



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

Mecanismo molecular de la función de OBP4 en
Arabidopsis thaliana

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Corradi, Matteo

Tutor/a: Agusti Feliu, Javier

Director/a Experimental: BRUNOT GARAU, PAULA

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

OBP4, UN POTENCIAL REGULADOR DEL CRECIMIENTO

Trabajo Final de Máster



AUTOR: MATTEO CORRADI

DIRECTORES: JAVIER AGUSTÍ FELIU | PAULA BRUNOT GARAU



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ibmcp

Instituto de Biología Molecular
y Celular de Plantas

Resumen

Durante el transcurso de la evolución, las plantas adquirieron un sistema vascular, lo que contribuyó enormemente a su éxito en un medio terrestre, permitiéndoles adaptarse a diferentes tipos de ambientes y aumentar su tamaño, tanto en altura como en anchura. El sistema vascular se divide en sistema vascular primario y secundario, el primero permite que las plantas crezcan en altura y se llama crecimiento primario, mientras que el segundo permite el crecimiento radial y se llama crecimiento secundario. El conocimiento de los complejos mecanismos, tanto hormonales como genéticos, que regulan el crecimiento en general es de gran importancia. No sólo desde el punto de vista científico sino también económico: por ejemplo, el sistema vascular secundario forma la madera, lo que permite a las plantas fijar el dióxido de carbono absorbido de la atmósfera. En los últimos años se han logrado grandes avances en la comprensión de los mecanismos reguladores del crecimiento, sin embargo los investigadores siempre están buscando nuevos descubrimientos que puedan mejorar y profundizar el conocimiento de este fenómeno. El trabajo que aquí se presenta parte de un fenotipado de mutantes realizado sobre 13 genes encontrados en un estudio de variación natural asociada a transcriptómica en *Arabidopsis thaliana* (Brunot-Garau et al, en preparación) que permitió identificar un factor de transcripción potencial regulador negativo del crecimiento: OBP4. En este estudio, se analizaron los fenotipos mutantes T-DNA y CRISPR de OBP4, con el objetivo de obtener más datos para dilucidar mejor la posible función reguladora de OBP4.

Palabras clave: Desarrollo vegetal, crecimiento secundario, *Arabidopsis thaliana*, fenotipado mutantes, CRISPR/Cas9, OBP4.

Abstract

During the course of evolution, plants acquired a vascular system, which contributed enormously to their success in a terrestrial environment, allowing them to adapt to different types of environments and to increase their size, both in height and width. The vascular system is divided into primary and secondary vascular systems, the first allows plants to grow in height and is called primary growth, while the second allows radial growth and is called secondary growth. Knowledge of the complex mechanisms, both hormonal and genetic, that regulate growth in general is of great importance. Not only from a scientific point of view but also from an economic one, for example the secondary vascular system forms wood, allowing plants to fix carbon dioxide absorbed from the atmosphere. In recent years, great advances have been made in understanding the regulatory mechanisms of growth, however researchers are always looking for new discoveries that can improve and deepen knowledge of this phenomenon. The work presented here starts from a mutants phenotyping o carried out on 13 genes encountered

in a study of natural variation associated with transcriptomics in *Arabidopsis thaliana* (Brunot-Garau et al, in preparation) which allowed the identification of a transcription factor that is a potential negative regulator of growth. : OBP4. In this study, the T-DNA and CRISPR mutant phenotypes of OBP4 were analyzed, with the aim of obtaining more data to better elucidate the possible regulatory function of OBP4.

Keywords: Plant development, secondary growth, *Arabidopsis thaliana*, mutant phenotyping, CRISPR/Cas9, OBP4.

1. Introducción	
1.1. Crecimiento primario.....	6
1.2. Crecimiento secundario.....	7-8
1.3. Regulación del crecimiento secundario.....	8-9
1.3.1. Control hormonal.....	9-10
1.3.2. Control genético.....	10
1.4. Resultados preliminares.....	11-14
2. Objetivos.....	14
3. Resultados.....	14
3.1. OBP4 se acumula en la epidermis y la cofia radicular.....	15
3.2. OBP4 se localiza en la parte central del SAM.....	15-16
3.3. OBP4 se acumula en el xilema en diferenciación y en las células cambiales....	16-17
3.4. La acumulación de OBP4 es mayor a 16°C y 22°C.....	17-18
3.5. El ABA regula positivamente la acumulación de OBP4.....	19-20
3.6. Los mutantes CRISPR y T-DNA (SALKseq_108296.1) proporcionan datos más sólidos que los obtenidos anteriormente de otros mutantes.....	20
3.7. Identificación de mutantes CRISPR para OBP4.....	20-21
3.8. OBP4 no parece ser, en raíces, un regulador negativo del crecimiento.....	22-24
4. Discusión.....	24-26
5. Conclusiones.....	27
6. Materiales y métodos.....	27
6.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	27
6.2. Análisis histológicos.....	27
6.2.1. Análisis fenotípico de crecimiento secundario.....	27
6.2.2. Localización de proteínas.....	28
6.2.3. Patrón de acumulación de proteínas en respuesta a temperatura y ABA...28	
6.3. Mutantes.....	28
6.3.1. Generación de mutante mediante CRISPR.....	28
6.3.2. Genotipados para seleccionar los mutantes deseados.....	29
6.3.3. Análisis fenotípico de mutantes.....	29
7. Referencias.....	30-34
8. Anexos.....	35

INTRODUCCIÓN

La capacidad de las plantas para aumentar su tamaño, tanto en altura como en anchura, ha permitido mejorar notablemente su adaptabilidad a diferentes tipos de ambientes. En el curso de la evolución, las plantas adquirieron un sistema vascular, lo que contribuyó en gran medida al éxito de las plantas terrestres. El sistema vascular permite a las plantas transportar rápidamente agua y nutrientes a largas distancias entre las raíces, que crecen profundamente en el suelo, y los brotes, que crecen hacia arriba, hacia el sol. Es importante destacar que también proporciona soporte mecánico al cuerpo de la planta. (1)

Tanto en parte aérea como en raíz el crecimiento longitudinal (también denominado primario) está mediado por la actividad del SAM (meristemas apicales del tallo) y el RAM (meristemas apicales de la raíz), mientras que el crecimiento radial/en grosor (también llamado secundario) es mediado por el cambium (21). El cambium es un meristemo secundario que da lugar exclusivamente a los tejidos vasculares: xilema (especializado en el transporte de agua y elementos minerales desde el suelo) y floema (especializado en transportar fotoasimilados y moléculas señalizadoras). El crecimiento, tanto primario como secundario, conduce a un aumento de la biomasa total de la planta. En las especies leñosas el xilema secundario es la madera, conocer los mecanismos que regulan el crecimiento de este órgano es muy importante y de gran interés para el ser humano. De hecho, un aumento de la biomasa supondría aumentar la productividad de algunas especies vegetales, así como mejorar la capacidad de las plantas para absorber dióxido de carbono de la atmósfera, contribuyendo a reducir la concentración de este gas de efecto invernadero y regulando el delicado equilibrio entre los gases que componen la atmósfera. Por esta razón y por el papel que juegan los tejidos vasculares en el funcionamiento de la planta, el crecimiento secundario se considera un proceso crucial tanto a nivel fisiológico como productivo. Además de en tallos y raíces, el crecimiento secundario se da también en hipocotilos, órganos que se definen como un excelente modelo para estudiar la vasculatura secundaria. Una notable ventaja es que la elongación y el crecimiento secundario se encuentran desacoplados en el hipocótilo. La elongación del hipocótilo cesa a los 4-5 días después de la germinación (ddg), mientras que el crecimiento secundario se inicia a los 5-6 ddd, tras la formación del cambium (2, 3).

Crecimiento primario

El sistema vascular primario está compuesto por el xilema, el floema y el procambium. El xilema y el floema primarios son generados por el procambium, un tejido meristemático que deriva de los meristemas apicales del tallo (SAM) y de la raíz (RAM) durante el crecimiento longitudinal. Los meristemas, las fuerzas impulsoras del crecimiento de las plantas, son nichos de células que cumplen los dos criterios que definen a las células madre: el automantenimiento y la capacidad de dar lugar a células hijas capaces de diferenciarse en al menos un tipo de célula

especializada (6). El meristemo apical del tallo (SAM) es un sistema celular dinámico que da origen a órganos durante la vida post-embrionaria de la planta a través de 2 funciones fundamentales. Primero, se mantiene una pequeña cantidad de células pluripotentes en la zona central del meristemo (CZ) con una baja tasa de división celular, asegurando así que la planta tenga una fuente de células indiferenciadas. En segundo lugar, se producirá un aumento en la división de las células que rodean la zona central, que entrarán en fase de diferenciación y producirán nuevos órganos (14). El desarrollo del sistema vascular comienza ya en la embriogénesis, con la formación de células no diferenciadas en el procambium (4, 5). Posteriormente, una serie de divisiones asimétricas del primordio vascular dan origen a la vasculatura radicular.

La organización y disposición de los distintos tejidos que componen el sistema vascular es muy diferente según las especies y el órgano de la planta. En *Arabidopsis thaliana*, especie objeto de este estudio, las raíces en una etapa temprana de desarrollo, muestran un xilema central flanqueado por dos polos de floema, dispuestos perpendicularmente al eje del xilema (8).

Crecimiento secundario

Los tejidos que forman el sistema vascular secundario se originan a partir del cambium vascular, que a su vez deriva del procambium. También en este caso existen algunas diferencias en la formación de los diferentes tejidos vasculares según el órgano. En la raíz e hipocótilo de *Arabidopsis* es el procambium y algunas células del periciclo las que dan lugar al cambium, mientras que en el tallo es gracias a la extensión lateral del cambium fascicular e interfascicular (22). El Cambium está compuesto por una capa de células iniciales que sufren divisiones paralelas a la superficie del cuerpo de la planta llamadas divisiones periclinales, que darán lugar a las células madre. Serán las células madre las que formen, a través de diversas divisiones, las células diferenciadas que forman el xilema y el floema (24).

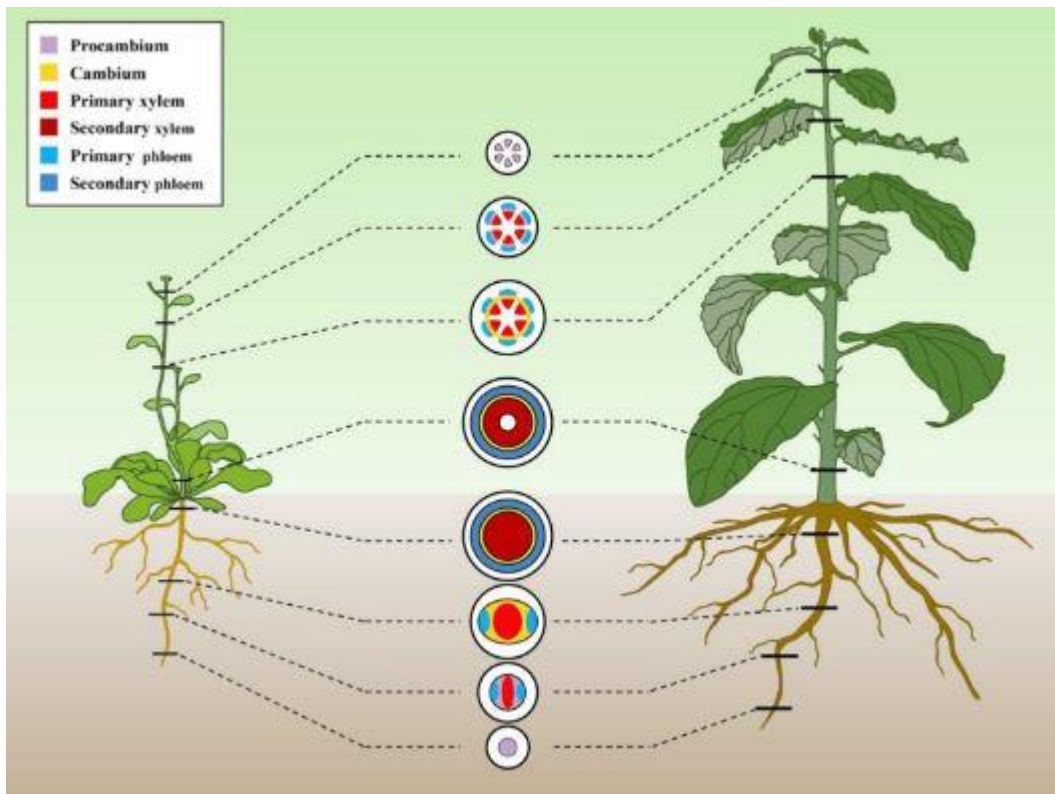


Figura 1. Representación esquemática del desarrollo del xilema en plantas vasculares representadas por *Arabidopsis* y *Chopo*. Imagen modificada de Sun et al, 2022 (23).

