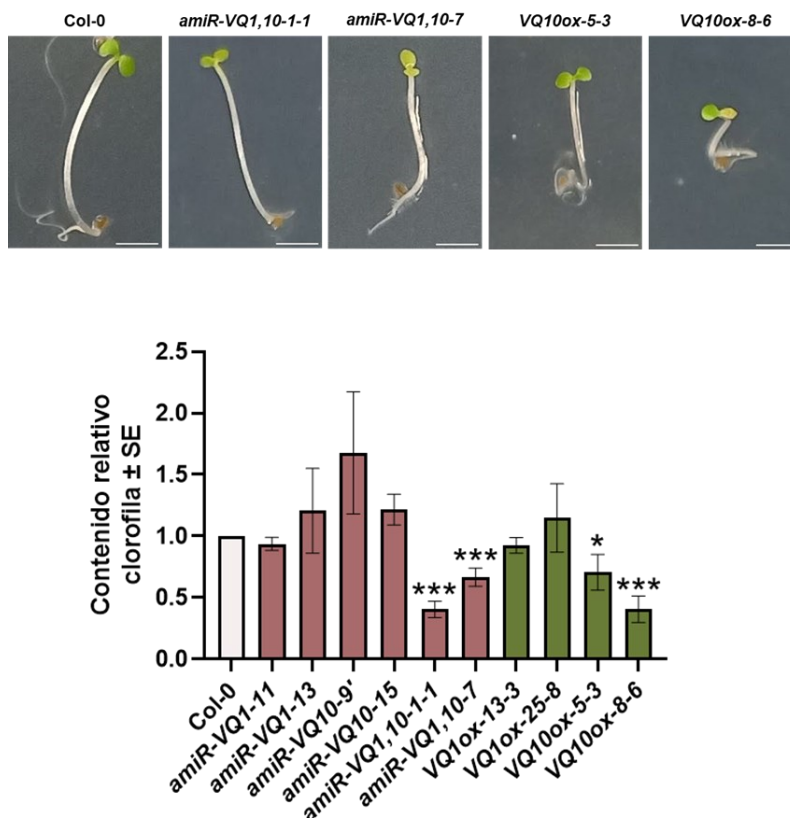


Figura 39. Efectos de cambios en la expresión de *VQ1* y *VQ10* en la desetiología de plantas. Se utilizaron plantas con expresión aumentada (verde) o disminuida (rosa) de *VQ1* y/o *VQ10*. El proceso de desetiología fue evaluado midiendo el contenido de clorofila total en plántulas de los genotipos indicados. En la parte superior se muestran imágenes representativas de plántulas Col-0 y de los genotipos con una cantidad de clorofila significativamente diferente. Las barras representan la media de valores de tres experimentos independientes ± el error estándar (SE), y el valor estadístico fue calculando con *t* de Student comparando cada genotipo con el control silvestre Col-0. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. La escala (barra blanca en la parte inferior derecha de las imágenes) representa 2 mm.

Como ya se ha observado anteriormente, *VQ1* y *VQ10* muestran interacción con la proteína cloroplástica DXS (Fig. 18) (Estévez et al., 2001; Rodríguez-Concepción, 2016). Como DXS es un regulador clave en la biosíntesis de isoprenoides, se decidió comprobar si los cambios en la expresión de *VQ1* y *VQ10* alteraban la biosíntesis de isoprenoides o su acumulación, así como la de las clorofilas. Para ello, se midió el contenido relativo de varios tipos de isoprenoides, como xantofilas u otros carotenoides y tocoferoles

(violaxantina, neoxantina, luteína, β -caroteno y cis- β -caroteno), y clorofilas. Sin embargo, en general no se detectaron diferencias significativas en ninguno de los genotipos con respecto a Col-0 (Fig. 40), lo cual significa que los posibles cambios ejercidos por VQ1 y VQ10 en la función del cloroplasto no afectan a la acumulación o síntesis de compuestos derivados de su metabolismo como los isoprenoides y las clorofilas.

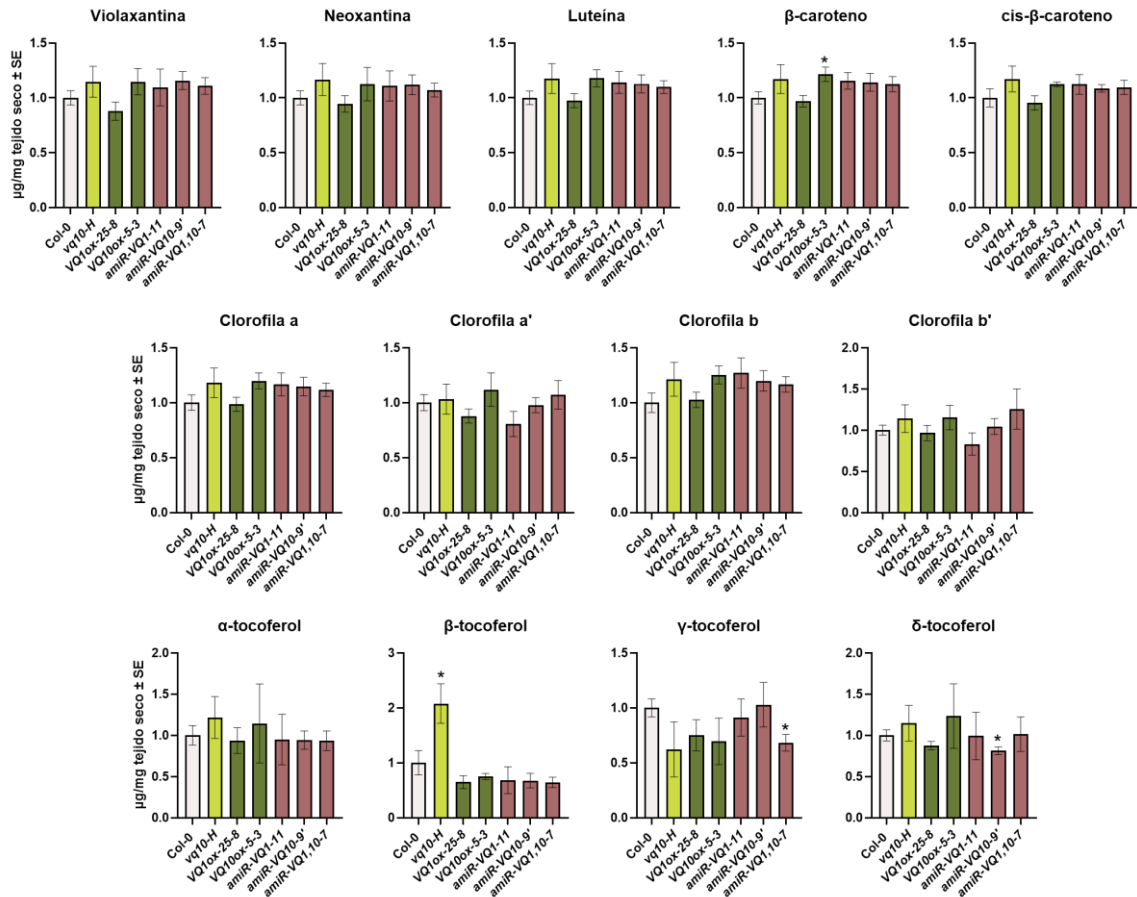


Figura 40. Efectos de cambios en la expresión de VQ1 y VQ10 en el contenido relativo de distintos isoprenoides en plantas. Se utilizaron plantas con expresión aumentada (verde) o disminuida (rosa) de VQ1 y/o VQ10. Las barras representan la media de tres experimentos independientes \pm el error estándar (SE), y el valor estadístico fue calculando con *t* de Student comparando cada genotipo con el control silvestre Col-0. * $p < 0.05$. Niveles de isoprenoides relativos a los valores detectados en plantas silvestres Col-0.



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Cuando las plantas se enfrentan a condiciones de hipoxia, ya sea durante el desarrollo en tejidos naturalmente hipóxicos (Considine et al., 2017; Le Gac & Laux, 2019; Weits et al., 2021) o debido al estrés ambiental (Phukan et al., 2016), experimentan, además de la limitada disponibilidad de O₂, un aumento en los niveles de NO endógeno, otras RNS y ROS (Armstrong et al., 2019; Diab & Limami, 2016; Gupta & Igamberdiev, 2011; Hamanaka & Chandel, 2009; Hebelstrup & Møller, 2015; Igamberdiev et al., 2014; Pucciariello & Perata, 2017). De entre los genes identificados en una búsqueda *in silico* como regulados por NO, hipoxia y estrés oxidativo, se encontró un conjunto de cinco genes, todos inducidos, que codifican proteínas con dominio VQ: VQ1, VQ10, VQ24, VQ27 y VQ32 (Fig. 9). A pesar de que se ha caracterizado la participación de algunas proteínas VQ en numerosas respuestas de las plantas a estreses bióticos y abióticos, así como en los procesos de crecimiento y desarrollo, para la mayoría de las proteínas VQ en *Arabidopsis* su función es todavía desconocida (Jiang et al., 2018; Jing & Lin, 2015; León et al., 2021; Yuan et al., 2021). En concreto, para estas cinco proteínas VQ la información disponible es casi inexistente.

Esta Tesis se ha centrado en el estudio de los genes *VQ1* y *VQ10* porque codifican proteínas pequeñas con características específicas que les diferencian de las otras tres proteínas VQ inducibles por hipoxia, NO y estrés oxidativo. Ambas presentan un alto grado de homología en su secuencia de aminoácidos y su estructura tridimensional, que forma un bucle desordenado que contiene un único residuo de C (Fig. 10, 20). *VQ1* y *VQ10*, además de por hipoxia, NO y estrés oxidativo (Fig. 9 y 12), también podrían estar regulados en múltiples procesos de desarrollo y en otros tipos de estrés (Fig. 11). Por otro lado, *VQ1* y *VQ10* forman un clado separado en el árbol filogenético (Fig. 5), no tienen capacidad de unión al ADN y por tanto no son reguladores directos de la transcripción (Tabla 2) (Jing & Lin, 2015), pero en base a algoritmos de predicción, sí que tienen potencial capacidad de unión al ARN (Tabla 2), y, junto con *VQ27*, su localización subcelular no parece ser exclusivamente nuclear (Tabla 2). Dado que no parecen comportarse como FT, es probable que ejerzan sus funciones reguladoras a través de otro tipo de interacciones moleculares. En este sentido, se ha vinculado el modo de acción reguladora de muchas proteínas VQ a la interacción con FT de la familia WRKY (Chen et al., 2018; Cheng et al., 2012; Hu et al., 2013b; Lei et al., 2017, 2018; Wang et al., 2015b; Weyhe et al., 2014).

En esta tesis, se ha demostrado que las proteínas *VQ1* y *VQ10* interactúan entre sí y con ellas mismas, así como con las otras tres proteínas VQ y con los cuatro FT WRKY también identificados como co-regulados por hipoxia, NO y estrés oxidativo (Fig. 9 y 13). Estas múltiples interacciones sugieren que las proteínas VQ y WRKY probablemente formen diferentes complejos proteicos a partir de los cuales podrían regular una gran variedad de procesos de manera conjunta. La formación de múltiples complejos reguladores, que podrían ser homodímeros, heterodímeros, u oligómeros, parece

probable dadas las investigaciones ya publicadas sobre los complejos de proteínas VQ-WRKY (Chen et al., 2018; Cheng et al., 2012; Hu et al., 2013b; Lei et al., 2017, 2018; Uji et al., 2019; Wang et al., 2015b; Weyhe et al., 2014; Yan et al., 2018; Ye et al., 2016) y los nuevos resultados presentados en esta Tesis. Sin embargo, se requiere de más trabajo de investigación para esclarecer la naturaleza, composición y formación de estos complejos reguladores, así como su modo de acción en diferentes procesos.

Este trabajo ha permitido establecer que la potencialidad de interacción de VQ1 y VQ10 no se restringe a FT WRKY, sino que son también capaces de interactuar con una gran variedad de proteínas con funciones muy diversas. Un rastreo de interacciones proteína-proteína basado en el sistema de Y2H utilizando VQ1 como cebo nos permitió identificar casi 300 proteínas que interactúan con VQ1 (Tabla A2). Estas proteínas tienen localizaciones subcelulares muy diversas y participan en una gran variedad de procesos biológicos (Fig. 14). Algunas de las proteínas identificadas en el rastreo con diferentes funciones y localizaciones subcelulares también interactuaron con VQ10 (Fig. 15), lo cual sugiere que la posible redundancia de función entre VQ1 y VQ10 podría deberse potencialmente a una redundancia en sus patrones de interacción proteína-proteína. Sin embargo, la potencial redundancia funcional entre VQ1 y VQ10 no se vio reflejada en un efecto sinérgico en plantas con expresión reducida de ambos genes a la vez. Apenas unos pocos genes cambiaron su nivel de expresión en plantas no sometidas a estrés que expresaban un amiARN contra ambas dianas génicas simultáneamente cuando se compararon con plantas silvestres (resultados recientes del laboratorio no incluidos en esta Tesis). Estos datos sugieren que el papel redundante de las proteínas VQ1 y VQ10 sería más relevante en plantas sometidas a alguna condición de estrés.

Entre las proteínas que interactúan con VQ1 hubo una sobrerrepresentación de proteínas con localización cloroplástica (Fig. 14A, Tabla 3). Sin embargo, tal y como se ha demostrado experimentalmente en esta Tesis, VQ1 y VQ10 no están localizadas en el cloroplasto, sino que co-localizan en el núcleo y el citoplasma (Fig. 16 y 17). Por tanto, estas interacciones podrían estar ocurriendo en el tránsito de las proteínas cloroplásticas desde el citoplasma donde se sintetizan hacia el orgánulo, formando estructuras más o menos complejas que podrían incluir desde dímeros con VQ1 o VQ10, trímeros con VQ1 y VQ10 juntas, u oligómeros con otras proteínas. El efecto o función reguladora ejercidos por VQ1 o VQ10 sobre las proteínas diana con las que interactúan podría ser muy diverso. Resulta interesante mencionar que una de las proteínas que se identificaron en el rastreo fue Toc75 (*Translocon outer membrane complex 75*), que es uno de los componentes del complejo Toc, un complejo proteico unido a la membrana cloroplástica que permite la traslocación de proteínas al cloroplasto (Baldwin et al., 2005), lo que podría sugerir que estas proteínas VQ podrían estar funcionando como guías facilitando la aproximación de las dianas al cloroplasto y más concretamente al sistema de translocación que facilita su entrada al orgánulo. Se han confirmado las interacciones *in planta* de VQ1 y VQ10 con una de las proteínas cloroplásticas identificadas en el rastreo, DXS. Según predicciones *in silico*, el motivo VQ sería relevante para la interacción. La interacción *in planta* se comprobó mediante Co-IP a partir de plantas co-transformadas con las proteínas de fusión DXS-GFP y HA-VQ1 o HA-VQ10 (Fig. 18B). La Co-IP permitió

identificar dos formas de la proteína DXS, una forma monomérica de 102 kDa correspondientes a la proteína DXS-GFP y una forma oligomérica de peso molecular mayor que 250 kDa (Fig. 18B). En nuestras condiciones de trabajo no se identificaron dímeros de DXS, que se han caracterizado previamente como la forma activa de la enzima (Di et al., 2023). El equilibrio entre las formas monomérica y dimérica de DXS, que controla por tanto su actividad, está regulado por los productos de la ruta del MEP a través de un mecanismo alostérico (Di et al., 2023). Nuestros resultados mostraron que la co-expresión de DXS con VQ1 o VQ10 no alteró el patrón de localización punteada de DXS en los cloroplastos (Fig. 19). Sin embargo, sí que se observó una posible alteración de la oligomerización de DXS en presencia de VQ1 y VQ10 a través de un mecanismo redox que implicaría la participación de los grupos tiólicos de los residuos de C. Los resultados sugieren que, en condiciones reductoras, VQ1, y sobre todo VQ10, provocan la reducción en los niveles de oligómeros y la consecuente acumulación de monómeros de DXS en comparación con los niveles detectados en plantas que solo expresaban DXS (Fig. 20C). Este hipotético mecanismo redox podría establecer un equilibrio entre la oxidación/oligomerización mediada por puentes disulfuro y la reducción/monomerización de estos puentes disulfuro a grupos tiol en los residuos de C reactivos. VQ1 y VQ10 tienen un único residuo C reactivo ubicado en el bucle desordenado de las proteínas, y DXS contiene dos residuos C con capacidad para formar puentes disulfuro también en un bucle desordenado (Fig. 20A, B). Dado que los dos residuos C que pueden formar puentes disulfuro en DXS (C23 y C42) están los dos separados en un bucle desordenado de la proteína (Fig. 20A, B), la formación de puentes disulfuro intramoleculares está desfavorecida y, por tanto, es más probable que se formen puentes disulfuro intermoleculares. La posible regulación de VQ1 y VQ10 sobre el estado redox de DXS podría ocurrir por medio de un mecanismo similar al de las peroxirredoxinas (Liebthal et al., 2020), tal y como se resume en la Figura 41. La oxidación del grupo tiol de los residuos C de las proteínas VQ a ácido sulfénico desencadenada por un peróxido les permitiría funcionar como una C peroxidática sobre el grupo tiol reducido de una C diana de DXS, provocando la formación de un puente disulfuro intermolecular entre VQ y DXS que puede ser revertido después mediante la liberación de la forma tiol reducida de la presumible peroxirredoxina VQ1 o VQ10 y la formación de un nuevo puente disulfuro con otra proteína DXS (Fig. 41). La repetición de este ciclo redox permitiría la generación de oligómeros de DXS. Cuando existe un ambiente celular reductor, el estado redox de las proteínas VQ se mantendría reducido y serían proclives a formar puentes disulfuro con formas oxidadas de DXS, incluyendo oligómeros con múltiples puentes disulfuro intermoleculares. De manera que, en un ambiente reductor, estos puentes disulfuro se romperían y se formarían heterodímeros VQ-DXS unidos por otros puentes disulfuro y monómeros de DXS con el grupo tiol de residuos de C reducido (Fig. 41). Esta hipótesis sobre la función de las proteínas VQ1 y VQ10 sugiere que podrían estar actuando como 1-Cis peroxirredoxinas. Hasta ahora, solo se ha caracterizado una 1-Cis peroxirredoxina en *Arabidopsis*: PER1 (Haslekås et al., 1998). La localización subcelular de PER1 es citoplásmica y nuclear (Stacy et al., 1996, 1999), al igual que VQ1 y VQ10 (Fig. 16). Cabe destacar que se ha demostrado que las peroxirredoxinas tienen actividad antioxidante y la 1-Cis peroxirredoxina PER1 de cebada y arroz promueve la

resistencia al estrés oxidativo (Lee et al., 2000; Stacy et al., 1996). Sin embargo, no está tan claro que la PER1 de Arabidopsis proteja el embrión y la capa de aleurona de las semillas del estrés oxidativo (Haslekås et al., 1998). No obstante, en esta Tesis se ha correlacionado una mayor expresión de *VQ10* con una mayor tolerancia de las semillas al estrés oxidativo desencadenado por el metil viológeno (Fig. 32). Cualquier estrés provoca cambios en el estado redox intracelular (Dat et al., 2000; Mittler et al., 2004; Van Breusegem & Dat, 2006). Estas condiciones provocan, entre otras reacciones, una acumulación de H_2O_2 y diversas enzimas antioxidantes entre las que se encuentran las peroxirredoxinas (Dietz, 2011; Foyer & Noctor, 2005; Hasanuzzaman et al., 2020). Por tanto, las peroxirredoxinas se encargan de controlar los niveles de ROS intracelular de manera directa mediante la eliminación de peróxido y peroxinitrito, y de manera indirecta participando en la señalización redox, es decir, oxidando otras proteínas para activar cascadas de señalización o uniéndose a otras proteínas mediante puentes disulfuro (Choudhary et al., 2020; Perkins et al., 2015). Así pues, la hipótesis de que *VQ1* y *VQ10* podrían estar regulando la acumulación de ROS y la señalización redox de la planta a través de su posible actividad peroxirredoxina no es descartable.

DXS controla el flujo de la ruta del MEP, es decir, es el paso limitante de la ruta (Volke et al., 2019; Wright et al., 2014). A pesar de eso, su sobreexpresión solo incrementa ligeramente la cantidad de isoprenoides (Wright et al., 2014). Esto es debido a que existe un mecanismo de *feedback* negativo que controla la ruta del MEP cuando sus productos finales (IDP y DMADP) se acumulan en exceso (Banerjee et al., 2013). Además, la forma activa de DXS es un dímero (Di et al., 2023), mientras que los monómeros inactivos de DXS son propensos a formar agregados, lo que lleva a la degradación de la proteína por parte del complejo Clp del cloroplasto (Pulido et al., 2016). Sin embargo, en condiciones de estrés se promueve la desagregación y reactivación de DXS (Pulido et al., 2016). Por tanto, existe la posibilidad de que *VQ1* y *VQ10* tengan un papel en la agregación o la desagregación de DXS, participando en el mecanismo de *feedback* negativo de la ruta del MEP y controlando la síntesis de isoprenoides y las respuestas a estrés. El mecanismo de acción de DXS en esta ruta, controlado por el *feedback* negativo, también podría explicar por qué no se han visto grandes cambios al medir la acumulación de isoprenoides en plantas con niveles alterados de *VQ1* y/o *VQ10* (Fig. 40).

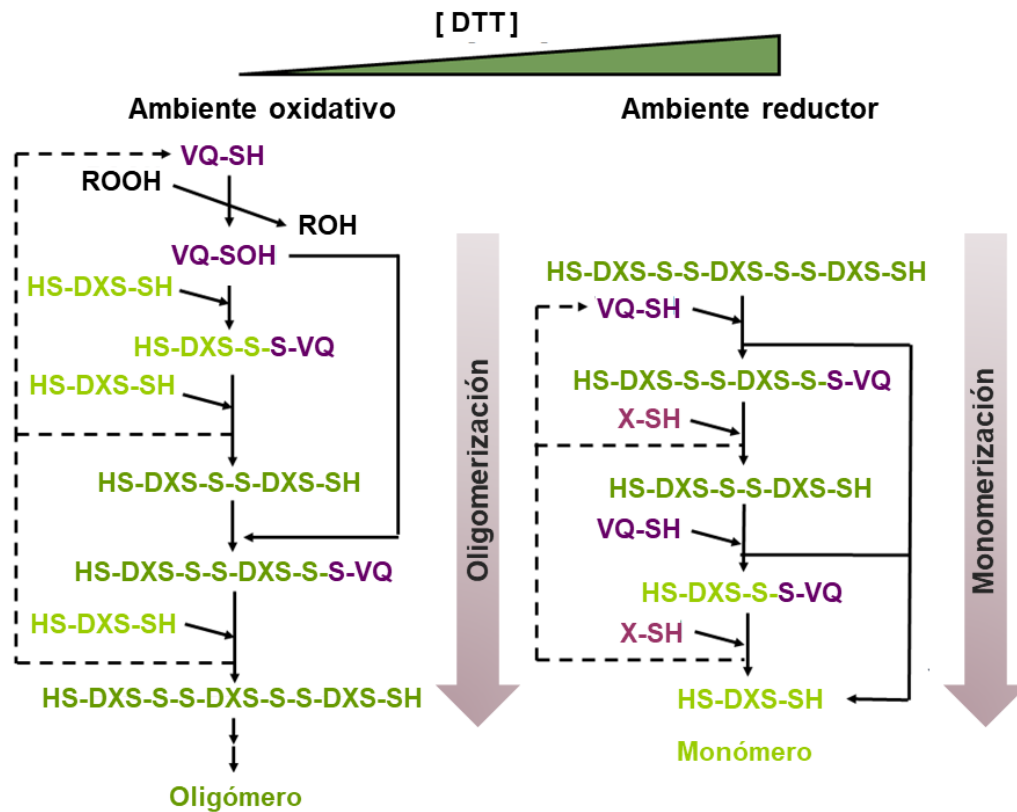


Figura 41. Modelo la regulación redox del estado de oligomerización de DXS mediado por la actividad 1-Cis peroxirredoxina de las proteínas VQ1 y VQ10.