En cuanto al hipocótilo, los tejidos se disponen en anillos concéntricos. En la parte más exterior encontramos el floema, en el interior el xilema y entre ambos el cambium vascular. En cuanto al tallo, existen dos tipos diferentes de organización, que dependen de la etapa de desarrollo en la que se encuentran. Cuando el tallo está en una etapa juvenil, la vasculatura se organiza de forma discreta en haces vasculares en los que se diferencian el tejido más externo (floema) y el más interno (xilema), entre los que se encuentra el procambium. En una etapa más avanzada, las células del procambium de distintos haces se conectan gracias a la de-diferenciación de la endodermis del tallo, que forma el llamado cambium interfascicular. La unión entre cambium interfascicular y las regiones procambiales de los haces vasculares resulta en el cambium vascular. En las hojas, sin embargo, la estructura del sistema vascular se caracteriza por el xilema dispuesto en el lado adaxial y por el floema en el lado abaxial (7).

Regulación del crecimiento secundario

En la base del control del crecimiento secundario hay un complejo proceso dirigido por un equilibrio preciso entre proliferación y diferenciación celular a partir del cambium. El control se produce tanto a nivel hormonal (citoquininas, giberelinas, estrigolactona, etileno, ácido jasmónico y brasinosteroides realizan diferentes funciones de control) como a nivel genético (25).

I. Control hormonal

Las hormonas vegetales, también llamadas fitohormonas, se definen como pequeñas moléculas orgánicas sintetizadas por las plantas capaces de realizar numerosas funciones. Entre las principales funciones destacamos la de influir en el desarrollo y crecimiento de la planta, así como producir diversas respuestas para afrontar diferentes tipos de estrés. Las fitohormonas se producen en concentraciones muy bajas y son capaces de actuar incluso sobre organismos cercanos.

Estrigolactonas

Las estrigolactonas son hormonas vegetales que pertenecen al grupo de las lactonas terpénicas y se sintetizan a través de la vía metabólica de los carotenoides. Son capaces de actuar en bajas concentraciones (26), y de ser transportados por toda la planta (28). Se ha demostrado que cumplen funciones fundamentales en el control del desarrollo de la arquitectura vegetal (29), también reprimen la formación de raíces laterales y estimulan el crecimiento de las raíces longitudinales al interactuar con las auxinas (27)

Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona involucrada en procesos esenciales de las plantas, como la maduración, desecación, latencia y germinación de las semillas. Numerosos estudios han demostrado que esta hormona interviene en la respuesta de las plantas frente a diferentes tipos de estrés, en particular la sequía y la salinidad, también limita la pérdida de agua mediante la regulación de la apertura de las estomas y afecta el patrón de expresión de más de 1000 genes (30-33). Además, algunos autores han propuesto que el ABA puede ser un inhibidor del crecimiento en condiciones de estrés pero un promotor del crecimiento en ausencia de estrés (34, 35, 36).

Auxinas

Las auxinas regulan tanto la formación de vasculatura primaria como el crecimiento secundario. Entre las diversas funciones que poseen, es importante mencionar que regulan la iniciación y diferenciación de las células del procambium, que darán lugar a las células de los tejidos vasculares (38). También regulan la formación de haces vasculares continuos (37) y la maduración de las células que forman los vasos (39).

Giberelinas

Las giberelinas actúan como señal móvil, son transportadas desde la zona apical de la planta hasta el hipocótilo, induciendo la expansión del xilema. También son responsables de la diferenciación de las fibras del xilema (41, 42), cuya regulación se produce mediante la interacción con las proteínas DELLA y KNAT1 (40).

Citoquininas

Las citoquininas son importantes reguladores del crecimiento primario (43, 44). La señalización inducida por citoquinina a través de su receptor ARABIDOPSIS HISTIDINA QUINASA4 (AHK4) y los reguladores de respuesta de tipo B ARR1, ARR10 y ARR12 es necesaria para la formación de procambium en las raíces de *Arabidopsis thaliana*. (45, 46, 47). También se ha visto que los factores implicados en la señalización de citoquininas en chopo (*Populus spp*; 48) y en su biosíntesis en *Arabidopsis* (49) parecen ser los principales reguladores de la actividad del cambium actuando como reguladores positivos del crecimiento secundario.

II. Control genético

Como se mencionó anteriormente, los mecanismos que controlan el crecimiento de las plantas vasculares, tanto a nivel de crecimiento primario como secundario, están regulados tanto por la actividad de fitohormonas como a nivel genético. El uso de *Arabidopsis thaliana* como especie modelo ha permitido, en los últimos años, importantes mejoras en la comprensión de los genes que controlan el crecimiento.

Control genético en el SAM

El factor de transcripción WUSCHEL (WUS) está indicado como responsable de mantener la identidad celular en la zona central del meristemo. De hecho, se ha visto que las mutaciones en WUS provocan un fin prematuro de los meristemos florales y del tallo tras la formación de unos pocos órganos. Los genes pertenecientes a la familia CLAVATA (CLV1, CLV2, CLV3) promueven la progresión de las células meristemáticas hacia la formación de órganos. Las mutaciones en uno de estos genes provocan la cancelación de la formación de nuevos órganos, una acumulación de células meristemáticas y un aumento paulatino del tamaño del meristemo (15, 16, 17).

Control genético en el RAM

Durante el crecimiento, las células experimentan una transición de la fase de división a una fase de expansión y diferenciación en distintas zonas de desarrollo (50). Además, los péptidos llamados factores de crecimiento del meristemo de la raíz (RGF) y sus receptores (RGFR), junto con las proteínas correpressoras nucleares GROWTH-REGULATING FACTOR (GRF), regulan la actividad meristemática al influir en la funcionalidad de las proteínas PLETHORA (PLT) (51-54). La expresión de los genes PLT, también llamados genes AINTEGUMENTA-LIKE (AIL), se limita al desarrollo de tejidos en raíces y brotes y controla el patrón de crecimiento y formación de órganos primordiales (55-57).

Control genético en el Cambium

El modelo propuesto para la regulación genética del cambium involucra el péptido señal CLE41(CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED41), que, después de ser secretado en el floema, es reconocido por el receptor tipo quinasa PXY (PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM) en el Cambium. Esta interacción desencadena la vía de señalización que inducirá la proliferación celular, dirigiendo el patrón de los tejidos vasculares

secundarios. Los factores de transcripción WOX4 y WOX14 son algunos de los elementos que participan en esta ruta de señalización, aguas abajo de CLE41-PXY (25, 58).

Resultados preliminares

El grupo de investigación del Dr. Agustí, con el objetivo de encontrar nuevos genes reguladores del crecimiento, emprendió un estudio sobre la variación natural en *Arabidopsis thaliana*. Se analizaron 165 ecotipos (a partir de ahora, accesiones) de *Arabidopsis* clasificadas según el área promedio de tejido vascular. Posteriormente se seleccionaron 8 accesiones y se dividieron en dos grupos: A y B. El grupo A con las accesiones que tienen mayor grado de crecimiento secundario y el grupo B con aquellas que tienen menor grado de crecimiento secundario, mas Columbia que fue utilizado como control. Se llevaron a cabo dos aproximaciones distintas: GWAS (Genome-Wide Association Studies) y transcriptómica comparada. Mediante estas dos aproximaciones se identificaron 13 genes candidatos y posteriormente, con un análisis fenotípico de mutantes (Brunot-Garau et al, en preparación) se identificaron 3 genes: CRK5, MYB52 y OBP4. CRK5 tenía defectos de crecimiento en generales, posiblemente por un efecto pleiotropico, MYB52 se había descrito ya y el mutante *obp4-RNAi* fue el que tuvo mayor crecimiento secundario. Por lo tanto, decidieron centrarse en OBP4. La hipótesis que se propuso fue que OBP4 podría ser un regulador negativo de la proliferación celular en el cambium. Mediante un análisis fenotípico en secciones de hipocotilo del mutante *obp4-RNAi*, se observó que poseía diferencias estadísticamente significativas en área de xilema, área cambial y área total, en comparación con el control (Col-0). Para excluir que el mutante de RNAi generara off-target , también se analizó un mutante OBP4 generado por inserción de T-DNA (SALKseq_085101) , donde solo el área del xilema tenía valores estadísticamente significativos (Fig. 2). Posteriormente, el análisis del patrón de expresión de OBP4, utilizando la línea indicadora *pOBP4:GUS*, mostró que la proteína se expresa en el tejido vascular primario y secundario, mientras que no se expresa en Cambium. El mismo tipo de análisis se realizó en muestras de *Arabidopsis* a una temperatura de 16°C y en presencia de ABA, los resultados obtenidos mostraron una mayor expresión de OBP4 en las raíces en ambas condiciones analizadas en comparación con las condiciones normales (22°C y ausencia de ABA). Gracias a estos últimos resultados parece claro que OBP4 responde a bajas temperaturas y ABA (Brunot-Garau et al, en preparación).

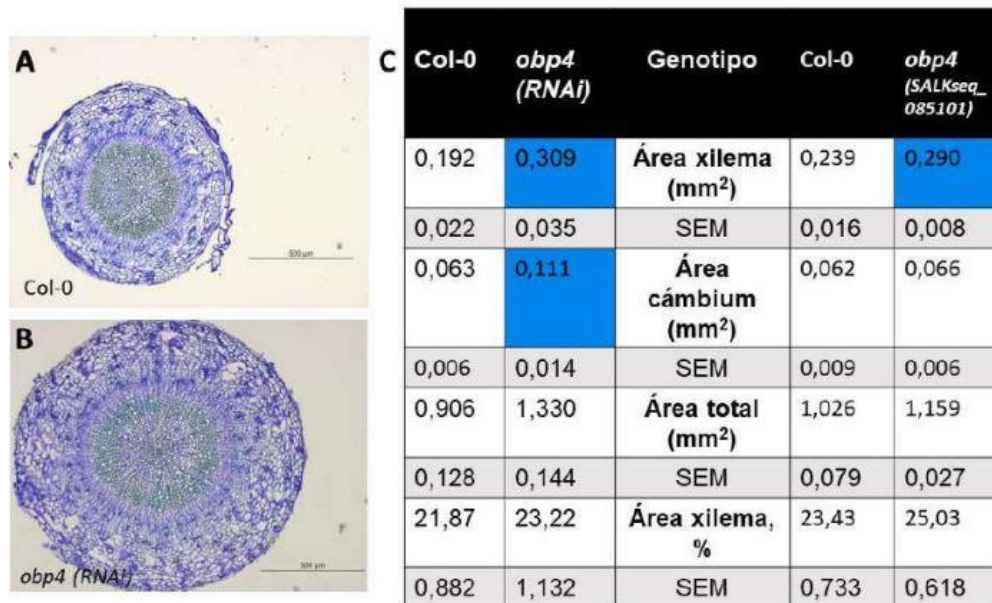


Figura 2. Fenotipado del mutante OBP4. Fenotipo de crecimiento secundario en secciones transversales de hipocótilo de plantas de 17 cm en Col-0 (A) y la línea mutante *obp4* (RNAi) (B). Cuantificación de distintos parámetros de vasculatura secundaria (C). (Imagen modificada de Paula Brunot Garau, 2020)

En concreto, mi trabajo de fin de máster tiene como objetivo general arrojar luz sobre un factor de transcripción, OBP4, un candidato potencial en la regulación transcripcional del crecimiento secundario. OBP4 es una proteína nuclear con actividad de factor de transcripción que forma parte de la familia de proteínas DOF (DNA binding with One Finger). Las proteínas DOF poseen un dominio de unión al DNA conservado en el extremo N-terminal que puede unir secuencias con un motivo AAAG central e interactuar con otras proteínas. Mientras que en el extremo C-terminal hay un dominio regulador transcripcional divergente. El nombre OBP4 deriva de OBF binding Protein 4, donde OBF significa OCS element Binding Factor, una clase específica de factores de transcripción con dominio a cremallera de leucina (bZIP) altamente conservados en plantas.

Estudios anteriores, destinados a buscar proteínas que interactúen con los factores de transcripción bZIP del factor de unión al elemento OCS 4 (en adelante OBF4), encontraron varias proteínas. OBP1, implicada en el control de la división celular; OBP2, que desempeña un papel en la regulación del metabolismo del indol-glucosinolato, y OBP3, que se ha caracterizado como un nuevo componente de la señalización luminosa (10).

Un estudio más reciente realizado por Xu, P. et al. destaca la importancia de OBP4 como regulador negativo de la progresión del ciclo celular y la expansión celular en *Arabidopsis*. La

morfogénesis vegetal, como se mencionó anteriormente, se basa en la relación coordinada entre la proliferación y diferenciación celular. La proliferación es un proceso que aumenta el número de células debido al crecimiento y división de una célula en células hijas. El mecanismo central que regula este proceso es el ciclo celular, conservado en los eucariotas. El ciclo celular se compone de una fase de replicación y una fase mitótica, separadas por dos fases gap, G1 y G2. Su correcto funcionamiento se debe a numerosos mecanismos, por ejemplo mediante la regulación de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) mediante ciclinas, inhibidores de CDK y fosforilaciones. Resultados anteriores han demostrado que OBP1 regula la reentrada en el ciclo celular dirigiéndose a CYCD3;3 y DOF2.3 (Fig. 3).

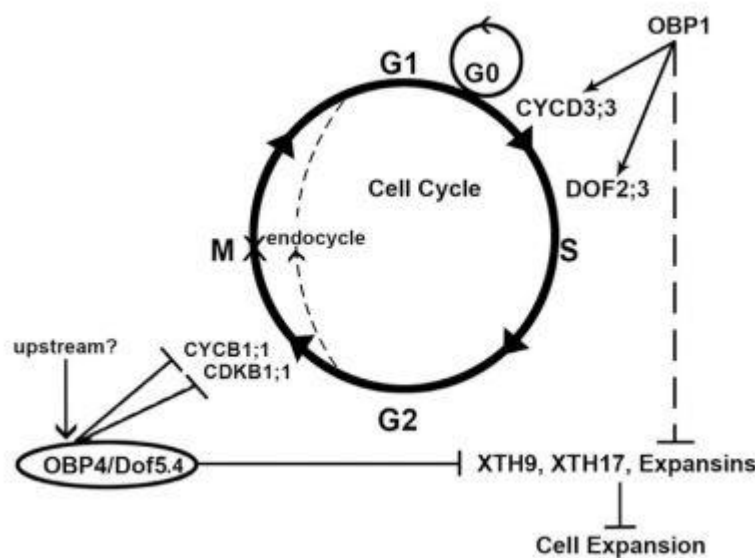


Figura 3. Modelo de la función de OBP4 y OBP1 en la regulación del ciclo celular y la expansión celular. Los reguladores del ciclo celular CYCB1;1, CDKB1;1 y los reguladores de expansión celular XTH9 y XTH17 son dianas de OBP4. OBP4 afecta negativamente tanto a la progresión del ciclo celular como a la expansión celular. (Imagen modificada de Xu et al, 2016), (10)

Para caracterizar la función de OBP4, analizaron plantas transgénicas con actividad de OBP4 aumentada o reducida.

Líneas de expresión constitutiva de OBP4 exhibían defectos de crecimiento, mientras que las mismas líneas de OBP4 fusionada a un dominio de activación promovía el crecimiento.

- 1) La expresión de OBP4 estuvo presente en todos los órganos analizados (plántula, raíz, ápices, hojas en roseta, hojas de caulina, silicuas y flores) pero en diferentes niveles.
- 2) Los valores de expresión de OBP4 de un análisis de qPCR fueron consistentes con los resultados de la tinción con GUS.

El momento y la localización de la expresión de OBP4 sugieren que este factor de transcripción desempeña un papel en la regulación del ciclo celular.

De hecho, se informa que su sobreexpresión causa una transición defectuosa de la fase G2 a la fase M. Además, plantearon la hipótesis de que OBP4 tenía un papel en la fase temprana del

endociclo, hipótesis confirmada por el hecho de que la activación de OBP4 conducía a una fase G2 más larga y a un inicio más temprano de la endoreplicación. Estos resultados demuestran que la endoreplicación se inicia gracias a la interacción de OBP4 con ciclinas de tipo B y quinasas dependientes de ciclina. OBP4 también inhibe la expansión celular al regular negativamente los factores de expansión de la pared celular (xiloglucano endotransglucosilasa-hidrolasas: XTH9, XTH17, expansinas). Para confirmar aún más la hipótesis de que OBP4 regula negativamente la elongación celular mediante la represión transcripcional de factores esenciales para la expansión de la pared, los autores generaron líneas sobrerrepresoras de OBP4 que exhibieron represión genética de estos factores esenciales. Además, mediante un análisis ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) observaron que tanto los factores que regulan la proliferación celular como los que regulan la expansión de la pared son dianas directas de OBP4 (10).

Ramírez-Parra et al. observaron un comportamiento diferente de OBP4 según el tipo de tejido vegetal. En el meristemo de la raíz, la expresión de varias ciclinas y quinasas dependientes de ciclina no se alteró en líneas que sobreexpresan OBP4. En cambio, sí se detectó represión de la expansina EXP17. Por tanto, de este estudio se desprende que OBP4 regula el crecimiento primario a través de una regulación transcripcional, exclusivamente, de la elongación celular. Sin embargo, observan que la proliferación celular y la formación de callos aumentan en las células del periciclo. Estos resultados refuerzan una idea ya propuesta sobre las proteínas DOF: OBP4 podría actuar regulando positivamente o negativamente un mismo gen diana, en función de los interactores (20).

Objetivos

Los objetivos propuestos para este trabajo son los siguientes:

- I. Analizar el patrón de acumulación de OBP4 en los meristemos apicales de raíz y tallo así como en el cambium.
- II. Analizar el patrón de acumulación de OBP4 en los meristemos apicales de raíz y tallo y en el cambium en respuesta a ABA y temperatura.
- III. Examinar nueva línea mutante de inserción de T-DNA y aislar una nueva línea mutante *obp4* generada mediante la tecnología CRISPR-Cas9.

Resultados

Como se ha comentado anteriormente, este trabajo tiene su origen en un estudio previo cuyo objetivo de identificar nuevos genes reguladores del crecimiento secundario (Brunot-Garau et al., en preparación). Dicho trabajo identificó el factor de transcripción OBP4 como un posible regulador negativo del crecimiento secundario. Además, los resultados del análisis del patrón de expresión espacio-temporal de OBP4 mediante ensayos GUS, no solo reforzaron la hipótesis, sino que muestran que OBP4 se expresa en la vasculatura primaria de la raíz y la hoja, así como en el tejido vascular secundario en desarrollo del hipocótilo. Además, se observa una mayor actividad del promotor en el meristemo apical y en la vasculatura de la raíz en

condiciones de baja temperatura (16° C) y en presencia de ABA. Para obtener más información acerca de la actividad de OBP4, se planteó una primera aproximación encaminada a entender el patrón de acumulación de la proteína OBP4.

OBP4 se acumula en la epidermis y la cofia radicular.

El análisis de microscopía confocal se realizó en una línea OBP4::OBP4-GFP. Se tomaron muestras de raíces de plantas cultivadas in vitro, se tiñeron con yoduro de propidio que tiñe las paredes celulares y se analizaron con un microscopio confocal. Los resultados muestran claramente que, en condiciones normales de temperatura, la proteína se acumula en los núcleos de las células de la epidermis, de la cofia radicular y de la vasculatura central.

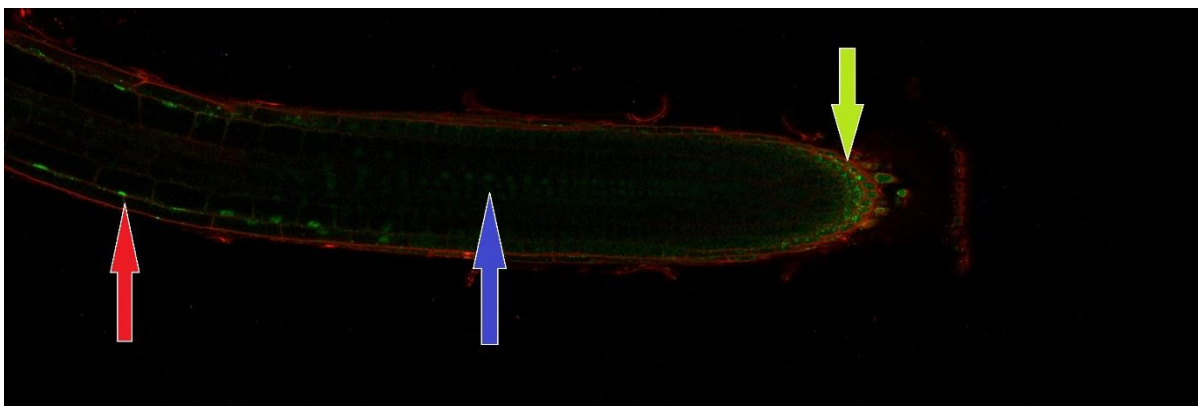


Figura x. Patrón de acumulación de OBP4 en condiciones normales. Imágenes de confocal de meristemo apical de la raíz primaria de plántulas de dos semanas de *A. thaliana* línea OBP4::OBP4-GFP. La flecha roja indica el núcleo de una célula epidérmica, la azul indica la vasculatura central de la raíz mientras que la flecha verde claro indica las células que forman la cofia radicular.

OBP4 se localiza en la parte central del SAM

Posteriormente, analizamos la localización de OBP4 en el meristemo apical del tallo (SAM). Las muestras analizadas pertenecen a la misma línea (OBP4::OBP4-GFP) utilizada en el análisis anterior, y fueron teñidas con FM4-64, una molécula que tiñe las membranas celulares. Una vez posicionado el meristemo en una placa de Agar, que cumple una función de soporte, se procedió a eliminar delicadamente cualquier primordio foliar que hubiera dificultado la observación del meristemo al microscopio. El análisis confocal muestra una acumulación de OBP4 en la parte central del meristemo apical del tallo, mientras que está ausente en los primordios foliares que lo rodean.