La proteína VQ10 de Arabidopsis, más allá de su bien caracterizada interacción con WRKY18 para regular la defensa contra *Botrytis cinerea* (Chen et al., 2018), su respuesta al NO (Castillo et al., 2018), la hipoxia y el estrés oxidativo (Fig. 9 y 12), y ahora su posible papel en la regulación de procesos relacionados con el cloroplasto descrito en esta Tesis, sigue estando poco caracterizada. En el segundo apartado de resultados de esta Tesis, también se han identificado y caracterizado fenotipos asociados al aumento en la expresión de VQ10 en el mutante hipermórfico *vq10-H* y en plantas transgénicas sobreexpresoras *VQ10ox*, así como el análisis del transcriptoma completo de plantas mutantes *vq10-H* comparado con plantas silvestres Col-0 en normoxia e hipoxia. Ni la sobreexpresión de genes de respuesta a hipoxia (Fig. 34), ni la tolerancia a la hipoxia y la re-oxigenación después de un periodo de inundación (Fig. 35) se vio significativamente alterada en las plantas *vq10-H*, lo cual sugiere que VQ10 por sí sola no participa de manera determinante en las respuestas a la hipoxia. Estos resultados son consistentes con el grupo de genes que fueron co-regulados por la hipoxia en plantas silvestres y plantas *vq10-H* (Fig. 23C), que sugiere la existencia de un grupo de genes sensibles a la hipoxia que no fueron regulados por VQ10. Por otro lado, dado el limitado impacto del aumento en la expresión de VQ10 en el transcriptoma diferencialmente expresado de *vq10-H* en comparación con las plantas Col-0 tanto en normoxia como en hipoxia (Tablas 4 y 5; Fig. 23A), junto con la incapacidad de VQ10 para unirse al ADN y regular la

transcripción descrita anteriormente (Tabla 2) (Jing & Lin, 2015), las funciones reguladoras ejercidas por la proteína deben depender de otras características.

Se ha predicho que la proteína VQ10 tiene capacidad de unión al ARN (Tabla 2). Por tanto, además de a través de su interacción con otras proteínas, parte de sus funciones reguladoras podrían estar relacionadas con la regulación postranscripcional de los ARNs, modificando su estabilidad, sus PTMs o su procesamiento. El AS es probablemente uno de los procesos relacionados con el ARN que mayor efecto diferencial puede ejercer sobre los genes diana (Meyer et al., 2015). A través del análisis transcriptómico de plantas *vq10-Hy* plantas Col-0, se identificaron un conjunto de eventos de AS diferenciales (Fig. 27). Entre los menos de 10 genes diana de AS identificados en normoxia, se detectaron diferentes eventos de AS en el gen *AGL42*, que codifica un FT de tipo MADS box cuya expresión está enriquecida en el centro quiescente y la estela de las raíces, regula la percepción de brasinoesteroides en la epidermis y controla el tamaño del meristemo de la raíz (Hacham et al., 2011; Nawy et al., 2005). Además, *AGL42* junto con otros FT MADS box, promueve la floración en el meristemo apical del tallo y los meristemos axilares a través de una ruta dependiente de giberelinas (Dorca-Fornell et al., 2011). En esta Tesis, se observó que la raíz de las plantas *vq10-H* crecía más activamente durante las primeras etapas de elongación de la raíz primaria (Fig. 30A), correlacionando con un meristemo radicular más grande (Fig. 30B, C) y una mayor tasa de división celular en la raíz (Fig. 29). Por otro lado, la tasa de división celular en el meristemo apical de las plantas *cycB1:GUS* en el fondo *vq10-H* no fue diferente al compararlas con las plantas *cycB1:GUS* en fondo silvestre (Fig. 29), pero sí que estaba incrementada tanto en el meristemo apical como en las raíces de las plantas *cycB1:GUS* en un fondo mutante nulo *wrky33* (Fig. 31A). Estos resultados sugieren que la división celular podría estar regulada de manera opuesta por VQ10 y WRKY33, actuando como activador y represor, respectivamente. En las raíces, la activación por parte de VQ10 debería predominar sobre la represión por parte de WRKY33, ya que a las raíces de las plantas *cycB1:GUS* en fondo *vq10-H* no parece afectarles dicha represión (Fig. 29). A su vez, la actividad represora de WRKY33 prevalecería en el meristemo apical (Fig. 29 y 31A). Sin embargo, en las plantas *VQ10ox* con niveles muy altos de expresión de *VQ10*, el tamaño del meristemo de la raíz fue menor que el de las raíces Col-0 (Fig. 30B, C), lo cual no correlaciona con los resultados obtenidos en *vq10-H*, e indicaría que la función represora de *WRKY33* prevalecería en el meristemo de la raíz de estas plantas. Por tanto, hay alguna diferencia entre plantas *vq10-Hy* *VQ10ox* responsable de que no correlacione el tamaño de su meristemo radicular y, potencialmente, su tasa de división celular. El gen *AGL42* no se detectó como diferencialmente expresado en plantas *vq10-H*, pero no se puede descartar que los eventos de AS que ocurren diferencialmente en el locus en plantas *vq10-H* en comparación con plantas Col-0 puedan estar involucrados. Resulta interesante que el cruce genético entre las plantas *vq10-Hy* *wrky33* haya dado lugar a plantas mutantes con un fenotipo de crecimiento muy acusado a pesar de no haber podido obtener plantas que sean dobles mutantes en homocigosis. Plantas con un genotipo combinado de una de las mutaciones en homocigosis y la otra en heterocigosis (*VQ10/vq10-H* con *wrky33/wrky33*, o *vq10-H/vq10-H* con *WRKY33/wrky33*) desarrollaron brotes enanos con

muchas hojas cloróticas y rizadas y retraso en la floración (Fig. 31B), un fenotipo que sugiere una alta proliferación celular en el meristemo apical del tallo y que podría ser consistente con una reducción de la función de AGL42 debido a la expresión de formas inactivas debido al AS en plantas *vq10-H*. Además, cabe destacar que se identificaron varios eventos de AS diferencial en las plantas *vq10-H* en hipoxia en el gen *AT4G30820*, que codifica una proteína relacionada con un factor ensamblador de quinasa dependiente de ciclina de la cual se han identificado 19 formas de AS diferentes y que está involucrada en el control de la división celular y la transcripción (Umeda et al., 2005).

La tasa de germinación de las semillas *vq10-H* y *VQ10ox* fue significativamente mayor que la de semillas Col-0 en condiciones de estrés oxidativo (Fig. 32), lo que sugiere que VQ10 podría tener un papel en procesos antioxidantes. Sin embargo, entre los DEGs identificados en *vq10-H* no se encontró ningún gen codificante de enzimas antioxidantes. El segundo gen más inducido codifica el receptor de GTPasa Rab prenilado PRA1.F4 (Tabla 4), que participa en la salida de algunos tipos de proteínas del aparato de Golgi (Lee et al., 2017). Cabe destacar que el gen *ICMEL2* estaba menos expresado en plantas *vq10-H* (Tabla 4). Este gen codifica una enzima que desmetila a proteínas preniladas involucradas en regular la sensibilidad y la señalización de ABA (Lan et al., 2010) y podría ser también relevante para regular la función de la proteína prenilada PRA1.F4. La proteína cloroplástica GTPasa Rab CPRabA5e de Arabidopsis parece estar involucrada en el transporte de vesículas y promover la germinación de semillas y el crecimiento durante el estrés oxidativo (Karim et al., 2014), y otra proteína GTPasa Rab, AtRabG3e, que participa en el transporte de vesículas entre el aparato de Golgi y la membrana plasmática, se induce por estrés oxidativo (Mazel et al., 2004). Estos datos sugieren que la participación de VQ10 en la protección contra el estrés oxidativo, a pesar de no estar relacionada con genes que codifican proteínas antioxidantes, podría estar relacionada con la regulación de vías de señalización, como la regulación de proteínas Rab en el tráfico de vesículas entre compartimentos intracelulares. Además, las plantas *vq10-H* mostraron una represión del gen *ICR4/RIP4*, que codifica el interactivo de la Rho GTPasa Constitutivamente Activa de las Plantas (ROPs) 4 (Tabla 4), lo que respalda la participación de la señalización relacionada con guanosina trifosfato (GTP) en la regulación ejercida por VQ10. Se ha publicado recientemente que la GTPasa ROP2 (*RHO-related protein from plants 2*) participa en la reducción del tamaño de la raíz provocada por NO en Arabidopsis (Kenesi et al., 2023). En esta Tesis se ha observado que el gen *VQ10* está regulado por el NO (Fig. 9 y 12A) y también que las plantas con mayores niveles de expresión de *VQ10* fueron menos sensibles al NO que plantas Col-0 en ensayos de acortamiento de hipocótilos etiolados (Fig. 33), un fenotipo que también podría estar relacionado con la señalización mediada por la GTPasa ICR4/RIP4. Cabe destacar que las plantas *vq10-H* en normoxia mostraron tener significativamente reprimidos tres genes que codifican peroxidasas (Tabla 4). Algunas mutaciones en arroz que provocaron la acumulación de ROS también provocaron la represión de ocho genes de peroxidasas (Li et al., 2021b), y la represión de peroxidasas parece ser un marcador de las respuestas a estrés oxidativo en Arabidopsis (Choi et al., 2019), lo cual sugiere que las plantas *vq10-H* podrían estar sufriendo constitutivamente estrés oxidativo en

condiciones normales. Un estado constante de estrés oxidativo podría ser la razón por la que las semillas *vq10-H* toleran mejor la germinación tras aplicar metil viológeno (Fig. 32). Niveles bajos de ROS conllevan una señalización que promueve la aclimatación y las respuestas a estrés, mientras que altas concentraciones de ROS llevan al daño oxidativo (Foyer & Noctor, 2009). Esta aclimatación podría darse mediante una transducción de señales por parte de VQ10 que, como ya se ha descrito anteriormente, podrían ser señales de tipo redox que iniciasen una cascada de ROS que mantuviese a la planta alerta y preparada para responder ante el estrés (Foyer & Noctor, 2009; Zandalinas et al., 2019).

Otro posible mecanismo de acción de VQ10 podría estar relacionado con las mitocondrias, no en la generación de energía, sino en el metabolismo primario del carbono. El gen *QQS*, que codifica una proteína clave en la regulación del metabolismo del almidón, estaba reprimido en plantas *vq10-H* tanto en normoxia como en hipoxia (Tablas 4 y 5). La expresión de *QQS* y otros genes relacionados con el almidón pueden alterarse en condiciones de estrés oxidativo (Jones et al., 2016). También es importante destacar que los niveles de expresión de *VQ10* aumentaron unas 2-2.5 veces en los mutantes de *Arabidopsis* *sex1-3* y *sex4-3*, que acumulan almidón (código GEO GSE19260). Además, el almidón que se almacena en las semillas es la principal fuente de energía usada para la germinación, y el contenido de almidón afecta a la germinación de las semillas a través de alteraciones en el equilibrio almidón-azúcares debido a la alteración del metabolismo del almidón (Zhang et al., 2022b). La regulación redox y el metabolismo de ROS están interconectados y participan en la función de mitocondrias y cloroplastos (Suzuki et al., 2012). Los gradientes en el estado redox del NADPH, el metabolismo de la fotorespiración, y el metabolismo del carbono y el nitrógeno pueden influir en el flujo de energía y el equilibrio redox entre cloroplastos, mitocondrias y citoplasma, e interconectar estos orgánulos en una red redox más amplia (Foyer & Noctor, 2009; Noctor et al., 2007; Suzuki et al., 2012). De hecho, una de las proteínas identificadas como posibles interactoras de VQ1 y que luego se confirmó que también interaccionaba con VQ10 fue NDHL, una subunidad del complejo de la NADPH deshidrogenasa del cloroplasto (Shimizu et al., 2008). Además, un número significativo de proteínas identificadas como interactoras de VQ1 y potencialmente de VQ10 son proteínas de localización mitocondrial (Tabla A2), lo que apoyaría la existencia de funciones reguladoras de estas proteínas VQ sobre la función mitocondrial.

A pesar de que en esta Tesis se ha comprobado que *VQ1* y *VQ10* se inducen al exponer las plantas al NO (Fig. 9 y 12A) y que las plantas con mayores niveles de expresión de *VQ10* fueron menos sensibles al NO (Fig. 33), no se encontraron cambios con respecto a las plantas silvestres al medir los niveles de 3-nitroY libre tras la exposición al NO (Fig. 36). Las plantas son capaces de percibir el NO por medio de proteínas modificadas postraduccionalmente por el NO como se ha publicado para la oxidación dependiente de NO y O₂ del residuo C2 de los FT ERFVIIs por la ruta del N-degrón (Astier & Lindermayr, 2012; Gibbs et al., 2014; Pucciariello & Perata, 2017). Aunque entre los DEGs identificados al comparar *vq10-H* y Col-0 no se encontró ningún gen relacionado con esta ruta, entre las proteínas identificadas en el rastreo de doble híbrido en levadura se encontraba la proteína MAP1B (Tabla A2) que es una de las metionina aminopeptidasas

encargada de eliminar el residuo de metionina N-terminal de los ERFVIIIs para prepararlos para la posterior oxidación de C2, su arginilación, poliubiquitinación, y degradación por el proteasoma.

En resumen, los resultados presentados en esta tesis indican que VQ1 y VQ10 podrían actuar como proteínas señalizadoras en procesos de desarrollo y de respuesta a estrés, actuando como reguladoras a través de mecanismos que no dependen de la unión al ADN. Es probable que las acciones reguladoras de VQ1 y VQ10 se deban principalmente a interacciones con el ARN y con otras proteínas. En esta Tesis se ha descrito que las proteínas homólogas VQ1 y VQ10 interactúan con muchas proteínas con localizaciones subcelulares muy diversas. Entre ellas, se encontró un gran porcentaje de proteínas cloroplásticas involucradas en el ensamblaje, función y mantenimiento de los fotosistemas, así como diversas enzimas que participan en el metabolismo del carbono, nitrógeno y azufre. Además, se observó una correlación entre la expresión alterada de VQ1 y VQ10, en plantas sobreexpresoras y líneas amiARN, y cambios en la eficiencia de la fotosíntesis, así como en la biogénesis de cloroplastos. Será necesario realizar más experimentos para comprobar si la regulación ejercida por VQ1 y VQ10 sobre la función del cloroplasto está relacionada con los fenotipos de mayor tolerancia al estrés oxidativo y menor sensibilidad a NO observados en esta Tesis en plantas *vq10-H* y *VQ10ox*. No obstante, la interacción proteína-proteína parece ser la clave para la regulación ejercida por estas proteínas VQ en múltiples procesos. Los resultados obtenidos sugieren que la interacción de VQ1 o VQ10 con DXS y, probablemente, con otras proteínas cloroplásticas identificadas en el rastreo de Y2H, podría retener a estas proteínas diana en el citoplasma, evitando que lleguen al cloroplasto o, por el contrario, podría facilitar el tránsito de estas proteínas hacia el cloroplasto, y hacerlo mediante mecanismos de regulación redox. Al estimar la eficiencia fotosintética de las plantas con expresión alterada de *VQ1* y/o *VQ10*, se observó una mayor eficiencia en las plantas sobreexpresoras y una menor eficiencia en las líneas amiARN (Fig. 38). También se comprobó si la biogénesis de cloroplastos estaba afectada en las plantas con expresión alterada de *VQ1* y/o *VQ10*. El análisis del contenido en clorofilas después de la desetiología mostró niveles reducidos de clorofila tanto en las plantas *VQ10ox* como en las líneas dobles amiARN con expresión reducida de *VQ1* y *VQ10* a la vez (Fig. 39). Además, dado que DXS participa en las rutas de síntesis de isoprenoides, se midió por HPLC la acumulación de algunos de estos compuestos en plantas con niveles de expresión de *VQ1* y/o *VQ10* alterados. No se observaron resultados significativamente diferentes al medir la cantidad de clorofilas, carotenoides o tocoferoles (Fig. 40).

En conjunto, estos hallazgos sugieren que la biogénesis y las funciones del cloroplasto, incluida la fotosíntesis, y también la tolerancia al estrés oxidativo y algunos procesos de desarrollo como el desarrollo de meristemos, podrían regularse mediante mecanismos mediados por la interacción de estas proteínas con diferentes proteínas clave o con el ARN. En general, las diferencias observadas en plantas con niveles alterados de *VQ10* siempre han sido más significativas que las observadas en plantas con niveles alterados de *VQ1*, sugiriendo que, de las dos, esta proteína tiene un efecto más importante en la regulación. No obstante, no se puede descartar que estas dos proteínas podrían ejercer

funciones redundantes ya que se ha demostrado que comparten características y fenotipos en numerosos análisis (Fig. 9-13, 15-19, 20 y 38). Que esta redundancia funcional se manifieste tanto en condiciones estándar como en situaciones de estrés es algo que queda por demostrar, pero datos preliminares disponibles en el laboratorio sugieren que esta potencial redundancia funcional en plantas no estresadas no se manifiesta desde luego en cambios en el transcriptoma (resultados no incluidos en esta Tesis). Por otro lado, dado el nivel de expresión muy bajo de los genes *VQ1* y *VQ10* en plantas no estresadas, es posible que los efectos reguladores no se manifiesten a nivel de planta o ni siquiera de órgano completo sino quizás a nivel celular. Comprobar esta hipótesis implicaría la necesidad de acometer técnicas de ARN-Sec a nivel celular que, aunque se plantean hacer en un futuro en el laboratorio, aún estamos lejos de poder realizar.



**PERSPECTIVAS
FUTURAS**

P E R S P E C T I V A S F U T U R A S

Las perspectivas futuras inmediatas en esta investigación estarían basadas en la demostración de la hipótesis de que VQ1 y VQ10 pudieran tener actividad 1-Cis peroxirredoxina. Para ello, se están generando versiones mutadas de VQ1 y VQ10 cambiando sus residuos de C reactivos por residuos de serina (S), para el posterior análisis de la interacción in planta con DXS y también los experimentos de regulación redox. También sería necesario co-agroinfiltrar plantas de *N. benthamiana* con construcciones que expresen versiones de DXS y VQ1 o VQ10 fusionadas a proteínas fluorescentes para comprobar si existen cambios en la localización subcelular de estas proteínas. Toda esta experimentación adicional sin duda nos ayudaría a averiguar la función de estas proteínas y a conocer otros factores que pudieran estar actuando junto con ellas. Hay numerosas evidencias de que las proteínas VQ suelen actuar junto con FT WRKY y, concretamente en esta Tesis se incluye un caso en el que la interacción de VQ10 con WRKY33 da lugar a fenotipos de desarrollo extremos. Una parte del trabajo futuro aún por explorar implica la interacción de VQ1 y VQ10, pero también de las otras proteínas VQ co-reguladas con los otros FT WRKY que fueron previamente identificados (León et al., 2021). De hecho, no es descartable que algunas de las funciones identificadas en esta Tesis impliquen la co-participación de otras proteínas VQ o WRKY. El posible modelo combinatorio de estas proteínas asociadas en complejos hará, no obstante, que dicha caracterización funcional pueda ser bastante compleja y difícil de analizar.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los genes que codifican las proteínas VQ1, VQ10, VQ24, VQ27 y VQ32 se inducen por estrés oxidativo, hipoxia y NO, al igual que los que codifican para los factores de transcripción WRKY18, WRKY33, WRKY40 y WRKY75. En concreto, *VQ1* y *VQ10* se inducen por hipoxia y NO a tiempos cortos que preceden a la activación de típicos genes marcadores para ambos factores.
2. VQ1 y VQ10 presentan una alta potencialidad de interacción proteína-proteína. Son capaces de interactuar entre ellas y consigo mismas, al igual que con un gran número de proteínas con localización subcelular muy diversa y, debido a que no poseen actividad transcripcional, podrían estar ejerciendo sus funciones mediante interacciones proteína-proteína.
3. VQ1 y VQ10 se localizan en el núcleo y el citoplasma. Sin embargo, se ha identificado la interacción *in planta* de estas proteínas con la proteína cloroplástica DXS. Además, se ha observado que esta interacción modifica el patrón de oligomerización de DXS, que es relevante para su actividad.
4. El efecto de la mutación *vq10-H* en el transcriptoma de Arabidopsis es muy limitado, tanto en normoxia como en hipoxia, lo que sugiere que los efectos fenotípicos detectados se deben a eventos de regulación no transcripcional. Esta regulación podría estar mediada tanto por interacciones proteína-proteína como por la modulación de la estabilidad, procesamiento o localización del ARN.
5. VQ10 regula el desarrollo del meristemo de la raíz a través de procesos como la división o la elongación celular, y participa junto con WRKY33 en procesos de división celular y desarrollo de la planta.
6. VQ10 aumenta la tolerancia al estrés oxidativo durante la germinación, pero disminuye la sensibilidad al NO y la tolerancia a la hipoxia y posterior re-oxigenación.
7. Plantas que sobreexpresan *VQ1* o *VQ10* presentan una mayor eficiencia fotosintética. Además, interactúan con numerosas proteínas implicadas en el ensamblaje, mantenimiento y protección de los fotosistemas, lo que sugiere que VQ1 y VQ10 podrían regular positivamente la fotosíntesis mediante la protección de la maquinaria fotosintética en el cloroplasto.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, M., Berckhan, S., Rooney, D. J., Gibbs, D. J., Vicente Conde, J., Sousa Correia, C., Bassel, G. W., Marín-De La Rosa, N., León, J., Alabadí, D., Blázquez, M. A., & Holdsworth, M. J. (2015). Oxygen sensing coordinates photomorphogenesis to facilitate seedling survival. *Current Biology*, 25(11), 1483–1488. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.060>
- Ahlfors, R., Brosché, M., Kollist, H., & Kangasjärvi, J. (2009). Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 58(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03756.x>
- Akhter, S., Uddin, M. N., Jeong, I. S., Kim, D. W., Liu, X., & Bahk, J. D. (2016). Role of *Arabidopsis* AtPI4Kγ3, a type II phosphoinositide 4-kinase, in abiotic stress responses and floral transition. *Plant Biotechnology Journal*, 14(1), 215–230. <https://doi.org/10.1111/pbi.12376>
- Al-Ani, A., Bruzau, F., Raymond, P., Saint-Ges, V., Leblanc, J. M., & Pradet, A. (1985). Germination, Respiration, and Adenylate Energy Charge of Seeds at Various Oxygen Partial Pressures. *Plant Physiology*, 79(3), 885–890. <https://doi.org/10.1104/pp.79.3.885>
- Alpuerto, J. B., Hussain, R. M. F., & Fukao, T. (2016). The key regulator of submergence tolerance, *SUB1A*, promotes photosynthetic and metabolic recovery from submergence damage in rice leaves. *Plant, Cell & Environment*, 39(3), 672–684. <https://doi.org/10.1111/pce.12661>
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N. H. T., Zhu, S., Qiu, J.-L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., Newman, M.-A., Bjørn Nielsen, H., Hirt, H., Somssich, I., Mattsson, O., & Mundy, J. (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *The EMBO Journal*, 24(14), 2579–2589. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600737>
- Andrzejczak, O. A., Havelund, J. F., Wang, W.-Q., Kovalchuk, S., Hagensen, C. E., Hasler-Sheetal, H., Jensen, O. N., Rogowska-Wrzesinska, A., Møller, I. M., & Hebelstrup, K. H. (2020). The Hypoxic Proteome and Metabolome of Barley (*Hordeum vulgare* L.) with and without Phytoglobulin Priming. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1546. <https://doi.org/10.3390/ijms21041546>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Arc, E., Galland, M., Godin, B., Cueff, G., & Rajjou, L. (2013). Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00346>
- Armstrong, W., & Beckett, P. M. (1987). Internal Aeration and the Development of Stelar Anoxia in Submerged Roots. A Multishelled Mathematical Model Combining Axial Diffusion of Oxygen in the Cortex with Radial Losses to the Stele, the Wall Layers and the Rhizosphere. *The New Phytologist*, 105(2), 221–245.