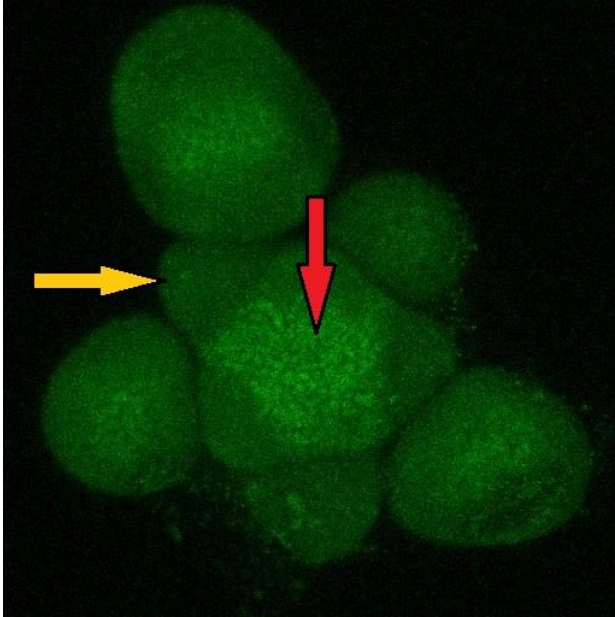


Figura x. Patrón de acumulación de OBP4 en condiciones normales. Imágenes de confocal de meristemo apical del tallo de línea OBP4::OBP4-GFP. Comparación entre la parte central del SAM (flecha roja) y un primordio foliar (flecha amarilla).

OBP4 se acumula en el xilema en diferenciación y en las células cambiales.

Se analizó el patrón de acumulación en el Cambium, meristemo secundario, usando la misma línea OBP4::OBP4-GFP. Los resultados muestran señal GFP en el núcleo de las células que forman el xilema en diferenciación y en las cambiales.

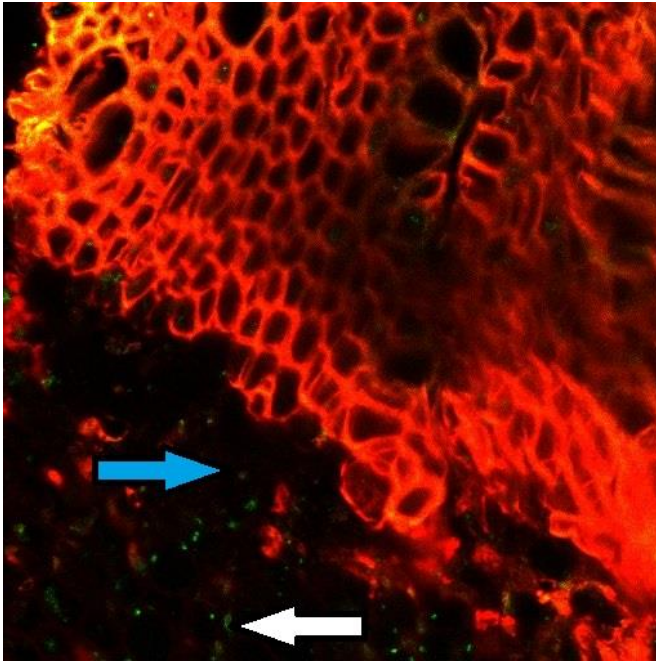


Figura x. Patrón de acumulación de OBP4 en condiciones normales. . Imágenes de confocal de meristemo secundario (Cambium) de línea OBP4::OBP4-GFP. Acumulación de OBP4 en el núcleo de una célula del xilema en diferenciación (flecha azul) y en una célula del cambium (flecha blanca).

La acumulación de OBP4 es mayor a 16°C y 22°C.

Para evaluar el patrón de acumulación de OBP4 en diferentes condiciones de temperatura, se cultivaron 6 placas Petri que contenían 12 plántulas líneas OBP4::OBP4-GFP en condiciones normales durante 2 semanas y se analizaron muestras de raíz primaria. Posteriormente se colocaron 2 placas a 16°C, 2 a 22°C y 2 a 28°C durante 1 día. El análisis de microscopía confocal se realizó al día siguiente y mostró una mayor intensidad de señal de GFP a 22°C y 16°. Sin embargo, las diferencias encontradas no fueron significativas, se observa una tendencia que es acorde con la observación previa de mayor actividad del promotor en condiciones de baja temperatura. Los valores analizados se refieren exclusivamente a la línea OBP4::OBP4-GFP número 27.4, ya que las muestras de raíces de la línea 10.16 sufrieron graves daños tras su colocación en el microscopio confocal.

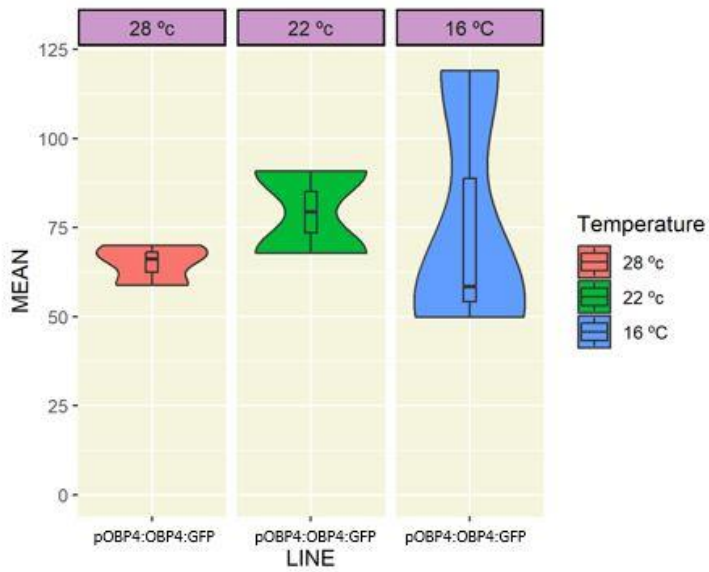
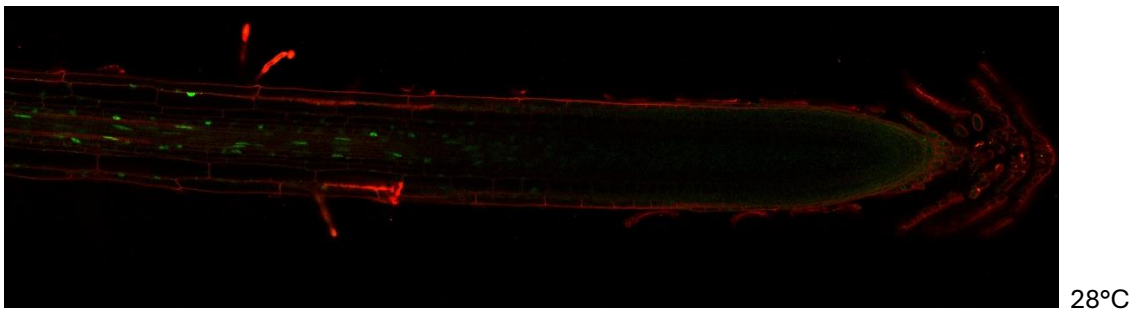
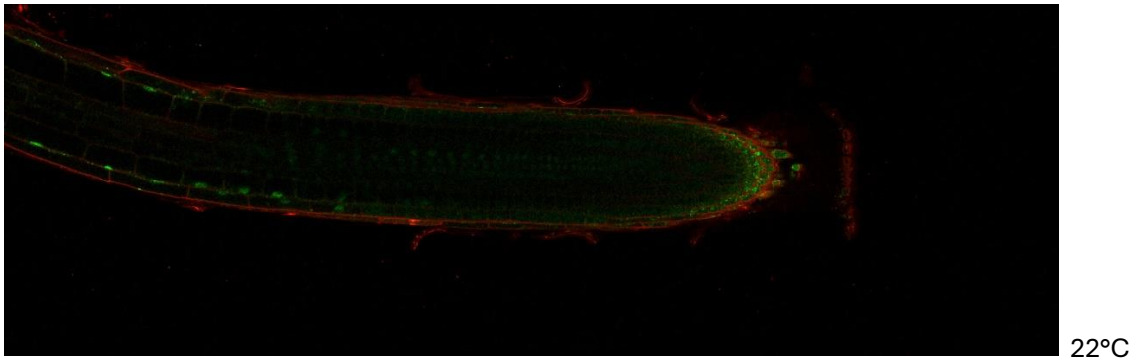
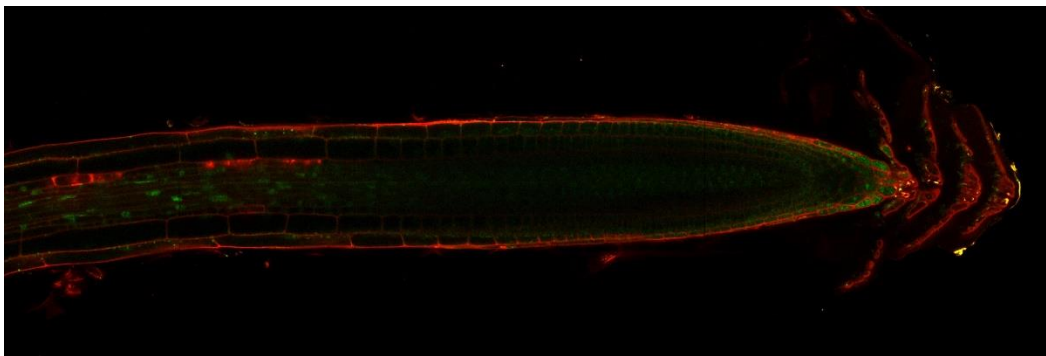


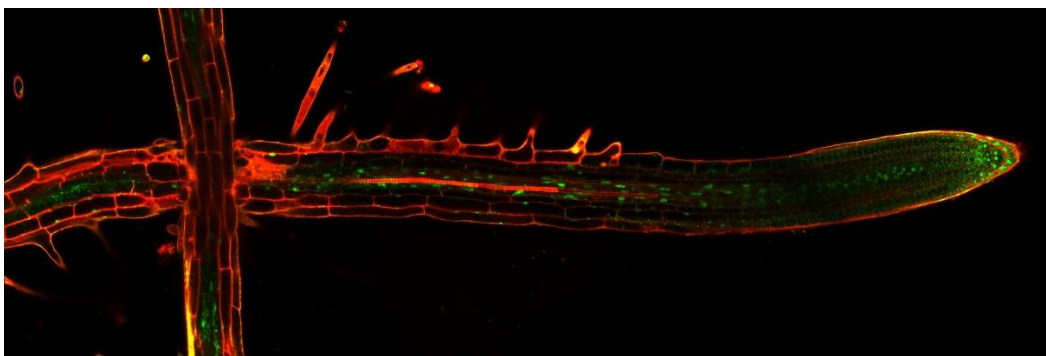
Figura x. Acumulación de OBP4 en diferentes condiciones de temperatura. Comparación del número promedio de células que muestran acumulación de OBP4. Las células con fluorescencias consideradas tienen un tamaño que oscila entre 10 y 200 μm y una circularidad entre 0,4 y 1 μm .

El ABA regula positivamente la acumulación de OBP4.

Se realizó un experimento similar al anterior, las plántulas se cultivaron a una temperatura de 22°C durante 2 semanas y luego la mitad se sometió a tratamiento con ABA a concentración 50 uM durante un día y la otra mitad se mantuvo sin tratamiento. Posteriormente se procedió al análisis de acumulación de proteína utilizando microscopía confocal sobre muestra la raíz primaria. Los resultados son consistentes con los niveles de actividad del promotor descritos previamente (Brunot-Garau et al., en preparación), dado que se observó una mayor acumulación de OBP4 en las muestras que se sometieron a tratamiento con ABA en comparación con aquéllas que se mantuvieron en condiciones estándar (MOCK). Para comprender el efecto que ejerce la presencia de ABA sobre la acumulación de OBP4, las imágenes obtenidas fueron cuantificadas con el software ImageJ y los valores de intensidad de señal nuclear obtenidos se separaron según las condiciones de tratamiento en el software RStudio, donde se realizó el análisis estadístico t-test considerando un p-value < 0,05, para mostrar cualquier diferencia estadísticamente significativa. Los resultados obtenidos se muestran en el gráfico de la figura.



MOCK



ABA

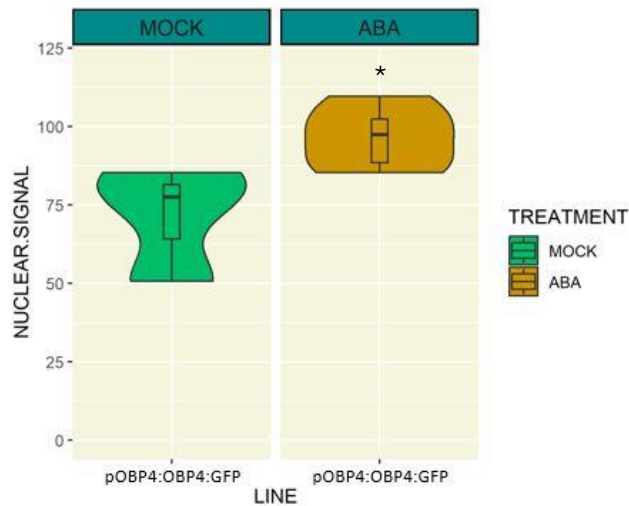


Figura x. Acumulación de OBP4 en condiciones MOCK y ABA. Comparación de la intensidad de la señal de GFP en muestras de raíces primarias de plántulas de 2 semanas de edad en condiciones MOCK y ABA.

Los mutantes CRISPR y T-DNA (SALKseq_108296.1) proporcionan datos más sólidos que los obtenidos anteriormente de otros mutantes.

Los datos obtenidos del fenotipado de mutantes realizado en estudios anteriores (Brunot et al.) sobre un mutante *obp4*-RNAi mostraron un aumento general del crecimiento en los distintos parámetros de la vasculatura secundaria analizados. Diferencias que resultaron significativas en el área del xilema secundario y en el área total del hipocótilo. El uso de una línea mutante de RNAi puede generar algunos problemas técnicos que pueden afectar la fiabilidad de los datos obtenidos. Las mutaciones por RNA de interferencia generan mutantes knock-down, lo que significa que la expresión del gen en cuestión no se anula totalmente (como en las mutaciones knock-out), sino que queda una cierta cantidad de expresión residual. Además, en estos mutantes no es posible excluir la presencia de off-targets. Para excluir esta última posibilidad, se llevó a cabo el mismo análisis fenotípico del hipocótilo de OBP4 en un mutante generado por inserción de T-DNA (SALKseq_085101), obteniendo resultados que, pese a mostrar una tendencia similar a la observada en los análisis llevados a cabo con el mutante RNAi, no fueron concluyentes (Brunot-Garau et al., en preparación). Con el fin de clarificar el fenotipo *obp4* en relación al crecimiento, hemos utilizado un mutante CRISPR -que se ha identificado en este trabajo- y otra línea de T-DNA (SALKseq_108296.1).

Identificación de mutantes CRISPR para *OBP4*

Nos centramos en la identificación de mutantes con un alto porcentaje de knock-out e índices predictivos. De esta forma aumentan las posibilidades de que la edición genética mediada por CRISPR se haya producido de manera precisa. A través de una serie de análisis genotípicos y de secuenciación de 96 líneas mutantes CRISPR de *Arabidopsis thaliana*, fue posible encontrar dos líneas muy prometedoras. La primera línea encontrada (CRISPR:OBP4:LOTE2.23) tuvo una tasa predictiva de knock-out del 100 % y un porcentaje de delección de una base del 100 %. El

mutante es muy útil para realizar análisis fenotípicos, sin embargo la delección está en una zona que no parece cambiar el patrón de lectura, cosa que sí ocurre si se utiliza la otra guía.

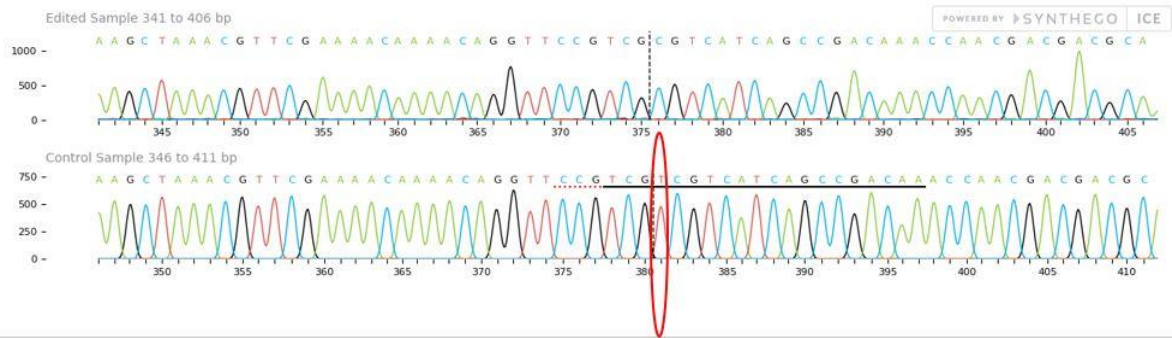


Figura x. Resultados secuenciaciones CRISPR:OBP4:LOTE 2.23. Espectro secuencia OBP4, el pico resaltado por el círculo en la parte inferior de la figura (secuencia de control Col-0) indica el nucleótido que se eliminó en los mutantes generados utilizando la segunda guía de la secuencia editada (parte superior de la figura).

El segundo mutante encontrado (CRISPR:OBP4:LOTE4.51) tiene un porcentaje predictivo de knock-out del 60 % y la inserción de una base en la guía 1, Un cambio en la primera guía cambiaría por completo la pauta de lectura, permitiéndonos obtener una edición más precisa del gen. Por esta razón, el segundo mutante resulta ser el más interesante encontrado en este estudio. Sin embargo, habiendo encontrado este mutante solo hacia el final de mi TFM, los análisis fenotípicos que presentaré a continuación se realizaron utilizando el primer mutante CRISPR identificado (CRISPR:OBP4:LOTE2.23).

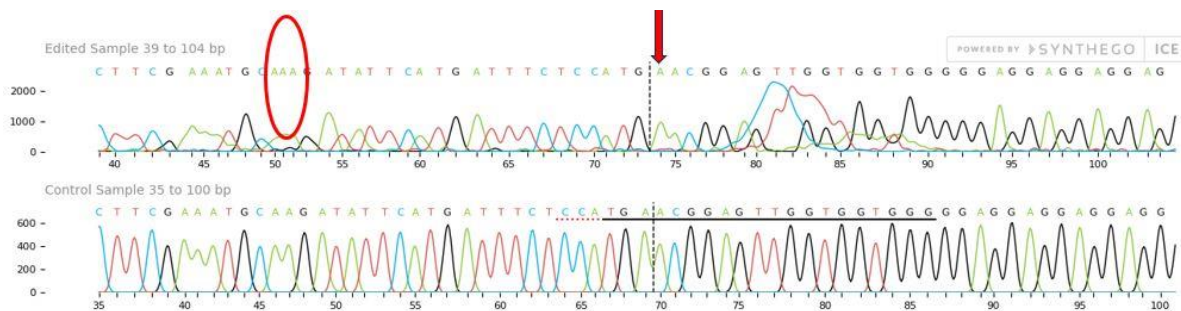


Figura x. Resultados secuenciaciones CRISPR:OBP4:LOTE 4.51. Espectro secuencia OBP4, la parte rodeada en rojo indica el área de la secuencia donde ocurrió la inserción, mientras que la flecha indica el cambio en la secuencia que ocurrió en la primera guía.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

OBP4	MQDIHDFSMNGVGGGGGGGRFFGGGIGGGGGDRRMRAHQNNILNHHQSLKCPRCNSLN	60
Edited	MQDIHDFSMNGVGGGGGGGRFFGGGIGGGGGDRRMRAHQNNILNHHQSLKCPRCNSLN	60

OBP4	TKFCYNNYNLSQPRHFCNKCRRYWTKGGVLRNVPVGGGCRKAKRSKTKQVPSSSSADKP	120
Edited	TKFCYNNYNLSQPRHFCNKCRRYWTKGGVLRNVPVGGGCRKAKRSKTKQVPSRHQPTNQ	120
***** . :		
OBP4	TTTQDDHHVEEKSSSTGSHSSSESSSLTASNSTTVAAV-SVTAAAEVASSVIPGDMPNMK	179
Edited	RRRK---MIITWR-----RNRVQDLTAAARALLSPLLLPPS---PPSPSPRRRKLRR	168
: : .. ** : : : : : : * * :		
OBP4	IYNGIEWSTLLGQSSAGGVFSEIGGFPAVSAIETTPFGFGGKFNQDDHLKLEGETVQ	239
Edited	LFQVLI---CLI-----	177
: : * * :		
OBP4	QQQFGDRTAQVEFQGRSSDPNMGFEPLDWGSGGDQTLFDLTSTVDHAYWSQSQWTSSDQ	299
Edited	-----	177
OBP4	DQSGLYLP	307
Edited	-----	177

Figura x. Alineamiento secuencia de aminoácidos mutante CRISPR editado. El codón de stop se resalta donde termina la secuencia de aminoácidos.

OBP4 no parece ser, en raíces, un regulador negativo del crecimiento.

Los genotipos analizados en este experimento fueron RNAi, T-DNA y CRISPR, y se compararon con el control Col-0. El fenotipo se analizó en 2 condiciones diferentes, una primera condición ABA/MOCK y una segunda condición PEG/MOCK, esta última para evaluar posibles cambios fenotípicos por sequía, considerando que PEG (polietilenglicol) cambia el potencial osmótico del medio en el que crecen las plántulas, simulando un efecto de sequía. Los mutantes se cultivaron *in vitro* durante 7 días en condiciones normales. Posteriormente, dos fracciones de plantas fueron cultivadas durante 7 días con los dos tratamientos diferentes. El análisis de diferentes parámetros (longitud de raíces primarias, número de raíces secundarias y densidad de raíces) no destacó diferencias significativas de los diferentes mutantes en comparación con el control, tanto en las condiciones MOCK/ABA como en MOCK/PEG. Los fenotipos observados indican que, en raíces, OBP4 no parece ser un regulador negativo del crecimiento.