- Armstrong, W., Beckett, P. M., Colmer, T. D., Setter, T. L., & Greenway, H. (2019). Tolerance of roots to low oxygen: 'Anoxic' cores, the phytooglobin-nitric oxide cycle, and energy or oxygen sensing. *Journal of Plant Physiology*, 239, 92–108. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.04.010>
- Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Üstün, Ş., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W., & Börnke, F. (2010). Plastidial Thioredoxin z Interacts with Two Fructokinase-Like Proteins in a Thiol-Dependent Manner: Evidence for an Essential Role in Chloroplast Development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell*, 22(5), 1498–1515. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071001>
- Astier, J., Gross, I., & Durner, J. (2018). Nitric oxide production in plants: an update. *Journal of Experimental Botany*, 69(14), 3401–3411. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx420>
- Astier, J., & Lindermayr, C. (2012). Nitric Oxide-Dependent Posttranslational Modification in Plants: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 15193–15208. <https://doi.org/10.3390/ijms131115193>
- Astier, J., Rasul, S., Koen, E., Manzoor, H., Besson-Bard, A., Lamotte, O., Jeandroz, S., Durner, J., Lindermayr, C., & Wendehenne, D. (2011). S-nitrosylation: An emerging post-translational protein modification in plants. *Plant Science*, 181(5), 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.02.011>
- Bailey-Serres, J., & Voesenek, L. A. C. J. (2008). Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 313–339. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092752>
- Baldwin, A., Wardle, A., Patel, R., Dudley, P., Park, S. K., Twell, D., Inoue, K., & Jarvis, P. (2005). A Molecular-Genetic Study of the Arabidopsis Toc75 Gene Family. *Plant Physiology*, 138(2), 715–733. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063289>
- Balmer, Y., Koller, A., Val, G. del, Schürmann, P., & Buchanan, B. B. (2004). Proteomics Uncovers Proteins Interacting Electrostatically with Thioredoxin in Chloroplasts. *Photosynthesis Research*, 79(3), 275–280. <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000017207.88257.d4>
- Banerjee, A., Wu, Y., Banerjee, R., Li, Y., Yan, H., & Sharkey, T. D. (2013). Feedback Inhibition of Deoxy-d-xylulose-5-phosphate Synthase Regulates the Methylerythritol 4-Phosphate Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 288(23), 16926–16936. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.464636>
- Banti, V., Mafessoni, F., Loreti, E., Alpi, A., & Perata, P. (2010). The Heat-Inducible Transcription Factor *HsfA2* Enhances Anoxia Tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 152(3), 1471–1483. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149815>
- Baxter, C. J., Redestig, H., Schauer, N., Repsilber, D., Patil, K. R., Nielsen, J., Selbig, J., Liu, J., Fernie, A. R., & Sweetlove, L. J. (2007). The Metabolic Response of Heterotrophic Arabidopsis Cells to Oxidative Stress. *Plant Physiology*, 143(1), 312–325. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090431>

- Bayden, A. S., Yakovlev, V. A., Graves, P. R., Mikkelsen, R. B., & Kellogg, G. E. (2011). Factors influencing protein tyrosine nitration—structure-based predictive models. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(6), 749–762. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.016>
- Bensmihen, S., To, A., Lambert, G., Kroj, T., Giraudat, J., & Parcy, F. (2004). Analysis of an activated *ABI5* allele using a new selection method for transgenic *Arabidopsis* seeds. *FEBS Letters*, 561(1–3), 127–131. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00148-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00148-6)
- Berton, P., Domínguez-Romero, J. C., Wuilloud, R. G., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Carreras, A., Valderrama, R., Begara-Morales, J. C., Corpas, F. J., Barroso, J. B., Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., & Molina-Díaz, A. (2012). Determination of nitrotyrosine in *Arabidopsis thaliana* cell cultures with a mixed-mode solid-phase extraction cleanup followed by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(5), 1495–1503. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6220-3>
- Birkenbihl, R. P., Diezel, C., & Somssich, I. E. (2012). *Arabidopsis* WRKY33 Is a Key Transcriptional Regulator of Hormonal and Metabolic Responses toward *Botrytis cinerea* Infection. *Plant Physiology*, 159(1), 266–285. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192641>
- Blokhina, O. B., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V., Hoikkala, A., Wähälä, K., & Chirkova, T. V. (2000). Antioxidant status of anoxia-tolerant and -intolerant plant species under anoxia and reoxygenation. *Physiologia Plantarum*, 109(4), 396–403. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.100405.x>
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Bui, L. T., Giuntoli, B., Kosmacz, M., Parlanti, S., & Licausi, F. (2015). Constitutively expressed ERF-VII transcription factors redundantly activate the core anaerobic response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 236, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.03.008>
- Bui, L. T., Shukla, V., Giorgi, F. M., Trivellini, A., Perata, P., Licausi, F., & Giuntoli, B. (2020). Differential submergence tolerance between juvenile and adult *Arabidopsis* plants involves the ANAC017 transcription factor. *The Plant Journal*, 104(4), 979–994. <https://doi.org/10.1111/tpj.14975>
- Carbonell, A. (2019). *Design and High-Throughput Generation of Artificial Small RNA Constructs for Plants* (pp. 247–260). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9042-9_19
- Castillo, M.-C., Coego, A., Costa-Broseta, Á., & León, J. (2018). Nitric oxide responses in *Arabidopsis* hypocotyls are mediated by diverse phytohormone pathways. *Journal of Experimental Botany*, 69(21), 5265–5278. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery286>
- Castillo, M.-C., Lozano-Juste, J., González-Guzmán, M., Rodríguez, L., Rodríguez, P. L., & León, J. (2015). Inactivation of PYR/PYL/RCAR ABA receptors by tyrosine nitration may enable rapid inhibition of ABA signaling by nitric oxide in plants. *Science Signaling*, 8(392). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa7981>
- Chaki, M., Begara-Morales, J. C., & Barroso, J. B. (2020). Oxidative Stress in Plants. *Antioxidants*, 9(6), 481. <https://doi.org/10.3390/antiox9060481>

- Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Llamas, A., Galvan, A., & Fernandez, E. (2017). Nitrate Reductase Regulates Plant Nitric Oxide Homeostasis. *Trends in Plant Science*, 22(2), 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.001>
- Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Llamas, Á., Ocaña-Calahorro, F., Mariscal, V., Carreras, A., Barroso, J. B., Galván, A., & Fernández, E. (2016). A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas*. *Plant, Cell & Environment*, 39(10), 2097–2107. <https://doi.org/10.1111/pce.12739>
- Chen, C., & Chen, Z. (2002). Potentiation of Developmentally Regulated Plant Defense Response by AtWRKY18, a Pathogen-Induced Arabidopsis Transcription Factor. *Plant Physiology*, 129(2), 706–716. <https://doi.org/10.1104/pp.001057>
- Chen, J., Wang, H., Li, Y., Pan, J., Hu, Y., & Yu, D. (2018). *Arabidopsis* VQ10 interacts with WRKY8 to modulate basal defense against *Botrytis cinerea*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60(10), 956–969. <https://doi.org/10.1111/jipb.12664>
- Cheng, C.-L., Acedo, G. N., Dewdney, J., Goodman, H. M., & Conkling, M. A. (1991). Differential Expression of the Two *Arabidopsis* Nitrate Reductase Genes. *Plant Physiology*, 96(1), 275–279. <https://doi.org/10.1104/pp.96.1.275>
- Cheng, X., Wang, Y., Xiong, R., Gao, Y., Yan, H., & Xiang, Y. (2020). A Moso bamboo gene VQ28 confers salt tolerance to transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta*, 251(5), 99. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03391-5>
- Cheng, Y., Zhou, Y., Yang, Y., Chi, Y.-J., Zhou, J., Chen, J.-Y., Wang, F., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y.-H., Yu, J.-Q., & Chen, Z. (2012). Structural and Functional Analysis of VQ Motif-Containing Proteins in *Arabidopsis* as Interacting Proteins of WRKY Transcription Factors. *Plant Physiology*, 159(2), 810–825. <https://doi.org/10.1104/pp.112.196816>
- Chibani, K., Couturier, J., Selles, B., Jacquot, J.-P., & Rouhier, N. (2010). The chloroplastic thiol reducing systems: dual functions in the regulation of carbohydrate metabolism and regeneration of antioxidant enzymes, emphasis on the poplar redoxin equipment. *Photosynthesis Research*, 104(1), 75–99. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9501-8>
- Cho, H., Loreti, E., Shih, M., & Perata, P. (2021). Energy and sugar signaling during hypoxia. *New Phytologist*, 229(1), 57–63. <https://doi.org/10.1111/nph.16326>
- Choi, W., Barker, R. J., Kim, S., Swanson, S. J., & Gilroy, S. (2019). Variation in the transcriptome of different ecotypes of *Arabidopsis thaliana* reveals signatures of oxidative stress in plant responses to spaceflight. *American Journal of Botany*, 106(1), 123–136. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1223>
- Choudhary, A., Kumar, A., & Kaur, N. (2020). ROS and oxidative burst: Roots in plant development. *Plant Diversity*, 42(1), 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.plid.2019.10.002>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1998.00343.x>
- Cochrane, D. W., Shah, J. K., Hebelstrup, K. H., & Igamberdiev, A. U. (2017). Expression of phytoalbumin affects nitric oxide metabolism and energy state of barley plants exposed to anoxia. *Plant Science*, 265, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.10.001>

- Colon-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., & Doerner, P. (1999). Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *The Plant Journal*, *20*(4), 503–508. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00620.x>
- Considine, M. J., Diaz-Vivancos, P., Kerchev, P., Signorelli, S., Agudelo-Romero, P., Gibbs, D. J., & Foyer, C. H. (2017). Learning To Breathe: Developmental Phase Transitions in Oxygen Status. In *Trends in Plant Science* (Vol. 22, Issue 2, pp. 140–153). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.11.013>
- Corpas, F. J., del Río, L. A., & Barroso, J. B. (2007). Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends in Plant Science*, *12*(10), 436–438. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.08.013>
- Corpas, F. J., Gupta, D. K., & Palma, J. M. (2015). Production Sites of Reactive Oxygen Species (ROS) in Organelles from Plant Cells. In *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress* (pp. 1–22). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20421-5_1
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., & Lamattina, L. (2004). Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, *218*(6), 900–905. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1172-7>
- Cukrov, D. (2018). Progress toward Understanding the Molecular Basis of Fruit Response to Hypoxia. *Plants*, *7*(4), 78. <https://doi.org/10.3390/plants7040078>
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, *57*(5), 779–795. <https://doi.org/10.1007/s000180050041>
- De Clercq, I., Vermeirssen, V., Van Aken, O., Vandepoele, K., Murcha, M. W., Law, S. R., Inzé, A., Ng, S., Ivanova, A., Rombaut, D., van de Cotte, B., Jaspers, P., Van de Peer, Y., Kangasjärvi, J., Whelan, J., & Van Breusegem, F. (2013). The Membrane-Bound NAC Transcription Factor ANAC013 Functions in Mitochondrial Retrograde Regulation of the Oxidative Stress Response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *25*(9), 3472–3490. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117168>
- Deutsch, C., Ferrel, A., Seibel, B., Pörtner, H. O., & Huey, R. B. (2015). Climate change tightens a metabolic constraint on marine habitats. *Science*, *348*(6239), 1132–1135. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1605>
- Devireddy, A. R., Zandalinas, S. I., Gómez-Cadenas, A., Blumwald, E., & Mittler, R. (2018). Coordinating the overall stomatal response of plants: Rapid leaf-to-leaf communication during light stress. *Science Signaling*, *11*(518). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aam9514>
- Di, X., Ortega-Alarcon, D., Kakumanu, R., Iglesias-Fernandez, J., Diaz, L., Baidoo, E. E. K., Velazquez-Campoy, A., Rodríguez-Concepción, M., & Perez-Gil, J. (2023). MEP pathway products allosterically promote monomerization of deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase to feedback-regulate their supply. *Plant Communications*, *4*(3), 100512. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100512>
- Diab, H., & Limami, A. (2016). Reconfiguration of N Metabolism upon Hypoxia Stress and Recovery: Roles of Alanine Aminotransferase (AlaAT) and Glutamate Dehydrogenase (GDH). *Plants*, *5*(2), 25. <https://doi.org/10.3390/plants5020025>

- Dietz, K.-J. (2011). Peroxiredoxins in Plants and Cyanobacteria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(4), 1129–1159. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3657>
- Ding, H., Yuan, G., Mo, S., Qian, Y., Wu, Y., Chen, Q., Xu, X., Wu, X., & Ge, C. (2019). Genome-wide analysis of the plant-specific VQ motif-containing proteins in tomato (*Solanum lycopersicum*) and characterization of SIVQ6 in thermotolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 143, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.08.019>
- Domingos, P., Prado, A. M., Wong, A., Gehring, C., & Feijo, J. A. (2015). Nitric Oxide: A Multitasked Signaling Gas in Plants. *Molecular Plant*, 8(4), 506–520. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.010>
- Dong, Q., Zhao, S., Duan, D., Tian, Y., Wang, Y., Mao, K., Zhou, Z., & Ma, F. (2018). Structural and functional analyses of genes encoding VQ proteins in apple. *Plant Science*, 272, 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.04.029>
- Dorca-Fornell, C., Gregis, V., Grandi, V., Coupland, G., Colombo, L., & Kater, M. M. (2011). The *Arabidopsis* *SOC1*-like genes *AGL42*, *AGL71* and *AGL72* promote flowering in the shoot apical and axillary meristems. *The Plant Journal*, 67(6), 1006–1017. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04653.x>
- Estévez, J. M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., & León, P. (2001). 1-Deoxy-d-xylulose-5-phosphate Synthase, a Limiting Enzyme for Plastidic Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22901–22909. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100854200>
- Fancy, N. N., Bahlmann, A., & Loake, G. J. (2017). Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 40(4), 462–472. <https://doi.org/10.1111/pce.12707>
- Fichman, Y., Miller, G., & Mittler, R. (2019). Whole-Plant Live Imaging of Reactive Oxygen Species. *Molecular Plant*, 12(9), 1203–1210. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.06.003>
- Fichman, Y., & Mittler, R. (2020). Rapid systemic signaling during abiotic and biotic stresses: is the ROS wave master of all trades? *The Plant Journal*, 102(5), 887–896. <https://doi.org/10.1111/tpj.14685>
- Ford, P. C. (2010). Reactions of NO and Nitrite with Heme Models and Proteins. *Inorganic Chemistry*, 49(14), 6226–6239. <https://doi.org/10.1021/ic902073z>
- Foresi, N., Mayta, M. L., Lodeyro, A. F., Scuffi, D., Correa-Aragunde, N., García-Mata, C., Casalengué, C., Carrillo, N., & Lamattina, L. (2015). Expression of the tetrahydrofolate-dependent nitric oxide synthase from the green alga *Ostreococcus tauri* increases tolerance to abiotic stresses and influences stomatal development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 82(5), 806–821. <https://doi.org/10.1111/tpj.12852>
- Foyer, C. H., Bloom, A. J., Queval, G., & Noctor, G. (2009). Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 455–484. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.091948>
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *The Plant Cell*, 17(7), 1866–1875. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033589>

- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2009). Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(4), 861–905. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2177>
- Friebe, A., & Koesling, D. (2003). Regulation of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase. *Circulation Research*, 93(2), 96–105. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000082524.34487.31>
- Fukao, T., & Bailey-Serres, J. (2004). Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act? *Trends in Plant Science*, 9(9), 449–456. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.07.005>
- Fukao, T., Yeung, E., & Bailey-Serres, J. (2011). The Submergence Tolerance Regulator SUB1A Mediates Crosstalk between Submergence and Drought Tolerance in Rice. *The Plant Cell*, 23(1), 412–427. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080325>
- Fukudome, M., Watanabe, E., Osuki, K., Uchi, N., & Uchiumi, T. (2019). Ectopic or Over-Expression of Class 1 Phytoalbumin Genes Confers Flooding Tolerance to the Root Nodules of *Lotus japonicus* by Scavenging Nitric Oxide. *Antioxidants*, 8(7), 206. <https://doi.org/10.3390/antiox8070206>
- Fukushima, A., Kuroha, T., Nagai, K., Hattori, Y., Kobayashi, M., Nishizawa, T., Kojima, M., Utsumi, Y., Oikawa, A., Seki, M., Sakakibara, H., Saito, K., Ashikari, M., & Kusano, M. (2020). Metabolite and phytohormone profiling illustrates metabolic reprogramming as an escape strategy of deepwater rice during partially submerged stress. *Metabolites*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/metabo10020068>
- Garcia, D., Saingery, V., Chambrier, P., Mayer, U., Jürgens, G., & Berger, F. (2003). Arabidopsis *haiku* Mutants Reveal New Controls of Seed Size by Endosperm. *Plant Physiology*, 131(4), 1661–1670. <https://doi.org/10.1104/pp.102.018762>
- Gargul, J. M., Mibus, H., & Serek, M. (2015). Manipulation of *MKS1* gene expression affects *Kalanchoë blossfeldiana* and *Petunia hybrida* phenotypes. *Plant Biotechnology Journal*, 13(1), 51–61. <https://doi.org/10.1111/pbi.12234>
- Garnczarska, M., Bednarski, W., & Morkunas, I. (2004). Re-aeration – induced oxidative stress and antioxidative defenses in hypoxically pretreated lupine roots. *Journal of Plant Physiology*, 161(4), 415–422. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01073>
- Garrido-Gala, J., Higuera, J. J., Muñoz-Blanco, J., Amil-Ruiz, F., & Caballero, J. L. (2019). The VQ motif-containing proteins in the diploid and octoploid strawberry. *Scientific Reports*, 9(1), 4942. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41210-4>
- Gaupels, F., Spiazzi-Vandelle, E., Yang, D., & Delledonne, M. (2011). Detection of peroxynitrite accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive defense response. *Nitric Oxide*, 25(2), 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.01.009>
- Gayatri, G., Agurla, S., & Raghavendra, A. S. (2013). Nitric oxide in guard cells as an important secondary messenger during stomatal closure. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00425>
- Gayubas, B., Castillo, M., Ramos, S., & León, J. (2023). Enhanced meristem development, tolerance to oxidative stress and hyposensitivity to nitric oxide in the hypermorphic *vq10-H* mutant in *AtVQ10* gene. *Plant, Cell & Environment*. <https://doi.org/10.1111/pce.14685>

- Gibbs, D. J., Md Isa, N., Movahedi, M., Lozano-Juste, J., Mendiondo, G. M., Berckhan, S., Marín-de la Rosa, N., Vicente Conde, J., Sousa Correia, C., Pearce, S. P., Bassel, G. W., Hamali, B., Talloji, P., Tomé, D. F. A., Coego, A., Beynon, J., Alabadí, D., Bachmair, A., León, J., ... Holdsworth, M. J. (2014). Nitric Oxide Sensing in Plants Is Mediated by Proteolytic Control of Group VII ERF Transcription Factors. *Molecular Cell*, 53(3), 369–379. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.020>
- Gibbs, J., & Greenway, H. (2003). Review: Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Functional Plant Biology*, 30(3), 353. https://doi.org/10.1071/PP98095_ER
- Gibbs, J., Turner, D. W., Armstrong, W., Darwent, M. J., & Greenway, H. (1998). Response to oxygen deficiency in primary maize roots. I. Development of oxygen deficiency in the stele reduces radial solute transport to the xylem. *Functional Plant Biology*, 25(6), 745. <https://doi.org/10.1071/PP97135>
- Gow, A. J., Farkouh, C. R., Munson, D. A., Posencheg, M. A., & Ischiropoulos, H. (2004). Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(2), L262–L268. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00295.2003>
- Grün, S., Lindermayr, C., Sell, S., & Durner, J. (2006). Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 507–516. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj053>
- Guo, J., Chen, J., Yang, J., Yu, Y., Yang, Y., & Wang, W. (2018). Identification, characterization and expression analysis of the VQ motif-containing gene family in tea plant (*Camellia sinensis*). *BMC Genomics*, 19(1), 710. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5107-x>
- Gupta, K. J., Hebelstrup, K. H., Mur, L. A. J., & Igamberdiev, A. U. (2011). Plant hemoglobins: Important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide. *FEBS Letters*, 585(24), 3843–3849. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.036>
- Gupta, K. J., Stoimenova, M., & Kaiser, W. M. (2005). In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. *Journal of Experimental Botany*, 56(420), 2601–2609. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri252>
- Gupta, K. J., & Igamberdiev, A. U. (2011). The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. *Mitochondrion*, 11(4), 537–543. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.03.005>
- Hacham, Y., Holland, N., Butterfield, C., Ubeda-Tomas, S., Bennett, M. J., Chory, J., & Savaldi-Goldstein, S. (2011). Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development (Cambridge, England)*, 138(5), 839–848. <https://doi.org/10.1242/dev.061804>
- Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), 894–899. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.08.005>
- Hancock, J., & Neill, S. (2019). Nitric Oxide: Its Generation and Interactions with Other Reactive Signaling Compounds. *Plants*, 8(2), 41. <https://doi.org/10.3390/plants8020041>
- Hancock, J. T. (2020). Nitric Oxide Signaling in Plants. *Plants*, 9(11), 1550. <https://doi.org/10.3390/plants9111550>

- Hartman, S., Liu, Z., van Veen, H., Vicente, J., Reinen, E., Martopawiro, S., Zhang, H., van Dongen, N., Bosman, F., Bassel, G. W., Visser, E. J. W., Bailey-Serres, J., Theodoulou, F. L., Hebelstrup, K. H., Gibbs, D. J., Holdsworth, M. J., Sasidharan, R., & Voesenek, L. A. C. J. (2019). Ethylene-mediated nitric oxide depletion pre-adapts plants to hypoxia stress. *Nature Communications*, *10*(1), 4020. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12045-4>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Anee, T. I., Parvin, K., Nahar, K., Mahmud, J. Al, & Fujita, M. (2019). Regulation of Ascorbate-Glutathione Pathway in Mitigating Oxidative Damage in Plants under Abiotic Stress. *Antioxidants*, *8*(9), 384. <https://doi.org/10.3390/antiox8090384>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S., Mahmud, J., Fujita, M., & Fotopoulos, V. (2020). Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants*, *9*(8), 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
- Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2022). Plant Oxidative Stress: Biology, Physiology and Mitigation. *Plants*, *11*(9), 1185. <https://doi.org/10.3390/plants11091185>
- Haslekås, C., Stacy, R. A. P., Nygaard, V., Culiáñez-Macià, F. A., & Aalen, R. B. (1998). The expression of a peroxiredoxin antioxidant gene, *AtPer1*, in *Arabidopsis thaliana* is seed-specific and related to dormancy. *Plant Molecular Biology*, *36*(6), 833–845. <https://doi.org/10.1023/A:1005900832440>
- Havemeyer, A., Bittner, F., Wollers, S., Mendel, R., Kunze, T., & Clement, B. (2006). Identification of the Missing Component in the Mitochondrial Benzamidoxime Prodrug-converting System as a Novel Molybdenum Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(46), 34796–34802. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607697200>
- Hebelstrup, K. H., & Møller, I. M. (2015). *Mitochondrial Signaling in Plants Under Hypoxia: Use of Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS)* (pp. 63–77). https://doi.org/10.1007/978-3-319-10079-1_4
- Hedrich, R. (2012). Ion Channels in Plants. *Physiological Reviews*, *92*(4), 1777–1811. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2011>
- Hess, D. T., & Stamler, J. S. (2012). Regulation by S-Nitrosylation of Protein Post-translational Modification. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(7), 4411–4418. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.285742>
- Hsu, F. C., Chou, M. Y., Chou, S. J., Li, Y. R., Peng, H. P., & Shih, M. C. (2013). Submergence confers immunity mediated by the WRKY22 transcription factor in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *25*(7), 2699–2713. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114447>
- Hu, P., Zhou, W., Cheng, Z., Fan, M., Wang, L., & Xie, D. (2013a). JAV1 Controls Jasmonate-Regulated Plant Defense. *Molecular Cell*, *50*(4), 504–515. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.027>
- Hu, Y., Chen, L., Wang, H., Zhang, L., Wang, F., & Yu, D. (2013b). *Arabidopsis* transcription factor WRKY8 functions antagonistically with its interacting partner VQ9 to modulate salinity stress tolerance. *The Plant Journal*, *74*(5), 730–745. <https://doi.org/10.1111/tpj.12159>