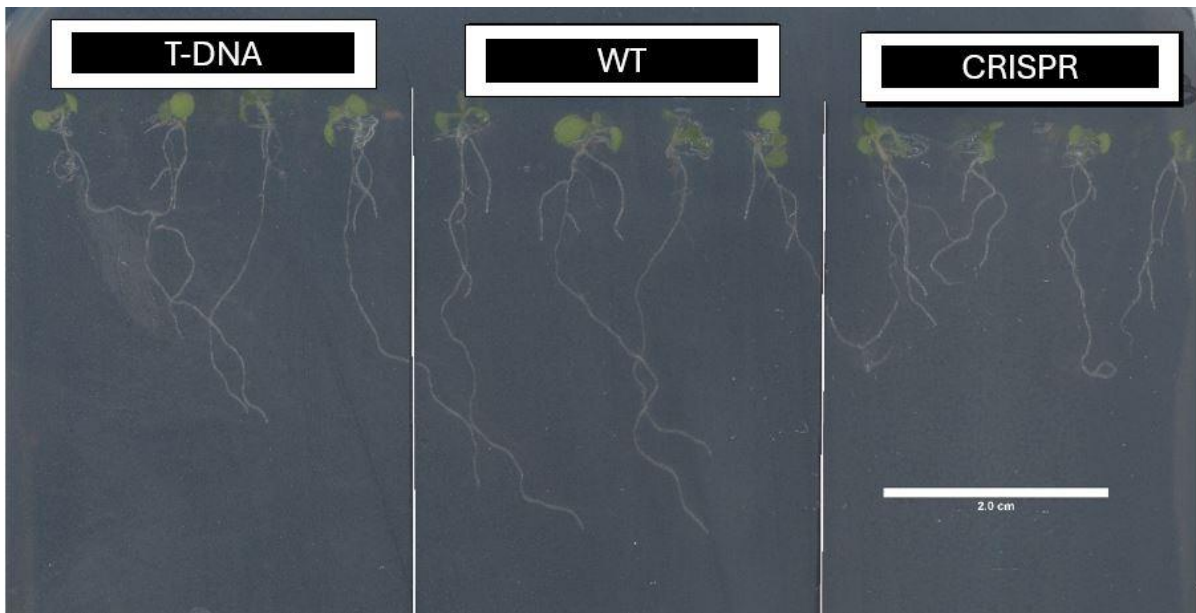


Figura x. Análisis fenotípico de mutantes *OBP4*. Comparación fenotípica de la longitud de la raíz primaria de mutantes CRISPR y T-DNA con control (WT). Condiciones de crecimiento: ABA a una concentración de 10 μ M.

Posteriormente, se realizó un análisis fenotípico en secciones de hipocotilo de plantas de aproximadamente 20 cm de altura, pertenecientes a diferentes genotipos (RNAi, T-DNA y CRISPR) y se compararon con el control (Col-0). El objetivo principal de este análisis es observar cualquier diferencia significativa entre los parámetros de crecimiento secundarios examinados de los diferentes genotipos. Los parámetros considerados fueron el área del xilema y el área total del hipocótilo. Los resultados obtenidos, a pesar de mostrar diferencias en función del genotipo al que pertenecen, no destacan diferencias estadísticamente significativas en los parámetros examinados en los mutantes respecto al control. Además, los resultados sugieren que los resultados obtenidos previamente en los que se observaba una tendencia a un mayor crecimiento en mutantes *obp4*, podrían haber estado sesgados por el hecho de haber utilizado una línea RNAi. Todavía falta por analizar una línea CRISPR que nos ayudará a acabar de determinar el papel de *OBP4* en el crecimiento, tanto primario como secundario.

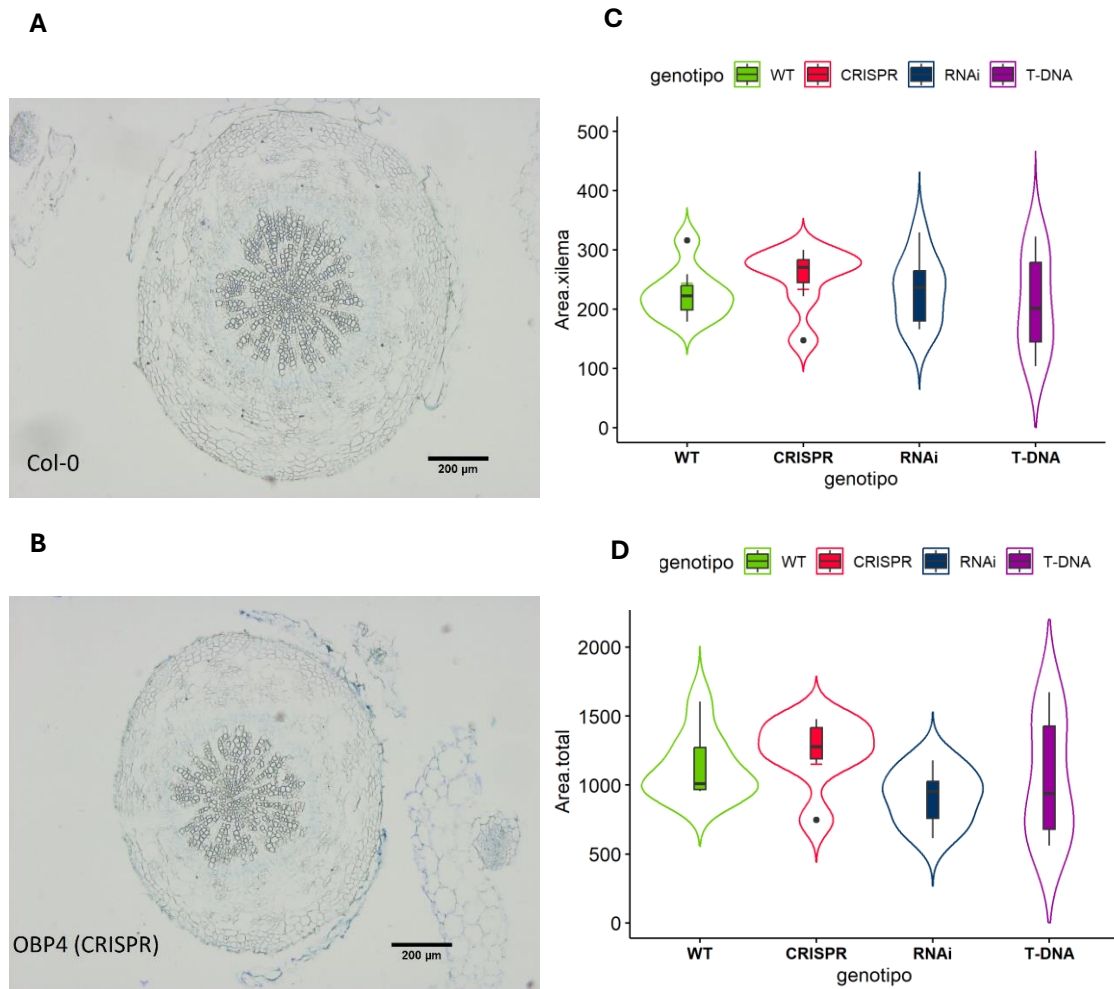


Figura x. Fenotipado del mutante obp4. Fenotipo de crecimiento secundario en secciones transversales de hypocótilo de plantas de 20 cm en Col-0 (A) y la línea mutante obp4 (CRISPR) (B). Resultados de la comparación entre los valores de área de xilema (C) y área total (D) del hypocótilo en los diferentes genotipos examinados.

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionaron información útil para comprender mejor la actividad del factor de transcripción OBP4, una proteína nuclear que forma parte de la familia de proteínas DOF (DNA binding with One Finger). Se sabe que numerosas proteínas DOF participan en el desarrollo de las plantas y responden a estímulos ambientales (10). En relación con el desarrollo de las plantas, especialmente el crecimiento (primario y secundario), uno de los principales mecanismos reguladores es el ciclo celular, que a su vez está controlado por numerosos mecanismos como la regulación de ciclinas dependiente de quinasas (CDKs) de ciclinas y fosforilaciones (11).

El análisis de microscopía confocal realizado en las raíces de la línea OBP4::OBP4-GFP en *Arabidopsis thaliana*, destinado a evaluar el patrón de acumulación de OBP4, muestra una localización nuclear de la proteína en las células que componen la epidermis, la cofia radicular

y la vasculatura central. La acumulación de OBP4, observada en los núcleos celulares de los tejidos mencionados, sugiere una función en la regulación del crecimiento. Un estudio de Xu, P. et al. (10) identifica a OBP4 como un regulador negativo de la progresión del ciclo celular y la expansión celular en *Arabidopsis*, habiendo observado una transición defectuosa de la fase G2 a la fase M del ciclo celular en mutantes que sobreexpresan OBP4. También se plantea la hipótesis de que OBP4 puede tener un papel en la fase inicial del endociclo (12), interactuando con ciclinas tipo B y ciclinas dependientes de quinasas (13). Se realizó un segundo análisis del patrón de acumulación de OBP4 en el meristemo apical del tallo (SAM). Los resultados muestran una clara acumulación de OBP4 en la parte central del SAM, excepto en los primordios foliares que lo rodean. La localización de OBP4 en la parte central del SAM podría significar que interactúa con factores de transcripción responsables de mantener la identidad celular del meristemo. Una hipotética interacción con el factor de transcripción WUSCHEL (WUS), responsable de mantener una baja tasa de división celular en la zona central del meristemo (14), conduciría a una limitación del crecimiento. Un tercer análisis del patrón de acumulación de OBP4 en condiciones normales de temperatura (22°C) muestra que la proteína se localiza en los núcleos de las células que forman el xilema en diferenciación y en aquellas cambiales.

Posteriormente, se analizó el patrón de acumulación de la proteína en la raíz de *Arabidopsis* bajo tres condiciones de temperatura diferentes. Los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas en la acumulación de OBP4 a las diferentes temperaturas examinadas. Sin embargo, es posible observar una tendencia que concuerda con resultados preliminares (Brunot-Garau et al., en preparación) obtenidos mediante ensayos GUS en condiciones de baja temperatura, que muestran la expresión de OBP4 en la raíz primaria de *Arabidopsis*.

El ácido abscísico (ABA) es uno de los principales reguladores del crecimiento de las plantas en respuesta a diferentes cambios ambientales. Varios estudios han descrito que el ABA inhibe el crecimiento de los pelos radiculares en *Arabidopsis* (18), reduciendo el crecimiento en un 50% a una concentración inicial de 1 μM , en comparación con el control (19). El patrón de acumulación de OBP4 en presencia de ABA a una concentración de 50 μM , realizado en este trabajo en muestras de raíces primarias de *Arabidopsis*, muestra una clara inducción de la acumulación de la proteína, con una diferencia estadísticamente significativa en comparación con la condición MOCK. Los resultados obtenidos concuerdan con la tendencia mostrada en los ensayos GUS (Brunot-Garau et al., en preparación), en el que la presencia de ABA induce la expresión de OBP4 a nivel de raíz. Cabe destacar que, en el estudio de Rymen et al (19), se observó un aumento estadísticamente significativo en la acumulación de OBP4-GFP en todas las células epidérmicas de la raíz, provocando acumulación de la proteína también en las células meristemáticas, donde es poco detectable en ausencia de ABA.

El análisis genotípico realizado en 96 líneas mutantes OBP4 CRISPR, con el objetivo de identificar líneas mutantes que tuvieran una alta tasa de knock-out predictiva e indels, condujo a la identificación de dos mutantes. El primer mutante encontrado se caracteriza por la

presencia de una tasa de knock-out predictiva del 100%, con la delección de una base en la segunda guía y una tasa de predicción del 100%. La construcción del mutante CRISPR generado previamente y utilizado en este trabajo implica el uso de dos guías dentro del gen, por lo que, en este primer mutante encontrado, la delección se localiza en un área que no parece cambiar el patrón de lectura. En cambio, el segundo mutante encontrado tiene una tasa de knock-out predictiva más baja (60%), con la inserción de una base al nivel de la primera guía. Aunque la tasa de inserción predictiva es menor que la del mutante encontrado anteriormente (60%), el hecho de que esté en la primera guía aumenta la probabilidad de que se produzca un cambio en el patrón de lectura en este mutante. Al haber encontrado el segundo mutante sólo hacia el final de este trabajo, no fue posible realizar análisis fenotípicos, que se realizaron exclusivamente en el primer mutante encontrado.

Estudios recientes han propuesto que OBP4 puede actuar como un regulador negativo del ciclo celular y, en consecuencia, del crecimiento (10, 20). En ambos estudios se observa la misma relación de OBP4 con el crecimiento: la sobreexpresión de OBP4 provoca una disminución del crecimiento longitudinal de las raíces primarias en *Arabidopsis* y una reducción del tamaño de la planta en general (10, 20), mientras que las líneas de *Arabidopsis thaliana* que poseen expresión reprimida de OBP4 se caracterizan por mostrar un mayor crecimiento. El análisis fenotípico sobre diferentes mutantes de OBP4 (RNAi, T-DNA y CRISPR) no mostró diferencias estadísticamente significativas en los diferentes parámetros analizados (longitud de la raíz primaria, número de raíces secundarias y densidad de raíces secundarias en función de la longitud de las primarias), tanto en presencia de ABA como de PEG. Estos resultados sugieren que, en raíces, OBP4 no parece ser un regulador negativo del crecimiento secundario. Desde el punto de vista del control genético, se observó que la expresión génica de reguladores conocidos del crecimiento secundario en el mutante *obp4* generado por inserción de T-DNA (SALKseq_085101) indica una expresión reducida de BP (BREVIPEDICELLUS), MOL1, PXY (PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM), SOBIR1 (SUPPRESSOR OF BIR-1), RUL1 y WOX4 en el mutante comparado con el control (WT) (Brunot-Garau et al., en preparación). Mientras que la expresión de OBP4 en *pxy*, *sobir1* y *wox4* no se vio alterada; estos resultados podrían sugerir o bien que OBP4 actúa aguas arriba de los genes reguladores del crecimiento secundario, o bien que desarrolla su actividad a través de una ruta diferente a las rutas mediante las cuales actúan dichos genes. Se necesitan más estudios para aclarar la función de OBP4 en relación con el crecimiento secundario. En el análisis fenotípico realizado en secciones de hipocótilo de plantas de *Arabidopsis* de aproximadamente 20 cm de altura y pertenecientes a los diferentes genotipos examinados (CRISPR), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el área del xilema y el área total del hipocótilo. Estos resultados, junto con los mencionados anteriormente, refuerzan aún más la hipótesis de que OBP4 no actúa como un regulador negativo del crecimiento secundario en raíces.

Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en este trabajo se enumeran a continuación:

- I. OBP4 se localiza en el núcleo de las células que forman los meristemos primarios y secundarios en *Arabidopsis thaliana*.
- II. La acumulación de OBP4 es inducida por ABA.
- III. En raíces, OBP4 no parece ser un regulador del crecimiento, a pesar de que otros estudios sí identifican la proteína como reguladora del crecimiento en parte aérea.

Materiales y métodos

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Los mutantes analizados en este estudio pertenecen al ecotipo *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col), el mutante por inserción de T-DNA, procedente de la colección SALK, se obtuvo del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC). Todo el material vegetal fue cultivado durante las generaciones necesarias para identificar líneas homocigotas.

Las semillas fueron esterilizadas en una solución de etanol 70% con tritón-X (0,05%) durante 10 minutos. Posteriormente, tras haber descartado el sobrenadante, se realizó otro lavado con etanol 100% durante 2 minutos. Después de este lavado final, las semillas se secan y están listas para ser sembradas.

Las plantas sembradas en tierra se cultivaron a 22 °C con un régimen de 16 h de luz / 8 h de oscuridad. Como sustrato se utilizó una mezcla de 3:1 (v/v) de compost de semillas y vermiculita respectivamente. En cuanto a las plantas cultivadas in vitro crecieron en un medio de cultivo con un contenido de 4,3 g/L de sales Murashige and Skoog (MS), 5 g/L de Phyto agar y 10 g/L de sacarosa en placas cuadradas (12 cm x 12 cm) a un pH de 5,7. Las placas se mantuvieron en posición vertical durante todo el período de crecimiento.

Análisis histológicos

- I. Análisis fenotípico de crecimiento secundario

Los análisis de crecimiento secundario se llevaron a cabo en plantas adultas cultivadas en tierra con un tallo de al menos 17 cm. Para este tipo de análisis, se tomaron hipocótilos e inmediatamente se colocaron en una solución de etanol al 70% y se almacenaron a una temperatura de 4°C. Las muestras fueron embebidas en parafina tras ser procesadas con el procesador automático de tejidos Leica TP 1020. Se generaron secciones transversales de 8-10 µm usando el microtomo Microm HM 310, montado en agua sobre portaobjetos de vidrio fijadas por calor. Las muestras fueron desparafinadas y teñidas con azul de toluidina al 0,02%. Luego, se tomaron imágenes con el microscopio Leica DM5000 B. En este análisis histológico

se analizó el área total del hipocótilo y el área ocupada por el xilema en el área total. Las imágenes fueron procesadas mediante el uso del software ImageJ.

II. Localización de proteínas

Se realizó un análisis con un microscopio confocal Zeiss 780 AxioObserver con el objetivo de localizar la proteína OBP4 en el meristemo primario de la raíz, en el meristemo apical y en el cámbium (meristemo secundario) del tallo de la inflorescencia. El material vegetal utilizado para este análisis fue una línea transgénica con el promotor endógeno (pOBP4) junto al gen, *OBP4*, fusionado a GFP (green fluorescent protein). Las muestras de raíces y de meristemo secundario fueron teñidas con yoduro de propidio (10 mg/ml) que tiñe las paredes celulares, mientras que las muestras de meristemo del tallo primario se tiñeron con FM4-64, que tiñe las membranas celulares. Este tipo de análisis se realizó en condiciones normales de temperatura. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el software disponible en el microscopio Confocal Zeiss 780 AxioObserver.

III. Patrón de acumulación de proteínas en respuesta a temperatura y ABA

Simultáneamente con este estudio de localización, se realizó la cuantificación de la intensidad de la señal de GFP inicialmente en el meristemo primario de la raíz a 3 condiciones de temperatura diferentes y, en un segundo experimento, en presencia de ácido abscísico (ABA). Las diferentes condiciones de temperatura fueron 16°, 22° y 28°C, mientras que la concentración de ABA utilizada fue 50 μ M. Las muestras tomadas para realizar estos experimentos, tanto para localizar la proteína como para evaluar su patrón de acumulación, procedieron de las líneas con la construcción *pOBP4:OBP4:GFP* cultivados in vitro. Las plantas se cultivaron durante 14 días en condiciones normales en un medio MS y posteriormente se sometieron a las diferentes condiciones de tratamiento (tanto de temperatura como de ABA) durante 1 día. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImageJ (v. 1.47) y los resultados de la cuantificación se graficaron con la plataforma R-Studio.

Mutantes

I. Generación de mutante mediante CRISPR

La construcción utilizada para generar el mutante CRISPR tiene 2 guías en el mismo exón, aunque el proceso de clonación se realizó previamente en el laboratorio con la construcción pUBQ:Cas9:tNos, y yo me encargué de la transformación con el método "floral dip" utilizando un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* transformado con nuestra construcción. Hemos preparado el precultivo de *Agrobacterium* con 3 antibióticos, 2 específicos por la cepa (rifampicina y gentamicina) y 1 específico del vector (kanamicina). Para preparar el precultivo de *Agrobacterium* hemos añadido en 200 mL de medio LB 1X (200 μ L) de kanamicina, 1X de gentamicina y 3X de rifampicina. a partir del precultivo saturado se preparó un cultivo de 200mL en el que se sumergieron las flores de *Arabidopsis thaliana*.

II. Genotipados para seleccionar los mutantes deseados

Se extrajo y purificó DNA genómico, tanto de los mutantes CRISPR cuanto de T-DNA, a partir de hojas de *Arabidopsis* mediante el método descrito por Edwards y et al. Los cebadores utilizados se enumeran en la Tabla 1. Luego de purificar el DNA extraído y amplificar el fragmento de nuestro interés con los respectivos cebadores mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) se procedió a su precipitación mediante el protocolo que describo a continuación.

Añadimos un volumen de cloroformo isoamilo equivalente al volumen total que tenemos de PCR y centrifugamos a 1800 g durante 5 minutos. Transferimos la fase superior a un nuevo tubo Eppendorf. Procedemos ahora añadiendo una décima parte del volumen previamente tomado (fase de arriba) de NaAc 3M y 3 volúmenes de etanol 100%. Se deja precipitar a -20°C durante al menos 30 minutos. Una vez pasados los 30 minutos centrifugamos durante 5 minutos a 1800 g y eliminamos el sobrenadante con la pipeta. Lavamos con etanol al 70%, volvemos a centrifugar durante 5 minutos a la misma velocidad y eliminamos el sobrenadante. Dejamos secar ahora todo al aire y, una vez completamente seco, lo resuspendemos en 20 uL de agua MilliQ. El producto de la PCR precipitado ya se puede enviar al servicio de secuenciación de la Universidad Politécnica de Valencia. Los datos de secuenciación fueron posteriormente analizados con el programa Synthego.

III. Análisis fenotípico de mutantes

Se realizó una comparación entre varios mutantes: el mutante CRISPR con los datos de secuenciación más prometedores (alto porcentaje de KOs e Indels), un mutante de RNAi, uno para inserción de T-DNA y Columbia-0 como control. Las muestras se cultivaron en placas de Petri cuadradas, 3 genotipos por placa y con 4 muestras por genotipo, para un total de 12 plántulas por placa. Las muestras se cultivaron durante 6 días en un fitotrón con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y una temperatura de 22°C. Una vez transcurridos 6 días, se escanearon las placas y se midieron diversos caracteres fenotípicos, como la longitud de la raíz primaria, el número de raíces secundarias y su densidad, calculada como la relación entre el número de raíces secundarias y la longitud de la raíz primaria. Una vez obtenidas las medidas, se graficaron mediante la plataforma RStudio.

Referencias

1. Hiroo Fukuda*, Kyoko Ohashi-Ito, Current Topics in Developmental Biology, Volume 131 # 2019 Elsevier Inc. ISSN 0070-2153 All rights reserved. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.10.005>
2. Sibout R, Plantegenet S, Hardtke CS. Flowering as a Condition for Xylem Expansion in Arabidopsis Hypocotyl and Root. *Curr Biol* [Internet]. 2008 Mar 25 [cited 2019 Aug 27];18(6):458–63. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982208002571#fig4>
3. Zhang J, Elo A, Helariutta Y. Arabidopsis as a model for wood formation. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2019 Aug 16];22(2):293–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21144727>
4. Demura T, Fukuda H. Transcriptional regulation in wood formation. *Trends Plant Sci* [Internet]. 2007 Feb [cited 2019 Aug 16];12(2):64–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17224301>
5. Ye Z-H. VASCULAR TISSUE DIFFERENTIATION AND PATTERN FORMATION IN PLANTS . *Annu Rev Plant Biol*. 2002 Jun;53(1):183–202.
6. Marie Baucher, Mondher El Jaziri, Olivier Vandeputte. *Journal of Experimental Botany*, Volume 58, Issue 13, October 2007, Pages 3485–3501, <https://doi.org/10.1093/jxb/erm185>
7. De Rybel B, Mähönen AP, Helariutta Y, Weijers D. Plant vascular development: From early specification to differentiation. Vol. 17, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 30–40
8. Ben Scheres, Philip Benfey, and Liam Dolan, *Arabidopsis Book*. 2002; 1: e0101. Published online 2002 Sep 30. doi: 10.1199/tab.0101
9. Kamil Růžička, Robertas Ursache, Jan Hejátko, Ykä Helariutta, Xylem development – from the cradle to the grave. *New Phytologist* Volume 207, Issue 3 p. 519-535
10. Peipei Xu, Haiying Chen, LuYing & Weiming Cai. AtDOF5.4/OBP4, a DOF Transcription Factor Gene that Negatively Regulates Cell Cycle Progression and Cell Expansion in Arabidopsis thaliana. DOI: 10.1038/srep27705
11. Tsukaya, H. Organ shape and size: a lesson from studies of leaf morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 57–62 (2003).
12. Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W. & Murray, J. A. H. Genome-wide gene expression in an Arabidopsis cell suspension. *Plant Mol Biol* 53, 423–442 (2003).
13. Inze, D. & De Veylder, L. Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics* 40, 77–105 (2006).