- Hwang, J. H., Yu, S. I., Lee, B. H., & Lee, D. H. (2020). Modulation of energy metabolism is important for low-oxygen stress adaptation in brassicaceae species. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/IJMS21051787>
- Igamberdiev, A. U., Bykova, N. V., & Hill, R. D. (2011). Structural and functional properties of class 1 plant hemoglobins. *IUBMB Life*, 63(3), 146–152. <https://doi.org/10.1002/iub.439>
- Igamberdiev, A. U., & Hill, R. D. (2018). Elevation of cytosolic Ca²⁺ in response to energy deficiency in plants: the general mechanism of adaptation to low oxygen stress. *Biochemical Journal*, 475(8), 1411–1425. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180169>
- Igamberdiev, A. U., Ratcliffe, R. G., & Gupta, K. J. (2014). Plant mitochondria: Source and target for nitric oxide. *Mitochondrion*, 19, 329–333. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.02.003>
- Imran, Q. M., Hussain, A., Lee, S.-U., Mun, B.-G., Falak, N., Loake, G. J., & Yun, B.-W. (2018). Transcriptome profile of NO-induced Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative regulatory role in multiple biological processes. *Scientific Reports*, 8(1), 771. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18850-5>
- Jahnová, J., Luhová, L., & Petřivalský, M. (2019). S-Nitrosoglutathione Reductase—The Master Regulator of Protein S-Nitrosation in Plant NO Signaling. *Plants*, 8(2), 48. <https://doi.org/10.3390/plants8020048>
- Jasid, S., Simontacchi, M., & Puntarulo, S. (2008). Exposure to nitric oxide protects against oxidative damage but increases the labile iron pool in sorghum embryonic axes. *Journal of Experimental Botany*, 59(14), 3953–3962. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern235>
- Jeandroz, S., Wipf, D., Stuehr, D. J., Lamattina, L., Melkonian, M., Tian, Z., Zhu, Y., Carpenter, E. J., Wong, G. K.-S., & Wendehenne, D. (2016). Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Science Signaling*, 9(417). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad4403>
- Jethva, J., Schmidt, R. R., Sauter, M., & Selinski, J. (2022). Try or Die: Dynamics of Plant Respiration and How to Survive Low Oxygen Conditions. *Plants*, 11(2), 205. <https://doi.org/10.3390/plants11020205>
- Jiang, S.-Y., Sevugan, M., & Ramachandran, S. (2018). Valine-glutamine (VQ) motif coding genes are ancient and non-plant-specific with comprehensive expression regulation by various biotic and abiotic stresses. *BMC Genomics*, 19(1), 342. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4733-7>
- Jiang, Y., & Yu, D. (2016). The WRKY57 Transcription Factor Affects the Expression of Jasmonate ZIM-Domain Genes Transcriptionally to Compromise *Botrytis cinerea* Resistance. *Plant Physiology*, 171(4), 2771–2782. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00747>
- Jiao, Z., Sun, J., Wang, C., Dong, Y., Xiao, S., Gao, X., Cao, Q., Li, L., Li, W., & Gao, C. (2018). Genome-wide characterization, evolutionary analysis of WRKY genes in Cucurbitaceae species and assessment of its roles in resisting to powdery mildew disease. *PLOS ONE*, 13(12), e0199851. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199851>
- Jing, Y., & Lin, R. (2015). The VQ Motif-Containing Protein Family of Plant-Specific Transcriptional Regulators. *Plant Physiology*, 169(1), 371–378. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00788>

- Jones, D. C., Zheng, W., Huang, S., Du, C., Zhao, X., Yennamalli, R. M., Sen, T. Z., Nettleton, D., Wurtele, E. S., & Li, L. (2016). A Clade-Specific Arabidopsis Gene Connects Primary Metabolism and Senescence. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00983>
- Karim, S., Alezzawi, M., Garcia-Petit, C., Solymosi, K., Khan, N. Z., Lindquist, E., Dahl, P., Hohmann, S., & Aronsson, H. (2014). A novel chloroplast localized Rab GTPase protein CPRabA5e is involved in stress, development, thylakoid biogenesis and vesicle transport in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 84(6), 675–692. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0161-x>
- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G., & Mullineaux, P. (1999). Systemic Signaling and Acclimation in Response to Excess Excitation Energy in Arabidopsis. *Science*, 284(5414), 654–657. <https://doi.org/10.1126/science.284.5414.654>
- Kelliher, T., & Walbot, V. (2012). Hypoxia Triggers Meiotic Fate Acquisition in Maize. *Science*, 337(6092), 345–348. <https://doi.org/10.1126/science.1220080>
- Kenesi, E., Kolbert, Z., Kaszler, N., Klement, É., Ménesi, D., Molnár, Á., Valkai, I., Feigl, G., Rigó, G., Cséplő, Á., Lindermayr, C., & Fehér, A. (2023). The ROP2 GTPase Participates in Nitric Oxide (NO)-Induced Root Shortening in Arabidopsis. *Plants*, 12(4), 750. <https://doi.org/10.3390/plants12040750>
- Kim, D. Y., Kwon, S. I., Choi, C., Lee, H., Ahn, I., Park, S. R., Bae, S. C., Lee, S. C., & Hwang, D. J. (2013). Expression analysis of rice VQ genes in response to biotic and abiotic stresses. *Gene*, 529(2), 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.08.023>
- Klecker, M., Gasch, P., Peisker, H., Dörmann, P., Schlicke, H., Grimm, B., & Mustroph, A. (2014). A Shoot-Specific Hypoxic Response of Arabidopsis Sheds Light on the Role of the Phosphate-Responsive Transcription Factor PHOSPHATE STARVATION RESPONSE1. *Plant Physiology*, 165(2), 774–790. <https://doi.org/10.1104/pp.114.237990>
- König, J., Muthuramalingam, M., & Dietz, K.-J. (2012). Mechanisms and dynamics in the thiol/disulfide redox regulatory network: transmitters, sensors and targets. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(3), 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.12.002>
- Lai, Z., Li, Y., Wang, F., Cheng, Y., Fan, B., Yu, J.-Q., & Chen, Z. (2011). Arabidopsis Sigma Factor Binding Proteins Are Activators of the WRKY33 Transcription Factor in Plant Defense. *The Plant Cell*, 23(10), 3824–3841. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.090571>
- Lan, P., Li, W., Wang, H., & Ma, W. (2010). Characterization, sub-cellular localization and expression profiling of the isoprenylcysteine methyltransferase gene family in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biology*, 10(1), 212. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-212>
- Le Berre, J.-Y., Gourgues, M., Samans, B., Keller, H., Panabières, F., & Attard, A. (2017). Transcriptome dynamic of Arabidopsis roots infected with *Phytophthora parasitica* identifies VQ29, a gene induced during the penetration and involved in the restriction of infection. *PLOS ONE*, 12(12), e0190341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190341>
- Le Gac, A. L., & Laux, T. (2019). Hypoxia Is a Developmental Regulator in Plant Meristems. *Molecular Plant* (Vol. 12, Issue 11, pp. 1422–1424). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.10.004>

- Lee, K. O., Jang, H. H., Jung, B. G., Chi, Y. H., Lee, J. Y., Choi, Y. O., Lee, J. R., Lim, C. O., Cho, M. J., & Lee, S. Y. (2000). Rice 1Cys-peroxiredoxin over-expressed in transgenic tobacco does not maintain dormancy but enhances antioxidant activity. *FEBS Letters*, *486*(2), 103–106. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02230-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02230-4)
- Lee, M. H., Yoo, Y.-J., Kim, D. H., Hanh, N. H., Kwon, Y., & Hwang, I. (2017). The Prenylated Rab GTPase Receptor PRA1.F4 Contributes to Protein Exit from the Golgi Apparatus. *Plant Physiology*, *174*(3), 1576–1594. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00466>
- Lee, S. W., Choi, D., Moon, H., Kim, S., Kang, H., Paik, I., Huq, E., & Kim, D. (2023). PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS are involved in starch degradation adjustment via inhibition of the carbon metabolic regulator *QUA-QUINE STARCH* in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *114*(1), 110–123. <https://doi.org/10.1111/tpj.16124>
- Lee, T. A., & Bailey-Serres, J. (2019). Integrative analysis from the epigenome to translome uncovers patterns of dominant nuclear regulation during transient stress. *The Plant Cell*, tpc.00463.2019. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00463>
- Lei, R., Li, X., Ma, Z., Lv, Y., Hu, Y., & Yu, D. (2017). Arabidopsis WRKY2 and WRKY34 transcription factors interact with VQ20 protein to modulate pollen development and function. *The Plant Journal*, *91*(6), 962–976. <https://doi.org/10.1111/tpj.13619>
- Lei, R., Ma, Z., & Yu, D. (2018). WRKY2/34–VQ20 Modules in *Arabidopsis thaliana* Negatively Regulate Expression of a Trio of Related MYB Transcription Factors During Pollen Development. *Frontiers in Plant Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00331>
- León, J., Castillo, M. C., & Gayubas, B. (2021). The hypoxia-reoxygenation stress in plants. *Journal of Experimental Botany* (Vol. 72, Issue 16, pp. 5841–5856). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa591>
- León, J., & Costa-Broseta, Á. (2020). Present knowledge and controversies, deficiencies, and misconceptions on nitric oxide synthesis, sensing, and signaling in plants. *Plant, Cell & Environment*, *43*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/pce.13617>
- León, J., Costa-Broseta, Á., & Castillo, M. C. (2020). RAP2.3 negatively regulates nitric oxide biosynthesis and related responses through a rheostat-like mechanism in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, *71*(10), 3157–3171. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa069>
- León, J., Gayubas, B., & Castillo, M. C. (2021). Valine-Glutamine Proteins in Plant Responses to Oxygen and Nitric Oxide. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.632678>
- Li, L., Zheng, W., Zhu, Y., Ye, H., Tang, B., Arendsee, Z. W., Jones, D., Li, R., Ortiz, D., Zhao, X., Du, C., Nettleton, D., Scott, M. P., Salas-Fernandez, M. G., Yin, Y., & Wurtele, E. S. (2015). QQS orphan gene regulates carbon and nitrogen partitioning across species via NF-YC interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(47), 14734–14739. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514670112>
- Li, N., Li, X., Xiao, J., & Wang, S. (2014a). Comprehensive analysis of VQ motif-containing gene expression in rice defense responses to three pathogens. *Plant Cell Reports*, *33*(9), 1493–1505. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1633-4>

- Li, N., Yang, Z., Li, J., Xie, W., Qin, X., Kang, Y., Zhang, Q., Li, X., Xiao, J., Ma, H., & Wang, S. (2021a). Two VQ Proteins are Substrates of the OsMPKK6-OsMPK4 Cascade in Rice Defense Against Bacterial Blight. *Rice*, *14*(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s12284-021-00483-y>
- Li, R. Q., Jiang, M., Huang, J. Z., Møller, I. M., & Shu, Q. Y. (2021b). Mutations of the Genomes Uncoupled 4 Gene Cause ROS Accumulation and Repress Expression of Peroxidase Genes in Rice. *Frontiers in Plant Science*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.682453>
- Li, X., Qin, R., Du, Q., Cai, L., Hu, D., Du, H., Yang, H., Wang, J., Huang, F., Wang, H., & Yu, D. (2020). Knockdown of *GmVQ58* encoding a VQ motif-containing protein enhances soybean resistance to the common cutworm (*Spodoptera litura* Fabricius). *Journal of Experimental Botany*, *71*(10), 3198–3210. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa095>
- Li, Y., Jing, Y., Li, J., Xu, G., & Lin, R. (2014b). Arabidopsis VQ MOTIF-CONTAINING PROTEIN29 Represses Seedling Deetiolation by Interacting with PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1. *Plant Physiology*, *164*(4), 2068–2080. <https://doi.org/10.1104/pp.113.234492>
- Liebthal, M., Schuetze, J., Dreyer, A., Mock, H.-P., & Dietz, K.-J. (2020). Redox Conformation-Specific Protein–Protein Interactions of the 2-Cysteine Peroxiredoxin in Arabidopsis. *Antioxidants*, *9*(6), 515. <https://doi.org/10.3390/antiox9060515>
- Ling, L., Qu, Y., Zhu, J., Wang, D., & Guo, C. (2020). Genome-wide identification and expression analysis of the VQ gene family in *Cicer arietinum* and *Medicago truncatula*. *PeerJ*, *8*, e8471. <https://doi.org/10.7717/peerj.8471>
- Liu, C., Liu, H., Zhou, C., & Timko, M. P. (2020). Genome-Wide Identification of the VQ Protein Gene Family of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and Analysis of Its Expression in Response to Phytohormones and Abiotic and Biotic Stresses. *Genes*, *11*(3), 284. <https://doi.org/10.3390/genes11030284>
- Lombardo, M. C., Graziano, M., Polacco, J. C., & Lamattina, L. (2006). Nitric Oxide Functions as a Positive Regulator of Root Hair Development. *Plant Signaling & Behavior*, *1*(1), 28–33. <https://doi.org/10.4161/psb.1.1.2398>
- Lozano-Juste, J., Colom-Moreno, R., & León, J. (2011). In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, *62*(10), 3501–3517. <https://doi.org/10.1093/jxb/err042>
- Lozano-Juste, J., & León, J. (2010). Enhanced Abscisic Acid-Mediated Responses in *nialnia2noa1-2* Triple Mutant Impaired in NIA/NR- and AtNOA1-Dependent Nitric Oxide Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *152*(2), 891–903. <https://doi.org/10.1104/pp.109.148023>
- Martí, M. C., Olmos, E., Calvete, J. J., Díaz, I., Barranco-Medina, S., Whelan, J., Lázaro, J. J., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2009). Mitochondrial and Nuclear Localization of a Novel Pea Thioredoxin: Identification of Its Mitochondrial Target Proteins. *Plant Physiology*, *150*(2), 646–657. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138073>
- Mata-Pérez, C., Sánchez-Calvo, B., Padilla, M. N., Begara-Morales, J. C., Valderrama, R., Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2017). Nitro-fatty acids in plant signaling: New key mediators of nitric oxide metabolism. *Redox Biology*, *11*, 554–561. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.002>

- Mata-Pérez, C., & Spoel, S. H. (2019). Thioredoxin-mediated redox signalling in plant immunity. *Plant Science*, 279, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.05.001>
- Mazel, A., Leshem, Y., Tiwari, B. S., & Levine, A. (2004). Induction of Salt and Osmotic Stress Tolerance by Overexpression of an Intracellular Vesicle Trafficking Protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiology*, 134(1), 118–128. <https://doi.org/10.1104/pp.103.025379>
- Meitha, K., Agudelo-Romero, P., Signorelli, S., Gibbs, D. J., Considine, J. A., Foyer, C. H., & Considine, M. J. (2018). Developmental control of hypoxia during bud burst in grapevine. *Plant, Cell & Environment*, 41(5), 1154–1170. <https://doi.org/10.1111/pce.13141>
- Meng, X., Li, L., Narsai, R., De Clercq, I., Whelan, J., & Berkowitz, O. (2020). Mitochondrial signalling is critical for acclimation and adaptation to flooding in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 103(1), 227–247. <https://doi.org/10.1111/tpj.14724>
- Meyer, K., Koester, T., & Staiger, D. (2015). Pre-mRNA Splicing in Plants: In Vivo Functions of RNA-Binding Proteins Implicated in the Splicing Process. *Biomolecules*, 5(3), 1717–1740. <https://doi.org/10.3390/biom5031717>
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*, 33(4), 453–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., & Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, 16(6), 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007>
- Molassiotis, A., & Fotopoulos, V. (2011). Oxidative and nitrosative signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(2), 210–214. <https://doi.org/10.4161/psb.6.2.14878>
- Morgan, C., Fozard, J. A., Hartley, M., Henderson, I. R., Bomblies, K., & Howard, M. (2021). Diffusion-mediated HEI10 coarsening can explain meiotic crossover positioning in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 12(1), 4674. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24827-w>
- Morikawa, K., Shiina, T., Murakami, S., & Toyoshima, Y. (2002). Novel nuclear-encoded proteins interacting with a plastid sigma factor, Sig1, in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 514(2–3), 300–304. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02388-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02388-8)
- Mustroph, A., Zanetti, M. E., Jang, C. J. H., Holtan, H. E., Repetti, P. P., Galbraith, D. W., Girke, T., & Bailey-Serres, J. (2009). Profiling translomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), 18843–18848. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906131106>

- Muthuramalingam, M., Seidel, T., Laxa, M., Nunes de Miranda, S. M., Gärtner, F., Ströher, E., Kandlbinder, A., & Dietz, K.-J. (2009). Multiple Redox and Non-Redox Interactions Define 2-Cys Peroxiredoxin as a Regulatory Hub in the Chloroplast. *Molecular Plant*, 2(6), 1273–1288. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp089>
- Nakamura, M., & Noguchi, K. (2020). Tolerant mechanisms to O₂ deficiency under submergence conditions in plants. *Journal of Plant Research*, 133(3), 343–371. <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01176-1>
- Nawy, T., Lee, J.-Y., Colinas, J., Wang, J. Y., Thongrod, S. C., Malmay, J. E., Birnbaum, K., & Benfey, P. N. (2005). Transcriptional Profile of the Arabidopsis Root Quiescent Center. *The Plant Cell*, 17(7), 1908–1925. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031724>
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D., & Wilson, I. (2008). Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 59(2), 165–176. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm293>
- Ng, S., Ivanova, A., Duncan, O., Law, S. R., Van Aken, O., De Clercq, I., Wang, Y., Carrie, C., Xu, L., Kmiec, B., Walker, H., Van Breusegem, F., Whelan, J., & Giraud, E. (2013). A Membrane-Bound NAC Transcription Factor, ANAC017, Mediates Mitochondrial Retrograde Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(9), 3450–3471. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113985>
- Noctor, G., De Paepe, R., & Foyer, C. H. (2007). Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science*, 12(3), 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.01.005>
- Noctor, G., Reichheld, J.-P., & Foyer, C. H. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 80, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.013>
- Palmieri, M. C., Sell, S., Huang, X., Scherf, M., Werner, T., Durner, J., & Lindermayr, C. (2008). Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach. *Journal of Experimental Botany*, 59(2), 177–186. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm345>
- Pan, J., Wang, H., Hu, Y., & Yu, D. (2018). Arabidopsis VQ18 and VQ26 proteins interact with ABI5 transcription factor to negatively modulate ABA response during seed germination. *The Plant Journal*, 95(3), 529–544. <https://doi.org/10.1111/tpj.13969>
- Pavelic, D., Arpagaus, S., Rawyler, A., & Brändle, R. (2000). Impact of Post-Anoxia Stress on Membrane Lipids of Anoxia-Pretreated Potato Cells. A Re-Appraisal. *Plant Physiology*, 124(3), 1285–1292. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.1285>
- Pecher, P., Eschen-Lippold, L., Herklotz, S., Kuhle, K., Naumann, K., Bethke, G., Uhrig, J., Weyhe, M., Scheel, D., & Lee, J. (2014). The *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 target a subclass of 'VQ-motif'-containing proteins to regulate immune responses. *New Phytologist*, 203(2), 592–606. <https://doi.org/10.1111/nph.12817>
- Pellinen, R., Palva, T., & Kangasjarvi, J. (1999). Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *The Plant Journal*, 20(3), 349–356. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.1999.00613.x>

- Perilli, S., & Sabatini, S. (2010). *Analysis of Root Meristem Size Development* (pp. 177–187). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-765-5_12
- Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B., & Karplus, P. A. (2015). Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(8), 435–445. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.05.001>
- Perruc, E., Charpentreau, M., Ramirez, B. C., Jauneau, A., Galaud, J.-P., Ranjeva, R., & Ranty, B. (2004). A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *The Plant Journal*, 38(3), 410–420. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02062.x>
- Petersen, K., Qiu, J.-L., Lütje, J., Fiil, B. K., Hansen, S., Mundy, J., & Petersen, M. (2010). Arabidopsis MKS1 Is Involved in Basal Immunity and Requires an Intact N-terminal Domain for Proper Function. *PLoS ONE*, 5(12), e14364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014364>
- Pfannschmidt, T., Bräutigam, K., Wagner, R., Dietzel, L., Schröter, Y., Steiner, S., & Nykytenko, A. (2009). Potential regulation of gene expression in photosynthetic cells by redox and energy state: approaches towards better understanding. *Annals of Botany*, 103(4), 599–607. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn081>
- Phukan, U. J., Mishra, S., & Shukla, R. K. (2016). Waterlogging and submergence stress: affects and acclimation. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 36, Issue 5, pp. 956–966). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1064856>
- Polle, A. (2001). Dissecting the Superoxide Dismutase-Ascorbate-Glutathione-Pathway in Chloroplasts by Metabolic Modeling. Computer Simulations as a Step towards Flux Analysis. *Plant Physiology*, 126(1), 445–462. <https://doi.org/10.1104/pp.126.1.445>
- Porra, R. J., Thompson, W. A. A., & Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 975(3), 384–394. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0)
- Pospíšil, P. (2009). Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787(10), 1151–1160. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.05.005>
- Pucciariello, C., & Perata, P. (2017). New insights into reactive oxygen species and nitric oxide signalling under low oxygen in plants. *Plant, Cell & Environment*, 40(4), 473–482. <https://doi.org/10.1111/pce.12715>
- Pulido, P., Llamas, E., Llorente, B., Ventura, S., Wright, L. P., & Rodríguez-Concepción, M. (2016). Specific Hsp100 Chaperones Determine the Fate of the First Enzyme of the Plastidial Isoprenoid Pathway for Either Refolding or Degradation by the Stromal Clp Protease in Arabidopsis. *PLOS Genetics*, 12(1), e1005824. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005824>
- Rao, M. V., & Davis, K. R. (2001). The physiology of ozone induced cell death. *Planta*, 213(5), 682–690. <https://doi.org/10.1007/s004250100618>