14. Clark S.E, Running M.P, Meyerowitz E.M. CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis. *Development*. 1993; 119: 397-418
15. Clark S.E, Running M.P, Meyerowitz E.M. CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1. *Development*. 1995; 121: 2057-2067
16. Kayes J.M, Clark S.E. CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in Arabidopsis. *Development*. 1998; 125: 3843-3851
17. Laufs P, Grandjean O, Jonak C, Kieu K, Traas J. Cellular parameters of the shoot apical meristem in Arabidopsis. *Plant Cell*. 1998; 10 (b): 1375-1390
18. Schnall JA, Quatrano RS (1992) Abscisic acid elicits the water-stress response in root hairs of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* 100: 216–218
19. Rymen et al, ABA Suppresses Root Hair Growth via the OBP4 Transcriptional Regulator. *Plant Physiology*, Volume 173, Issue 3, March 2017, Pages 1750–1762.
20. Ramirez-Parra E, Perianez-Rodriguez J, Navarro-Neila S, Gude I, Moreno-Risueno MA, del Pozo JC. The transcription factor OBP 4 controls root growth and promotes callus formation. *New Phytol* [Internet]. 2017 Mar 17 [cited 2019 Dec 4];213(4):1787–801. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/nph.14315>
21. Ye ZH, Freshour G, Hahn MG, Burk DH, Zhong R. Vascular development in Arabidopsis. *Int Rev Cytol*. 2002;220:225–38.
22. Stefanie Suer, Javier Agusti, Pablo Sanchez, Martina Schwarz, Thomas Greb, WOX4 Imparts Auxin Responsiveness to Cambium Cells in Arabidopsis , *The Plant Cell*, Volume 23, Issue 9, September 2011, Pages 3247–3259, <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087874>
23. Sun, P.; Wang, H.; Zhao, P.; Yu, Q.; He, Y.; Deng, W.; Guo, H. The Regulation of Xylem Development by Transcription Factors and Their Upstream MicroRNAs. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 10134. <https://doi.org/10.3390/ijms231710134>
24. Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, et al. Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development*. 1993;119(1):71–84.
25. Ursache R, Nieminen K, Helariutta Y. Genetic and hormonal regulation of cambial development. *Physiol Plant* [Internet]. 2013 Jan [cited 2019 Aug 16];147(1):36–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22551327>
26. Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. A., Pillot, J. P., ... Rochange, S. F. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455(7210), 189–194. <https://doi.org/10.1038/nature07271>
27. Kapulnik, Y., Resnick, N., Mayzlish-Gati, E., Kaplan, Y., Wininger, S., Hershenhorn, J., & Koltai, H. (2011b). Strigolactones interact with ethylene and auxin in regulating root-hair

elongation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2915–2924. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq464>

28. Turnbull, C. G. N., Booker, J. P., & Leyser, H. M. O. (2002). Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 32(2), 255–262. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01419.x>

29. Zwanenburg, B., Pospíšil, T., & Čavar Zeljković, S. (2016). Strigolactones: new plant hormones in action. *Planta*, 243(6), 1311–1326. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2455-5>

30. Skriver K, Mundy J.1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *The Plant Cell*2,503–512.

31. Hoth S, Morgante M, Sanchez JP, Hanafey MK, Tingey SV, Chua NH.2002. Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *Journal of Cell Science* 115, 4891–4900.

32. Seki M, Ishida J, Narusaka M, et al.2002. Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Functional and Integrative Genomics*2,282–291.

33. Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder JI.2004. Microarray expression analyses of *Arabidopsis* guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *The Plant Cell* 16, 596–615.

34. Cheng WH, Endo A, Zhou L, et al.2002. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *The Plant Cell*14,2723–2743.

35. Sharp RE, LeNoble ME.2002. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany*53,33–37.

36. José María Barrero, Pedro Piqueras, Miguel González-Guzmán, Ramón Serrano, Pedro L. Rodríguez, María Rosa Ponce, José Luis Micol, A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development, *Journal of Experimental Botany*, Volume 56, Issue 418, August 2005, Pages 2071–2083, <https://doi.org/10.1093/jxb/eri206>

37. Sachs, T. (1991). Cell polarity and tissue patterning in plants. *Development*, 113(Supplement 1), 83–93.

38. Simona Baima, Marco Possenti, Antonella Matteucci, Ellen Wisman, Maria Maddalena Altamura, Ida Ruberti, and G. M. (2001). The *Arabidopsis* ATHB-8 HD-Zip Protein Acts as a Differentiation-Promoting Transcription Factor of the Vascular Meristems. *Plant Physiology*, 126(2), 643–655. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.643>

39. Ye, Z.-H., Freshour, G., Hahn, M. G., Burk, D. H., & Zhong, R. (2002). Vascular development in *Arabidopsis*. *International Review of Cytology*, 220, 225–238. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(02\)20007-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(02)20007-8)
40. Felipo-Benavent, A., Úrbez, C., Blanco-Touriñán, N., Serrano-Mislata, A., Baumberger, N., & Achard, P. et al. (2018). Regulation of xylem fiber differentiation by gibberellins through DELLA-KNAT1 interaction. *Development*, 145(23), dev164962. doi: 10.1242/dev.164962
41. Aloni R. Role of hormones in controlling vascular differentiation and the mechanism of lateral root initiation. *Planta*. 2013 Nov;238(5):819-30. doi: 10.1007/s00425-013-1927-8. Epub 2013 Jul 9. PMID: 23835810.
42. Ragni, L., Nieminen, K., Pacheco-Villalobos, D., Sibout, R., Schwechheimer, C., & Hardtke, C. (2011). Mobile Gibberellin Directly Stimulates *Arabidopsis* Hypocotyl Xylem Expansion. *The Plant Cell*, 23(4), 1322-1336. doi: 10.1105/tpc.111.084020
43. Aloni, R. (1987). Differentiation of vascular tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 38 : 179–204.
44. Medford, J.I., Horgan, R., El-Sawi, Z., and Klee, H.J. (1989). Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. *Plant Cell* 1 : 403–413.
45. Scheres, B., Dilaurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M.T., Janmaat, K., Weisbeek, P., and Benfey, P.N. (1995). Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 121 : 53–62.
46. Mähönen, A.P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P.N., and Helariutta, Y. (2000). A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev.* 14 : 2938–2943.
47. Yokoyama, A., Yamashino, T., Amano, Y., Tajima, Y., Imamura, A., Sakakibara, H., and Mizuno, T. (2007). Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 48 : 84–96.
48. Kaisa Nieminen, Juha Immanen, Marjukka Laxella,¹ Leila Kauppinen,¹ Petr Tarkowskib,^{c,1} Karel Dolezalc,^{d,1} Sari Tahtiharjua, Annakaisa Eloa, Me lanie Decourteixa, Karin Ljungd, Rishikesh Bhaleraod, Kaija Keinonen, Victor A. Albertf, and Yka Helariutta. Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar.
49. Matsumoto-Kitano M, Kusumoto T, Tarkowski P, Kinoshita-Tsujimura K, Václavíková K, Miyawaki K, et al. Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 16;105(50):20027–31.
50. Heidstra, R. , Sabatini, S. (2014). Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 301–312.

51. Matsuzaki, Y. , Ogawa-Ohnishi, M. , Mori, A. , Matsubayashi, Y. (2010). Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in Arabidopsis. *Science* 329: 1065–1067.
52. Rodriguez, R.E. , Ercoli, M.F. , Debernardi, J.M. , Breakfield, N.W. , Mecchia, M.A. , Sabatini, M. , Cools, T. , De Veylder, L. , Benfey, P.N. , Palatnik, J.F. (2015). MicroRNA miR396 regulates the switch between stem cells and transit-amplifying cells in Arabidopsis roots. *Plant Cell* 27: 3354–3366.
53. Ou, Y. , et al. (2016). RGF1 INSENSITIVE 1 to 5, a group of LRR receptor-like kinases, are essential for the perception of root meristem growth factor 1 in Arabidopsis thaliana. *Cell Res.* 26: 686–698.
54. Shinohara, H. , Mori, A. , Yasue, N. , Sumida, K. , Matsubayashi, Y. (2016). Identification of three LRR-RKs involved in perception of root meristem growth factor in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: 3897–3902.
55. Prasad, K. , et al. . (2011). Arabidopsis PLETHORA transcription factors control phyllotaxis. *Curr. Biol.* 21: 1123–1128.
56. Krizek, B.A. , Eaddy, M. (2012). AINTEGUMENTA-LIKE6 regulates cellular differentiation in flowers. *Plant Mol. Biol.* 78: 199–209.
57. Hofhuis, H. , Laskowski, M. , Du, Y. , Prasad, K. , Grigg, S. , Pinon, V. , Scheres, B. (2013). Phyllotaxis and rhizotaxis in Arabidopsis are modified by three PLETHORA transcription factors. *Curr. Biol.* 23: 956–962.
58. Hirakawa Y, Kondo Y, Fukuda H. Regulation of Vascular Development by CLE Peptide receptor Systems. *J Integr Plant Biol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2019 Dec 22];52(1):8– 16. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-7909.2010.00904.x>
59. Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Vol. 19, *Nucleic Acids Research*. 1991. p. 1349.

Anexo

Código	Descripción	Secuencia (5'→3')				
Lb1.3	Lb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC				
PB097 SALKseq_108296.1 RP		AAGATGATCATCACGTGGAGG	Lb1 + RP PTE PCR 501-801 bp			
PB098 SALKseq_108296.1 LP		TTTAAATCGCCTAGTCATGC	RP + LP PTE PCR 1188 bp			
PB047	FORWARD	CCTCCAATTCAAAAACAATTATAA	Secuenciar guía 1 crispr obp4			
PB048	REVERSE	AGATCCTGTACTIONGATTCTCT	Secuenciar guía 2 crispr obp4			

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en los genotipados.

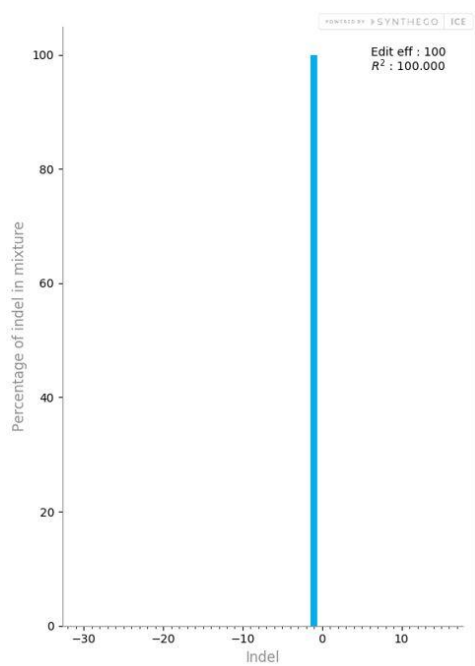


Figura suplementaria 1. Porcentaje indels mutante CRISPR línea 2.23.

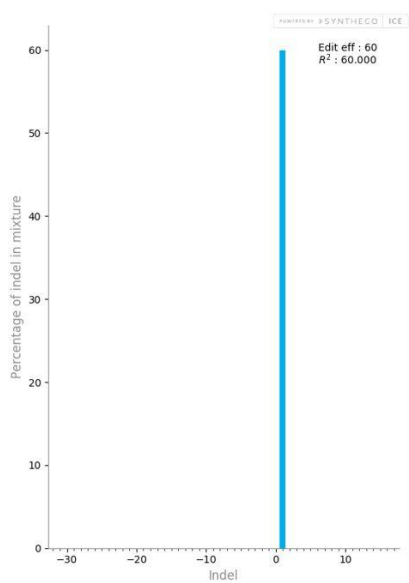


Figura suplementaria 2. Porcentaje indels mutante CRISPR línea 4.51.