- Raymond, P., Al-Ani, A., & Pradet, A. (1985). ATP Production by Respiration and Fermentation, and Energy Charge during Aerobiosis and Anaerobiosis in Twelve Fatty and Starchy Germinating Seeds. *Plant Physiology*, 79(3), 879–884. <https://doi.org/10.1104/pp.79.3.879>
- Reichler, S. A., Torres, J., Rivera, A. L., Cintolesi, V. A., Clark, G., & Roux, S. J. (2009). Intersection of two signalling pathways: extracellular nucleotides regulate pollen germination and pollen tube growth via nitric oxide. *Journal of Experimental Botany*, 60(7), 2129–2138. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp091>
- Rishmawi, L., Pesch, M., Juengst, C., Schauss, A. C., Schrader, A., & Hülskamp, M. (2014). Non-Cell-Autonomous Regulation of Root Hair Patterning Genes by *WRKY75* in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 165(1), 186–195. <https://doi.org/10.1104/pp.113.233775>
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., & Kaiser, W. M. (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 103–110. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.366.103>
- Rodriguez-Concepcion, M. (2016). The methylerythritol 4-phosphate pathway as a metabolic crossroad for microbial and plant volatile organic compounds. *Plant, Cell & Environment*, 39(12), 2589–2591. <https://doi.org/10.1111/pce.12833>
- Rolletschek, H. (2002). Legume embryos develop in a hypoxic environment. *Journal of Experimental Botany*, 53(371), 1099–1107. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.371.1099>
- Russwurm, M., & Koesling, D. (2004). NO activation of guanylyl cyclase. *The EMBO Journal*, 23(22), 4443–4450. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600422>
- Sagi, M., & Fluhr, R. (2006). Production of Reactive Oxygen Species by Plant NADPH Oxidases. *Plant Physiology*, 141(2), 336–340. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078089>
- Santolini, J., André, F., Jeandroz, S., & Wendehenne, D. (2017). Nitric oxide synthase in plants: where do we stand? *Nitric Oxide*, 63, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.09.005>
- Sasidharan, R., Bailey-Serres, J., Ashikari, M., Atwell, B. J., Colmer, T. D., Fagerstedt, K., Fukao, T., Geigenberger, P., Hebelstrup, K. H., Hill, R. D., Holdsworth, M. J., Ismail, A. M., Licausi, F., Mustroph, A., Nakazono, M., Pedersen, O., Perata, P., Sauter, M., Shih, M. C., ... Voesenek, L. A. C. J. (2017). Community recommendations on terminology and procedures used in flooding and low oxygen stress research. In *New Phytologist* (Vol. 214, Issue 4, pp. 1403–1407). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/nph.14519>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, 24(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schmidt, H. H. H. W., & Walter, U. (1994). NO at work. *Cell*, 78(6), 919–925. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90267-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90267-4)
- Schmidt, R. R., & van Dongen, J. T. (2019). The ACBP1-RAP2.12 signalling hub: A new perspective on integrative signalling during hypoxia in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 14(10), e1651184. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1651184>
- Schmidt-Rohr, K. (2020). Oxygen Is the High-Energy Molecule Powering Complex Multicellular Life: Fundamental Corrections to Traditional Bioenergetics. *ACS Omega*, 5(5), 2221–2233. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03352>

- Schwarz, O., Schürmann, P., & Strotmann, H. (1997). Kinetics and Thioredoxin Specificity of Thiol Modulation of the Chloroplast H⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(27), 16924–16927. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.27.16924>
- Shabala, S., Shabala, L., Barcelo, J., & Poschenrieder, C. (2014). Membrane transporters mediating root signalling and adaptive responses to oxygen deprivation and soil flooding. *Plant, Cell & Environment*, 37(10), 2216–2233. <https://doi.org/10.1111/pce.12339>
- Shimizu, H., Peng, L., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., & Shikanai, T. (2008). CRR23/NdhL is a Subunit of the Chloroplast NAD(P)H Dehydrogenase Complex in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 49(5), 835–842. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn058>
- Shingaki-Wells, R., Millar, A. H., Whelan, J., & Narsai, R. (2014). What happens to plant mitochondria under low oxygen? An omics review of the responses to low oxygen and reoxygenation. *Plant, Cell & Environment*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/pce.12312>
- Singh, A., Sharma, A., Singh, N., & Nandi, A. K. (2022). *MTO1-RESPONDING DOWN 1 (MRD1)* is a transcriptional target of OZF1 for promoting salicylic acid-mediated defense in Arabidopsis. *Plant Cell Reports*, 41(5), 1319–1328. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02861-2>
- Šírová, J., Sedlářová, M., Piterková, J., Luhová, L., & Petřivalský, M. (2011). The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Science*, 181(5), 560–572. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.03.014>
- Song, W., Zhao, H., Zhang, X., Lei, L., & Lai, J. (2016). Genome-Wide Identification of VQ Motif-Containing Proteins and their Expression Profiles Under Abiotic Stresses in Maize. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01177>
- Stacy, R. A. P., Munthe, E., Steinum, T., Sharma, B., & Aalen, R. B. (1996). A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancy-related gene, *Per1*, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. *Plant Molecular Biology*, 31(6), 1205–1216. <https://doi.org/10.1007/BF00040837>
- Stacy, R. A. P., Nordeng, T. W., Culianez-Macia, F. A., & Aalen, R. B. (1999). The dormancy-related peroxiredoxin antioxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. *The Plant Journal*, 19(1), 1–8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00488.x>
- Stöhr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W. R., & Rockel, P. (2001). A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta*, 212(5–6), 835–841. <https://doi.org/10.1007/s004250000447>
- Stöhr, C., & Ullrich, W. R. (2002). Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Botany*, 53(379), 2293–2303. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf110>
- Subbaiah, C. C., Zhang, J., & Sachs, M. M. (1994). Involvement of Intracellular Calcium in Anaerobic Gene Expression and Survival of Maize Seedlings. *Plant Physiology*, 105(1), 369–376. <https://doi.org/10.1104/pp.105.1.369>

- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., & Miller, G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 35(2), 259–270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x>
- Suzuki, N., Miller, G., Salazar, C., Mondal, H. A., Shulaev, E., Cortes, D. F., Shuman, J. L., Luo, X., Shah, J., Schlauch, K., Shulaev, V., & Mittler, R. (2013). Temporal-Spatial Interaction between Reactive Oxygen Species and Abscisic Acid Regulates Rapid Systemic Acclimation in Plants. *The Plant Cell*, 25(9), 3553–3569. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114595>
- Takahashi, S., & Murata, N. (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science*, 13(4), 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.01.005>
- Tamang, B. G., & Fukao, T. (2015). Plant adaptation to multiple stresses during submergence and following desubmergence. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 16, Issue 12, pp. 30164–30180). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms161226226>
- Tang, H., Bi, H., Liu, B., Lou, S., Song, Y., Tong, S., Chen, N., Jiang, Y., Liu, J., & Liu, H. (2021). WRKY33 interacts with WRKY12 protein to up-regulate RAP2.2 during submergence induced hypoxia response in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 229(1), 106–125. <https://doi.org/10.1111/nph.17020>
- Tanou, G., Job, C., Rajjou, L., Arc, E., Belghazi, M., Diamantidis, G., Molassiotis, A., & Job, D. (2009). Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *The Plant Journal*, 60(5), 795–804. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04000.x>
- Trevisan, S., Manoli, A., Begheldo, M., Nonis, A., Enna, M., Vaccaro, S., Caporale, G., Ruperti, B., & Quaggiotti, S. (2011). Transcriptome analysis reveals coordinated spatiotemporal regulation of hemoglobin and nitrate reductase in response to nitrate in maize roots. *New Phytologist*, 192(2), 338–352. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03822.x>
- Uji, Y., Kashihara, K., Kiyama, H., Mochizuki, S., Akimitsu, K., & Gomi, K. (2019). Jasmonic Acid-Induced VQ-Motif-Containing Protein OsVQ13 Influences the OsWRKY45 Signaling Pathway and Grain Size by Associating with OsMPK6 in Rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 2917. <https://doi.org/10.3390/ijms20122917>
- Umeda, M., Shimotohno, A., & Yamaguchi, M. (2005). Control of Cell Division and Transcription by Cyclin-dependent Kinase-activating Kinases in Plants. *Plant and Cell Physiology*, 46(9), 1437–1442. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci170>
- Vainonen, J. P., & Kangasjärvi, J. (2015). Plant signalling in acute ozone exposure. *Plant, Cell & Environment*, 38(2), 240–252. <https://doi.org/10.1111/pce.12273>
- Van Breusegem, F., & Dat, J. F. (2006). Reactive Oxygen Species in Plant Cell Death. *Plant Physiology*, 141(2), 384–390. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078295>
- Vicente, J., Mendiondo, G. M., Movahedi, M., Peirats-Llobet, M., Juan, Y., Shen, Y., Dambire, C., Smart, K., Rodriguez, P. L., Charng, Y., Gray, J. E., & Holdsworth, M. J. (2017). The Cys-Arg/N-End Rule Pathway Is a General Sensor of Abiotic Stress in Flowering Plants. *Current Biology*, 27(20), 3183–3190.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.006>

- Vishwakarma, A., Kumari, A., Mur, L. A. J., & Gupta, K. J. (2018). A discrete role for alternative oxidase under hypoxia to increase nitric oxide and drive energy production. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.045>
- Voesenek, L. A. C. J., & Sasidharan, R. (2013). Ethylene - and oxygen signalling - drive plant survival during flooding. *Plant Biology*, 15(3), 426–435. <https://doi.org/10.1111/plb.12014>
- Volke, D. C., Rohwer, J., Fischer, R., & Jennewein, S. (2019). Investigation of the methylerythritol 4-phosphate pathway for microbial terpenoid production through metabolic control analysis. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 192. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1235-5>
- Vranová, E., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1227–1236. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1227>
- Wang, A., Garcia, D., Zhang, H., Feng, K., Chaudhury, A., Berger, F., Peacock, W. J., Dennis, E. S., & Luo, M. (2010). The VQ motif protein IKU1 regulates endosperm growth and seed size in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 63(4), 670–679. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04271.x>
- Wang, F., Chen, Z.-H., Liu, X., Colmer, T. D., Zhou, M., & Shabala, S. (2016). Tissue-specific root ion profiling reveals essential roles of the CAX and ACA calcium transport systems in response to hypoxia in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 67(12), 3747–3762. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw034>
- Wang, H., Hu, Y., Pan, J., & Yu, D. (2015a). Arabidopsis VQ motif-containing proteins VQ12 and VQ29 negatively modulate basal defense against *Botrytis cinerea*. *Scientific Reports*, 5(1), 14185. <https://doi.org/10.1038/srep14185>
- Wang, L., Xu, F., & Yu, F. (2023). Two environmental signal-driven RNA metabolic processes: Alternative splicing and translation. *Plant, Cell & Environment*, 46(3), 718–732. <https://doi.org/10.1111/pce.14537>
- Wang, M., Vannozzi, A., Wang, G., Zhong, Y., Corso, M., Cavallini, E., & Cheng, Z.-M. (Max). (2015b). A comprehensive survey of the grapevine VQ gene family and its transcriptional correlation with WRKY proteins. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00417>
- Wang, X., Zhang, H., Sun, G., Jin, Y., & Qiu, L. (2014). Identification of active VQ motif-containing genes and the expression patterns under low nitrogen treatment in soybean. *Gene*, 543(2), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.012>
- Wang, Y., Jiang, Z., Li, Z., Zhao, Y., Tan, W., Liu, Z., Cui, S., Yu, X., Ma, J., Wang, G., & Li, W. (2019). Genome-wide identification and expression analysis of the VQ gene family in soybean (*Glycine max*). *PeerJ*, 7, e7509. <https://doi.org/10.7717/peerj.7509>
- Wang, Y., Liu, H., Zhu, D., Gao, Y., Yan, H., & Xiang, Y. (2017). Genome-wide analysis of VQ motif-containing proteins in Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Planta*, 246(1), 165–181. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2693-9>

- Wang, Y., Yun, B.W., Kwon, E.J., Hong, J. K., Yoon, J., & Loake, G. J. (2006). S-Nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1777–1784. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj211>
- Weits, D. A., Dongen, J. T., & Licausi, F. (2021). Molecular oxygen as a signaling component in plant development. *New Phytologist*, 229(1), 24–35. <https://doi.org/10.1111/nph.16424>
- Weits, D. A., Giuntoli, B., Kosmacz, M., Parlanti, S., Hubberten, H.-M., Riegler, H., Hoefgen, R., Perata, P., van Dongen, J. T., & Licausi, F. (2014). Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nature Communications*, 5(1), 3425. <https://doi.org/10.1038/ncomms4425>
- Weyhe, M., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Scheel, D., & Lee, J. (2014). Ménage à trois, the complex relationships between mitogen-activated protein kinases, WRKY transcription factors, and VQ-motif-containing proteins. *Plant Signaling & Behavior*, 9(8), e29519. <https://doi.org/10.4161/psb.29519>
- Wituszynska, W., & Karpinski, S. (2013). Programmed Cell Death as a Response to High Light, UV and Drought Stress in Plants. *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*. InTech. <https://doi.org/10.5772/53127>
- Woodson, J. D., & Chory, J. (2008). Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nature Reviews Genetics*, 9(5), 383–395. <https://doi.org/10.1038/nrg2348>
- Wright, L. P., Rohwer, J. M., Ghirardo, A., Hammerbacher, A., Ortiz-Alcaide, M., Raguschke, B., Schnitzler, J.-P., Gershenzon, J., & Phillips, M. A. (2014). Deoxyxylulose 5-Phosphate Synthase Controls Flux through the Methylerythritol 4-Phosphate Pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 165(4), 1488–1504. <https://doi.org/10.1104/pp.114.245191>
- Xiao, Z., Rogiers, S. Y., Sadras, V. O., & Tyerman, S. D. (2018). Hypoxia in grape berries: the role of seed respiration and lenticels on the berry pedicel and the possible link to cell death. *Journal of Experimental Botany*, 69(8), 2071–2083. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery039>
- Xie, Y. D., Li, W., Guo, D., Dong, J., Zhang, Q., Fu, Y., Ren, D., Peng, M., & Xia, Y. (2010). The Arabidopsis gene *SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1* plays a role in the salicylate- and jasmonate-mediated defence responses. *Plant, Cell & Environment*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02109.x>
- Xu, E., Vaahtera, L., & Brosché, M. (2015). Roles of Defense Hormones in the Regulation of Ozone-Induced Changes in Gene Expression and Cell Death. *Molecular Plant*, 8(12), 1776–1794. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.008>
- Xu, X., Chen, C., Fan, B., & Chen, Z. (2006). Physical and Functional Interactions between Pathogen-Induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 Transcription Factors. *The Plant Cell*, 18(5), 1310–1326. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037523>
- Yamasaki, H., & Sakihama, Y. (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters*, 468(1), 89–92. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01203-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01203-5)

- Yamasaki, H., Sakihama, Y., & Takahashi, S. (1999). An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Science*, 4(4), 128–129. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01393-X](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01393-X)
- Yan, C., Fan, M., Yang, M., Zhao, J., Zhang, W., Su, Y., Xiao, L., Deng, H., & Xie, D. (2018). Injury Activates Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Phosphorylation of JAV1-JAZ8-WRKY51 Complex for Jasmonate Biosynthesis. *Molecular Cell*, 70(1), 136-149.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.013>
- Yan, H., Wang, Y., Hu, B., Qiu, Z., Zeng, B., & Fan, C. (2019). Genome-Wide Characterization, Evolution, and Expression Profiling of VQ Gene Family in Response to Phytohormone Treatments and Abiotic Stress in *Eucalyptus grandis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1765. <https://doi.org/10.3390/ijms20071765>
- Ye, Y.-J., Xiao, Y.-Y., Han, Y.-C., Shan, W., Fan, Z.-Q., Xu, Q.-G., Kuang, J.-F., Lu, W.-J., Lakshmanan, P., & Chen, J.-Y. (2016). Banana fruit VQ motif-containing protein5 represses cold-responsive transcription factor MaWRKY26 involved in the regulation of JA biosynthetic genes. *Scientific Reports*, 6(1), 23632. <https://doi.org/10.1038/srep23632>
- Yeung, E., Bailey-Serres, J., & Sasidharan, R. (2019). After The Deluge: Plant Revival Post-Flooding. In *Trends in Plant Science* (Vol. 24, Issue 5, pp. 443–454). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.02.007>
- Yeung, E., van Veen, H., Vashisht, D., Sobral Paiva, A. L., Hummel, M., Rankenberg, T., Steffens, B., Steffen-Heins, A., Sauter, M., de Vries, M., Schuurink, R. C., Bazin, J., Bailey-Serres, J., Voosenek, L. A. C. J., & Sasidharan, R. (2018). A stress recovery signaling network for enhanced flooding tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(26). <https://doi.org/10.1073/pnas.1803841115>
- Yu, M., Yun, B.-W., Spoel, S. H., & Loake, G. J. (2012). A sleigh ride through the SNO: regulation of plant immune function by protein S-nitrosylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4), 424–430. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.03.005>
- Yu, T., Lu, X., Bai, Y., Mei, X., Guo, Z., Liu, C., & Cai, Y. (2019). Overexpression of the maize transcription factor *ZmVQ52* accelerates leaf senescence in *Arabidopsis*. *PLOS ONE*, 14(8), e0221949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221949>
- Yuan, G., Qian, Y., Ren, Y., Guan, Y., Wu, X., Ge, C., & Ding, H. (2021). The role of plant-specific VQ motif-containing proteins: An ever-thickening plot. *Plant Physiology and Biochemistry*, 159, 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.12.005>
- Yun, B., Skelly, M. J., Yin, M., Yu, M., Mun, B., Lee, S., Hussain, A., Spoel, S. H., & Loake, G. J. (2016). Nitric oxide and S-nitrosoglutathione function additively during plant immunity. *New Phytologist*, 211(2), 516–526. <https://doi.org/10.1111/nph.13903>
- Zandalinas, S. I., Sengupta, S., Burks, D., Azad, R. K., & Mittler, R. (2019). Identification and characterization of a core set of ROS wave-associated transcripts involved in the systemic acquired acclimation response of *Arabidopsis* to excess light. *The Plant Journal*, 98(1), 126–141. <https://doi.org/10.1111/tpj.14205>

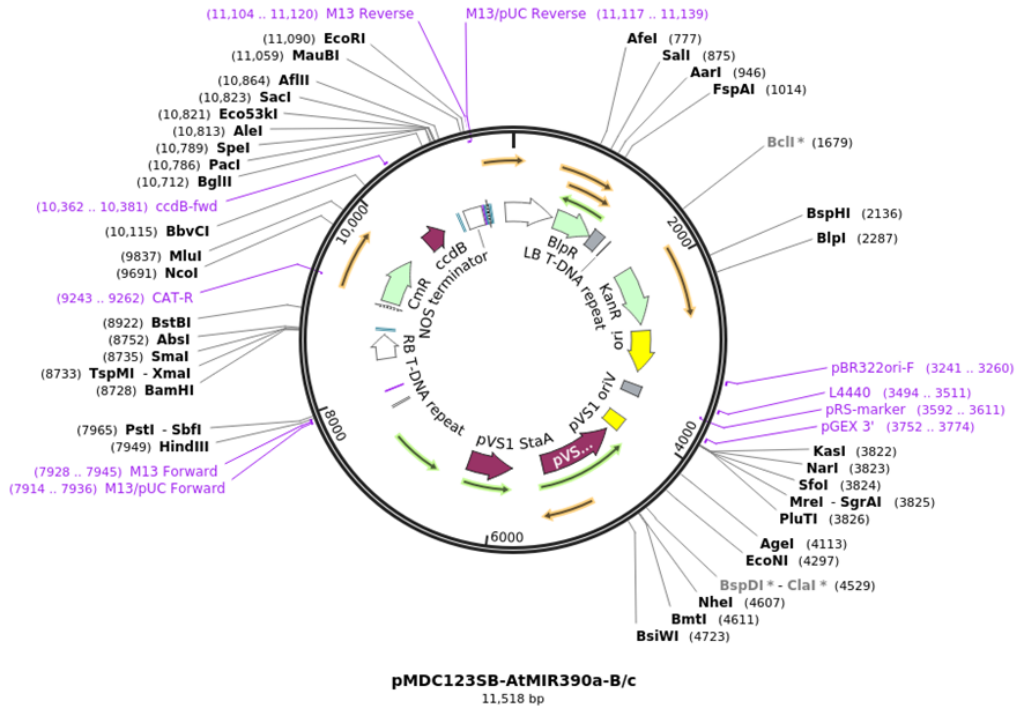
- Zhang, G., Wang, F., Li, J., Ding, Q., Zhang, Y., Li, H., Zhang, J., & Gao, J. (2015). Genome-Wide Identification and Analysis of the VQ Motif-Containing Protein Family in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*). *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(12), 28683–28704. <https://doi.org/10.3390/ijms161226127>
- Zhang, L., Wang, K., Han, Y., Yan, L., Zheng, Y., Bi, Z., Zhang, X., Zhang, X., & Min, D. (2022a). Genome-wide analysis of the VQ motif-containing gene family and expression profiles during phytohormones and abiotic stresses in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics*, *23*(1), 292. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08519-3>
- Zhang, M., Li, B., Wan, Z., Chen, X., Liu, C., Liu, C., & Zhou, Y. (2022bng). Exogenous Spermidine Promotes Germination of Aged Sorghum Seeds by Mediating Sugar Metabolism. *Plants*, *11*(21), 2853. <https://doi.org/10.3390/plants11212853>
- Zhong, Y., Guo, C., Chu, J., Liu, H., & Cheng, Z.-M. (2018). Microevolution of the VQ gene family in six species of *Fragaria*. *Genome*, *61*(1), 49–57. <https://doi.org/10.1139/gen-2017-0038>
- Zhou, Y., Yang, Y., Zhou, X., Chi, Y., Fan, B., & Chen, Z. (2016). Structural and Functional Characterization of the VQ Protein Family and VQ Protein Variants from Soybean. *Scientific Reports*, *6*(1), 34663. <https://doi.org/10.1038/srep34663>



ANEXOS

ANEXOS

Created with SnapGene®



Created with SnapGene®

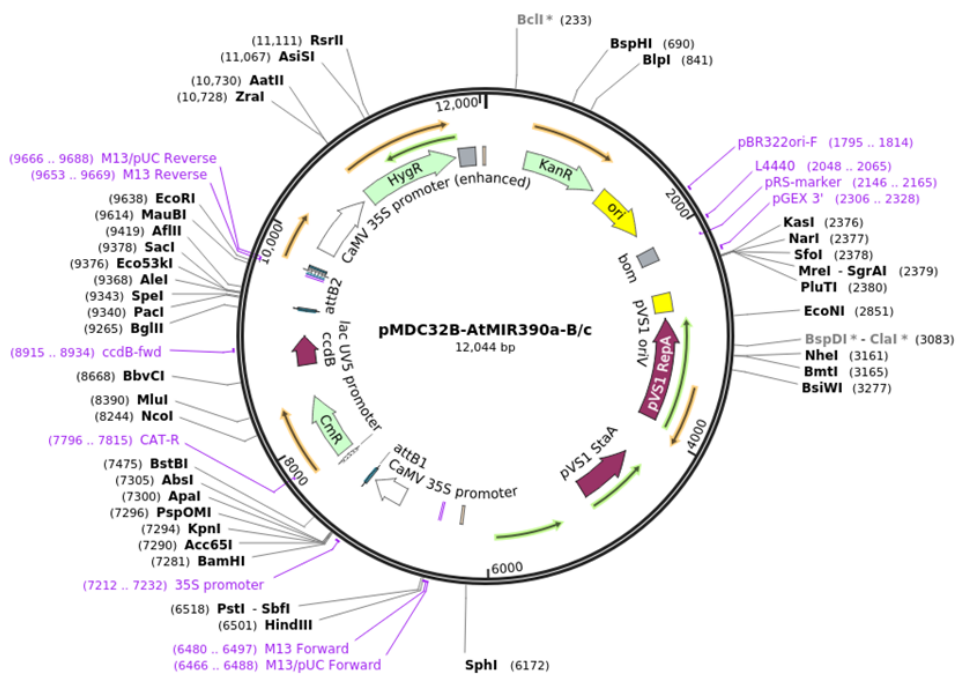


Figura A1. Mapas de los vectores pMDC123SB-AtMIR390a-B/c (arriba) y pMDC32B-AtMIR390a-B/c (abajo).

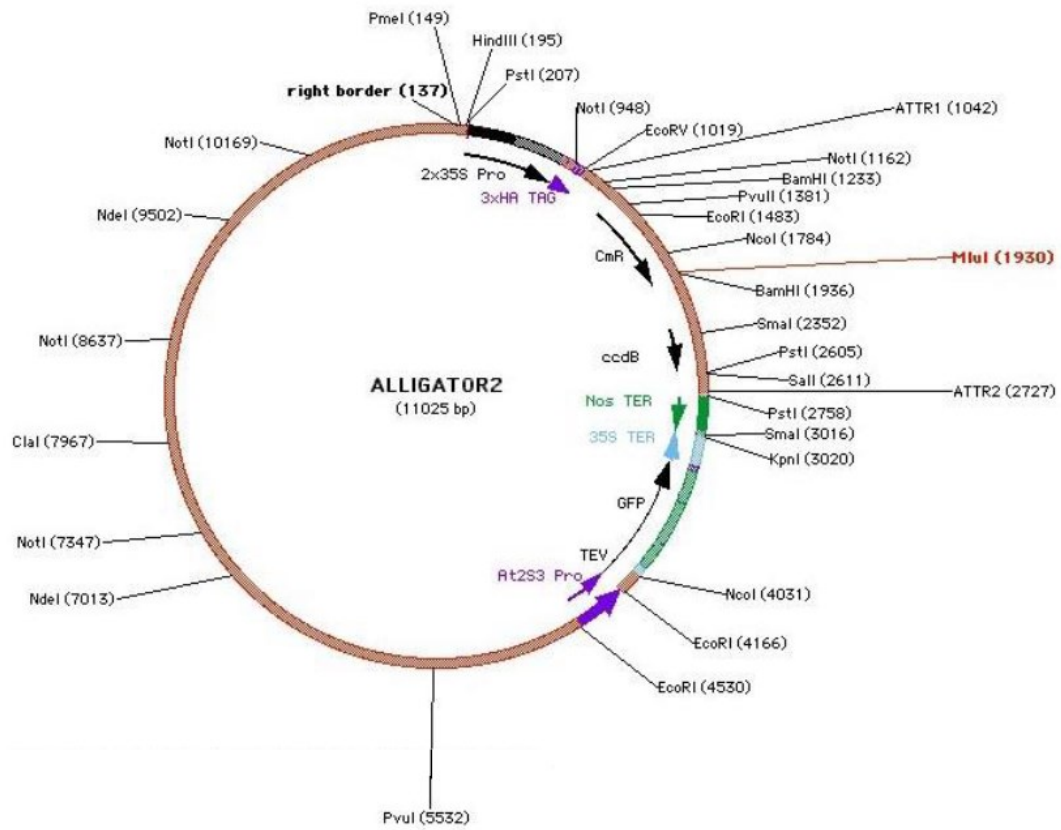


Figura A2. Mapa del vector pAlligator2.

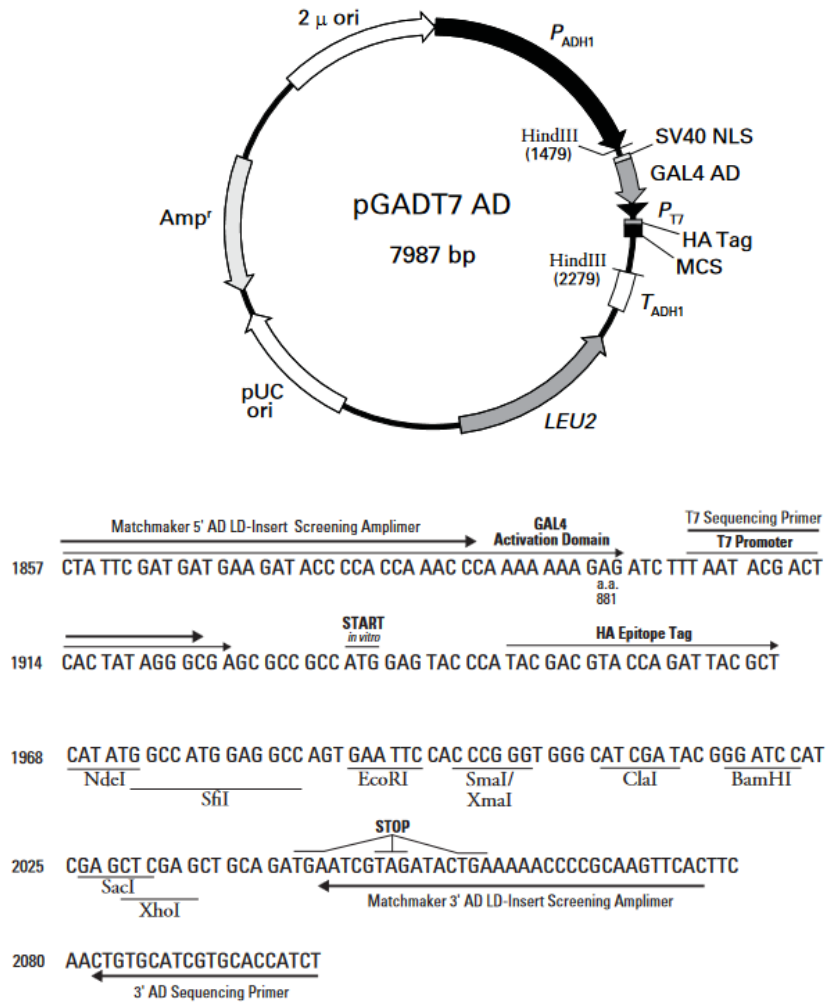


Figura A3. Mapa y secuencia del sitio de clonación del vector pGADT7.

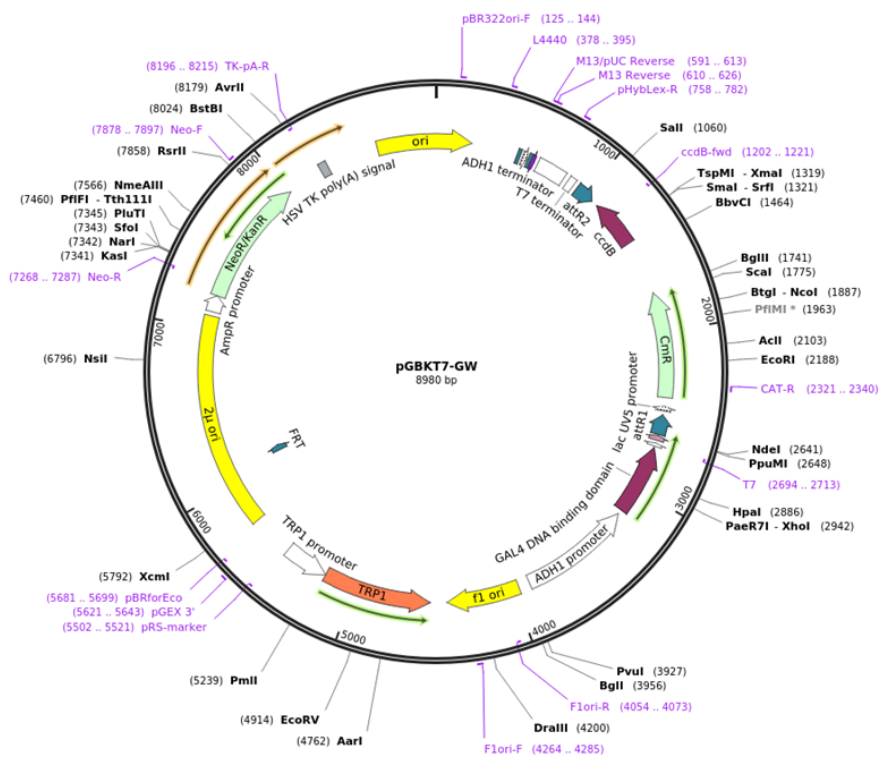
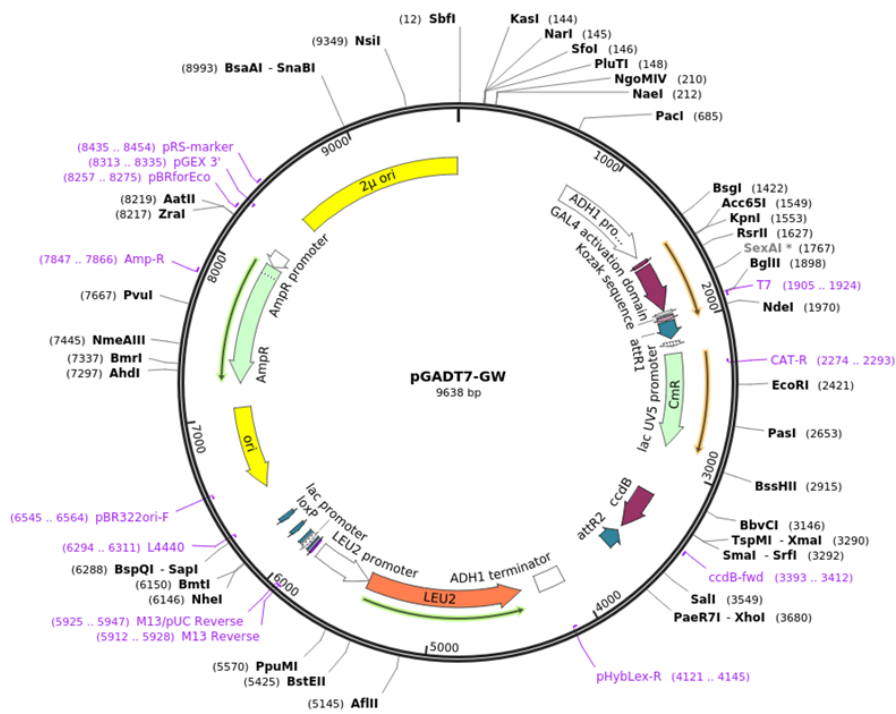


Figura A4. Mapas de los vectores pGADT7-GW (arriba) y pGBKT7 (abajo).

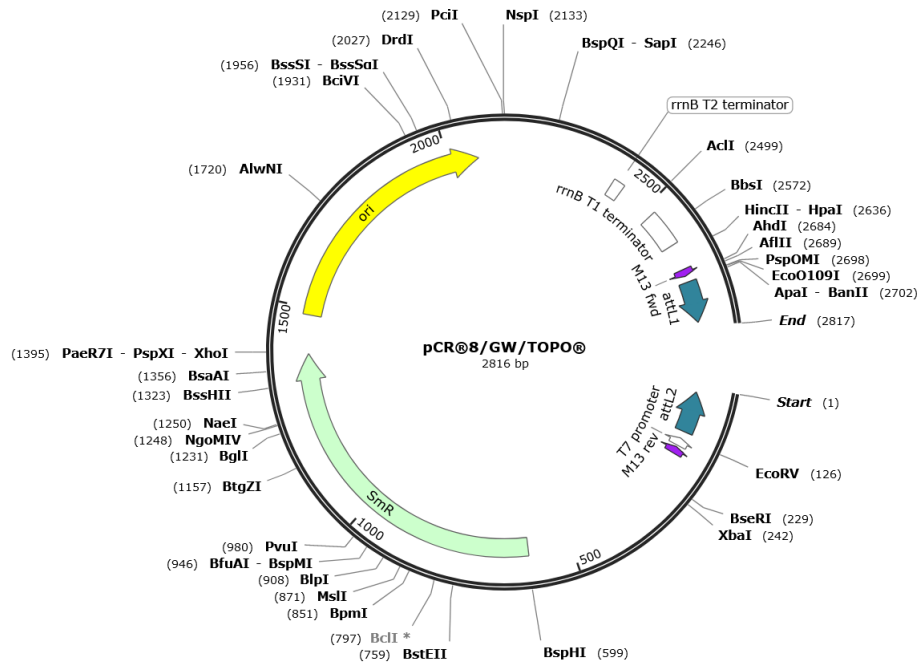


Figura A5. Mapa del vector pCR8/GW/TOPO (Invitrogen).

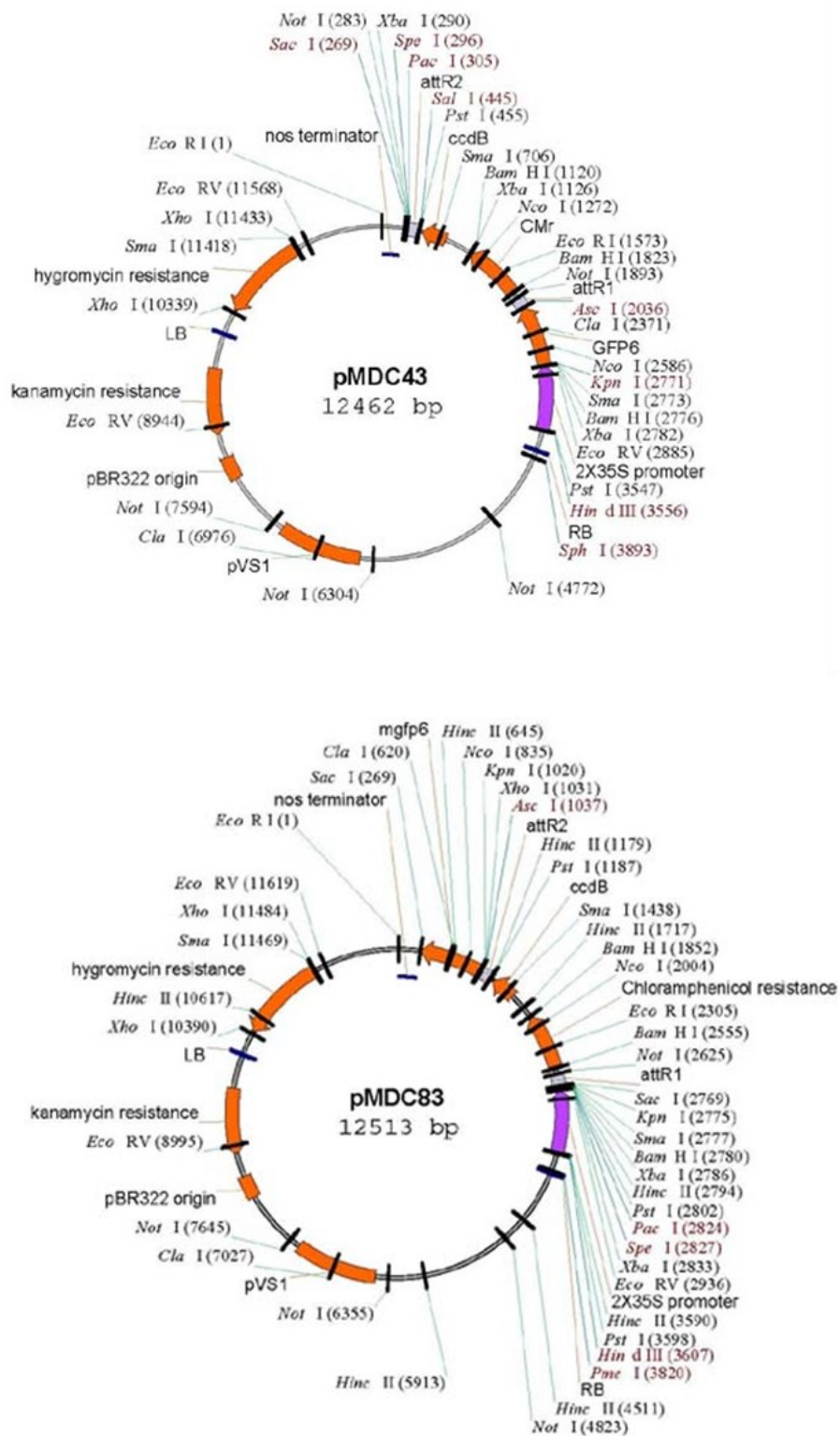


Figura A6. Mapas de los vectores pMDC43 (arriba) y pMDC83 (abajo).

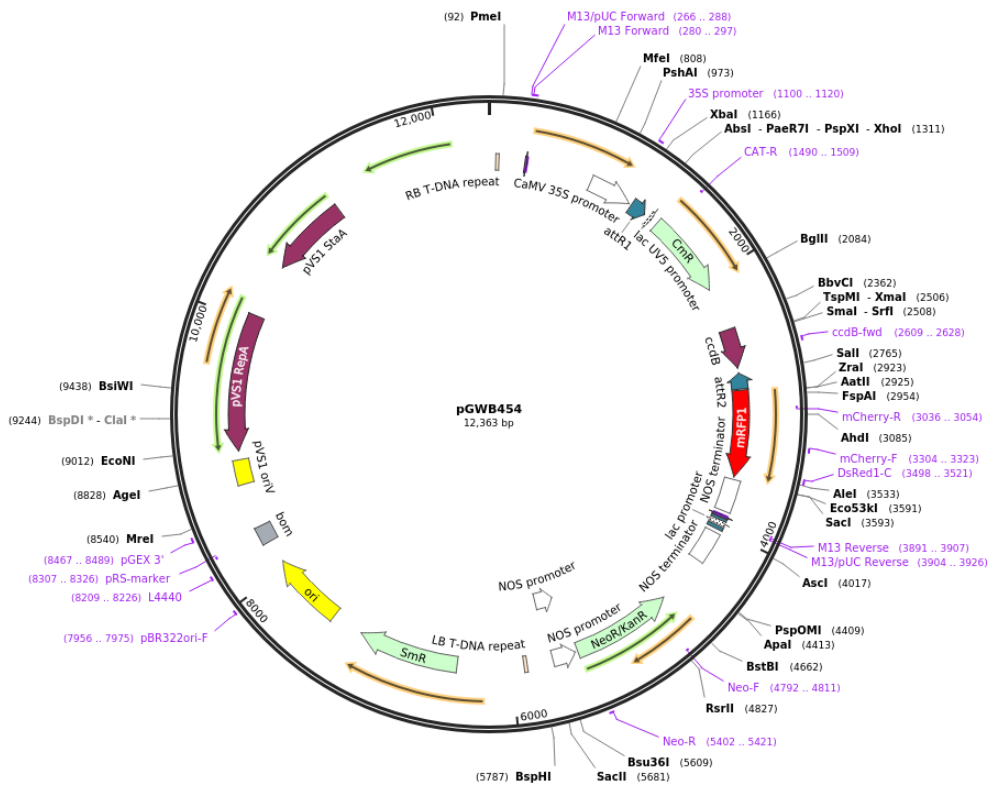


Figura A7. Mapa del vector pGWB454.

Tabla A1. Líneas transgénicas y construcciones utilizadas en esta Tesis.

Línea transgénica	Construcción	Plásmido	Selección en bacteria	Selección en planta	Selección en levadura
<i>cycB1,1:GUS</i> (Col-0)	<i>cycB1,1:GUS</i>	pBIB-KAN	Kanamicina	Kanamicina	-
<i>cycB1,1:GUS</i> (<i>vq10-H</i>)	<i>cycB1,1:GUS</i>	pBIB-KAN	Kanamicina	Kanamicina	-
<i>cycB1,1:GUS</i> (<i>wrky33</i>)	<i>cycB1,1:GUS</i>	pBIB-KAN	Kanamicina	Kanamicina	-
<i>amiR-VQ1-11</i> , <i>amiR-VQ1-13</i>	<i>35S:AtMIR390a:amiARN-VQ1</i>	pMDC123SB- AtMIR390a-B/c (Fig. A1)	Kanamicina	BASTA	-
<i>amiR-VQ10-9'</i>	<i>35S:AtMIR390a:amiARN-VQ10</i>	pMDC32B- AtMIR390a-B/c (Fig. A1)	Kanamicina	Higromicina	-
<i>amiR-VQ10-15</i>	<i>35S:AtMIR390a:amiARN-VQ10</i>	pMDC123SB- AtMIR390a-B/c (Fig. A1)	Kanamicina	BASTA	-
<i>amiR-VQ1,10-1-1</i> , <i>amiR-VQ1,10-7</i>	<i>35S:AtMIR390a:amiARN-VQ1:amiARN-VQ10</i>	pMDC123SB- AtMIR390a-B/c (Fig. A1)	Kanamicina	BASTA	-
<i>VQ1ox-13-3</i> , <i>VQ1ox-25-8</i>	<i>35S:HA:VQ1</i>	pAlligator2 (Fig. A2)	Espectinomocina	<i>pAt2s3:GFP</i>	-
<i>VQ10ox-5-3</i> , <i>VQ10ox-8-6</i>	<i>35S:HA:VQ10</i>	pAlligator2 (Fig. A2)	Espectinomocina	<i>pAt2s3:GFP</i>	-
-	<i>35S:GFP:VQ1</i>	pMDC43 (Fig. A6)	Kanamicina	-	-
-	<i>35S:GFP:VQ10</i>	pMDC43 (Fig. A6)	Kanamicina	-	-
-	<i>35S:VQ1:GFP</i>	pMDC83 (Fig. A6)	Kanamicina	-	-
-	<i>35S:VQ10:GFP</i>	pMDC83 (Fig. A6)	Kanamicina	-	-
-	<i>35S:VQ1:RFP</i>	pGWB454 (Fig. A7)	Espectinomocina	-	-
-	<i>35S:VQ10:RFP</i>	pGWB454 (Fig. A7)	Espectinomocina	-	-
-	<i>35S:DXS:GFP</i>	pB7GW2	Espectinomocina	-	-
-	<i>GAL4-AD:VQ1</i>	pGADT7-GW (Fig. A4)	Ampicilina	-	SD/-Leu
-	<i>GAL4-BD:VQ1</i>	pGBKT7-GW (Fig. A4)	Kanamicina	-	SD/-Trp
-	<i>GAL4-AD:VQ10</i>	pGADT7-GW (Fig. A4)	Ampicilina	-	SD/-Leu
-	<i>GAL4-BD:VQ10</i>	pGBKT7-GW (Fig. A4)	Kanamicina	-	SD/-Trp
-	<i>GAL4-AD:VQ24</i>	pGADT7-GW (Fig. A4)	Ampicilina	-	SD/-Leu
-	<i>GAL4-BD:VQ24</i>	pGBKT7-GW (Fig. A4)	Kanamicina	-	SD/-Trp
-	<i>GAL4-AD:VQ27</i>	pGADT7-GW (Fig. A4)	Ampicilina	-	SD/-Leu
-	<i>GAL4-BD:VQ27</i>	pGBKT7-GW (Fig. A4)	Kanamicina	-	SD/-Trp
-	<i>GAL4-AD:VQ32</i>	pGADT7-GW (Fig. A4)	Ampicilina	-	SD/-Leu
-	<i>GAL4-BD:VQ32</i>	pGBKT7-GW (Fig. A4)	Kanamicina	-	SD/-Trp
-	<i>GAL4-AD:WRKY18</i>	pGADT7-GW (Fig. A4)	Ampicilina	-	SD/-Leu
-	<i>GAL4-BD:WRKY18</i>	pGBKT7-GW (Fig. A4)	Kanamicina	-	SD/-Trp

-	<i>GAL4-AD:WRKY33</i>	pGADT7-GW (Fig. A4)	Ampicilina	-	SD/-Leu
-	<i>GAL4-BD:WRKY33</i>	pGBKT7-GW (Fig. A4)	Kanamicina	-	SD/-Trp
-	<i>GAL4-AD:WRKY40</i>	pGADT7-GW (Fig. A4)	Ampicilina	-	SD/-Leu
-	<i>GAL4-BD:WRKY40</i>	pGBKT7-GW (Fig. A4)	Kanamicina	-	SD/-Trp
-	<i>GAL4-AD:WRKY75</i>	pGADT7-GW (Fig. A4)	Ampicilina	-	SD/-Leu
-	<i>GAL4-BD:WRKY75</i>	pGBKT7-GW (Fig. A4)	Kanamicina	-	SD/-Trp
-	<i>GAL4-AD:NDHL</i>	pGADT7 (Fig. A3)	Ampicilina	-	SD/-Leu
-	<i>GAL4-AD:ACT12</i>	pGADT7 (Fig. A3)	Ampicilina	-	SD/-Leu
-	<i>GAL4-AD:BBX24</i>	pGADT7 (Fig. A3)	Ampicilina	-	SD/-Leu
-	<i>GAL4-AD:SS1</i>	pGADT7 (Fig. A3)	Ampicilina	-	SD/-Leu
-	<i>GAL4-AD:UBC19</i>	pGADT7 (Fig. A3)	Ampicilina	-	SD/-Leu
-	<i>GAL4-AD:BRI1</i>	pGADT7 (Fig. A3)	Ampicilina	-	SD/-Leu
-	<i>GAL4-AD:eiF3</i>	pGADT7 (Fig. A3)	Ampicilina	-	SD/-Leu

Tabla A2. Proteínas interactoras de VQ1 identificadas en el rastreo de Y2H realizado con una genoteca normalizada de Arabidopsis Mate&Plate y su localización subcelular. La localización subcelular fue analizada con los términos GO de componentes celulares usando PANTHER (<http://go.pantherdb.org/>).

AGI loci	Anotación	Símbolo	Localización subcelular
AT4G18260	<i>Citochrome b561/ferric reductase transmembrane protein family</i>	B561M	Vacuola
AT3G29330	<i>Zinc finger RNA-binding-like protein</i>	Q6E238; Q6E239	Núcleo
AT3G59280	<i>AtPAM16_MUSE5_PAM16_TXR1_Protein Transporter, Pam16</i>	TM16B	Mitocondria
AT1G70760	<i>CRR23_NdhL_inorganic carbon transport protein-related</i>	NDHL	Cloroplasto
AT5G54850	<i>Unknown</i>	Q9FFU5	
AT1G34130	<i>STT3B_staurosporin and temperature sensitive 3-like b</i>	STT3B	ER/Nucleolo
AT5G29000	<i>PHL1_Homeodomain-like superfamily protein</i>	PHL1	Núcleo
AT3G04790	<i>EMB3119_Ribose 5-phosphate isomerase, type A protein</i>	RPI3	Cloroplasto
AT5G12960	<i>Proline-tRNA ligase</i>	Q84W43	
AT5G66055	<i>AKRP_EMB16_EMB2036_ankyrin repeat protein</i>	AKRP	Cloroplasto
AT2G34070	<i>TBL37_TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 37</i>	TBL37	Golgi
AT2G35790	<i>Uncharacterized protein</i>	Q9ZQQ1	Mitocondria
AT1G32960	<i>ATSBT3.3_SBT3.3_Subtilase family protein</i>	SBT33	Secretada
AT1G73350	<i>Ankyrin repeat protein</i>	A8MS11; Q84WW0	Núcleo
AT3G62420	<i>ATBZIP53_BZIP53_basic region/leucine zipper motif 53</i>	BZP53	Núcleo
AT3G08850	<i>ATRAPTOR1B_RAPTOR1_RAPTOR1B_HEAT repeat; WD domain, G-beta repeat protein protein</i>	RTOR1	Citoplasma
AT2G32640	<i>LCYB_Lycopene beta/epsilon cyclase protein</i>	F4ITT3; Q0WVA1	Cloroplasto
AT4G32140	<i>EamA-like transporter family</i>	O49378	Endomembrana
AT3G20060	<i>UBC19_ubiquitin-conjugating enzyme19</i>	UBC19	Citoplasma/Núcleo
AT3G51880	<i>AtHMGB1_HMGB1_NFD1_high mobility group B1</i>	F4J5M5; HMGB1	Núcleo
AT1G75580	<i>SAUR51_SAU-like auxin-responsive protein family</i>	Q9LR00	Membrana plasmática
AT4G18390	<i>TCP2_TEOSINTE BRANCHED 1, cycloidea and PCF transcription factor 2</i>	TCP2	Núcleo
AT4G00100	<i>ATRPS13A_PFL2_RPS13_RPS13A_ribosomal protein S13A</i>	RS132	Citoplasma, ER, Nucleolo
AT5G24300	<i>ATSS1_SS1_Glycogen/starch synthases, ADP-glucose type</i>	SSY1	Cloroplasto/Amiloplasto
AT4G18970	<i>GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein</i>	F4JSC9; GDL65	Secretada
AT1G17720	<i>ATB BETA_Protein phosphatase 2A, regulatory subunit PR55</i>	2ABB	Citoplasma/Núcleo
AT5G42470	<i>BRISC and BRCA1-A complex member 2</i>	Q5XF81	Citoplasma/Núcleo
AT5G35630	<i>ATGSL1_GLN2_GS2_glutamine synthetase 2</i>	GLNA2	Cloroplasto/Mitocondria
AT1G73970	<i>Obscurin-like protein</i>	F4HTS4	
AT5G15090	<i>AtVDAC-3_ATVDAC3_VDAC3_voltage dependent anion channel 3</i>	VDAC3	Membrana p/Mito
AT3G13130	<i>Unknown transmembrane protein</i>	Q9LK60	Endomembrana

AT3G26510	<i>Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein</i>	Q27GK5; Q6ID88	
AT3G16370	<i>GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein</i>	APG2	Secretada
AT4G16540	<i>Heat shock protein HSP20/alpha crystallin family</i>	O23498	
ATCG00490	<i>RBCL_ribulose-bisphosphate carboxylases</i>	RBL	Cloroplasto
AT2G39990	<i>AteIF3f_EIF2_eIF3F_eukaryotic translation initiation factor 2</i>	EIF3F	Citoplasma
AT1G11125	<i>Uncharacterized protein</i>	F4I7D8	
AT3G50480	<i>HR4_homolog of RPW8 4</i>	HR4	Endomembrana
AT2G05850	<i>scpl38_serine carboxypeptidase-like 38</i>	SCP38	Secretada
AT4G10110	<i>RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein</i>	Q8GW25	
AT5G53330	<i>Ubiquitin-associated/translation elongation factor EF1B protein</i>	Q8LG11	Plastidio
AT1G79530	<i>GAPCP-1_glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Plastidio 1</i>	G3PP1	Plastidio/Estroma
AT2G10970	<i>Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein</i>	Q9SKH8	
AT4G16140	<i>proline-rich family protein</i>	O23462	Endomembrana
AT5G13100	<i>Uncharacterized protein</i>	Q9FYA0	
AT1G11910	<i>APA1_ATAPA1_AtPaspA1_PaspA1_aspartic proteinase A1</i>	APA1	Vacuola
AT3G23640, AT3G23650	<i>HGL1_heteroglycan glucosidase 1/protein kinase-related</i>	Q93Y12; F4J460	Cloroplasto
AT3G06200	<i>Guanylate kinase 3, Cloroplastoic</i>	GMK3	Cloroplasto
AT3G13390	<i>sk511_SKU5 similar 11</i>	Q9LJF2	Cloroplasto
AT5G52320	<i>CYP96A4_Citochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 4</i>	Q9FHC8	Membrana cloroplasto
AT3G04720	<i>AtPR4_HEL_PR-4_PR4_pathogenesis-related 4</i>	HEVL	Vacuola
AT4G15520	<i>tRNA/rRNA methyltransferase (SpoU) family protein</i>	Q8GYT1	
AT3G06850	<i>BCE2_DIN3_LTA1_2-oxoacid dehydrogenases acyltransferase family protein</i>	ODB2	Mitocondria
AT2G34620	<i>mTERF10_Mitochondrial transcription termination factor family protein</i>	O64685	Mitocondria
AT5G23090	<i>NF-YB13_nuclear factor Y, subunit B13</i>	F4KBG0; F4KBG1;NC2 B	Núcleo
AT1G64510	<i>PRPS6_Translation elongation factor EF1B/ribosomal protein S6 family protein</i>	RR6	Plastidio/Cloroplasto
AT5G27030	<i>TPR3_TOPLESS-related 3</i>	F4K2T3;TPR3	Núcleo
AT3G05840	<i>ATSK12_ASK3_Protein kinase superfamily protein</i>	KSG3	Citoplasma/Córtex cel
AT5G15800/ AT3G02310	<i>AGL2_SEP1/AGL4_SEP2_K-box region and MADS-box transcription factor family protein</i>	F4KB90; SEP1/SEP2	Núcleo
AT3G22680	<i>DMS7_RDM1_RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1</i>	RDM1	Núcleo
AT3G47420	<i>AtG3Pp1_ATPS3_G3Pp1_PS3_phosphate starvation-induced gene 3</i>	GLPT1	Endomembrana
AT4G27130	<i>Translation initiation factor SUI1 family protein</i>	SUI11	Citoplasma
AT4G24460	<i>CLT2_CRT (chloroquine-resistance transporter)-like transporter 2</i>	CLT2	Membrana plastidio

AT1G06040	<i>BBX24_STO_B-box zinc finger family protein</i>	BBX24;F4IBY7	Núcleo
AT4G26520	<i>AtFBA7_FBA7_Aldolase superfamily protein</i>	ALFC7	Citoplasma
AT2G19640	<i>ASHR2_SDG39_ASH1-related protein 2_Histone-lysine N-methyltransferase</i>	ASHR2	Núcleo
AT2G20630	<i>PIA1_PP2C induced by AVRRPM1</i>	P2C20	Mitocondria
AT5G20550	<i>2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein</i>	Q8LF12	
AT2G07725	<i>Ribosomal L5P family protein</i>	Q6NMS1	Mitocondria
AT4G26850	<i>GGP_VTC2_mannose-1-phosphate guanylyltransferase (GDP); GDP-galactose:mannose-1-phosphate guanylyltransferases; GDP-galactose:glucose-1-phosphate guanylyltransferases; GDP-galactose:myoinositol-1-phosphate guanylyltransferases;glucose-1-phosphate guanylyltransferase</i>	GGAP1	Citoplasma/Núcleo
AT1G61870	<i>PPR336_rPPR1_pentatricopeptide repeat 336</i>	PPR87	Membrana interna mitocondria
AT1G78240	<i>OSU1_QUA2_TSD2_S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein</i>	PMTT	Golgi
AT5G50665	<i>Uncharacterized protein</i>	F4KAD6; Q6DBB7	
AT1G70680	<i>Caleosin-related family protein_Probable peroxygenase 5</i>	PXG5	Endomembrana
AT3G59870	<i>Uncharacterized protein</i>	Q9M1Y7	Estroma
AT3G17510	<i>CIPK1_SnRK3.16_CBL-interacting protein kinase 1</i>	CIPK1	Membrana plasmática
AT4G00895	<i>ATPase, F1 complex, OSCP/delta subunit protein</i>	Q8W481	
AT1G74260	<i>PUR4_purine biosynthesis 4</i>	PUR4	Cloroplasto/Mitocondria
AT3G26934	<i>Uncharacterized protein</i>	Q9LJF6	
AT1G30510	<i>ATRFNR2_RFNR2_root FNR 2</i>	FNRR2	Cloroplasto
AT5G14260	<i>Rubisco methyltransferase family protein</i>	Q8VZB5	Estroma
AT2G28315	<i>UXT1_UDP-xylose transporter 1</i>	UXT1	Golgi/ER
AT1G25510	<i>Eukaryotic aspartyl protease family protein</i>	Q9C6M0	
AT4G08950	<i>EXO_EXORDIUM_Phosphate-responsive 1 family protein</i>	EXO	Secretada
AT1G76920	<i>SKP1-interacting partner 15_F-box family protein</i>	SKI15	Núcleo
AT3G01230	<i>Splicing regulatory glutamine/lysine-rich-like protein</i>	Q9MAD2	
AT2G04790	<i>PTB domain engulfment adapter</i>	F4IFB5;F4IFB6;Q6ICW4	
AT5G09550	<i>GDI_GDP dissociation inhibitor family protein / Rab GTPase activator family protein</i>	GDI	Citoplasma/Secretada
AT4G04078	<i>Uncharacterized protein of 35 aa</i>	B3H7E1	
AT1G47380	<i>Protein phosphatase 2C family protein</i>	P2C12	
AT1G52540	<i>Protein kinase superfamily protein</i>	Q8LDB7	Membrana plasmática/Plasmodesmo
AT3G18060	<i>Actin-interacting protein 1-2_transducin family protein / WD-40 repeat family protein</i>	AIP12	Citoplasma/ Citoesqueleto
AT2G44160	<i>MTHFR2_methylenetetrahydrofolate reductase 2</i>	MTHR2	Citoplasma

AT1G12050	<i>AtFAH_FAH_SSCD1_fumarylacetoacetase, putative</i>	FAH	Citoplasma/Secretada
AT2G25830	<i>YebC-related probable transcriptional regulatory protein</i>	U082	Cloroplasto/Vacuola
AT4G35060	<i>HIPP25_Heavy metal transport/detoxification superfamily protein</i>	HIP25	Membrana plasmática/Plasmodesmo
AT3G13400	<i>sks13_SKU5 similar 13</i>	Q9LJF1	Secretada
AT3G02740	<i>Eukaryotic aspartyl protease family protein</i>	Q9M8R6	Citoplasma/Membrana plasmática/Plasmodesmo
AT3G54830	<i>Amino acid transporter AVT1B_Transmembrane amino acid transporter family protein</i>	AVT1B	Membrana
AT5G37475	<i>Translation initiation factor eIF3 subunit</i>	Q8GRX2	Citoplasma
AT3G54050	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase 1, Chloroplastoic_cfbp1_HCEF1_high cyclic electron flow 1</i>	F16P1	Estroma
AT5G43060	<i>RD21B_Granulin repeat cysteine protease family protein</i>	RD21B	ER/Vacuola/Secretada
AT5G19620	<i>ATOEP80_EMB213_OEP80_TOC75-V_outer envelope protein of 80 kDa</i>	OEP80	Membrana externa cloroplasto
AT2G44410	<i>RING/U-box superfamily protein</i>	Q6NLR3	ER/Núcleo
AT1G03250	<i>R3H domain protein</i>	F4I0U6; Q8L3X7	
AT3G27220	<i>HUP6_Hypoxia response unknown protein 6_Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein</i>	Y3272	Endomembrana
AT4G13220	<i>Uncharacterized protein</i>	Q6NLB6	Endomembrana
AT5G04140	<i>FD-GOGAT_GLS1_GLU1_GLUS_glutamate synthase 1</i>	GLTB1	Estroma/Mito
AT3G51130	<i>PHAF1 protein</i>	Q9SD33	
AT5G04590	<i>SIR_sulfite reductase</i>	Q9LZ66;SIR	Estroma
AT2G30490	<i>ATC4H_C4H_CYP73A5_REF3_cinnamate-4-hydroxylase</i>	TCMO	Endomembrana
AT1G23820	<i>SPDS1_spermidine synthase 1</i>	F4I7M5;SPD S1	
AT3G54130	<i>Ataxin-3 homolog_Josephin family protein_Transcription repressor</i>	ATX3H	Núcleo
AT5G23730	<i>EFO2_RUP2_Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein</i>	RUP2	Citoplasma/Núcleo
AT4G13540	<i>Golgin family A protein</i>	Q9T0H4	Peroxisoma
AT4G23840	<i>Leucine-rich repeat (LRR) family protein</i>	Q8L4C7	
AT3G23200	<i>CASPL5B3_Uncharacterised protein family (UPF0497)</i>	CSPLG	Membrana plasmática
AT3G54210	<i>PRPL17_Ribosomal protein L17 family protein</i>	RK17	Cloroplasto
AT2G46280	<i>TIF3I1_TRIP-1_TRIP1_TGF-beta receptor interacting protein 1</i>	EIF3I;F4II65	Citoplasma
AT3G13110	<i>ATSERAT2;2_SAT-1_SAT-A_SAT-M_SAT3_SERAT2; 2_serine acetyltransferase 2;2</i>	SAT3	Mitocondria
AT3G49360	<i>PGL2_6-phosphogluconolactonase 2</i>	6PGL2	Citoplasma
AT5G46180	<i>DELTA-OAT_ornithine-delta-aminotransferase Mitochondrial</i>	OAT	Mitocondria
AT1G17350	<i>Probable complex I intermediate-associated protein 30_NADH:ubiquinone oxidoreductase intermediate-associated protein 30</i>	CIA30;F4I7I6	Mitocondria
AT5G24420	<i>PGL5_6-phosphogluconolactonase 5</i>	6PGL5	Citoplasma

AT5G20900	<i>JAZ12_TIFY3B_jasmonate-zim-domain protein 12</i>	TIF3B	Núcleo
AT1G32580	<i>Multiple organellar RNA editing factor 5, Chloroplastic/Mitochondrial MORF5_Plastidio developmental protein DAG, putative</i>	MORF5	Clorop/Mito
AT1G73750	<i>Uncharacterised conserved protein UCPO31088, alpha/beta hydrolase</i>	Q8W568	
AT5G15140	<i>Galactose mutarotase-like superfamily protein_Aldose 1-epimerase family protein</i>	Q9LXG7	
AT5G58110	<i>chaperone binding;ATPase activators</i>	Q9FGT3	Citoplasma
AT1G20696	<i>HMGB3_NFD03_NFD3_high mobility group B3</i>	HMGB3	Citoplasma/Núcleo
AT4G36500	<i>Uncharacterized protein</i>	O23231	
AT3G17330	<i>ECT6_evolutionarily conserved C-terminal region 6</i>	A8MPR6; Q1JPL5	Citoplasma
AT5G16390	<i>BCCP_BCCP-1_BCCP1_CAC1_CAC1-A_CAC1A_Cloroplastic acetylcoenzyme A carboxylase 1</i>	BCCP1;F4KE 21	Cloroplasto
AT5G65840	<i>Thioredoxin superfamily protein</i>	Q8L5Y8	Estroma
AT2G36250	<i>ATFTSZ2-1_FTSZ2-1_Tubulin/FtsZ family protein</i>	FTZ21	Estroma/Tilacoide
AT1G04140	<i>Transducin family protein / WD-40 repeat family protein</i>	F4I458; Q94C94	
AT3G51250	<i>Senescence/dehydration-associated protein-related</i>	SDEH3	Membrana plasmática/Plasmodesmo
AT3G32930	<i>6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase</i>	Q9LHC4	Envoltura cloroplasto
AT2G33590	<i>AtCRL1_CRL1_NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein</i>	O22809	Cloroplasto
AT1G15030	<i>Uncharacterized protein</i>	Q9M9Q2	
AT3G26900	<i>ATSKL1_SKL1_shikimate kinase like 1</i>	SKL1	Cloroplasto
AT1G13440	<i>GAPC-2_GAPC2_glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2</i>	F4HQ11; G3PC2	Citoplasma/Núcleo
AT5G50100	<i>DCC1_Putative thiol-disulphide oxidoreductase DCC</i>	Y5010	Cloroplasto
AT3G07525	<i>ATATG10_ATG10_autophagoCitopsis-associated family protein</i>	ATG10	Endomembrana
AT5G47810	<i>PFK2_phosphofructokinase 2</i>	PFKA2	Citoplasma
AT5G49030	<i>OVA2_tRNA synthetase class I (I, L, M and V) family protein</i>	F4K4Q2;SYI M	
AT1G56700	<i>Peptidase C15, pyroglutamyl peptidase I-like</i>	A8MSE7; Q9FXC0	Citoplasma
AT5G18650	<i>MIEL1_CHY-type/CTCHY-type/RING-type Zinc finger protein</i>	MIEL1	Citoplasma/Núcleo
AT2G31610	<i>40S ribosomal protein S3-1</i>	RS31	Citoplasma/Núcleo/Cloroplasto/Peroxisoma/Plasmodesmo/Vacuola
AT5G08100	<i>ASPGA1_N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolases) superfamily protein</i>	ASPGA;F4K9 K7	
AT3G27930	<i>AtOM47_OM47</i>	F4IXS2;Q8W 106	Membrana externa mitocondria
AT1G55880	<i>Pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme family protein</i>	F4I3G8; Q6NKY5	Endomembrana
AT5G15025	<i>Unknown</i>	Q9LFFQ2	Núcleo
AT2G42910	<i>AtPRS4_PRS4_Phosphoribosyltransferase family protein</i>	KPRS4	Citoplasma/Membrana plasmática/Plasmodesmo
AT4G04460	<i>AtPaspA3_PaspA3_Sapoin-like aspartyl protease family protein</i>	APA3;F4JGD 2	Secretada

AT3G17900	<i>Uncharacterized protein</i>	Q9ASZ4	Golgi
AT4G14930	<i>Survival protein SurE-like phosphatase/nucleotidase</i>	Q8LAM2	Citoplasma
AT2G34860	<i>PHOTOSYSTEM I ASSEMBLY 2, Chloroplastic_EDA3_PSA2_DnaJ/Hsp40 cysteine-rich domain superfamily protein</i>	PSA2	Cloroplasto
AT1G78450	<i>SOUL heme-binding family protein</i>	Q9SYN6	
AT1G74070	<i>Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein</i>	CP26B	Cloroplasto
AT1G53400	<i>Ubiquitin domain-containing protein</i>	Q9MAG2	
AT1G56500	<i>SUPPRESSOR OF QUENCHING 1, Chloroplastic_SOQ1_haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein</i>	SOQ1	Tilacoide
AT4G28556	<i>RIC7_PAK-box/P21-Rho-binding family protein</i>	RIC7	Citoplasma/Núcleo/Membrana plasmática
AT3G55380	<i>UBC14_ubiquitin-conjugating enzyme 14</i>	F4IWU7;UBC14	
AT5G58680	<i>ARM repeat superfamily protein</i>	Q8LGC7	Citoplasma/Núcleo
AT1G42960	<i>Inner membrane localized protein</i>	Q9C7S3	Cloroplasto/Núcleo
AT4G17560	<i>50S Ribosomal protein L19-1</i>	RK191	Cloroplasto
AT2G42230	<i>C-CAP/cofactor C-like domain-containing protein</i>	F4IN01; Q66GP5	Citoplasma/Citoesqueleto
AT4G02195	<i>ATSYP42_ATTGL2B_SYP42_TLG2B_syntaxin of plants 42</i>	SYP42	Golgi
AT1G19800	<i>ABC114_TGD1_trigalactosyldiacylglycerol 1</i>	TGD1	Membrana interna cloroplasto
AT5G12040	<i>Omega-amidase, Chloroplastic_Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase family protein</i>	NILP3	Cloroplasto
AT1G79500	<i>AtkdsA1_KDO8PS_Aldolase-type TIM barrel family protein</i>	KDSA1	Citoplasma
AT4G15560	<i>AtCLA1_CLA_CLA1_DEF_DXPS2_DXS_DXS1_Deoxyxylulose-5-phosphate synthase</i>	DXS	Estroma
AT2G05790	<i>O-Glycosyl hydrolases family 17 protein</i>	F4IHD3	Membrana plasmática
AT3G46520	<i>ACT12_actin-12</i>	ACT12	Citoplasma/Citoesqueleto
AT5G26990	<i>DEHYDRATION-INDUCED 19 homolog 6</i>	DI196	Núcleo
AT3G55770	<i>WLIM2b_GATA type zinc finger transcription factor family protein</i>	F4IY33;WLI2B	Citoplasma/Citoesqueleto
AT4G18810	<i>NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein</i>	F4JRN8; Q8VYA4	Citoplasma/Cloroplasto/Vacuola
AT4G28610	<i>AtPHR1_PHR1_phosphate starvation response 1</i>	PHR1	Núcleo
AT2G40330	<i>PYL6_RCAR9_PYR1-like 6</i>	PYL6	Citoplasma/Núcleo/Membrana plasmática
AT3G18050	<i>GPI-anchored protein</i>	Q9LV36	Endomembrana
AT5G28020	<i>Bifunctional L-3-cyanoalanine synthase/cysteine synthase D2</i>	CYSD2;F4K5T1	Citoplasma
AT2G29400	<i>PP1-AT_TOPP1_type one protein phosphatase 1</i>	PP11	Citoplasma/Núcleo
AT5G37600	<i>ATGLN1;1_ATGSR1_GLN1;1_GSR 1_Glutamine synthetase Citopsolic isozyme 1-1</i>	GLN11	Citoplasma
AT1G54030	<i>ERMO3_GOLD36_MVP1_NUC_GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein</i>	GDL21	ER/Vacuola
AT5G22810	<i>GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein</i>	GDL78	Secretada

AT4G26930	<i>AtMYB97_MYB97_myb domain protein 97</i>	MYB97	Núcleo
AT4G33520	<i>AtHMA6_HMA6_PAA1_PCH1_P-type ATPase 1</i>	F4JIZ4;HMA6	Endomembrana
AT3G04280	<i>ARR22_RR22_response regulator 22</i>	ARR22	Núcleo
AT1G74880	<i>NDH-O_NdhO_NAD(P)H:plastoquinone dehydrogenase complex subunit O</i>	NDHO	Tilacoide
AT2G39720	<i>Probable E3 ubiquitin-protein ligase RHC2A_RHC2A_RING-H2 finger C2A</i>	RHC2A	Citoplasma
AT3G59980	<i>Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein</i>	Q9M1X8	Núcleo
AT3G02640	<i>Uncharacterized protein anac021_ANAC022_NAC1_NAC domain containing protein 1</i>	Q9M878	Endomembrana
AT1G56010	<i>Uncharacterized protein 1</i>	NAC22	Núcleo
AT4G35220	<i>CYCLASE2_Cyclase family protein</i>	CYL2	Secretada/Endomembrana
AT5G27280	<i>Zim17-type zinc finger protein</i>	O04646	Mitocondria
AT4G22930	<i>DHOASE_PYR4_pyrimidin 4</i>	PYRC	Mitocondria
AT3G20510	<i>FATTY ACID EXPORT 6_FAX6_Transmembrane proteins 14C</i>	FAX6	Endomembrana
AT2G34410	<i>REDUCED WALL ACETYLATION 3_RWA3_O-acetyltransferase family protein</i>	RWA3	Golgi
AT2G05632	<i>Uncharacterized protein of 52 aa with 4C</i>	Q0WU16	
AT3G11830	<i>T-complex protein 1 subunit eta TCP-1/cpn60 chaperonin family protein</i>	TCPH	Citoplasma
AT5G20500	<i>Glutaredoxin-C4</i>	GRXC4	Citoplasma
AT4G13270	<i>Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family</i>	Q52K84	Endomembrana
AT5G46210	<i>ATCUL4_CUL4_cullin4</i>	CUL4	Núcleo
AT5G59840	<i>AtRabE1b_Ras-related small GTP-binding family protein</i>	Q9FJF1	Membrana plasmática/Plasmodesmo/ Plastidio
AT2G44745	<i>AtWRKY12_WRKY12_WRKY family transcription factor</i>	WRK12	Núcleo
AT4G05450	<i>Adrenodoxin-like protein 1, Mitochondrial_ATMFDX1_MFDX1_Mitochondrial ferredoxin 1</i>	MFDX1	Mitocondria
AT3G46970	<i>ATPHS2_PHS2_alpha-glucan phosphorylase 2</i>	PHS2	Citoplasma
AT5G18260	<i>RING/U-box superfamily protein</i>	Q9FK45	
AT3G27810	<i>ATMYB21_ATMYB3_MYB21_myb domain protein 21</i>	MYB21	Núcleo
AT1G24480	<i>S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein</i>	Q9FYL5	Endomembrana
AT1G75280	<i>Isoflavone reductase homolog P3_NmrA-like negative transcriptional regulator family protein</i>	IFRH	Citoplasma
AT5G15030	<i>Paired amphipathic helix (PAH2) superfamily protein</i>	Q9LFO2	Núcleo
AT4G26000	<i>PEP_RNA-binding KH domain-containing protein PEPPER</i>	PEP	Núcleo
AT2G20360	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, Mitochondrial</i>	NDUA9	Mitocondria
AT3G01480	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase_ATCYP38_CYP38_cyclophilin 38, Chloroplastic</i>	CYP38	Tilacoide
AT4G32770	<i>ATSDX1_VTE1_tocopherol cyclase, Chloroplasto / vitamin E deficient 1 (VTE1) / sucrose export</i>	TOCC	Cloroplasto/plastoglobulo

	<i>defective 1 (SXD1)</i>		
AT2G36530	<i>ENO2_LOS2_Enolase</i>	ENO2	Citoplasma/Núcleo/Membrana externa mitocondria
AT1G58235	<i>Uncharacterized protein of 74 aa</i>	Q93Z15	
AT2G21385	<i>AtCGLD11_BFA3_CGLD11</i>	A8MQF3; F4IGM4; Q94AU3	Cloroplasto/Mitocondria
AT4G32520	<i>AtSHMT3_SHM3_serine hydroxymethyltransferase 3</i>	GLYP3	Cloroplasto
AT3G54110	<i>ATPUMP1_ATUCP1_PUMP1_UCP_UCP1_plant uncoupling Mitochondrial protein 1</i>	PUMP1	Membrana interna mitocondria
AT5G24530	<i>DOWNY MILDEW RESISTANCE 6_DMR6_2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein</i>	DMR6	
AT1G25230	<i>Purple acid phosphatase 4</i>	PPA4	Secretada
AT3G25900	<i>ATHMT-1_HMT-1_Homocysteine S-methyltransferase family protein</i>	F4JBA7; F4JBA8; HMT1	
AT1G60010	<i>D-ribose-binding periplasmic protein</i>	Q9ZUJ2	
AT1G34000	<i>Light-harvesting complex-like protein OHP2, Chloroplastoic_one-helix protein 2</i>	OHP2	Tilacoide
AT4G35550	<i>ATWOX13_HB-4_WOX13_WUSCHEL related homeobox 13</i>	WOX13	Núcleo
AT5G37478	<i>TPX2 (targeting protein for Xklp2) protein family</i>	F4K773	Citoplasma/Citoesqueleto
AT2G26340	<i>Uncharacterized protein</i>	F4IU19; F4IUJ0	Tilacoide/Peroxisoma
AT2G30170	<i>PBCP_Protein phosphatase 2C protein 26</i>	P2C26	Cloroplasto
AT4G00570	<i>NAD-ME2_NAD-dependent malic enzyme 2</i>	MAO2	Mitocondria
AT1G80070	<i>PRP8_SUS2_Pre-mRNA-processing-splicing factor 8A</i>	PRP8A	Núcleo
AT1G59900	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha-1, Mitochondrial</i>	ODPA1	Mitocondria
AT1G53000	<i>3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase, Mitochondrial</i>	KDSB	Membrana externa mitocondria
AT3G06483	<i>ATPDHK_PDK_pyruvate dehydrogenase kinase Mitochondrial</i>	PDK	Mitocondria
AT1G23560	<i>Domain of unknown function (DUF220)</i>	Q9ZUD8	
AT4G01970	<i>Probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 4_RS4_STS_stachyose synthase</i>	RFS4	
AT5G05010	<i>Coatomer subunit delta_Clathrin adaptor complexes medium subunit family protein</i>	COPD	Citoplasma/Golgi
AT4G39400	<i>ATBRI1_BIN1_BRI1_CBB2_DWF2_Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein</i>	BRI1	Membrana plasmática/Endomembrana
AT5G42030	<i>ABIL4_ABL interactor-like protein 4</i>	ABIL4	Citoplasma/Citoesqueleto
AT4G03210	<i>XTH9_xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 9</i>	F4JI68;XTH9	Secretada
AT5G47310	<i>PPPDE putative thiol peptidase family protein_Deubiquitinase</i>	Q9LVS8	
AT4G26970	<i>ACO2_aconitase 2 Mitochondrial</i>	ACO2M	Mitocondria
AT3G09630	<i>SAC56_Ribosomal protein L4/L1 family</i>	Q2V3X4; RL4A	Citoplasma/Ribosoma
AT1G65840	<i>ATPAO4_PAO4_polyamine oxidase 4</i>	PAO4	Peroxisoma
AT1G75460	<i>ATP-dependent protease La (LON) domain protein</i>	Q9FWT4	Cloroplasto
AT2G41410	<i>Probable calcium-binding protein CML35</i>	CML35	Citoplasma

AT2G13570	<i>NF-YB7_nuclear factor Y, subunit B7</i>	NFYB7	Núcleo
AT3G55290	<i>SDRd_NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein</i>	F4JFB9; Q94AL3	Peroxisoma
AT5G40200	<i>DEG9_DegP9_DegP protease 9</i>	DEGP9	Núcleo
AT4G31990	<i>AAT3_ASP5_ATAAT1_aspartate aminotransferase 5</i>	AAT5; B9DG21; F4JTH0	Cloroplasto/Amiloplasto
AT2G36000	<i>EMB3114_Mitochondrial transcription termination factor family protein</i>	Q8S8E4; Q9SJ50	Mitocondria
AT1G24050	<i>RNA-processing, Lsm domain</i>	Q8L466	
AT2G23080	<i>Casein kinase II subunit alpha-3</i>	CSK23	Citoplasma/Núcleo
AT5G63980	<i>SAL1 phosphatase_ALX8_AtFRY1_ATSAL1_FR1_H OS2_RON1_SAL1_SUPO1_Inositol monophosphatase family protein</i>	DPNP1	
AT5G20350	<i>Protein S-acyltransferase 24_TIP1_Ankyrin repeat family protein with DHHC zinc finger domain</i>	ZDH22	Golgi
AT1G27770	<i>ACA1_PEA1_autoinhibited Ca2+-ATPase 1</i>	ACA1; F4HUS8	Endomembrana
AT3G13510	<i>Protein of Unknown Function (DUF239)</i>	Q9LJE0	
AT5G58950	<i>Protein kinase superfamily protein</i>	Q9FIL6	
AT1G76450	<i>PsbP domain-containing protein 3, Chloroplastoic_Photosystem II reaction center PsbP family protein</i>	PPD3	Tilacoide
AT5G45130	<i>Ras-related protein RABF2a_ATRABF2A_RAB-F2A_RAB5A_RABF2A_RHA1_RAB homolog 1</i>	RAF2A	Endomembrana
AT2G33255	<i>Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein</i>	GPPL3	Cloroplasto/Citoplasma/ER
AT5G07020	<i>MAINTENANCE OF PSII UNDER HIGH LIGHT 1 MPH1_proline-rich family protein</i>	MPH1	Tilacoide
AT3G12480	<i>NF-YC11_nuclear factor Y, subunit C11</i>	Q9LHG0	Núcleo
AT5G00480	<i>Uncharacterized protein</i>	A0A178ULA 0	
AT5G14450	<i>GDLS-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein</i>	GDL76	Secretada
AT1G12910	<i>ATAN11_LWD1_Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein</i>	LWD1	Núcleo
AT1G66250	<i>Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 2_O-Glycosyl hydrolases family 17 protein</i>	E132	Membrana plasmática
AT1G17620	<i>Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family</i>	Q9LNP3	Núcleo/Membrana plasmática/Plasmodesmo
AT4G16510	<i>YbaK/aminoacyl-tRNA synthetase-associated domain</i>	Q940I4	
AT2G43810	<i>LSM6B_Small nuclear ribonucleoprotein family protein</i>	LSM6B	Citoplasma/Núcleo
AT1G13270	<i>MAP1B_MAP1C_methionine aminopeptidase 1B Chloroplastoic</i>	F4HQQ8; MAP1B	Cloroplasto
AT1G72160	<i>Patellin-3 PATL3_Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein</i>	PATL3	Endomembrana/Citoplasma
AT2G39460	<i>60S ribosomal protein L23a-1</i>	R23A1	Citoplasma/Ribosoma/Golgi/ Nucleolo/Secretada/ Plasmodesmo
AT4G18640	<i>MALE DISCOVERER 2 MDIS2_MRH1_Leucine-rich repeat protein kinase family protein</i>	MDIS2	Endomembrana
AT5G39740	<i>60S ribosomal protein L5-2</i>	RL52	Citoplasma/Núcleo/Nucleolo
AT3G25050	<i>AtXTH3_XTH3_xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 3</i>	XTH3	Secretada
AT5G09620	<i>Octicosaepptide/Phox/Bem1p family protein</i>	Q9LXC6	Membrana plasmática

AT5G22420	<i>FAR7_fatty acid reductase 7</i>	FACR7	Endomembrana
AT1G28660	<i>GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein</i>	GDL12	Secretada
AT5G47030	<i>ATPase, F1 complex, delta/epsilon subunit Mitochondrial</i>	ATP4	Mitocondria
AT4G32551	<i>LUG_RON2_Transcriptional corepressor LEUNIG_LisH dimerisation motif;WD40/YVTN repeat-like-containing domain</i>	F4JUD2; LEUNIG	Núcleo
AT3G60450	<i>Phosphoglycerate mutase family protein</i>	Q9M214	
AT3G62550	<i>Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein</i>	Q93W91	Vacuola
AT2G35810	<i>Ureidoglycolate hydrolase</i>	Q8VZP3	
AT4G25670	<i>Stress response NST1-like protein</i>	Q94BX3	

Tabla A3. Análisis de términos *Gene Ontology* (GO) de categorías funcionales sobre-representadas entre las proteínas interactoras de VQ1 identificadas en el rastreo de Y2H.

Términos GO (proceso biológico)	<i>Arabidopsis thaliana</i> - REFLIST (27430)	upload_1 (280)	upload_1 (expected)	upload_1 (fold Enrichment)	upload_1 (raw P- value)	upload_1 (FDR)
<i>generation of precursor metabolites and energy (GO:0006091)</i>	407	22	4,15	5,3	5,93E-10	3,49E-06
<i>small molecule metabolic process (GO:0044281)</i>	2857	62	29,16	2,13	1,26E-08	3,70E-05
<i>cellular process (GO:0009987)</i>	14852	191	151,61	1,26	2,24E-06	3,29E-03
<i>pyruvate metabolic process (GO:0006090)</i>	81	8	0,83	9,68	3,42E-06	4,03E-03
<i>alpha-amino acid metabolic process (GO:1901605)</i>	368	16	3,76	4,26	2,17E-06	4,25E-03
<i>cellular metabolic process (GO:0044237)</i>	8829	127	90,12	1,41	6,05E-06	4,45E-03
<i>nucleotide metabolic process (GO:0009117)</i>	313	14	3,2	4,38	6,92E-06	4,53E-03
<i>carboxylic acid metabolic process (GO:0019752)</i>	1537	36	15,69	2,29	5,42E-06	4,56E-03
<i>organonitrogen compound metabolic process (GO:1901564)</i>	5422	88	55,35	1,59	5,22E-06	5,12E-03
<i>nucleoside phosphate metabolic process (GO:0006753)</i>	324	14	3,31	4,23	1,01E-05	5,92E-03
<i>glucose metabolic process (GO:0006006)</i>	46	6	0,47	12,78	1,39E-05	7,44E-03
<i>photosynthesis (GO:0015979)</i>	210	11	2,14	5,13	1,69E-05	8,31E-03
<i>organonitrogen compound biosynthetic process (GO:1901566)</i>	1431	33	14,61	2,26	1,86E-05	8,40E-03
<i>alpha-amino acid biosynthetic process (GO:1901607)</i>	175	10	1,79	5,6	2,02E-05	8,51E-03
<i>nucleobase-containing small molecule metabolic process (GO:0055086)</i>	415	15	4,24	3,54	3,63E-05	1,19E-02
<i>cellular amino acid biosynthetic process (GO:0008652)</i>	190	10	1,94	5,16	3,94E-05	1,22E-02
<i>cellular amino acid metabolic process (GO:0006520)</i>	566	18	5,78	3,12	3,16E-05	1,24E-02
<i>organic acid metabolic process (GO:0006082)</i>	2088	42	21,31	1,97	3,59E-05	1,24E-02
<i>oxoacid metabolic process (GO:0043436)</i>	1953	40	19,94	2,01	3,41E-05	1,25E-02
<i>glutamine family amino acid metabolic process (GO:0009064)</i>	59	6	0,6	9,96	5,06E-05	1,42E-02
<i>glutamine metabolic process (GO:0006541)</i>	17	4	0,17	23,05	5,33E-05	1,43E-02
<i>ribose phosphate metabolic process (GO:0019693)</i>	238	11	2,43	4,53	5,05E-05	1,49E-02
<i>monosaccharide metabolic process (GO:0005996)</i>	127	8	1,3	6,17	7,20E-05	1,57E-02
<i>metabolic process (GO:0008152)</i>	10826	144	110,51	1,3	6,13E-05	1,57E-02
<i>dicarboxylic acid metabolic process (GO:0043648)</i>	92	7	0,94	7,45	6,73E-05	1,58E-02
<i>response to light stimulus (GO:0009416)</i>	2003	40	20,45	1,96	7,00E-05	1,59E-02
<i>response to cadmium ion (GO:0046686)</i>	92	7	0,94	7,45	6,73E-05	1,65E-02
<i>ATP metabolic process (GO:0046034)</i>	97	7	0,99	7,07	9,19E-05	1,80E-02
<i>biosynthetic process (GO:0009058)</i>	3327	57	33,96	1,68	1,01E-04	1,80E-02
<i>response to radiation (GO:0009314)</i>	2045	40	20,87	1,92	8,72E-05	1,83E-02
<i>purine nucleotide metabolic process (GO:0006163)</i>	211	10	2,15	4,64	9,09E-05	1,84E-02
<i>response to abiotic stimulus (GO:0009628)</i>	4114	67	41,99	1,6	9,98E-05	1,84E-02
<i>sulfur amino acid biosynthetic process (GO:0000097)</i>	41	5	0,42	11,95	9,93E-05	1,89E-02
<i>organic substance biosynthetic process (GO:1901576)</i>	3119	54	31,84	1,7	1,38E-04	2,32E-02

<i>primary metabolic process (GO:0044238)</i>	8191	114	83,61	1,36	1,34E-04	2,32E-02
<i>purine ribonucleoside triphosphate metabolic process (GO:0009205)</i>	105	7	1,07	6,53	1,46E-04	2,39E-02
<i>photosynthesis, light reaction (GO:0019684)</i>	142	8	1,45	5,52	1,50E-04	2,39E-02
<i>purine-containing compound metabolic process (GO:0072521)</i>	231	10	2,36	4,24	1,84E-04	2,65E-02
<i>ribonucleotide metabolic process (GO:0009259)</i>	229	10	2,34	4,28	1,72E-04	2,67E-02
<i>purine nucleoside triphosphate metabolic process (GO:0009144)</i>	109	7	1,11	6,29	1,82E-04	2,68E-02
<i>monosaccharide biosynthetic process (GO:0046364)</i>	47	5	0,48	10,42	1,79E-04	2,70E-02
<i>organophosphate metabolic process (GO:0019637)</i>	599	17	6,11	2,78	1,97E-04	2,77E-02
<i>small molecule biosynthetic process (GO:0044283)</i>	898	22	9,17	2,4	2,59E-04	3,47E-02
<i>glutamate metabolic process (GO:0006536)</i>	27	4	0,28	14,51	2,59E-04	3,54E-02
<i>sulfur amino acid metabolic process (GO:0000096)</i>	52	5	0,53	9,42	2,77E-04	3,54E-02
<i>ribonucleoside triphosphate metabolic process (GO:0009199)</i>	117	7	1,19	5,86	2,75E-04	3,59E-02
<i>glutamine family amino acid biosynthetic process (GO:0009084)</i>	29	4	0,3	13,51	3,31E-04	3,75E-02
<i>glycolytic process (GO:0006096)</i>	54	5	0,55	9,07	3,26E-04	3,76E-02
<i>photosynthetic electron transport chain (GO:0009767)</i>	53	5	0,54	9,24	3,01E-04	3,77E-02
<i>ATP generation from ADP (GO:0006757)</i>	54	5	0,55	9,07	3,26E-04	3,84E-02
<i>purine ribonucleotide metabolic process (GO:0009150)</i>	203	9	2,07	4,34	3,26E-04	3,91E-02
<i>sulfur compound biosynthetic process (GO:0044272)</i>	160	8	1,63	4,9	3,25E-04	3,98E-02
<i>purine nucleoside diphosphate metabolic process (GO:0009135)</i>	56	5	0,57	8,75	3,81E-04	4,08E-02
<i>hexose metabolic process (GO:0019318)</i>	88	6	0,9	6,68	3,90E-04	4,10E-02
<i>purine ribonucleoside diphosphate metabolic process (GO:0009179)</i>	56	5	0,57	8,75	3,81E-04	4,15E-02
<i>electron transport chain (GO:0022900)</i>	125	7	1,28	5,49	4,02E-04	4,15E-02
<i>ADP metabolic process (GO:0046031)</i>	56	5	0,57	8,75	3,81E-04	4,23E-02
<i>L-serine metabolic process (GO:0006563)</i>	31	4	0,32	12,64	4,17E-04	4,24E-02
<i>organic substance metabolic process (GO:0071704)</i>	9807	129	100,11	1,29	4,37E-04	4,36E-02
<i>nucleoside triphosphate metabolic process (GO:0009141)</i>	128	7	1,31	5,36	4,60E-04	4,51E-02
<i>NADH dehydrogenase complex assembly (GO:0010257)</i>	33	4	0,34	11,87	5,18E-04	4,92E-02
<i>monocarboxylic acid metabolic process (GO:0032787)</i>	655	17	6,69	2,54	5,34E-04	4,99E-02
<i>pentose-phosphate shunt (GO:0006098)</i>	33	4	0,34	11,87	5,18E-04	5,00E-02
Términos GO (función molecular)						
<i>copper ion binding (GO:0005507)</i>	191	10	1,95	5,13	4,11E-05	6,72E-02
<i>hydrolase activity (GO:0016787)</i>	2694	50	27,5	1,82	4,57E-05	4,98E-02
<i>catalytic activity (GO:0003824)</i>	8348	131	85,21	1,54	1,47E-08	4,80E-05
Términos GO (componente celular)						
<i>chloroplast inner membrane (GO:0009706)</i>	63	5	0,64	7,77	6,30E-04	3,26E-02
<i>plastid inner membrane (GO:0009528)</i>	67	5	0,68	7,31	8,19E-04	3,84E-02
<i>plastid stroma (GO:0009532)</i>	751	31	7,67	4,04	1,07E-10	3,68E-08

<i>chloroplast stroma (GO:0009570)</i>	735	30	7,5	4	2,83E-10	7,30E-08
<i>chloroplast thylakoid membrane (GO:0009535)</i>	345	13	3,52	3,69	8,04E-05	5,19E-03
<i>plastid thylakoid membrane (GO:0055035)</i>	353	13	3,6	3,61	1,00E-04	5,75E-03
<i>thylakoid membrane (GO:0042651)</i>	381	14	3,89	3,6	5,57E-05	4,43E-03
<i>photosynthetic membrane (GO:0034357)</i>	386	14	3,94	3,55	6,37E-05	4,70E-03
<i>plastid membrane (GO:0042170)</i>	484	17	4,94	3,44	1,57E-05	1,35E-03
<i>plastid envelope (GO:0009526)</i>	861	30	8,79	3,41	9,64E-09	1,24E-06
<i>cytosolic ribosome (GO:0022626)</i>	294	10	3	3,33	1,13E-03	4,16E-02
<i>chloroplast thylakoid (GO:0009534)</i>	445	15	4,54	3,3	7,76E-05	5,35E-03
<i>plastid thylakoid (GO:0031976)</i>	451	15	4,6	3,26	8,96E-05	5,45E-03
<i>chloroplast envelope (GO:0009941)</i>	608	20	6,21	3,22	7,13E-06	7,36E-04
<i>envelope (GO:0031975)</i>	1283	38	13,1	2,9	6,70E-09	1,15E-06
<i>organelle envelope (GO:0031967)</i>	1283	38	13,1	2,9	6,70E-09	9,89E-07
<i>thylakoid (GO:0009579)</i>	547	15	5,58	2,69	6,56E-04	3,23E-02
<i>plasmodesma (GO:0009506)</i>	888	20	9,06	2,21	1,09E-03	4,88E-02
<i>cell-cell junction (GO:0005911)</i>	888	20	9,06	2,21	1,09E-03	4,67E-02
<i>symplast (GO:0055044)</i>	888	20	9,06	2,21	1,09E-03	4,49E-02
<i>anchoring junction (GO:0070161)</i>	888	20	9,06	2,21	1,09E-03	4,31E-02
<i>cell junction (GO:0030054)</i>	888	20	9,06	2,21	1,09E-03	4,15E-02
<i>cytosol (GO:0005829)</i>	2648	56	27,03	2,07	2,31E-07	2,66E-05
<i>chloroplast (GO:0009507)</i>	5068	105	51,73	2,03	1,12E-13	5,76E-11
<i>plastid (GO:0009536)</i>	5484	112	55,98	2	2,97E-14	3,07E-11
<i>organelle membrane (GO:0031090)</i>	1552	31	15,84	1,96	4,05E-04	2,20E-02
<i>cytoplasm (GO:0005737)</i>	14835	202	151,43	1,33	7,89E-10	1,63E-07
<i>intracellular anatomical structure (GO:0005622)</i>	21574	249	220,22	1,13	9,31E-06	8,75E-04



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA