

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**



**TESIS DOCTORAL**

**Papel de *FIP1* en la regulación del desarrollo y la respuesta a estrés mediante poliadenilación alternativa en *Arabidopsis thaliana***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Bárbara Téllez Robledo**

DIRECTOR

**Juan Carlos del Pozo Benito**

**Madrid, 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA**  
**MOLECULAR IV**



**PAPEL DE *FIP1* EN LA REGULACIÓN Y EL  
DESARROLLO DE LA RESPUESTA A ESTRÉS  
MEDIANTE POLIADENILACIÓN ALTERNATIVA  
EN *Arabidopsis thaliana***

Autor: Bárbara Téllez Robledo

Director: Dr. Juan Carlos del Pozo Benito



**Memoria presentada por D<sup>a</sup> Bárbara Téllez Robledo,  
licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor  
por la Universidad Complutense de Madrid**

Director  
Dr. Juan Carlos del Pozo Benito

Tutor  
Dr. Álvaro Martínez del Pozo

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA)

Madrid, 2017



**"One sometimes finds what one is not looking for"**  
Sir Alexander Fleming



## **Reconocimientos:**

Quiero agradecer a la doctora Manzano la elaboración del rastreo de mutantes que permitió identificar *fip1-1*. Al doctor Moreno-Risueño su consejo y su generosidad en la generación de líneas marcadoras. A los doctores Hunt y De Lorenzo su ayuda y consejo en el procedimiento PATSeq, así como en el análisis de las secuencias obtenidas. A los doctores Casimiro y Casero por su ayuda en los análisis de desarrollo de primordios de raíz lateral.

## **Agradecimientos:**

Para ser completamente sincera hay mucho que agradecer y mucha gente que nombrar. Gente que me ha enseñado y me ha inspirado en el laboratorio y gente que me ha ayudado a absorber y disfrutar esta experiencia sin perder la cabeza.

Lo primero es lo primero: Gracias, Carlos. Sin tu confianza nada de esto hubiera pasado. Gracias por acogerme en el laboratorio cuando estudiaba y por creerme merecedora de una beca para trabajar contigo. Gracias por tu infinita paciencia, por los trucos de poyata y por todos los consejos y comentarios que me has hecho en este tiempo. Contigo he aprendido muchísimo en muchos aspectos y estoy muy agradecida.

Por supuesto, quiero agradecer a todas las personas que han pasado por el laboratorio 180 y alrededores sus consejos y su complicidad. A los jotapegeros en general, que saben lo que es un café salvavidas y pueden bucear en todos los universos que escapan de éste. Porque todo salga a pedir de Milhouse. A Javier porque los hermanos mayores también necesitamos un hermano mayor y tú has sido un poco el mío. Porque me emociona la pasión con la que vives la ciencia, por las lecciones entre cervezas, por los debates filosófico-surreales a las tantas, por picarnos jugando a todo y por los maratones de pelis y F1. A Abeto, que conoce la señal secreta y puede curar todos los males. Empezamos juntos y juntos conseguiremos acabarlo con una guinda. El día de tu defensa pienso llorar más que tu madre. A Álvaro, porque siempre nos quedará Nashville... y si no ya nos escapamos a donde sea. A María, que siempre guarda un abrazo que da la vida. A Juan, que tiene la frase perfecta en el momento apropiado. A Sara, que es todo paz y que se ha convertido en un referente para mí. A Elena, por sus consejos y sus historias y por convertir el día a día en mucho más que trabajo. A Concha porque es Concha, y eso es insuperable. Gracias por enseñarme, por acogerme, por hablarme de tus retos y por creer en mí. A Fano, que sabe neutralizar la tensión pre-tesis vendiendo ovejas. A Clara, por todas las frases a medias con las que nos entendemos y nos hemos reído de los cambios de ciclo. Por la tontería del pomelo y por todas las majaderías que se pueden decir en una conversación seria. A Lau, por enseñarme lo de "ríe cuando puedas..." y por ser otra gota en el mar que habla mi mismo idioma. Sin ti no hubiera pasado de la primera semana en Kentucky. A David, Encina, Iván, Alfon, Patri Rubia, Patri Morena... A todos los que hacéis que los descansitos sean un placer, que siempre tenéis un momento para echar una mano y que hacéis que los días sean mejores.

Como decía antes, no sólo hay que llegar, hay que llegar cuerdo, y yo no habría podido hacerlo sin mucha gente que me ha ayudado a ver las cosas con perspectiva y me ha hecho sentir fuerte cuando flojeé. Antes de nada, quiero darle las gracias a mi familia. A mis padres, por hacerme un poco como ellos, un poco como ninguno y un poco como la mezcla de los dos. Por la paciencia, el carácter y las frases que suenan a muletilla. Porque me encanta haberos llamado "chicos" toda la vida, porque os puedo decir que qué asco dá cuando tenéis razón y porque a veces sois vosotros los que queréis aprender algo de

nosotras. Por haber salido adelante contra viento y marea y por inspirarnos a aprender cosas todos los días. Somos dos tiarracas fuertes por cosas como esas.

A mi hermana Helena, de la que he aprendido de todo por las buenas y por las malas. Por las peleas de mentira y las risas de verdad, Antonia, por tu determinación, por enseñarme que puedes romper todos los moldes y volverlos a juntar a tu manera. Por la canción del Dahaka, los 5€, el “¡Pero salta!” y todos los juegos que nos inventamos para convertir el blanco y el negro en gris. Porque siempre estás ahí.

A mis abuelos. Por el camino al colegio, por jugar con los retales, por bailar el tango en el salón, por el “cómo están ustedes”, por las confesiones de desayuno y por la silueta en esa mecedora. A mis tíos, que han sido siempre un seguro infalible y a mis primos, que son lo más grato de haber formado parte de una familia numerosa.

A Carlos, que es parte de lo que soy y siempre seré. A los biólogos elegantes y a las víctimas del Fronky Ball: Sergio, Sara, Lita, Marta, Rodri, Manu, Álex, Elena, Sergito... Por cada momento de la carrera. Por las pellas y por las tardes de biblioteca pagando por ello. Por los fin de exámenes de antaño, por nuestras primeras incursiones en los laboratorios y por las llamadas para contarnos que nos hacemos mayores. Por las cosas que me dijisteis cuando tuve miedo de no estar haciendo todo lo posible y porque siempre habéis creído en mí.

A Las Paquitas por buscarme cuando necesitaba un apoyo para parar el río. Por los audios desafinados para decir que nos echábamos de menos, por las noches de aquelarre y porque la forma en la que lucháis por vuestros sueños me inspira. A los Soulvivors, por los miles de canciones y de momentos. A D por enseñarme lo de la vida y los planes. A la gente que me ha hecho ver todo de forma diferente: Carmensita, Nina, Sara, Dani... Las personas como vosotros hacéis el mundo mejor.

Gracias, gracias a todos!!!

# Índice

Resumen .....	1
Abstract .....	3
Abreviaturas y siglas .....	5
Relación de tablas y figuras .....	6
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
Sistema radicular.....	13
<i>Arabidopsis thaliana</i> como organismo de estudio.....	14
Desarrollo y fisiología .....	14
Caracterización genética y molecular .....	15
Desarrollo del sistema radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i> . .....	16
Crecimiento de la raíz principal de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	17
Desarrollo de las raíces laterales de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	21
Poliadenilación alternativa .....	34
Poliadenilación del extremo 3'UTR .....	36
Poliadenilación aguas arriba del último exón. ....	37
Selección de PAS alternativos .....	40
Funcionalidad de la regulación vía poliadenilación alternativa .....	45
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
Material vegetal y condiciones de cultivo .....	55
Condiciones de cultivo de los diferentes tratamientos .....	56
Análisis morfológico .....	56
Desarrollo radicular .....	56
Respuesta gravitrópica.....	57
Amplificación, clonaje y análisis de secuencias .....	57
Genotipado de mutantes de inserción SALK.....	57
Clonaje de <i>FIP1</i> y su promotor para generación de plantas transgénicas .....	57
Procesamiento de <i>FIP1</i> .....	59

Análisis transcriptómicos .....	60
Análisis de expresión: RNASeq .....	60
Análisis de poliadenilación alternativa: PATSeq.....	60
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>67</b>
1. Identificación del mutante <i>fip1-1</i> .....	69
Complementación de <i>fip1-1</i> .....	72
Procesamiento de <i>FIP1</i> en el fondo genético <i>fip1-1</i> .....	73
Expresión de <i>FIP1</i> .....	76
2. Análisis transcriptómico .....	77
2.1 Análisis de expresión .....	77
2.2 Poliadenilación alternativa en el mutante <i>fip1-1</i> .....	82
3. Caracterización fenotípica .....	89
3.1 Caracterización del sistema radicular .....	89
3.2 Caracterización fenotípica de la parte aérea de <i>fip1-1</i> .....	99
4. Respuesta a estrés .....	104
4.1 Estrés salino .....	104
4.2 Estreses nutricionales .....	110
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>115</b>
1. Identificación del alelo <i>FIP1-1</i> .....	117
1.1 <i>FIP1</i> -like.....	118
1.2 Especificidad de <i>FIP1</i> .....	118
1.3 FUEs redundantes.....	119
1.4 Regulación de la expresión de <i>FIP1</i> mediante la producción de transcritos .....	119
2. Alteraciones de la poliadenilación en <i>fip1-1</i> .....	120
2.1. Alteraciones generales de la poliadenilación <i>fip1-1</i> en el sistema radicular.....	121
2.2. Alteraciones generales de la poliadenilación en <i>fip1-1</i> : Parte aérea .....	122
2.3. Alteraciones generales de la poliadenilación en <i>fip1-1</i> : Especificidad de órgano. ....	123
3. Caracterización fenotípica de <i>fip1-1</i> .....	124
3.1. Sistemas de regulación alterados en <i>fip1-1</i> .....	124
3.2. Caracterización fenotípica de <i>fip1-1</i> : Desarrollo de raíces laterales.....	128
3.3. Caracterización fenotípica de <i>fip1-1</i> : Raíz principal .....	132
4. Respuesta a estrés .....	135
4.1 Estrés salino .....	135
4.2 Ayuno de nitrógeno .....	140

<b>CONCLUSIONES</b> .....	145
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	149
<b>ANEXO</b> .....	165
1. Poliadenilación alternativa: Selección de Poly(A) Sites .....	167
Poliadenilación alternativa en la raíz de <i>fip1-1</i> respecto a su control .....	167
Poliadenilación alternativa en la parte aérea de <i>fip1-1</i> respecto a su control.....	178
Poliadenilación alternativa en raíz como respuesta a estrés salino.....	181
Poliadenilación alternativa en parte aérea como respuesta a estrés salino .....	187
Poliadenilación alternativa como respuesta a estrés salino .....	188
2. Poliadenilación alternativa: Genes regulados por APA en <i>fip1-1</i> .....	195
3. Poliadenilación alternativa: Genes regulados por APA en respuesta a estrés salino..	198
4. Poliadenilación alternativa: Genes regulados por APA en respuesta a estrés salino en el fondo genético <i>fip1-1</i> .....	200



## Resumen

Las plantas son organismos sésiles que deben adaptar su crecimiento al medio en que se encuentran. Para ello, han desarrollado una serie de mecanismos de respuesta a diferentes señales endógenas y exógenas que regulan la activación de diferentes rutas genéticas. La regulación de la expresión génica en eucariotas se da a distintos niveles, siendo el transcripcional el más estudiado. Sin embargo, los procesos de regulación postranscripcional tienen un papel muy relevante en la regulación de la expresión. Recientemente se ha observado que la poliadenilación de los transcritos inmaduros es clave en la regulación de la expresión génica, ya que participa en los procesos de procesamiento postranscripcional, estabilidad, exportación nuclear y localización subcelular de los ARN mensajeros. Este nivel de regulación depende de la localización del sitio de corte y poliadenilación (PAS), que se selecciona gracias a la interacción de numerosas proteínas implicadas en el reconocimiento de secuencias y activación de la Poly(A) polimerasa.

Este trabajo de tesis doctoral se centra en el análisis de la regulación de la expresión génica por poliadenilación alternativa (APA) en el organismo modelo *Arabidopsis thaliana*. Se han descrito diferentes tipos de APA que se han relacionado con diferentes tipos celulares, así como con su grado de diferenciación celular: Por un lado, la poliadenilación de diferentes puntos situados en el extremo 3'UTR (regiones canónicas) da lugar a mensajeros de diferente longitud, portadores de diferentes secuencias diana para proteínas reguladoras implicadas en la estabilidad y localización subcelular del mensajero maduro. Por otro lado, la poliadenilación de regiones no canónicas (extremo 5'UTR, CDS e intrones) se ha relacionado con sistemas de control de calidad de los mensajeros y con su procesamiento. Por ello, se han planteado los siguientes objetivos:

- Evaluar el papel de la regulación de la expresión génica mediante APA en el desarrollo radicular de *Arabidopsis thaliana*.
- Analizar el papel de FIP1 en la selección de sitios de poliadenilación (PAS) en, así como su impacto en la distribución de los PAS en las distintas regiones genómicas (3'UTR, 5'UTR, CDS e intrones).
- Identificar genes que experimentan poliadenilación alternativa (APA) en el fondo mutante *fip1-1* en condiciones óptimas de crecimiento.
- Caracterizar el fenotipo del fondo mutante *fip1-1* e identificar rutas de señalización desreguladas como consecuencia de alteraciones en la selección de PAS.
- Evaluar el papel de la regulación de la expresión génica vía APA en la respuesta a diferentes estreses abióticos. Se analizará la distribución de PAS en las distintas regiones genómicas y se identificarán genes regulados por APA como respuesta al estrés.
- Caracterizar la respuesta del mutante *fip1-1* a estos estreses y analizar el impacto de la regulación vía APA en la tolerancia.

Se ha identificado un mutante puntual y viable de una de las proteínas responsables del proceso de poliadenilación: FIP1, responsable de la estimulación de la actividad de la Poly(A) polimerasa y del reconocimiento de secuencias específicas del ARN mensajero inmaduro. El mutante *fip1-1* presenta un fenotipo pleiotrópico que afecta a distintos aspectos de su desarrollo y respuesta a diferentes estreses abióticos. Se ha realizado una caracterización fenotípica de *fip1-1*, así como un perfil transcriptómico por RNASeq y un

estudio de sitios de corte y poliadenilación mediante la técnica PATSeq. Estos abordajes han revelado que la regulación de la expresión génica vía APA participa en diferentes procesos de señalización implicados en el desarrollo y la respuesta a estrés.

Los resultados obtenidos han permitido identificar regulación vía APA en genes que participan en diferentes procesos de señalización hormonal. Entre ellas, destacan auxinas y ácido abscísico (ABA), ambas reguladoras de algunos de los procesos alterados en el fondo genético *fip1-1*. Entre estos procesos destacan el desarrollo del meristemo apical principal y las raíces laterales, ambos regulados por las rutas hormonales alteradas en el mutante.

Por otra parte, se realizó un análisis de poliadenilación en condiciones de estrés salino y ayuno de nitrógeno que ha permitido identificar en el fondo genético control numerosos casos de APA relacionados con la respuesta a estrés. En cuanto al mutante *fip1-1*, tolerante a los estreses analizados, selecciona sitios de corte y poliadenilación propios de la respuesta a estrés incluso en condiciones óptimas de crecimiento. En conjunto, estos datos sugieren que FIP1 participa en la generación de transcriptomas en respuesta a señales endógenas y estímulos ambientales. Así, se ha observado que la regulación de la expresión génica vía poliadenilación alternativa es clave en la regulación del desarrollo y la respuesta a estrés en *Arabidopsis*, y se propone a FIP1 como selector de sitios de poliadenilación específicos de condiciones de crecimiento óptimas.

En resumen, se ha observado que FIP1 tiene un papel determinante en la selección de PAS y que su ausencia provoca APA en un conjunto de genes entre los que destacan el desarrollo radicular, la respuesta a la fitohormona ABA y el estrés salino. Como consecuencia, numerosos de procesos de señalización celular se encuentran alterados en el fondo mutante *fip1-1*. Así, es posible afirmar que los eventos de poliadenilación alternativa que sufre *fip1-1* provocan alteraciones de la señalización y éstas, a su vez, defectos en el desarrollo.

En lo que a la respuesta a estrés se refiere, los resultados obtenidos han permitido observar que la regulación de la expresión vía APA participa en la regulación de las respuestas a salinidad y deficiencia de nitrógeno y que FIP1 juega un papel importante en esta regulación. Dados los datos previos que apuntan a que FIP1 es promotor de transcriptomas propios de células en bajo estado de diferenciación y visto su patrón de expresión y su tendencia a seleccionar PAS proximales, se propone que el fenotipo de *fip1-1* en condiciones estándar de crecimiento podría ser consecuencia de la generación de un transcriptoma propio de respuesta a estrés.

## Abstract

Plants are sessile organism that have to adapt their growth to the environment. They have developed several pathways in response to different endogen and exogen signals, so they can control the activation of different genetic routes. Eukaryotic regulation of gene expression takes place at different levels, being transcriptional level the most studied one. However, post-transcriptional regulation processes such as polyadenylation play an important role in gene expression regulation. It has been recently observed that the choice of Poly(A) Site (PAS) can effectively determine what the gene will code for and how it may be regulated, so it influences mRNA splicing, stability, transport and subcellular localization. This regulation level depends on the position of the Polyadenylation Site (PAS), which is selected through the interaction of several proteins that recognize specific sequences and induce activation of Poly(A) polymerase enzymes.

This PhD work is focused in post-transcriptional regulation of gene expression through alternative polyadenylation (APA) in the model organism *Arabidopsis thaliana*. It has been described that different APA types are related to cell type specification and differentiation through different strategies: On one hand, polyadenylation of different 3'UTR positions (canonic regions) results in mRNA with different length that can present different regulatory sequences which have a role on stability and localization of mature mRNA. On the other hand, polyadenylation at non canonic regions (5'UTR, CDS and introns) has been related to quality mechanisms and splicing. For this reason, we propose the following objectives:

- To assess the role of APA regulation of gene expression in *Arabidopsis thaliana* root development.
- To analyse the role of FIP1 in polyadenylation site (PAS) selection, as well as PAS distribution throughout genomic regions (3'UTR, 5'UTR, CDS and introns).
- To identify genes affected by APA during *fip1-1* development under optimal conditions.
- To characterize *fip1-1* phenotype and indentify altered signaling pathways due to APA.
- To assess the role of APA regulation of gene expression in abiotic stress response. We will analyze PAS distribution along genomic regions and we will identify APA regulated genes in response to stress.

We identified *fip1-1* a novel and viable mutant affected on *FIP1*, a subunit of the polyadenylation machinery. FIP1 stimulates poly(A) polymerase activity and also recognizes specific sequences of pre-mRNA. *fip1-1* has a pleiotropic phenotype that it is affected in several developmental and stress responsive pathways. We have carried out phenotypic characterization of *fip1-1*, as well as transcriptomic RNASeq and polyadenylation site selection analysis. These approaches show that APA plays a role in different signal pathways related to regulation of development and abiotic stress responses.

It has been observed that APA regulation takes place at some fitohormones networks such as auxins and abscisic acid (ABA), both key regulators of some of the altered developmental processes at *fip1-1*. Among these processes, root apical meristem and lateral root development stand out.

On the other hand, we carried out a polyadenylation analysis under salt stress and nitrogen starvation and detected several APA events related to stress response in wildtype seedlings. Regarding to *fip1-1*, which is tolerant to tested stresses, we observed that a number of those APA events are FIP1-dependent. Besides, some of the APA events found at *fip1-1* are also

present in wildtype plants under abiotic stress. Overall, these data suggest that FIP1 plays a role on poly(A) site selection in response to endogenous and environmental signals. Thereby, APA seems to be a key factor in development and stress response, and we aim that FIP1 moves polyadenylation machinery towards poly(A) sites that are specific to optimal growth conditions.

In summary, it has been observed that FIP1 has a role in PAS selection and its absence induce APA in a set of genes. Among these genes, some gene ontology categories stand up: root development, ABA response and salt stress. Due to these APA events, *fip1-1* shows alteration of several signalling pathways, which trigger developmental defects.

With regard to stress response, we observed that APA regulation of gene expression plays a role in salt stress and nitrogen starvation responses. Moreover, FIP1 plays an important role in this level of regulation. FIP1 has been proposed to induce undifferentiated cells transcriptomes, which correlates with the expression pattern observed and its tendency to select proximal PAS. With these data, we propose that *fip1-1* phenotype in standard developmental conditions could be a consequence of its stress-response transcriptome.

## Abreviaturas y siglas

ABA: Ácido abscísico

APA: Poliadenilación alternativa

CF: Células fundadoras

D-Root: Dark-Root

FUE: Regiones lejanas situadas aguas arriba en los sitios de poliadenilación

GFP: Proteína fluorescente verde

GUS:  $\beta$ -glucuronidasa

kb: kilobase

mm: milímetro

NUE: Regiones cercanas situadas aguas arriba en los sitios de poliadenilación

PAS: Sitio de corte y poliadenilación

PRL: Primordio de raíz lateral

RAM: Meristemo radicular apical

RL: Raíces laterales

ROS: Especies reactivas de oxígeno

um: micrómetro

YFP: Proteína amarilla fluorescente

ZD: Zona de diferenciación del meristemo radicular apical

ZO: Zona de oscilación del meristemo radicular apical

ZT: Zona de transición del meristemo radicular apical

# Relación de tablas y figuras

## Figuras

Figura 1: Regulación de la expresión de genes de respuesta a auxinas (Nanao et al., 2013). p12

Figura 2: Organización celular de la raíz principal de *Arabidopsis thaliana* (Adaptado de Overhorde et al., 2010). p13

Figura 3: Procesos de crecimiento en el ápice de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Beemster et al., 2003). p14

Figura 4: A) Distribución de auxinas a lo largo de la raíz principal y gradiente de expresión de los genes PLT (Barrada et al., 2015). B) Modelo de acción de los flavonoles como integradores de señales de proliferación y diferenciación celular (Adaptado de Silva-Navas et al., 2016). p16

Figura 5: Esquema general de la regulación entre los procesos de proliferación y diferenciación en la raíz principal de *Arabidopsis*. (Adaptado de Barrada et al., 2015). p17

Figura 6: Estructura y desarrollo de la raíz de *Arabidopsis* (Van Norman et al., 2013). p18

Figura 7: Primeros eventos del desarrollo del PRL (Sparks, 2015). p19

Figura 8: Estadios de desarrollo de un PRL (Casimiro et al., 2001). p20

Figura 9: Representación esquemática de los módulos de señalización de auxina que actúan durante la especificación, migración nuclear e iniciación del PRL (De Rybel et al., 2010). p21

Figura 10: Inducción secuencial de los transportadores de auxinas PIN3 y LAX3 en el desarrollo del PRL (Péret et al., 2013). p27

Figura 11: Regulación de la emergencia mediante control del equilibrio hídrico (Péret et al., 2012). p28

Figura 12: Esquema general de las rutas hormonales de regulación de la formación de RL en *Arabidopsis thaliana* (Chen et al., 2012). p30

Figura 13: Esquema de posibles PAS (Lutz y Moreira 2011). p32

Figura 14: Regulación de la presencia de elementos reguladores en el extremo 3'UTR de mensajeros maduros alternativos (Tian y Manley, 2013). p34

Figura 15: Representación esquemática de los procesos que median la estabilidad de los mensajeros (Wagner y Lykke-Andersen, 2002). p36

Figura 16: Clasificación de los PAS que mapean en el extremo 5'UTR (Wu et al., 2011). p36

Figura 17: Representación esquemática de las señales identificadas en los PAS de humanos y *Arabidopsis* (Loke et al., 2005). p38

Figura 18: Representación esquemática de las proteínas de la maquinaria de poliadenilación en metazoos, levaduras y plantas (Millevoy, 2009). p39

Figura 19: Red de interacciones de la maquinaria de poliadenilación de *Arabidopsis* (Hunt et al., 2008). p40

Figura 20: Árbol filogenético de genes con motivo Fip en distintas especies de plantas (Hunt et al., 2012). p41

Figura 21: Esquema comparativo de los dominios identificados en los genes que contienen el motivo Fip1 en plantas, humanos y levaduras (Forbes et al., 2006). p42.

Figura 22: Esquema de la estrategia de clonaje para el ADN genómico de FIP1. p51

Figura 23: Esquema de trabajo para la elaboración de librerías PATSeq. Adaptado de Polyadenylation in Plants (Adaptado de Hunt & Li, 2015). p55

Figura 24: Definición de bin según el método DEXSeq (Anders et al., 2012). p56

Figura 25: Plántulas pSKP2B:GUS y sbrel52/pSKP2B:GUS. Desarrollo de RL. p62

Figura 26: Resultado del mapeo de la mutación responsable del fenotipo de sbrel52. p62

Figura 27: Identificación del gen SBREL52. p63

Figura 28: Test de alelismo entre los mutantes sbrel52 y SALK\_099558. p64

Figura 29: Complementación del mutante sbrel52 por sobreexpresión de FIP1. p65

Figura 30: Procesamiento del intrón 2 del gen FIP1. p66

Figura 31: Alineamiento de las secuencias obtenidas en el análisis del procesamiento del Intrón 2 de FIP1. p66

Figura 32: Secuencia de aminoácidos de la proteína resultante de la traducción de los mensajeros identificados. p67

Figura 33: PAS predichos en la secuencia genómica de FIP1. p68

Figura 34: Alineamiento de la secuencia analizada mediante la herramienta PASPA (amarillo) y la secuencia genómica de Arabidopsis (naranja). p68

Figura 35: Expresión de FIP1. p69

Figura 36: Representación de los genes que sufren cambios en sus niveles de expresión en el fondo mutante *fip1-1* con respecto a su control. p70

Figura 37: Categorías funcionales enriquecidas entre los genes sobreexpresados en el fondo mutante *fip1-1*. p71

Figura 38: Categorías funcionales enriquecidas entre los genes reprimidos en el fondo mutante *fip1-1*. p71

Figura 39: Categorías funcionales enriquecidas entre los genes que sufren alteraciones de la longitud del extremo 3'UTR en el fondo mutante *fip1-1*. p72

Figura 40: Esquema de los posibles casos de poliadenilación alternativa en el extremo 3'UTR. p72

Figura 41: PAS seleccionados en *fip1-1* y su control. p73

Figura 42: Genes coincidentes entre aquellos que se encuentran desregulados en *fip1-1* y los que sufren APA. p74

Figura 43: Categorías funcionales enriquecidas entre los eventos de poliadenilación alternativa del mutante *fip1-1*. p75

Figura 44: Comparación de la distribución de los sitios de poliadenilación en el mutante *fip1-1* respecto a su control. p76

Figura 45: Distribución de los casos identificados de poliadenilación alternativa en el mutante *fip1-1* respecto al control. p77

Figura 46: Categorías funcionales enriquecidas en el conjunto de genes cuya poliadenilación alternativa afecta al extremo 3'UTR. p78

Figura 47: Enriquecimiento de categorías funcionales del conjunto de casos de poliadenilación alternativa que afectan al extremo 5'UTR en el mutante *fip1-1*. p78

Figura 48: Categorías funcionales sobrerrepresentadas en el conjunto de casos de APA que afectan al CDS. 79

Figura 49: Análisis modular de las categorías funcionales sobrerrepresentadas en el conjunto de casos identificados de APA que afectan a intrones. p79

Figura 50: Comparación de la distribución de los sitios de poliadenilación en el mutante *fip1-1* respecto a su control en muestras de parte aérea. p80

Figura 51: Eventos de poliadenilación alternativa identificados en el mutante *fip1-1* con respecto a su control. p81

Figura 52: PRL de plántulas *pSKP2B:GUS* y *fip1-1pSKP2B:GUS*. p83

Figura 53: Desarrollo de los PRL. p83

Figura 54: PRL iniciados en el área de curvatura por graviestimulación. p84

Figura 55: Número de RL emergidas en un tratamiento de 6d con IAA 10<sup>-6</sup>M. p84

Figura 56: Crecimiento de la raíz principal de *fip1-1* y su control. p85

Figura 57: Porcentaje de semillas germinadas en función del tiempo postimbibición. p86

Figura 58: Crecimiento de la raíz principal de Arabidopsis. p86

Figura 59: Longitud del RAM en plantas *fip1-1* y control. p87

Figura 60: Longitud de las células de la ZT. p88

Figura 61: Expresión de los marcadores *pDR5:GFP* y *pDR5:Luc*. p89

Figura 62: Marcadores de transporte de auxina en los fondos *fip1-1* y control. p89

Figura 63: Expresión del marcador *pWOX5:YFP*. p90

Figura 64: Expresión de distintos marcadores de desarrollo radicular: *pCYCB1;1:GFP*. p90

Figura 65: Expresión de distintos marcadores de desarrollo radicular: *pSCR:GFP*. p91

Figura 66: Gravitropismo. p91

Figura 67: Porcentaje de crecimiento de la raíz principal de Arabidopsis de los fondos genéticos *fip1-1* y control como respuesta a distintos tratamientos hormonales. p92

Figura 67: Estructura vegetativa de *fip1-1* y su control. p93

Figura 68: Observaciones de la roseta de *fip1-1*. p94

Figura 69: Observaciones de las células epidérmicas de *fip1-1* y su control. p94

Figura 70: Alteraciones morfológicas en las silículas de *fip1-1*. p95

Figura 71: Semillas inmaduras en *fip1-1* y su control. p96

Figura 72: Semillas maduras en *fip1-1* y su control. p97

Figura 73: Respuesta de la raíz del mutante *fip1-1* al estrés osmótico y salino en raíz principal. p98

Figura 74: Desarrollo de raíces laterales en condiciones de estrés salino. p99

Figura 75: Genes desregulados en *fip1-1* (RNASeq) y plantas control bajo estrés salino (Dinneny et al., 2008). p100

Figura 76: APA en el sistema radicular del fondo genético control bajo estrés salino. p101

Figura 77: APA en el sistema radicular del fondo genético *fip1-1* bajo estrés salino. p102

Figura 78: Coincidencias entre los genes que sufren APA en la raíz de los fondos genéticos *fip1-1* y control como respuesta al estrés salino. p102

Figura 79: APA en la parte aérea del fondo genético control bajo estrés salino. p103

Figura 80: APA en la parte aérea del fondo genético *fip1-1* bajo estrés salino. p104

Figura 81: Plántulas de 13dpi *fip1-1* y control crecidas en ausencia de N. p105

Figura 82: Porcentaje de RL emergidas en tratamiento de ausencia de nitratos en el mutante *fip1-1* y su control respecto a plántulas crecidas en medio completo. p105

Figura: APA en el sistema radicular del fondo genético control bajo ausencia de nitratos. p106

Figura 84: APA en el sistema radicular del fondo genético *fip1-1* bajo estrés por ausencia de nitratos. p107

Figura 85: Coincidencias entre los genes que sufren APA en la raíz de los fondos genéticos *fip1-1* y control como respuesta al estrés por ausencia de nitratos. p108

Figura 86: Desarrollo radicular en déficit de fosfatos. p109

Figura 87: Porcentaje de crecimiento de la raíz principal en ausencia de fosfatos respecto al medio completo. p109

## Tablas

Tabla 1: Porcentaje de eventos de poliadenilación alternativa en diferentes especies (Shi et al., 2012). p31

Tabla 2: Homología de FIP1[V] con sus ortólogos en humanos y levaduras (Forbes et al., 2006). p42

Tabla 3: Mutantes de inserción de los genes situados en el intervalo de segregación de *sbrel52*. p50

Tabla 4: Cebadores diseñados para el clonaje del ADN genómico de FIP1 y de su promotor. p50

Tabla 5: Cebadores diseñados para el análisis del procesamiento del Intrón 2 de FIP1 en los fondos genéticos *fip1-1* y control. p51

Tabla 6: A) Cebadores utilizados para la retrotranscripción y amplificación de los fragmentos de ARN poliadenilados. La serie PE-RT3 incluye un código de identificación de 7 nucleótidos que se muestran como xxx. B) Relación de códigos de la serie PE-RT3. p55

Tabla 7: Genes que sufren APA en el fondo genético *fip1-1* tanto en raíz como en parte aérea



# **INTRODUCCIÓN**



# Introducción

Las plantas son organismos sésiles que deben adaptar su crecimiento al medio que las rodea. Para ello, disponen de capacidad para formar órganos de origen postembrionario, lo que les permite modular su crecimiento según sus necesidades. Esta capacidad reside en un balance de la tasa de diferenciación celular y posterior diferenciación de las células meristemáticas. Este balance está regulado a través de una serie de factores genéticos que son influenciado por distintos estímulos externos

Se han descrito diversos mecanismos genéticos de regulación que actúan para asegurar la actividad de las proteínas en el momento, lugar y medida necesarios. La regulación de la expresión génica se puede agrupar en 3 niveles principales: transcripcional, postranscripcional y postraducciona. Investigaciones recientes han permitido destacar el efecto de la regulación postranscripcional mediante poliadenilación alternativa (APA) en células animales y vegetales, habiéndose podido relacionar tanto con el grado de diferenciación celular como con la especificidad de tejido o la respuesta a estímulos.

En este trabajo de tesis se estudia la regulación del desarrollo y respuesta a diferentes estrés abióticos mediante APA en *Arabidopsis thaliana*. En un rastreo de mutantes de *Arabidopsis* con alteraciones en el sistema radicular se identificó un mutante viable de *FIP1*, un componente esencial de la maquinaria de poliadenilación. Hemos caracterizado morfológica y molecularmente el mutante *fip1-1*, que muestra un fenotipo altamente pleiotrópico. Este mutante se identificó en un rastreo de mutantes que mostraba una deslocalización de la expresión del marcador de formación de raíces laterales SKP2B::GUS en la raíz y por los defectos que ésta tiene en su arquitectura radicular.

## Sistema radicular

Debido a su incapacidad para desplazarse, el desarrollo del sistema radicular es fundamental para los organismos vegetales. La raíz permite la absorción de agua y nutrientes, da soporte estructural y ancla la planta al suelo. Además, participa en las interacciones con el ambiente biótico del suelo. Así, a pesar de que la morfología de la raíz está determinada genéticamente, la arquitectura final del sistema radicular depende en gran medida del ambiente; de modo que la planta adecúa su desarrollo al desarrollar una respuesta específica ante multitud de estímulos externos. De este modo, el patrón de desarrollo radicular se ve regulado por dos sistemas independientes: Endógeno (dominancia apical, número y posición de raíces laterales) y exógeno (distribución de nutrientes en el suelo, gravedad, intensidad y calidad de la luz que incide en el sistema radicular) (Woodward *et al.*, 2005).

La disponibilidad de agua y nutrientes son algunos de los factores limitantes del crecimiento en todos los ecosistemas, ya que su adquisición es vital para el mantenimiento de la proliferación celular, el crecimiento y la eficiencia reproductiva (Zhang y Forde, 2000; Lopez-Bucio *et al.*, 2002; Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004). La plasticidad en su desarrollo permite regular la formación de pelos radiculares y de raíces laterales y adventicias, lo que permite aumentar la superficie de absorción, así como explorar el suelo en busca de puntos de

elevada concentración de nutrientes (Smith y De Smet, 2012). De este modo, la producción de órganos de origen postembrionario permite que la planta module su desarrollo para incrementar la superficie de absorción en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes y/o agua, respondiendo a una gran variedad de situaciones de estrés. Por todas estas razones, ampliar los conocimientos e investigar los factores que determinan la arquitectura de la raíz representa un hecho agronómico importante (Hodge, 2004).

La ramificación del sistema radicular es un elemento clave en la capacidad de adaptación de la planta al medio. La formación de raíces laterales o adventicias, este proceso está regulado por señales hormonales y nutricionales que inducen o inhiben localmente su desarrollo (Bellini et al., 2014; Giehl and von Wirén, 2014). Se ha descrito una gran diversidad de arquitecturas radiculares en plantas superiores tanto a nivel anatómico como sistémico (Lloret y Casero, 2002). Uno de los aspectos básicos de esta arquitectura es la producción de raíces laterales o adventicias de origen postembrionario como complemento a la raíz principal. Así, mientras que en dicotiledóneas todo el sistema radicular procede de la ramificación de la raíz principal o seminal en raíces laterales (LR) (Nibau et al., 2008), las monocotiledóneas como el maíz (*Zea mays*) o el arroz (*Oryza sativa*) basan su desarrollo radicular en la producción de raíces adventicias (Hochholdinger et al., 2004; Osmont et al., 2007). Se ha identificado una colección de genes comunes en el desarrollo de raíces laterales y adventicias (Hochholdinger y Zimmermann, 2008). Sin embargo, la regulación del desarrollo de estos dos órganos es independiente y se realiza a través de rutas específicas. A día de hoy se han hecho grandes avances en este terreno, especialmente en el caso de la dicotiledónea *Arabidopsis thaliana* L., que constituye el sistema experimental mejor caracterizado para el estudio del desarrollo radicular.

## ***Arabidopsis thaliana* como organismo de estudio**

*Arabidopsis thaliana* (Figura) pertenece a la familia *Cruciferae* o *Brassicaceae* y se distribuye por Europa, Asia y Norteamérica (Meyerowitz y Somerville, 1994). Se han catalogado muchos ecotipos diferentes a partir de poblaciones naturales que están disponibles en diferentes bancos de germoplasma para su uso en investigación. *Columbia* y *Landsberg* son los ecotipos más utilizados como modelos para estudios genéticos y moleculares.

### **Desarrollo y fisiología**

El ciclo de vida completo de *Arabidopsis* es de aproximadamente 6 semanas, incluyendo la germinación de la semilla, la formación de la roseta, el desarrollo del tallo principal, la floración y la maduración de las primeras semillas. El crecimiento de las plantas se puede llevar a cabo en placas petri bajo luces fluorescentes en el laboratorio o en macetas en un invernadero o cámara de cultivo.

Las plantas desarrollan una arquitectura radicular simple, fácil para estudiar en cultivo in vitro. Las plantas maduras alcanzan entre 15 y 20 cm de altura y desarrollan una roseta que de entre 2 y 10 cm de diámetro, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Las hojas están cubiertas con pequeños pelos unicelulares llamados tricomas que son un modelo muy

adecuado para estudiar morfogénesis y diferenciación celular. La floración empieza alrededor de las 3 semanas en tierra, y la inflorescencia resultante forma una progresión lineal de flores y silicuas durante varias semanas, antes de entrar en senescencia. Las flores, de 2 mm de longitud, pueden ser fácilmente fertilizadas aplicando polen sobre la superficie del estigma. Por su parte, los frutos son silicuas y contienen más de 50.000 semillas que alcanzan unos 0,5 mm en la madurez (Meinke et al., 1998).

## Caracterización genética y molecular

El genoma de *Arabidopsis* está organizado en cinco parejas de cromosomas y contiene 27.025 genes. Su secuenciación se completó en diciembre del año 2000 gracias a una iniciativa Internacional The Arabidopsis Genome Initiative (AGI) (AGI, 2000).

A lo largo de los últimos años, se han desarrollado numerosos recursos genéticos y métodos necesarios para definir a esta planta como un organismo modelo (Koncz et al., 1992; Martínez-Zapater y Salinas, 1998). Las semillas maduras son las dianas perfectas para la mutagénesis química, lo que permite la producción masiva de mutantes puntuales. Por otro lado, la mutagénesis por inserción de ADN transferido (T-DNA) mediante *Agrobacterium tumefaciens* permite generar plantas transgénicas con una elevada eficiencia, así como elaborar mutantes de inserción con inserciones de T-DNA por todo el genoma (Meinke et al., 1998).

En los últimos 25 años se han identificado miles de mutantes de *Arabidopsis* afectados en casi todos los aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal, incluido el desarrollo radicular (Meyerowitz y Somerville, 1994). El análisis genético y molecular de mutantes de *Arabidopsis* ha proporcionado detalles moleculares de algunos genes involucrados en el contexto de genómica funcional (Finnegan et al., 1998), así como la identificación de genes con aplicación agronómica (Meinke et al., 1998).

Por otro lado, estas técnicas han hecho posible identificar algunos de los mecanismos de regulación sistémica que modulan el desarrollo radicular. Entre ellos, destaca la señalización hormonal mediada por auxinas, que se ha descrito como inductora de la degradación de los inhibidores de la transcripción Aux/IAA. Estudios genéticos y moleculares han permitido identificar los receptores de auxinas y su posterior transducción de señal. En presencia de auxinas, las proteínas con función redundante de tipo F-box TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1) y 5 miembros de la familia AFB (AUXIN RECEPTOR F-BOX PROTEIN) interaccionan con proteínas del tipo Aux/IAA y las marcan para su degradación vía Ubiquitina/Proteasoma (Darmashiri et al., 2005; Gray et al., 2003; Zenser et al., 2001; Kepinski y Leyser, 2005; Pérez-Torres et al., 2008).

En ausencia de auxina los represores Aux/IAA dimerizan con factores de transcripción de respuesta a auxina llamados ARF (Auxin Response Factor), que a su vez regulan la transcripción de los genes de respuesta a auxina (Figura 1). La familia de factores de transcripción ARF está formada por 23 miembros (Guilfoyle y Gahan, 2007). Entre ellos, 5 de ellos tienen función de activador transcripcional (ARF 4, 5, 6, 7 y 19) y el resto se asocian con un papel represor (Tiwari et al., 2003; Tiwari et al., 2004). Estos factores se han asociado al control de múltiples procesos de desarrollo, incluidos el desarrollo de raíces

laterales (Mallory et al., 2005; Wang et al., 2005; Tian et al., 2004).

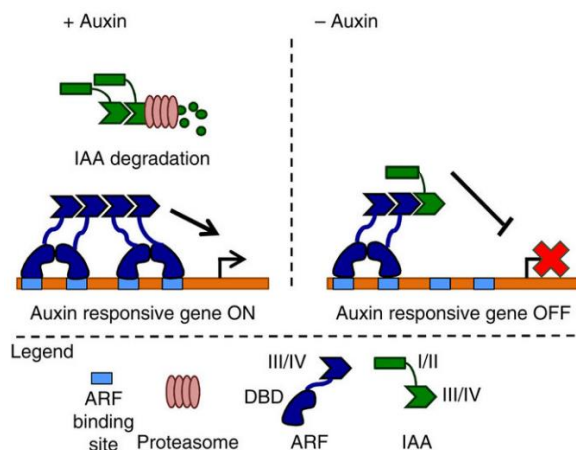


Figura 1: Regulación de la expresión de genes de respuesta a auxinas. En presencia de auxinas se induce degradación de los represores Aux/IAA y activación de la expresión de los genes inducidos por los factores ARF (Nanao et al., 2013).

## Desarrollo del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*.

La raíz principal de *A. thaliana* presenta una anatomía muy simple. En una sección transversal se observa una epidermis monoestratificada que contiene entre 16 y 23 células y que reviste exteriormente a la raíz sin sucesión de continuidad (Figura 2). Está compuesta por dos tipos celulares cuya identidad depende de su posición relativa a las células corticales inmediatamente subyacentes (Overvoorde et al., 2010). Así, las células epidérmicas que contactan con las paredes transversales de dos células corticales adyacentes se diferencian en células que producen pelos radiculares (tricoblastos) (Cormack, 1949). Por otro lado, las células epidérmicas que contactan con la pared tangencial externa de solo una célula cortical (atricoblasto) generalmente no producen ningún pelo radicular (Dolan et al., 1993; Overvoorde et al., 2010).

Inmediatamente hacia el interior se localizan dos capas de células: corteza (externa, células de mayor tamaño) y endodermis (interna). Ambos estratos suelen contener ocho células muy vacuolizadas que tienden a disponerse emparejadas radialmente. Las células de la endodermis presentan en sus paredes las características bandas de Caspary, que aíslan hidráulicamente a estas células de los haces vasculares.

En el interior de la endodermis se encuentra el periciclo, que rodea a un cilindro vascular diarco que ocupa el centro de la raíz. El periciclo contiene entre 11 y 13 células de pequeño tamaño y con un citoplasma más denso que las células de la endodermis o de la corteza. Dentro del cilindro vascular, el xilema atraviesa diametralmente el cilindro vascular, con lo que ambos extremos (polos del xilema) contactan con las células del periciclo. Por otro lado, el floema forma dos grupos separados de células (polos de floema) situados perpendicularmente respecto a los polos del xilema y cuyas células más externas también establecen contacto con las células del periciclo. Las células del parénquima vascular, que constituyen el resto del cilindro vascular, separan las células del xilema de las del floema.

En una sección longitudinal las células se suceden a lo largo de la raíz formando columnas continuas que discurren en paralelo en la mayor parte de su extensión y que confluyen hacia las células iniciales, en el extremo del meristemo apical (RAM) (Dolan et al., 1993; Overvoorde et al. 2010).

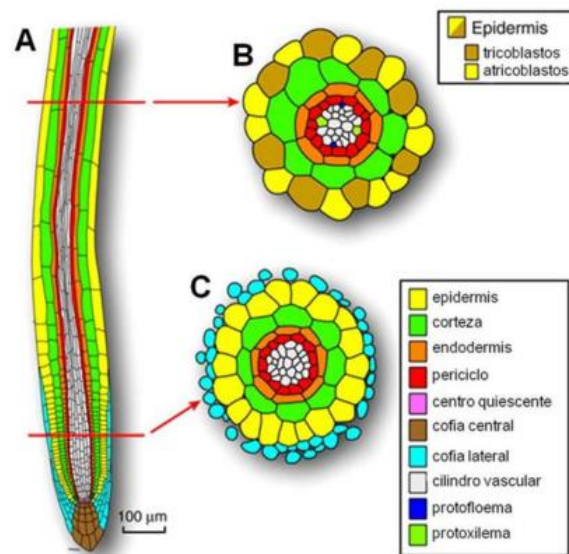


Figura 2: Organización celular de la raíz principal de *Arabidopsis thaliana*. A) Sección longitudinal B) Sección transversal a nivel de la zona madura C) Sección transversal a nivel de meristemo apical (Adaptado de Overhoorde et al., 2010).

## Crecimiento de la raíz principal de *Arabidopsis thaliana*

Las raíces son capaces de mantener su crecimiento durante todo el periodo de vida de la planta (Waisel et al., 2002). En todas las plantas vasculares superiores, este crecimiento es consecuencia de dos procesos: proliferación y elongación celular. La proliferación se produce en el extremo apical del RAM, donde las células iniciales, localizadas junto al Centro Quiescente (CQ), se dividen para generar dos células hijas (Dolan et al., 1993; Overvoorde et al., 2010). La célula hija en contacto con el CQ se mantendrá en estadio de pluripotencia, mientras que la otra sufre una serie de divisiones celulares antes de salir del meristemo y elongar (Scheres, 2007). Así, las células se originan desde el centro quiescente formando columnas paralelas de modo que se mantiene la estructura del tejido (Figura 3) (Beemster et al., 2003). Atendiendo al estadio de desarrollo de los tipos celulares, el ápice radicular de *Arabidopsis* se puede dividir en las siguientes regiones (Dolan et al., 1993):

- **Meristemo apical (RAM).** El meristemo apical está localizado en el extremo de la raíz y contiene el nicho de células madre pluripotentes, así como aquellas células que están en proceso de división activa y experimentan niveles mínimos de elongación celular. En esta zona las células se dividen y elongan de forma coordinada de modo que el tamaño de la célula permanece más o menos constante.

Ambos procesos son simultáneos y su regulación es independiente y obedece a mecanismos de control diferentes (Barlow, 1984; Allan y Trewavas, 1986, Beemster et al., 2003).

- **Meristemo basal o zona de transición (TZ).** En la zona basal del meristemo las células se dividen aproximadamente a la misma velocidad que en la mitad apical del meristemo, pero la velocidad de elongación incrementa con la distancia al ápice de la raíz. Como consecuencia, el tamaño de la célula empieza a aumentar progresivamente (Casero et al., 1989).
- **Zona de elongación (EZ).** Las células no se dividen, pero elongan más del 40% por hora (Traas et al., 1998; Beemster y Baskin, 1998). Estas células pueden llegar a aumentar su longitud hasta el 300% en 3 horas (Verbelen et al., 2006), lo que conlleva que la longitud celular aumente hasta alcanzar un máximo que define el límite proximal de la zona de elongación. El mecanismo descrito para la inducción de elongación contemplan la acidificación de la pared celular mediante activación de bombas de protones y la activación de las enzimas expansinas, que relajan la pared y permiten su extensión (Shcherban et al., 1995; Vissenberg et al., 2005; Park and Cosgrove, 2012).
- **Zona madura de la raíz.** Las células no se dividen ni elongan (salvo en procesos relacionados con el desarrollo de las raíces laterales). En su lugar, experimentan diferenciación celular en forma de modificaciones que determinan una forma y función determinadas, lo que permite la especialización en un tipo celular (De Smet et al., 2007)

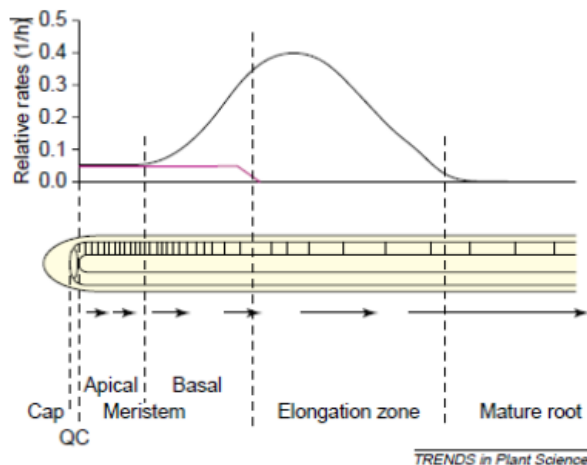


Figura 3: Procesos de crecimiento en el ápice de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Beemster et al., 2003).

El progreso de los diferentes procesos que intervienen en el crecimiento de la raíz principal depende del equilibrio entre proliferación y elongación, que a su vez se coordina mediante señales sistémicas. Se ha descrito un mecanismo de retroalimentación entre los sistemas antagónicos de señalización dependientes de auxinas y citoquininas que explica esta organización. Así, el gradiente de auxinas asegura la proliferación en el meristemo apical y su efecto se ve paulatinamente reprimido en la ZT por acción de las citoquininas (Figura 4 A).

La distribución de auxinas a lo largo de la raíz principal depende de su síntesis en el meristemo apical (Chen et al., 2014) y del transporte polar (Rashotte et al., 2000). El punto máximo de respuesta a auxina se encuentra en el RAM, donde promueve la iniciación y el mantenimiento de la actividad mitótica en una doble estrategia. En primer lugar actúa como mitógeno estimulando la expresión de genes que codifican distintas proteínas clave en la transición G1/S (Doerner et al., 2000; Tromas et al., 2009). Además, la señalización por auxinas induce la expresión de una serie de factores de transcripción implicados en el desarrollo radicular. Por un lado, *WOX5* (*WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5*) se encarga del mantenimiento de la pluripotencia y la quiescencia en el CQ (Sarkar et al., 2007; Forzani et al., 2014). Por otro lado, la transcripción de los genes *PLT* (*PLETHORA*) mantiene la identidad y de la homeostasis de las células del CQ, además de estimular la actividad proliferativa de las células meristemáticas en un proceso dependiente de dosis (Aida et al., 2004; Bilou et al., 2005; Mahönen et al., 2014).

Esta señal activada por auxinas se modula de forma adicional mediante el efecto de las citoquininas, cuya síntesis se produce en el RAM y la ZT (Dello Iorio et al., 2008; Zhang et al., 2013). En el CQ los elevados niveles de citoquininas reprimen el flujo de auxina vía *ARR1* (*ARABIDOPSIS RESPONSE FACTOR 1*) (Zhang et al., 2013). En las células iniciales, sin embargo, el regulador *SCR* (*SCARECROW*) reprime la expresión de transcripción *ARR1* permitiendo así la entrada de auxina y la activación de la mitosis (Sabatini et al., 2003; Moubayidin et al., 2013). A su vez, la expresión de *SCR* es inducida por auxinas, lo que supone un sistema de retroalimentación que controla la homeostasis responsable de la actividad del nicho de células madre. Además, los altos niveles de auxinas en las células que rodean el CQ refuerzan el transporte polar mediante inducción de la degradación del inhibidor *SHY2/IAA3* por el sistema *SCFT<sup>TIR1/AFB</sup>*, lo que a su vez reduce la señalización de citoquininas (Mockaitis et al., 2008).

En el meristemo basal, por otra parte, los altos niveles de citoquininas activan la degradación de ciclinas mitóticas y, por tanto, favorecen el proceso de endoreduplicación y la consiguiente elongación celular (Okushima et al., 2014), además de estimular la expresión de *ARR1* y *ARR12*, que a su vez inducen la expresión de *SHY2/IAA3* (*SHORT HYPOCOTYL 2*). Este sistema, por una parte, reprime la señal de auxina y, por otra, altera el transporte para favorecer la acumulación de auxina en el RAM (Dello Iorio et al., 2008; Moubayidin et al., 2010). Además, se ha observado que la actividad de *ARR1* también depende del correcto transporte basipétalo de auxinas hacia la ZT (Moubayidin et al., 2010) y de la actividad de *SCR* en la endodermis (Moubayidin et al., 2016), lo que supone un fino balance de señales hormonales.

Recientemente se ha descrito que las señales de proliferación y diferenciación celular se integran a través de la distribución de flavonoles (Silva-Navas et al., 2016). Los flavonoles son compuestos polifenólicos producidos como metabolitos secundarios en respuesta a luz (Brown et al., 2001; Buer y Muday, 2004) y tienen función inhibidora de la síntesis y el transporte de auxinas (Brown et al., 2001; Peer et al., 2001; Peer et al., 2004; Peer et al., 2013), además de regular la señalización por ROS (Maloney et al., 2014; Watkins et al., 2014; Silva-Navas et al., 2016). La acumulación de flavonoles en la zona de diferenciación se favorece por señalización de citoquininas (a través de *SHY2*) y de peróxido de hidrógeno, lo que a su vez estimula la elongación celular. Así, los flavonoles se han propuesto como mecanismo intrínseco de regulación de la zonación del RAM en respuesta a señales endógenas (Figura 4B) (Silva-Navas et al., 2016).

....

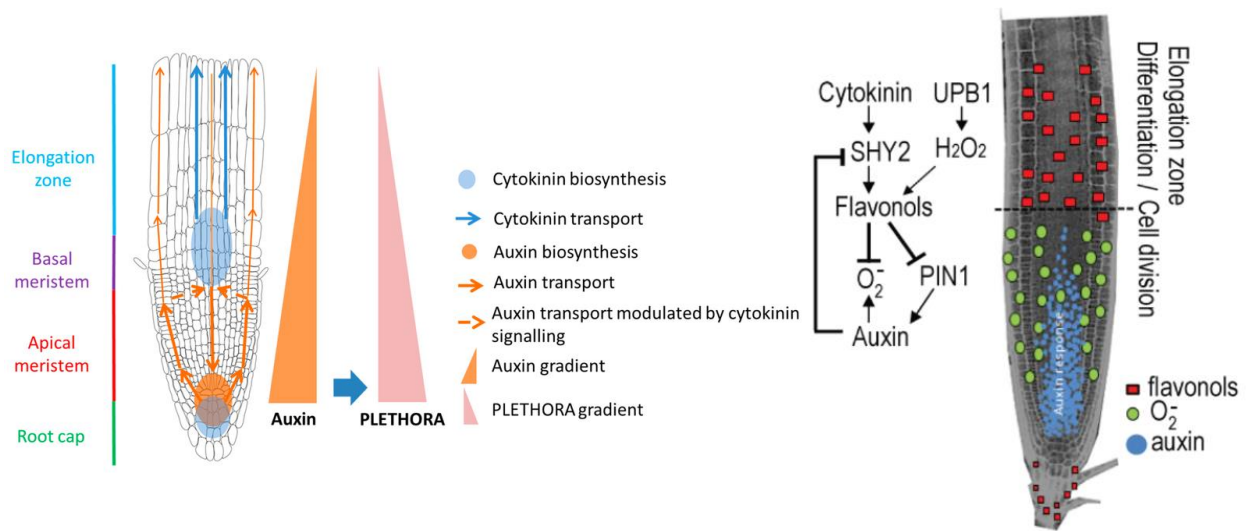


Figura 4: A) Distribución de auxinas a lo largo de la raíz principal y gradiente de expresión de los genes *PLT*. Se representa el transporte de auxinas en naranja y la biosíntesis y transporte de citoquininas en azul (Barrada et al., 2015). B) Modelo de acción de los flavonoles como integradores de señales de proliferación y diferenciación celular (Adaptado de Silva-Navas et al., 2016).

Se han observado evidencias de regulación a través de otras fitohormonas (Figura 5), como es el caso del ácido jasmónico, que inhibe el crecimiento primario a través del factor de transcripción MYC2/JAI1 (*JASMONATE\_INSENSITIVE 1*), regulador negativo de *PLT1* y *PLT2* (Chen et al., 2011). Otra de las hormonas implicadas en el control de la activación de rutas reguladas por auxina son los brasinosteroides (BRs), activadores de la transcripción de *BES1* (*BRI1-EMS SUPPRESSOR1*), un potente represor de las divisiones del centro quiescente (Vilarrasa-Blasi et al., 2014; Chaiwanon and Wang, 2015). Además, los brasinosteroides estimulan la expresión de *ERF115* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR 115*), un factor limitante en las divisiones del centro quiescente, lo que permite establecer una convergencia entre las rutas de señalización del etileno y los brasinosteroides (Ortega-Martínez et al., 2007; Heyman et al., 2013).

También se ha descrito que el ácido abscísico (ABA) regula la quiescencia e inhibe la diferenciación de las células del meristemo radicular (Zhang et al., 2010), además de estimular la elongación celular en la ZT (Sharp et al., 2004; Geng et al., 2013). Por otro lado, se ha observado que las giberelinas participan en la represión de la expresión de *ARR1* por parte de SCR en la ZT (Mouyabidin et al., 2016).

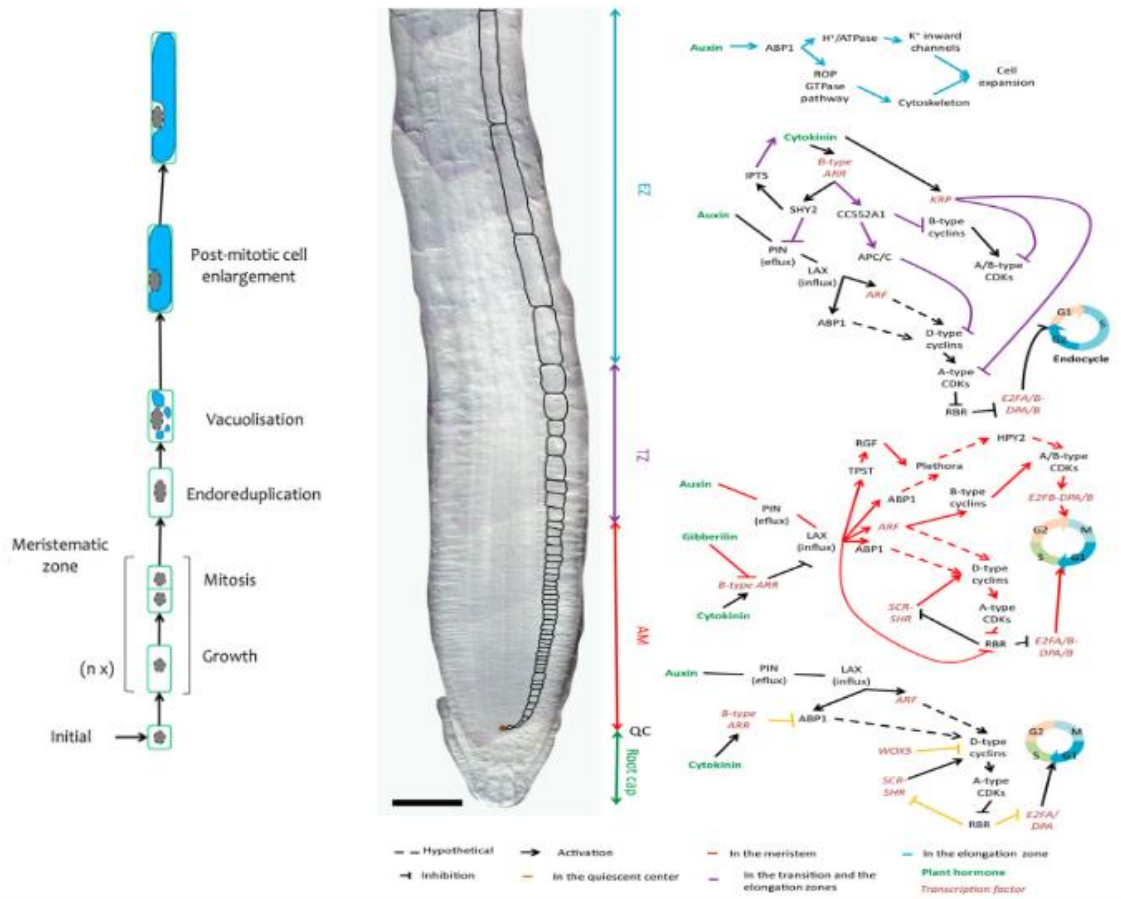


Figura 5: Esquema general de la regulación entre los procesos de proliferación y diferenciación en la raíz principal de *Arabidopsis*. En el centro de la imagen se pueden observar las distintas capas celulares en un corte longitudinal. A la izquierda, se representa el proceso predominante a diferentes alturas del meristemo. A la derecha, las rutas de regulación implicadas en cada paso del proceso se esquematizan cómo se regula el ciclo celular en cada estrato celular (Adaptado de Barrada et al., 2015).

## Desarrollo de las raíces laterales de *Arabidopsis thaliana*

La formación de raíces laterales (RL) es un proceso organogénico postembrionario que contribuye al establecimiento de la arquitectura radicular en plantas superiores (Fukaki *et al.*, 2009). Al igual que el crecimiento de la raíz principal, la iniciación de RL en *Arabidopsis* sigue un patrón acropétalo. Así, las RL jóvenes generalmente se encuentran en el extremo apical de la raíz, mientras que las raíces laterales más maduras se localizan en la zona proximal de la misma. La iniciación de estas raíces laterales ocurre a un ritmo regular durante el crecimiento de la raíz (Lucas *et al.*, 2008) generando una distribución izquierda-derecha (De Smet *et al.*, 2007)

En *Arabidopsis thaliana* las raíces laterales se originan a partir de células del periciclo adyacentes a los dos polos del protoxilema (células XPP, Figura 6B) que son especificadas como células fundadoras (CF) (Dolan *et al.*, 1993; Casero *et al.*, 1995; Laskowsky *et al.*, 1995; Malamy y Benfey, 1997; Casimiro *et al.*, 2001, 2003; Dubrovsky *et al.*, 2001; Lloret y

Casero, 2002). Dubrovsky y colaboradores definieron en 2001 estas células fundadoras como “células que adquieren un destino de desarrollo diferente del de su madre y, como consecuencia, juegan un papel principal durante los primeros estadios de la iniciación de las raíces laterales”. Estas células, una vez especificadas, experimentan una serie de divisiones y expansiones celulares para formar un primordio de raíz lateral (PRL) (Figura 6C) (Malamy y Benfey, 1997; Casimiro et al., 2001, 2003; Dubrovsky et al., 2001; Lloret y Casero, 2002; Péret et al., 2013)

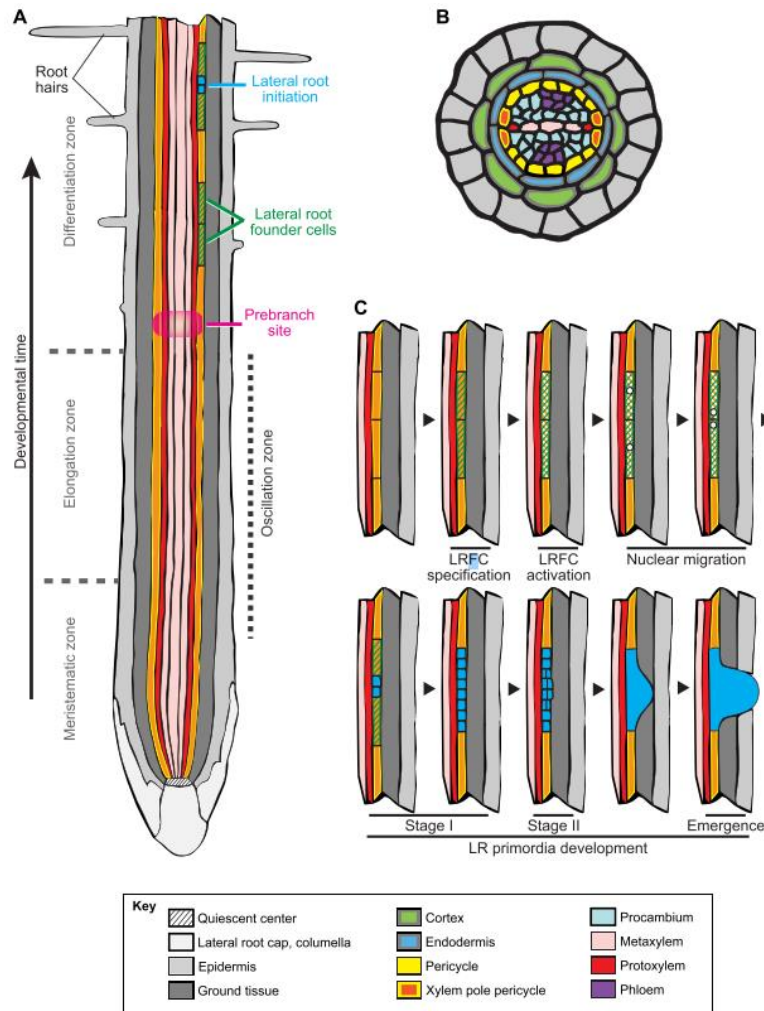


Figura 6: Estructura y desarrollo de la raíz de Arabidopsis. A) Sección longitudinal. Se pueden apreciar las distintas zonas del meristemo, así como los pasos más relevantes en la formación de PRL. B) Sección transversal del meristemo basal. Las células XPP se han destacado en color rojo con borde amarillo. C) Sección longitudinal de un PRL en desarrollo. Las células del periciclo próximas a las células XPP son especificadas en CF (verde) y la iniciación del PRL ocurre con la primera división asimétrica (Azul) (Van Norman *et al.*, 2013).

### Descripción histológica del desarrollo del primordio de raíz lateral

La iniciación de RL se detecta a nivel morfológico cuando determinadas células del XPP experimentan la migración de sus núcleos hacia la pared celular colindante. En Arabidopsis son tres las columnas de células del periciclo enfrentadas al protoxilema las que se dividen durante la formación de las raíces laterales. No obstante, experimentos de linaje celular han mostrado que sólo la fila central contribuye significativamente al establecimiento del

primordio (Kurup et al., 2005). Este proceso precede a una división transversal asimétrica y simultánea en ambas células que da lugar a dos células hijas cortas flanqueadas por dos células más largas (**estadio I** del PRL, Figura 7) (Casimiro et al., 2001; Casimiro et al., 2003; Dubrovsky et al., 2001; De Smet et al., 2007). Las divisiones asimétricas son indicativas de que las células hijas tienen distintos destinos celulares (Scheres y Benfey, 1999) y se ha observado que las células hijas pequeñas expresan genes relacionados con la división asimétrica (De Smet et al., 2008).

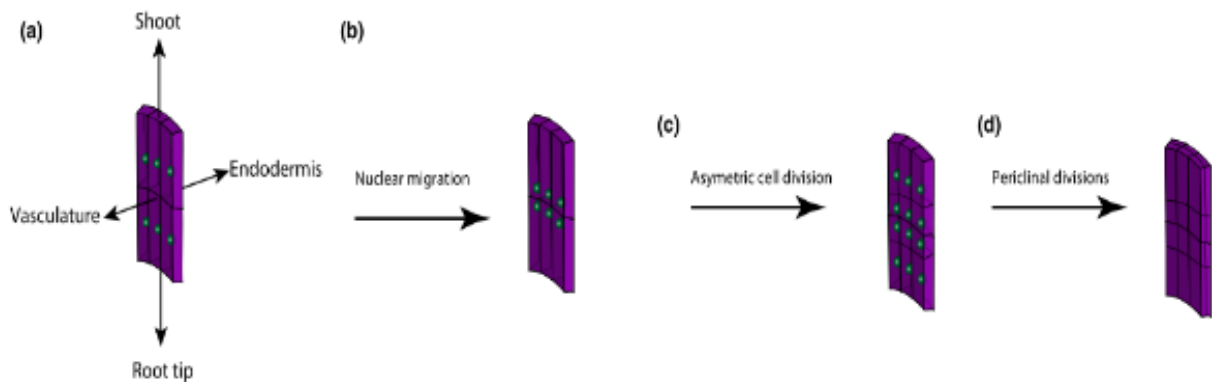


Figura 7: Primeros eventos del desarrollo del PRL. a) Células del periciclo especificadas. b) Migración nuclear. c) División asimétrica. d) Divisiones periclinales (Sparks, 2015).

Después del primer par de divisiones asimétricas en una columna del periciclo, las células localizadas a la misma altura en las columnas adyacentes también se activan. Las células hijas continúan dividiéndose simétrica y asimétricamente, desde el centro hacia arriba y hacia abajo, creando grupos con un máximo de diez células cortas que son similares en longitud. Una serie idéntica de divisiones mitóticas ocurre también en ambas columnas de células del periciclo adyacentes, lo que da lugar a un grupo de células cortas centrales localizadas al mismo nivel transversal. A menudo se observa una plasticidad considerable en el preciso orden de estas divisiones (Casimiro et al., 2001; Casimiro et al., 2003).

Siguiendo un periodo de expansión radial, las células hijas cortas centrales se dividen periclinalmente para formar un primordio compuesto por dos capas de células definido como **estadio II** (Malamy y Benfey, 1997; Casimiro et al., 2001; Casimiro et al., 2003). Las siguientes divisiones conducen a los estadios III-VII, haciendo crecer el PRL en forma de bóveda o campana hasta emerger como RL (Figura 8) (Malamy y Benfey, 1997; Lucas et al., 2013). Debido a esta configuración en forma de campana, se ha podido observar una gran variabilidad en la orientación de los planos de estas divisiones (Lucas et al., 2013).

Para completar la emergencia, los primordios deben atravesar varios tejidos de la raíz principal. En *Arabidopsis*, esto comprende capas monoestratificadas de células endodérmicas, corticales y epidérmicas (Dolan et al., 1993; Swarup et al., 2008; Péret et al., 2009). Durante los últimos años se ha especulado que el desarrollo de las raíces laterales y los procesos de separación celular en los tejidos adyacentes de la raíz deberían estar finamente coordinados para minimizar los daños en los tejidos y reducir el riesgo de infección. Así, los **pasos IV-VI** del desarrollo del PRL son claves para su emergencia ya que de debe atravesar la Banda de Caspary, capa que aísla los tejidos internos de la raíz (Lloret

y Casero, 2002; Péret et al., 2009).

Una vez atravesada la endodermis (estadio VI), los PRL tienen una organización similar al meristemo de la raíz principal. A partir de este punto, la elongación celular permite la emergencia desde la raíz madre (estadio VIII), proceso que se puede observar entre los cinco y los siete días post germinación (Casimiro et al., 2001; Dubrovsky et al., 2001).

Para que se produzca esta emergencia los diferentes tejidos de la raíz principal deben participar activamente en el proceso. Se ha observado que las células situadas junto a los primordios expresan genes que codifican enzimas remodeladoras de la pared celular (CWR, cell wall remodelling) para facilitar la separación celular en los tejidos de alrededor y promover la emergencia de los PRL (Neuteboom et al., 1999; Roberts et al., 2002; Laskowski et al., 2006).

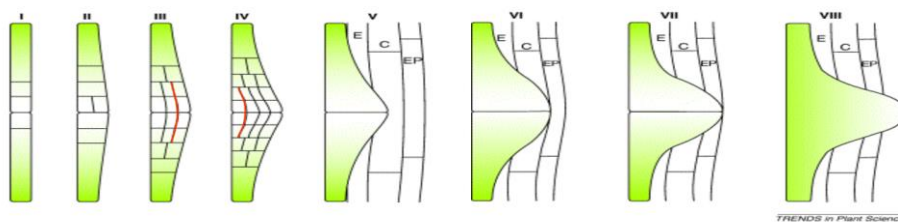


Figura 8: Estadios de desarrollo de un PRL (Casimiro et al., 2001).

El desarrollo de los primordios es fundamental en el establecimiento de la arquitectura radicular, por lo que es un proceso altamente regulado. Además, este desarrollo puede inducirse o reprimirse en respuesta a las condiciones ambientales, lo que permite a la planta adaptar su crecimiento. Algunos de los estímulos descritos que pueden modificar el desarrollo de los PRL de *Arabidopsis thaliana* son: la baja disponibilidad de agua como consecuencia de estrés osmótico/salino, así como la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno y fósforo en el medio (Malamy, 2005; Deak y Malamy, 2005; Lima et al., 2010; Péret et al., 2011; Jones y Ljung, 2012; Lavenus et al., 2013)

## Regulación del desarrollo de raíces laterales

La formación de raíces laterales es un proceso altamente regulado en *Arabidopsis thaliana*. A continuación se describen los mecanismos moleculares responsables del desarrollo de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana* en cada uno de los siguientes procesos: Especificación de células fundadoras, iniciación del primordio de raíz lateral, emergencia y adquisición de meristemo. La Figura 9 muestra un resumen de las principales rutas reguladoras de dichos procesos identificadas.

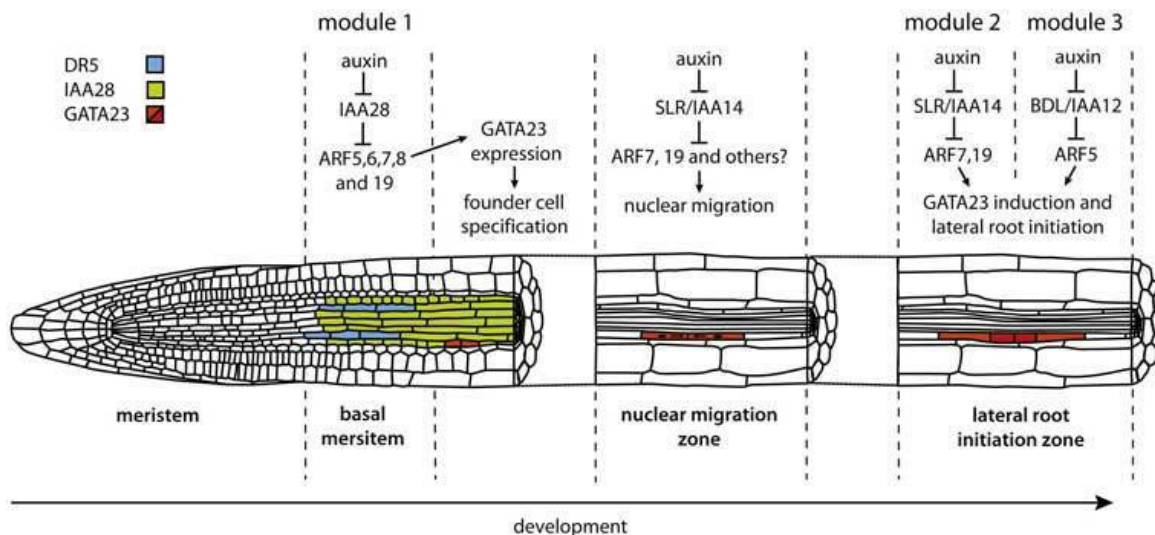


Figura 9: Representación esquemática de los módulos de señalización de auxina que actúan durante la especificación, migración nuclear e iniciación del PRL (De Rybel et al., 2010).

### Especificación de células fundadoras

La especificación de los primordios comienza en el meristemo basal, donde determinadas células del periciclo son especificadas para dar lugar a células fundadoras (CF) (Beemster et al., 2003). En esta región las células del periciclo próximas al floema mantienen su actividad mitótica paralizada en estado G1, mientras que aquellas próximas al xilema (Xylem pole pericycle cells - XPP-) tienen capacidad para pasar a fase G2 y continuar dividiéndose incluso después de salir del meristemo principal (Beeckman et al., 2001; Casimiro et al., 2003). De Smet y colaboradores demostraron en 2007 que las células XPP situadas en la ZT tienen una morfología y perfil de expresión génica concretos y se especifican en células proliferativas mediante señalización por auxina que se transporta desde el RAM a través de los transportadores PIN y AUX1 (De Smet et al., 2007).

No todas las células XPP muestran el mismo potencial, ya que sólo algunas de ellas se dividen para formar primordios y establecerse como CF (Casimiro et al., 2003). Recientemente se ha asociado esta activación con la oscilación en la expresión de cientos de genes (Moreno-Risueno et al., 2010). Esta oscilación puede monitorizarse *in vivo* mediante diferentes construcciones del marcador de respuesta a auxinas *DR5* (*DIRECT REPEAT 5*) y se ha observado hay un máximo de señal en las células del protoxilema localizadas en la zona de oscilación y que su periodo coincide con los picos de respuesta a auxinas que preceden la iniciación del primordio (De Smet et al., 2007; Moreno-Risueno et al., 2010).

Se han identificado otros genes relacionados en la formación de LR o que actúan aguas abajo de la señalización de auxinas con expresión pulsátil en la zona de oscilación (Moreno-Risueno et al., 2010). Entre ellos, destaca el caso de *ARF7* (*AUXIN RESPONSIVE FACTOR 7*), que oscila en antifase con *DR5* y cuyo mutante ve afectada la formación de sitios de prerramificación. Estos resultados sugieren que *ARF7* podría tener una función en la periodicidad de la expresión génica en la ZO, lo que podría explicar el patrón de expresión oscilatorio de genes como *LBD16* (*LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN*

16) implicado en la iniciación del primordio (Okushima et al., 2007).

Por otro lado, se han identificado algunos genes activados por auxinas cuya expresión es específica de las CF: *GATA23* (Regulado por ARF6, ARF8, ARF19 e IAA28, De Rybel et al., 2010; Xuan et al., 2015), *MAKR4* (*MEMBRANE-ASSOCIATED KINASE REGULATOR 4*) (Xuan et al., 2015; Van Norman et al., 2015) y *SKP2B* (*S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2B*, regulado por IAA28, Manzano et al., 2012). Así, Möller y colaboradores (2017) proponen que la activación transitoria de *ARF7* podría ser resultado de la degradación periódica de determinadas proteínas Aux/IAA en la zona de oscilación como respuesta a la acumulación local de auxinas.

Sin embargo, no se ha podido identificar evidencias de que otros promotores activados por auxinas presenten expresión oscilatorio. Además, la adición de auxina exógena en la zona de oscilación no es suficiente para iniciar una nueva oscilación de *DR5* (Moreno-Risueno et al., 2010), lo que ha llevado a estos autores a afirmar que esta oscilación no es consecuencia de fluctuaciones en el contenido de auxinas. En su lugar, proponen un modelo de reloj biológico similar al observado durante la somitogénesis de animales vertebrados, de modo que este sistema de regulación endógeno e independiente de auxinas aseguraría el patrón de desarrollo espacial con información temporal (Moreno-Risueno y Benfey, 2011). Esta hipótesis se apoya en la identificación de más de 2000 genes que oscilan en fase con *DR5* y 1400 en antifase, así como en el hecho de que no se han identificado patrones de expresión en otras fases (Moreno-Risueno et al., 2010).

Por último, es necesario remarcar que que el periodo de oscilación transcripcional en el meristemo basal es más corto que la frecuencia de iniciación de PRLs, lo que sugiere que la adquisición de competencia para formar una RL y la iniciación del PRL son procesos independientes (Moreno-Risueno et al., 2010). Manzano y colaboradores (2011) sugieren que el hecho de que se especifiquen más CF que PRL emergen permite a la planta generar un reservorio de CF que podrían responder a activación por señales externas, aportando capacidad de adaptación.

### **Iniciación del primordio de raíz lateral**

En *Arabidopsis*, la primera división del periciclo para formar una RL ocurre en la zona de diferenciación (Casimiro et al., 2001) y corresponde con áreas de máxima respuesta a auxinas (Casimiro et al., 2001; De Smet et al., 2007; Dubrovsky et al., 2008). Sin embargo, se ha observado que la inhibición química del transporte de auxinas a las células fundadoras inhibe la división asimétrica inicial (Casimiro et al., 2001), aunque no la migración nuclear (De Smet et al., 2007), lo que implica que estas células deben haber sido expuestas a una señal inductora aún sin determinar. De Smet y colaboradores sugirieron en 2007 que las células del protoxilema que expresan el marcador *DR5* podrían señalar a las células XPP adyacentes para que se dividan y den lugar a un primordio en estadio I. Así, la señal de auxinas podría ser una señal de división para la CF más que una señal de iniciación.

Se ha monitorizado la respuesta y distribución de auxinas a lo largo del sistema radicular de *Arabidopsis* y se ha observado la inducción de *DR5* en las CF se produce en una zona con bajos niveles de auxinas. Estos resultados han permitido establecer una ventana

espaciotemporal para la iniciación de RL. Esta ventana se adaptaría de forma dinámica al crecimiento de la raíz, lo que garantizaría una apropiada secuencia de formación de raíces laterales en función de las condiciones de crecimiento (Dubrovsky et al., 2006; Dubrovsky et al., 2008).

Por otro lado, se ha observado que la alteración del transporte polar de auxinas altera su distribución en la ventana espaciotemporal a nivel mínimo. Sin embargo, esta fluctuación es suficiente para provocar inhibición de la iniciación (Dubrovsky et al., 2011; Marhavý et al., 2013). Estos resultados sugieren que la respuesta podría desencadenarse ante fluctuaciones mínimas del estímulo. Así, una porción de las células XPP podrían estar experimentando cambios locales en los niveles de auxina disponible como señal para el desarrollo del primordio (Dubrovsky et al., 2011).

Algunos de los transportadores de auxinas implicados en el proceso de activación de las células fundadoras son PIN3 (PIN-FORMED 3) y AUX1 (AUXIN TRANSPORTER PROTEIN 1). PIN3 importa auxinas a las células del periciclo desde las células endodérmicas adyacentes para crear un punto de máxima concentración de auxinas que desencadena la iniciación del primordio (Marhavý et al., 2013). Por su parte, AUX1 se localiza en la membrana plasmática basal de las células del protofloema (donde facilita el transporte acrópeto de auxina) y en superficie la apical de las células de la cofia lateral y/o epidermis (Swarup et al., 2001). Se ha observado que los elementos más apicales del protofloema coinciden con la posición de las células fundadoras en la transición G1-S (De Smet et al., 2003), lo que sugiere que AUX1 podría participar en la elevada concentración de auxina encontrada en esta posición (Kleine-Vehn et al., 2006).

Se han caracterizado muchos de los componentes de la transducción de señal que regula la formación de RL (Fukaki et al., 2007). Los resultados más recientes apuntan a que la distribución de auxina activaría el mecanismo de señalización vía *TIR1/AFB1-3* y la consecuente activación de las células fundadoras, que iniciarían la migración nuclear y la primera división asimétrica (De Rybel et al., 2010; Goh et al., 2012). Así, los represores transcripcionales de la familia Aux/IAA regulados por *TIR1/AFB* serían degradados en respuesta a auxina, desencadenando la expresión de los genes de respuesta (Chapman y Stelle, 2009). Además, se han logrado identificar las rutas dependientes de auxina *IAA12/BDL(BODENLOS)-ARF5* y *IAA14/SLR-ARF7/ARF19* como componentes de respuesta necesarios para este proceso (Fukaki et al., 2002, 2005; Okushima et al., 2005; Vanneste et al., 2005; De Smet et al., 2010; Vernoux et al., 2011).

#### Regulación vía *IAA14/SLR-ARF7/ARF19*

Se han identificado mutantes puntuales de *SLR* incapaces de ser degradados a través de la ruta *TIR1/AFB1-3* en respuesta a auxinas. Estos mutantes *slr-1*, que son dominantes negativos, son incapaces de llevar a cabo las primeras divisiones anticlinales del periciclo (Fukaki et al., 2002). Se ha observado que estos mutantes tienen bloqueada la expresión de *SKP2B* en CF y PRL, lo que sugiere que la degradación de *SLR* tras la especificación podría ser necesaria para que se diera la iniciación y la primera división asimétrica. Por otro lado, la sobreexpresión de *CYCD3;1* (un regulador positivo de la transición G1/S) en el fondo mutante *slr-1* induce algunas rondas de división, pero es incapaz de activar la

expresión de marcadores de la primera división asimétrica (De Smet et al., 2008) o de desarrollar el PRL (Vanneste et al., 2005), lo que demuestra que la activación del ciclo celular no es suficiente para rescatar la formación de los primordios en el mutante *slr-1*.

La proteína SLR interacciona con ARF7 y ARF19 (Fukaki et al., 2005) y su degradación en respuesta a auxinas desbloquea a estos activadores y permite que se produzcan las divisiones anticlinales que dan comienzo al desarrollo del PRL (Fukaki et al., 2002; Wilmoth et al., 2005; Vanneste et al., 2005). El doble mutante *arf7/arf19* presenta una drástica reducción en la formación de PRL (Fukaki et al., 2002; Wilmoth et al., 2005). Sin embargo, esta reducción no es total, lo que sugiere que otros factores de transcripción podrían contribuir al proceso de formación de RL (Fukaki et al., 2007).

Por otro lado, simulaciones recientes muestran que la inducción del gen de respuesta a auxinas ARF7 comienza durante la iniciación y que actúa en un sistema de retroalimentación positiva que mantiene elevados los niveles de auxinas en el PRL en desarrollo (Lavenus et al., 2015; Chen et al., 2015). Se ha identificado a la familia de factores de transcripción *LBD* (*L*ATERAL *O*RGAN *B*OUNDARIES *D*OMAIN) como genes diana de la ruta SLR/IAA14-ARF7/ARF19. *LBD16*, *LBD18* y *LBD19* son reguladores positivos de la formación de raíces laterales (De Smet et al., 2010). *LBD16*, por su parte se expresa específicamente en las células del periciclo antes de la iniciación y su inducción desencadena la migración nuclear que es uno de las etapas iniciales y limitantes del desarrollo del primordio (Goh et al., 2012).

Otro de los targets identificados de SLR/ARF7 es el factor de transcripción *MYB77* (Shin et al., 2007). El mutante *myb77* reduce sus niveles de expresión y esto se traduce en una disminución de la densidad de raíces laterales. El dominio de activación de *MYB77* interacciona con los dominios III y IV de la proteína SLR1 y se ha observado que la coexpresión de *MYB77* y la región C-terminal de *ARF7* aumenta la expresión de genes de respuesta a auxina en protoplastos. Las interacciones con SLR y ARF7, así como su efecto sinérgico, sugieren que *MYB77* (e incluso otros MYBs relacionados) interaccionan con los factores ARF para regular procesos de respuesta a auxina.

#### Regulación vía *IAA12/BDL(BODENLOS)-ARF5*

Alternativamente, se ha descrito el módulo *BDL(BODENLOS)/IAA12-ARF5* como regulador de la formación de RL que actuaría aguas abajo de SLR/IAA14-ARF7/ARF19 (De Smet et al., 2010). Este trabajo propone la coordinación de módulos discretos y sucesivos que regularían distintos aspectos del desarrollo en respuesta a auxinas de una forma similar a la regulación de dianas únicas que controla la respuesta bipartita de la auxina durante la especificación de la hipófisis (Weijers et al., 2006).

#### Otros reguladores de la iniciación mediada por auxinas del primordio de raíz lateral.

Se han identificado numerosos genes implicados en el desarrollo de los PRL, aunque sus rutas de regulación están sin determinar. En conjunto, estos resultados permiten describir una red genética que regula procesos muy diversos en función de su respuesta a una sola

molécula señalizadora: la auxina, mediante mecanismos de respuesta multimodular (De Smet et al., 2010) A continuación se describen los más relevantes:

- El factor de transcripción de tipo *AP2* (*APETALA 2*) / *EREBP* (*ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN*) *PUCHI* se expresa en respuesta a auxinas en todas las células de PRL en estadios tempranos, donde controla los patrones de división del primordio (Hirota et al., 2007)
- *GNOM* regula la división celular asimétrica (Steinmann et al., 1999) y su mutación produce incapacidad para iniciar el primordio (Geldner et al., 2004). Este gen codifica una ARF-GEF (*ADP RIBOSYLATION FACTOR-GUANIDINE EXCHANGE FACTOR*) que regula el tráfico de los transportadores de auxinas tipo PIN (Steinmann et al., 1999)
- El gen *ACR4* (*ARABIDOPSIS CRINCKLY 4*) se expresa en las células hijas pequeñas que se forman después de la primera división asimétrica y su mutación provoca defectos en la distribución alterna de los primordios, así como en su periodo a lo largo de la raíz principal y alteraciones de la expresión de *LBD5* o *DR5* en los PRL. Esta proteína se ha descrito como un receptor tipo kinasa asociado a membrana que sería responsable de detectar y transmitir una señal inhibitoria de la división celular. Así, reprimiría de una forma no autónoma la proliferación de las células del periciclo que rodean el primordio (De Smet et al., 2008)
- El factor de transcripción *MYB93*, que es inducible por auxinas, se expresa de forma exclusiva y temporal en las células endodérmicas localizadas en los nuevos primordios, desde donde regula negativamente el desarrollo de la raíz lateral (Gibbs et al., 2014)
- El gen *DFL1/GH3.6*, participa en la transducción de señal mediada por auxinas y es inhibidor de la diferenciación celular durante la formación de raíces laterales, así como de la elongación celular en la parte aérea y el hipocotilo (Nakazawa et al., 2001)

### Regulación mecánica de la iniciación de raíces laterales

De forma paralela al control genético existe un mecanismo de regulación del patrón espacial de las raíces laterales mediado por respuestas trópicas o estímulos mecánicos (Ditengou et al., 2008). Se ha observado que el estímulo gravitrópico, provocado por la torsión manual de la raíz, puede inducir el desarrollo de primordios en la zona externa de raíces dobladas (Lucas et al., 2008). Este proceso de inducción se han asociado a una acumulación de auxinas en la zona doblada (Ottenschlager y colaboradores (2003) y Swarup y colaboradores (2005). Análisis transcriptómicos de estos experimentos de torsión manual han revelado cambios dinámicos en la expresión de genes de respuesta a auxina consistentes con una redistribución de la misma (Ditenglou et al., 2008; Laskowski et al., 2008).

Se ha propuesto que la estimulación mecánica induce cambios en la expresión de genes de respuesta a auxinas en el sitio de iniciación de RL mediante relocalización del transportador PIN1 (*PIN-FORMED1*) en las células adyacentes del protoxilema (Ditenglou et al., 2008). Por otro lado, Laskowski y colaboradores (2008) elaboraron un modelo *in silico* en el que el estímulo gravitrópico generaría acumulación de altos niveles de auxina en la parte superior de la raíz doblada como consecuencia de cambios en los tamaños celulares. Esta señal promovería la expresión del importador de auxinas *AUX1* (*AUXIN RESISTANT 1*) y se desencadenaría un proceso de retroalimentación positiva que concluiría con la aparición de

un punto máximo en los niveles de esta fitohormona. El defecto en la formación de RL del mutante *aux1*, sin embargo, puede ser compensado por estimulación mecánica (Ditenglou et al., 2008). Estos datos, unidos al hecho de que el mutante *pin1* no muestra defectos en el desarrollo de RL (Benkova et al., 2003), sugieren que la señalización mediada por estímulo mecánico es independiente del marcaje de las células fundadoras. Así, se puede afirmar que la distribución de los PRL se encuentra bajo regulación de al menos dos mecanismos diferentes que operan de forma coordinada, lo que puede explicar la capacidad de la raíz para responder a señales endógenas y ambientales.

### **Emergencia del primordio de raíz lateral**

La emergencia de las raíces laterales es un proceso altamente regulado e independiente de la iniciación del primordio (Casimiro et al., 2001; De Smet et al., 2007). Su progreso depende de la auxina sintetizada en la parte aérea (Bhalerao et al., 2007; Swarup et al., 2008), que se trasloca a la raíz mediante los transportes floemático y polar (Ljung et al., 2005). Si durante la iniciación del primordio la auxina estimulaba la división celular, durante el desarrollo del primordio su función se encuentra ligada a la separación celular mediante el control de los niveles de expresión de enzimas remodeladoras de la pared celular como pectoliasa, pectil metilesterasa, expansinas y b-xilolasa (Boerjan et al., 1995; Laskowski et al., 2006). Así, la auxina actúa como una señal inductora que reprograma las células adyacentes al PRL y estimula la separación de sus paredes celulares (Swarup et al., 2008).

La auxina se acumula en un primer momento en las células centrales de los PRL para pasar más adelante a las células del extremo del primordio. Ahí, estimulará la degradación de las proteínas Aux/IAA y la consiguiente activación de los factores de transcripción ARF. Uno de los targets identificados de esta ruta son los transportadores de auxinas *PIN3* y *LAX3* (*LIKE AUX1 3*), estimulados por ARF7 (Figura 10) (Péret et al., 2013; Palme y Teale, 2013). *PIN3* se expresa en las células corticales como respuesta a la señal de auxina emitida por las células XPP. El resultado es una pérdida neta de la respuesta a auxinas en estas células. Sin embargo, la señal es suficiente para que las dos columnas de células corticales que rodean a los PRLs expresen *LAX3*, experimenten acumulación local de auxinas y activen la señal para llevar a cabo la separación celular necesaria para el desarrollo del primordio (Swarup et al., 2008; Péret et al., 2013). Este patrón de expresión restringido asegura que la separación celular esté sincronizada con el desarrollo y la emergencia de los PRLs, reduciendo la tensión creada por los tejidos de alrededor y permitiendo a las células meristemáticas del ápice de los PRLs dividirse periclinalmente (Péret et al., 2009).

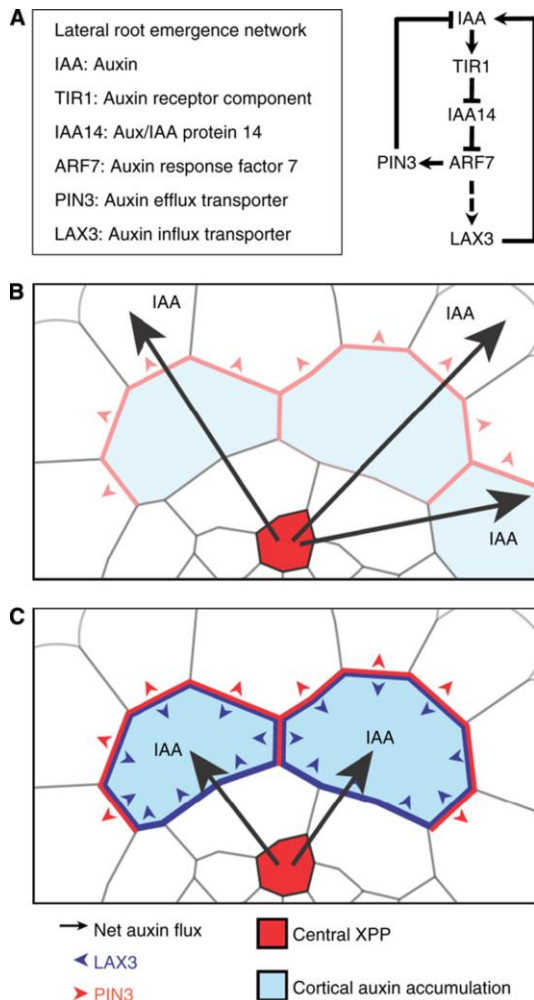


Figura 10: Inducción secuencial de los transportadores de auxinas *PIN3* y *LAX3* en el desarrollo del PRL. A) Modelo de la ruta de regulación de la expresión de *LAX3*. B) La auxina procedente de las células XPP estimula la expresión de *PIN3* en el córtex, lo que resulta en un flujo neto de auxinas hacia las células de la epidermis. C) Las células corticales que rodean a las CF acumulan suficiente auxina para inducir la expresión del importador de auxinas *LAX3*, lo que desencadena la separación celular necesaria para el desarrollo del PRL. (Péret et al., 2013).

En lo que a su función se refiere, se ha podido determinar que *LAX3* regula la expresión dependiente de auxina de un grupo de enzimas remodeladoras de pared celular (CWR) en las células que rodean al primordio (Cosgrove, 2000; Marín-Rodríguez et al., 2002; Vissenberg et al., 2005; Wen et al., 2006). Como resultado de la activación enzimática, las paredes de las células que rodean a los PRLs se debilitan. Sin embargo, en la endodermis este mismo grupo de enzimas remodeladoras está controlado por IAA/*SHY2*, lo que refleja las diferencias en la composición de la pared celular entre los tejidos de la endodermis de la raíz principal y la raíz lateral (Tian y Reed, 1999; Vermeer et al., 2014).

Sin embargo, la remodelación de la pared no es el único proceso necesario para la emergencia de los PRL (Caspary, 1865). Además de las distintas capas celulares, el primordio debe atravesar la Banda de Caspary, una red que conecta las células de la endodermis con una barrera impermeable que sella el espacio apoplástico (de Ruzf de Lavisson, 1910; Nagahashi and Thomson, 1974). La formación de la Banda de Caspary depende de las enzimas *CASP* (*CASPASAS*), que guían a la maquinaria de biosíntesis de

lignina (Roppolo et al., 2011), así como de la acción de NADPH oxidasas y peroxidasas que favorecen la polimerización (Lee et al., 2013). Adicionalmente, las células endodérmicas presentan un segundo nivel de diferenciación de pared celular que consiste en el depósito de suberina entre la pared primaria y la membrana citoplásmica (Andersen et al., 2015; Barberon et al., 2016).

Otro de los factores clave en la emergencia de las RL es el transporte de agua. (Péret et al., 2012). Los PRLs están aislados simplásticamente de la vasculatura de la raíz principal (Oparka et al., 1995), por lo que es necesario establecer un flujo de agua entre las células que se están expandiendo y dividiendo. Se han descrito cambios en la distribución de acuaporinas que facilitan la emergencia de las RL como respuesta a auxina, así como una compleja interacción espaciotemporal entre ambas (Figura 11) (Péret et al., 2012). La mayoría de los genes que regulan la actividad de las acuaporinas están reprimidos en la raíz principal de *Arabidopsis* durante la formación de las raíces laterales, mientras que se expresan en la base de estadios tempranos (I-II) de los PRLs, de una manera dependiente de auxina. Así, la auxina reprime la conductividad hídrica en las células de la raíz principal y la promueve en los PRLs (Péret et al., 2012)

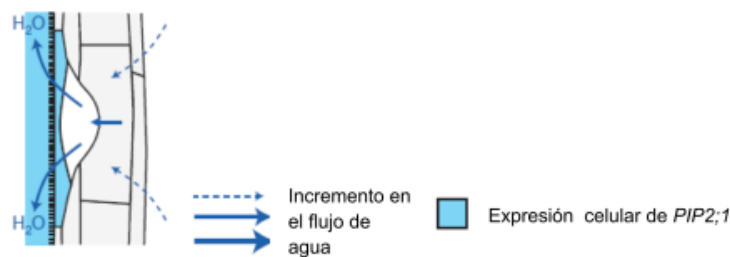


Figura 11: Regulación de la emergencia mediante control del equilibrio hídrico. Como resultado de la acumulación de auxina, se estimula el transporte de agua en los tejidos basales del PRL (Péret et al., 2012).

### Adquisición de meristemo

Se ha descrito ampliamente el control del desarrollo de los PRL mediante la importación de auxina sintetizada en la parte aérea y trasladada a la raíz mediante transporte polar y floemático (Bhalerao et al., 2007; Ljunget al., 2005; Swarup et al., 2008). Sin embargo, experimentos de escisión de tallo han demostrado que, aunque los PRL jóvenes son incapaces de continuar dividiéndose en ausencia de auxina exógena, los primordios maduros son capaces de finalizar correctamente su desarrollo (Dubrovsky et al., 2001). Así, los PRL entre los estadios de desarrollo III y V se desarrollan independientemente de la auxina proveniente del transporte polar, lo que indica que contienen tipos celulares que han desarrollado la capacidad de funcionar como fuente de auxina endógena (Laskowski et al., 1995; Himanen et al., 2002; Marchant et al., 2002; Casimiro et al., 2003).

El establecimiento de un gradiente autónomo de auxinas a lo largo de la raíz lateral en crecimiento es fundamental para su desarrollo y su efecto es similar al de los gradientes de morfógenos en el desarrollo animal (Bhalerao y Bennett, 2003). Se ha observado que la respuesta máxima a auxinas se localiza en las células centrales de primordio durante las primeras etapas de su desarrollo para trasladarse más tarde al ápice de los PRLs

multicelulares (Benková et al., 2003; Péret et al., 2009). Este gradiente depende del transporte auxina mediado por GNOM y los transportadores PIN (Friml et al., 2003). La interferencia química (a través de inhibidores) o genética (mutantes) con el transporte de auxina origina alteraciones tanto en el establecimiento del gradiente de auxina como en el desarrollo de los PRLs (Benková et al., 2003; Geldner et al., 2004).

Otras rutas de regulación hormonal implicadas en la formación y desarrollo de PRL.

### **Citoquininas**

Se ha descrito una actividad represora de las citoquininas en la formación de raíces laterales. Esta represión se produce mediante interrupción del transporte polar de auxinas (Benková et al., 2003; Laplaze et al., 2007; Li et al., 2006). Bielach y colaboradores demostraron que las fases tempranas del desarrollo de PRL, incluyendo las células en estadio premitótico, son más sensibles a citoquinina que los primordios desarrollados (2012). Estos autores proponen que la sensibilidad a citoquininas está inversamente relacionada con los niveles de auxina endógena, de manera que en la ventana de desarrollo, donde los niveles de auxina son bajos, la citoquininas adicionada exógenamente sería capaz de interrumpir el proceso de desarrollo del primordio. Sin embargo, en primordios más desarrollados, donde los niveles de auxina son mayores, el impacto de las citoquininas sería menor.

### **ABA**

El Ácido Abscísico (ABA) participa en la formación de raíces laterales a diferentes niveles. En primer lugar, se ha descrito un papel promotor que actúa a través de la inducción de la expresión de genes inducidos por auxinas. El receptor PYL 8 (PYR1-like), interacciona directamente con los factores de transcripción MYB77, MYB44 y MYB73, lo que permite modular la actividad de ARF7 e incrementar la expresión de *LBD16* y *LBD29*, ambos inductores de la formación y elongación de raíces laterales (Okushima et al., 2005; Okushima et al., 2007; Wilmoth et al., 2005).

Por otro lado, se ha descrito que el ABA tiene un papel inhibitorio de la formación de RL mediante la inhibición de la expresión de *TIR1* vía *miR393* y *ABI4* (*ABA* *INSENSITIVE* 4), lo que conlleva inhibición de la respuesta a auxinas (Chen et al., 2012). Además, el ABA tiene un papel antagonista del efecto cooperativo de Giberelinas (GA) y etileno, ambos inductores de la muerte celular programada de las células epiteliales adyacentes al PRL (Mergemann and Sauter, 2000; Steffens et al., 2006).

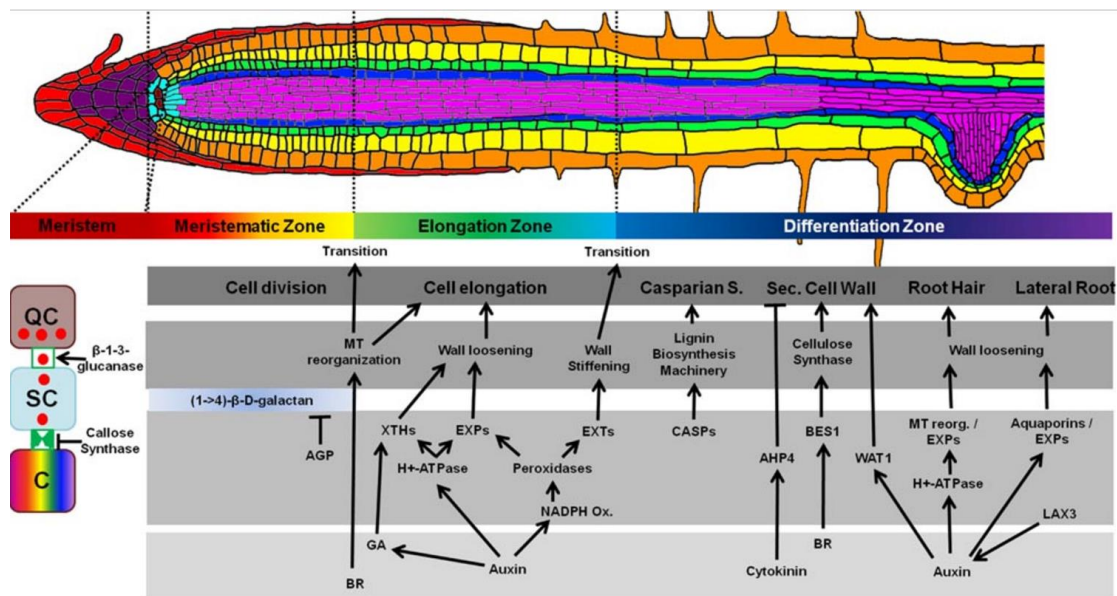


Figura 12: Esquema general de las rutas hormonales de regulación de la formación de RL en *Arabidopsis thaliana* (Chen et al., 2012).

## Poliadenilación alternativa

El transcriptoma de las células eucariotas se modifica por diferentes procesos que regulan su estabilidad y traducción. Uno de esos procesos clave en la maduración de los pre-mRNA es el corte endonucleotídico del ARN naciente, seguido de la síntesis de una cola de adeninas (Poly(A)) en su extremo 3'UTR (Colgan et al., 1997). La poliadenilación es esencial para la localización, exportación, estabilidad y traducción del RNA maduro (Revisado por Millevoy y Vagner, 2009) y su adición se regula de forma interconectada a los procesos de procesamiento (*splicing*) y transcripción (Maniatis et al., 2002).

Se han hallado multitud de evidencias de un sistema de regulación de la expresión génica mediante la selección del sitio de corte y poliadenilación que implica selección de sitios de poliadenilación (**PAS**) en diferentes regiones genómicas del mensajero inmaduro (UTRs, CDS e intrones). Este nivel de regulación se encuentra ampliamente extendido entre los metazoos y ha permitido describir el proceso de Poliadenilación Alternativa (**APA**) como aquel que genera mensajeros de distinta longitud en respuesta a señales específicas de tejido, de estadio de desarrollo y de respuesta a estímulos (Elkon et al., 2013; Tian & Manley, 2013; Gruber et al., 2014; Neve et al., 2014).

Recientes proyectos de secuenciación masiva han mostrado que el proceso de poliadenilación alternativa se da en un 70-79% del transcriptoma de mamíferos (Revisado por Derti et al., 2012), 54% en *Drosophila melanogaster* (Smibert et al., 2012), 30-40% en *Caenorhabditis elegans* (Mangone et al., 2010; Jan et al., 2011; Haeni et al., 2012), 70-75% y en *Arabidopsis thaliana* (Wu et al., 2011; Sherstnev et al., 2012). En levaduras, por otro lado, se ha descrito una amplia extensión de sitios de poliadenilación alternativos, aunque el porcentaje de genes afectados difiere entre las distintas publicaciones (Ozsolak et al., 2010; Wilkening et al., 2013) (Tabla 1).

**TABLE 1.** Summary of alternative polyadenylation in different species

Species	Genes with APA	Samples analyzed	References
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72.1%	Poly(A)+ RNAs	Ozsolak et al. (2010)
<i>Arabidopsis</i>	70%–75%	Seeds and leaves Seedlings	Wu et al. (2011) Sherstnev et al. (2012)
<i>C. elegans</i>	43%	Embryo, larvae (L1, L2, L3, L4, dauer), adult	Mangone et al. (2010)
	31%	Embryo, larvae (L1, L2, L3, L4, dauer), adult	Jan et al. (2010)
<i>Drosophila</i>	54.3%	29 tissues and S2R+ cells	Smibert et al. (2012)
Zebrafish	55%	Four embryonic stages, mixed gender adults, and three tissues	Ulitsky et al. (2012)
Mammals	~70%	24 matched tissues	Derti et al. (2012)
Human			
Rhesus			
Dog			
Mouse			
Rat			

Tabla 1: Porcentaje de eventos de poliadenilación alternativa en diferentes especies (Shi et al., 2012).

La selección de PAS alternativos revela un nuevo nivel de regulación de la expresión génica con un elevado nivel de complejidad. En primer lugar, y dado que el proceso de poliadenilación conlleva el corte del mensajero, la selección de PAS puede producir proteínas truncadas, así como añadir o eliminar diferentes segmentos reguladores en el mensajero maduro, tales como sitios de unión de microRNA (Sandberg et al., 2008; Mayr et al., 2009; Pelechano et al., 2013; Lianoglou et al., 2013; Masamha et al., 2014; Geisberg et al., 2014; Oikonomou et al., 2014). Además, se ha podido asociar la poliadenilación con los eventos de *splicing*, adición del CAP 5', iniciación y terminación de la traducción (Proudfoot, 2004; Tollervy, 2004; Tian et al., 2007).

La selección de los distintos sitios de corte y poliadenilación se regula mediante la interacción entre elementos en *cis* localizados en la secuencia del pre-mRNA y la maquinaria de poliadenilación (Danckwardt et al. 2008) y se traduce en la generación de diferentes mensajeros que pueden tener afectada la longitud de su extremo 3'UTR o sufrir cambios en su región codificante (Figura 13). Los sitios de corte y poliadenilación (PAS) pueden situarse en el extremo 3'UTR y afectar a la presencia de diferentes elementos que actúan en *cis* durante la regulación postranscripcional. Por otro lado, los PAS situados aguas arriba del último exón (formas no canónicas) conllevan la producción de isoformas proteínicas alternativas, así como transcritos susceptibles de ser objeto de regulación postranscripcional (Hamill et al., 2010). A continuación se describen los métodos de regulación descritos para estas dos formas de poliadenilación alternativa.

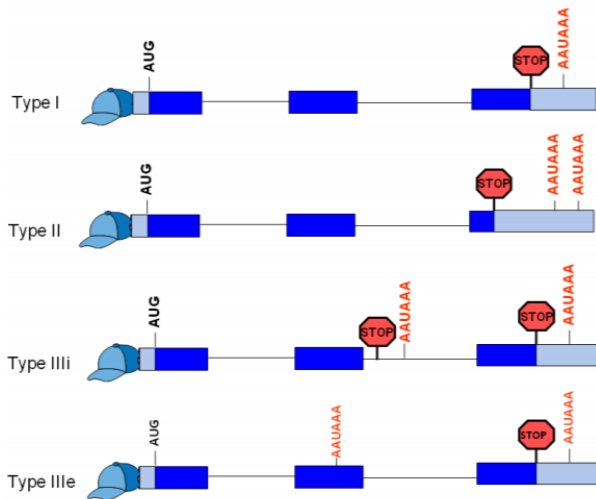


Figura 13: Esquema de posibles sitios de poliadenilación alternativa. Las cajas azul oscuro representan la región codificante, mientras que las claras son los extremos UTR. Los mensajeros maduros se han categorizado en función de la localización del PAS alternativo: Extremo 3'UTR (tipo II), intrón (tipo III) y región codificante (tipo IV) (Lutz y Moreira 2011).

## Poliadenilación del extremo 3'UTR

La selección de PAS alternativos en el extremo 3'UTR da lugar a mensajeros con diferente longitud. En células humanas, se ha observado que la distribución de estos mensajeros depende de la localización subcelular. Las isoformas largas tienen tendencia a localizarse en el núcleo, aunque no se ha podido determinar si se debe a diferencias en la estabilidad

de los mensajeros en su exportación al citoplasma (Djebali et al., 2012; Neve et al., 2016). Uno de los factores que apoyan la teoría de la estabilidad es la presencia de elementos reguladores en la secuencia del 3'UTR alternativo. Se han descrito numerosas evidencias de la presencia de motivos reclutadores de proteínas en estas secuencias. En mamíferos y levaduras se ha observado que el acortamiento masivo de los extremos 3'UTR no correlaciona con cambios generales de expresión (Spies et al., 2013; Gupta et al., 2014). Estas secuencias pueden contener motivos represores (Sandberg et al., 2008; Mayr et al., 2009; Pelechano et al., 2013; Lianoglou et al., 2013; Masamha et al., 2014) o activadores (Geisberg et al., 2014; Oikonomou et al., 2014) y el resultado de su eliminación masiva podría ser neutral para el transcriptoma (Chen y Shyu, 2016).

Los elementos reguladores en *cis* responsables de la estabilidad del mensajero más estudiados son los *ARE* (Barreau et al., 2006; Fabian et al., 2012; Jonas et al., 2015). Estos elementos reclutan proteínas de unión (ARE-Binding Proteins) y mi RNAs, además de deaminasas y/o enzimas decapantes que promueven la degradación del mensajero (Behm-Ansmant et al., 2006; Stoecklin et al., 2006; Garneau et al., 2007; Sandler et al., 2011; Hogg y Goff, 2010; Gong et al., 2011).

Uno de los procesos mejor estudiados en este nivel de regulación de la expresión genética es la inestabilidad que produce la aparición de dianas de miRNA, comunes en esta región (Bartel et al., 2009; Sandberg et al., 2008; Ji et al., 2009; Lianoglou et al., 2013). Se ha

observado que el acortamiento de los extremos 3'UTR durante la proliferación celular mejora el contexto de reconocimiento para los miRNA, aumentando su eficiencia en la promoción de la división (Hoffman et al., 2016). También se ha encontrado que el ratio de isoformas es específico de tipos celulares en mamíferos y se ha sugerido que el uso de PAS proximales en células específicas podría evitar el silenciamiento por elementos localizados en el extremo distal del 3'UTR (Derti et al., 2013; Lianoglou, 2013). Así, se ha observado que, entre los genes transcritos ubicuamente, aquellos que producen sólo una isoforma están enriquecidos en sitios de reconocimiento para miRNAs específicos de tejido, mientras que aquellos que experimentan APA se encuentran enriquecidos en sitios de reconocimiento de miRNAs generales (Lianoglou et al, 2013).

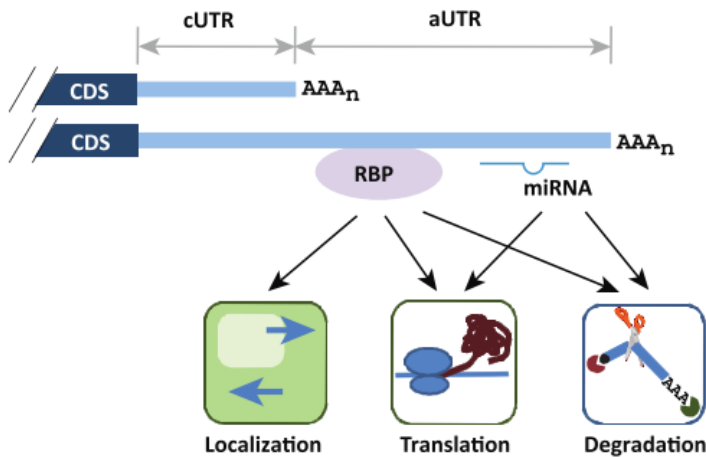


Figura 14: Regulación de la presencia de elementos reguladores en el extremo 3'UTR de mensajeros maduros alternativos. La presencia de motivos reclutadores de proteínas de unión a RNA o miRNAs en el extremo alternativo regulan la localización, traducción y estabilidad del mensajero (Tian y Manley, 2013).

Por otra parte, se ha observado que secuencias localizadas en el extremo 3'UTR de algunos mensajeros pueden facilitar las interacciones proteína-proteína, actuando como reclutadores de la maquinaria de traslación. Así, favorecen su transporte a las proximidades del retículo endoplásmico, donde se acopla la traducción con la translocación de la proteína naciente (Loya et al., 2008; Reid et al., 2015; Berkovits et al., 2015).

En *Arabidopsis thaliana* se ha observado cambios en el 3'UTR en más del 80% de los genes que sufren APA, haciéndolos susceptibles de servir de diana para distintos reguladores de la expresión (Wu et al., 2011).

## Poliadenilación aguas arriba del último exón.

Los eventos de APA localizados en la región codificante, los intrones, o los extremos 5'UTR dan lugar a isoformas de mRNA no canónicas. En los dos primeros casos, la selección de estos sitios de corte y poliadenilación conlleva cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína resultante, lo que conlleva un aumento de la variación genética sin que se produzca cambio alguno en la secuencia del DNA. Esta diversificación del transcriptoma

sería específica de tejido y tipo celular y se ha asociado con el mantenimiento del estado de proliferación celular (Elkon et al., 2012; Hoque et al., 2013; Taliaferro et al., 2016). Además, se han descrito fenómenos de diversificación proteínica mediante APA que afectan a algunos dominios de anclaje a membrana (Davis et al., 2006), así como producción de proteínas truncadas que con un efecto de dominancia negativa (Mbita et al., 2012).

La producción de mensajeros no canónicos se ha asociado con represión de la expresión. Así, se han descrito mecanismos de degradación de transcritos aberrantes que afectan a algunas de las isoformas producidas por APA. En el caso de los PAS localizados en intrones, el resultado habitual es la formación de un transcrito con un codón stop prematuro (PTC), que son dianas del sistema *Nonsense-Mediated decay* (NMD, Figura 15) (Arciga-Reyes et al., 2006; Hogg y Goff, 2010; Hwuang y Maquat, 2011). Este proceso está mediado por la familia de proteínas UPF (UP-FRAMESHIFT SUPPRESSOR) que, en *Arabidopsis thaliana*, se encargan de la degradación de los PCT en proceso independiente de la maquinaria de *splicing* (Arciga-Reyes et al., 2006). Recientemente se han podido identificar algunos procesos regulados por este sistema en *Arabidopsis*: Se ha observado regulación del tiempo de floración por producción de distintas isoformas del transcrito *FCA* (Simpson et al., 2013; Duc et al., 2003). Además, el sistema NMD se ha asociado con la modulación de la inmunidad en respuesta a infecciones bacterianas (Wachter y Hartmann, 2014).

Se han descrito PAS localizados en intrones en un 2-6% de los casos de APA analizados en *Arabidopsis* (Shen et al., 2011; Wu et al., 2011). Ambas publicaciones muestran evidencias de una regulación cruzada entre los procesos de *splicing* y poliadenilación y sugieren un papel de los intrones en la regulación de la expresión. La retención de intrones es un fenómeno común en plantas (Ner-Gaon et al. 2004), aunque aún no se ha podido determinar si esta retención es responsable del APA o es el evento de corte y poliadenilación lo que bloquea el procesamiento del intrón. Además, el análisis de las secuencias adyacentes a los PAS localizados en intrones reveló que no hay diferencias significativas entre estos y aquellos localizados en el extremo 3'UTR (Wu et al., 2011).

Por otro lado, la poliadenilación de la región codificante (CDS), genera transcritos que carecen de codón STOP. En mamíferos y levaduras, estos mensajeros son inestables y se degradan por el mecanismo *Non-Stop Decay* (NSD, Figura 15). Este sistema actúa a través del exosoma en levaduras (Frischmeyer et al., 2002; Van Hoof et al., 2002), mientras que en mamíferos produce inhibición de la traducción por acumulación de los ribosomas (Akimitsu et al., 2007). El sistema NSD, en estos casos, se ha interpretado como mecanismo de control de calidad de los mRNA, de modo que la célula eliminaría los transcritos en los que se han producido errores en la transcripción o en el procesamiento. Sin embargo, la elevada presencia de PAS situados en el CDS de *Arabidopsis thaliana* (10% de los casos de APA analizados) apunta a que estos RNAs podrían formar parte del transcriptoma normal de la planta, aunque de momento no se puede explicar cómo tolera tal cantidad de mensajeros que serían deletéreos en otros organismos (Wu et al., 2011).

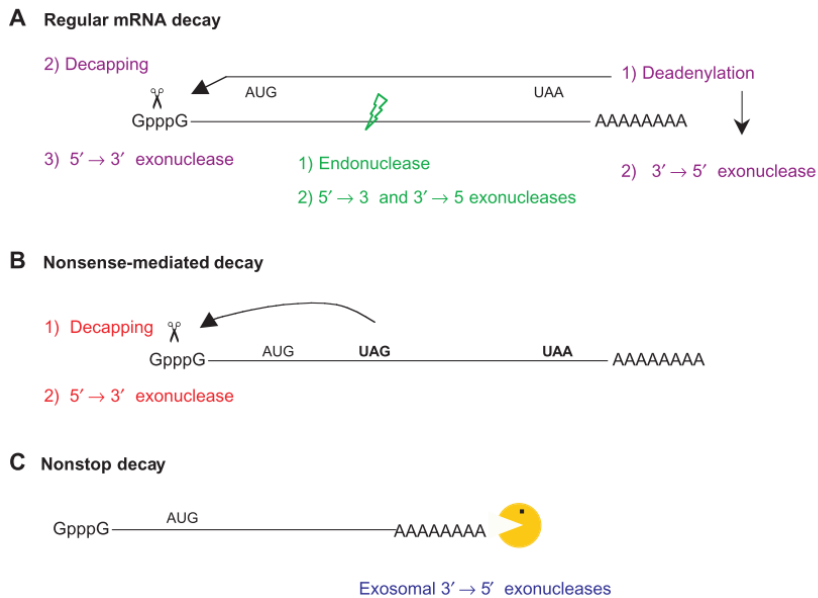


Figura 15: Representación esquemática de los procesos que median la estabilidad de los mensajeros. A) Degradación estándar por deadenilación. B) *Nonsense-Mediated decay* (NMD). Mecanismo que marca para degradación mensajeros poliadenilados cerca del extremo 5'UTR. C) *Non-Stop decay* (NSD). Mecanismo de degradación de mensajeros que no presentan codón *STOP*. (Wagner y Lykke-Andersen, 2002).

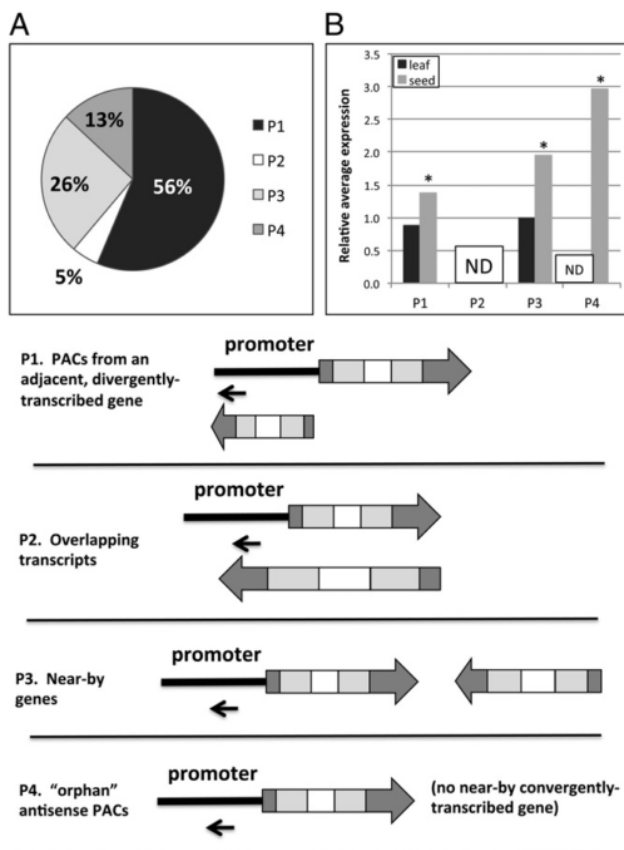


Figura 16: Clasificación de los PAS que mapean en el extremo 5'UTR. Se han clasificado en 4 categorías (P1-P4), que se pueden observar en la parte inferior de la imagen. Las flechas anchas representan mensajeros inmaduros en los que se ha coloreado de gris oscuro los extremos 3' y

5'UTR, en gris claro el CDS y en blanco los intrones. La posición de los PAS se representa como flechas negras. A) Distribución de los PAS según la clasificación. B) Expresión media de los genes diana de los PAS en *antisense*. Se representa el ratio entre la expresión media de cada clase entre la media global (Wu et al., 2011).

Por último, los casos de poliadenilación del extremo 5'UTR suponen una incógnita. Estos extremos pueden contener marcos de lectura localizados aguas arriba del gen en estudio. En mamíferos este fenómeno se ha asociado con inhibición de la traducción por restricción del acceso de los ribosomas. Además, se han detectado numerosas evidencias de la relación entre la longitud del extremo 5'UTR y la especificidad de tejido o la presencia de secuencias diana de proteínas reguladoras. (Revisado por Hughes et al., 2006)

En *Arabidopsis*, se ha observado que alrededor del 4% de los casos de APA afectan al extremo 5'UTR (Shen et al., 2011), y dentro de estos un 22% no se pueden explicar por la presencia de genes adyacentes. Estos PAS podrían representar genes sin identificar o ser el resultado de terminación de la transcripción por alguna clase de señal (Figura 16) (Wu et al., 2011).

## Selección de PAS alternativos

La selección de los distintos PAS depende de la interacción de elementos en *cis* localizados en la secuencia del pre-mRNA y algunas de las proteínas que forman parte de la maquinaria de poliadenilación (Danckwardt et al. 2008).

### Elementos que actúan en *cis* en la selección de los PAS

Las secuencias de los motivos que actúan en *cis* durante la selección del PAS son específicos del tipo de organismo analizado. Así, se han encontrado diferencias sustanciales entre las secuencias que flanquean los PAS de mamíferos, levaduras y plantas. En el caso de las plantas, se ha observado que su secuencia estándar se acerca más a las de levaduras que a las de otros metazoos gracias a la presencia de elementos AAUAAA aguas arriba del sitio de corte flanqueado por una secuencia rica en Uracilos (Li y Hunt, 1997). Las observaciones realizadas en distintos organismos han permitido elaborar un modelo en el que se definen 3 regiones señalizadoras: **NUE** (Near Upstream Element), **FUE** (Far Upstream Element) y **CE** (Cleavage Element).

La región **NUE** se sitúa 10-30 nucleótidos aguas arriba del sitio de corte y comprende un grupo de motivos relacionados con la secuencia AAUAAA, que es la señal dominante en la selección de PAS de células animales. Sin embargo, a pesar de que esta señal es responsable de más de la mitad de los eventos de poliadenilación de animales (Tian et al., 2005), sólo se ha identificado en el 10% de los genes de *Arabidopsis* (Loke et al., 2005) y arroz (Lu et al., 2006; Shen et al., 2008). Estos resultados sugieren que la maquinaria de poliadenilación podría ser menos estricta en la selección de la señal AAUAAA debido a que requiere la presencia de las otras señales (FUE y CE).

Las señales **FUE**, por su parte se localizan aguas arriba de las NUE y comprenden una

región de 60-120 nucleótidos en la que no se han podido identificar motivos conservados (Loke et al., 2005; Shen et al., 2008), aunque se han observado cambios cuantitativos en mensajeros delecionados (Mogen et al., 1990; Rothnie et al., 1994). Por último, la señal CE se localiza en las proximidades del sitio de corte y poliadenilación. El sitio de corte se define entre las posiciones -1 y +1, siendo el último nucleótido antes de la cola de poly(A) el que define la posición -1. Esta posición contiene un motivo YA (CA o UA) y se ha observado que la secuencia de las regiones que lo flanquean (CE) se pueden organizar en una serie de patrones que intervienen en la selección del sitio YA (Figura 17) (Loke et al., 2005).

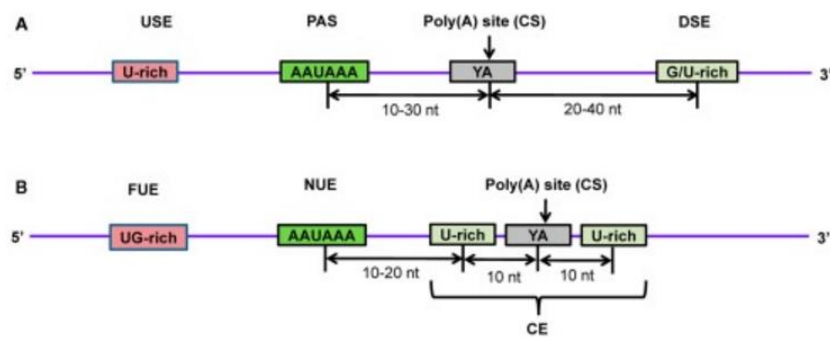


Figura 17: Representación esquemática de las señales identificadas en los PAS de humanos (A) y Arabidopsis (B). El sitio de corte y poliadenilación se representa como YA y se compara la distribución de las diferencias secuencias reguladoras (Loke et al., 2005).

### Elementos que actúan en *trans* en la selección de los PAS

El proceso de poliadenilación involucra una serie de proteínas que interactúan con el mensajero naciente, seleccionan el PAS y estimulan el corte y síntesis de la cola de poly(A). Estas proteínas son responsables de la especificidad del corte, así como de la relación entre la poliadenilación, el procesamiento de los intrones y la transcripción (Maniatis et al., 2002). La maquinaria de poliadenilación está relativamente conservada en metazoos (Figura 18) y se compone de diferentes subcomplejos entre los que se encuentran las proteínas **CPSF** (**C**LEAVAGE AND **P**OLYADENYLATION **S**PECIFICITY **F**ACTOR, identifican la secuencia señal de PAS), **CstF** (**C**LEAVAGE **S**TIMULATION **F**ACTOR), la proteína **SYMPLEKIN** y el extremo C-terminal de la RNA POLYMERASE II (**CTD**). Estas proteínas identifican el PAS, reclutan a la POLY(A) POLIMERASA (PAP) y estimulan su actividad (Kuhn et al., 2009).

La mayoría de las proteínas de la maquinaria de poliadenilación de humanos y levaduras tienen ortólogos en Arabidopsis (Revisado por Hunt, 2008). El ensamblaje de las proteínas CPSF en plantas es dinámico (Rhao et al., 2009; Zhao et al., 2009), pero se ha podido determinar que CPSF100 actúa como núcleo para la interacción del resto de proteínas del complejo. Por su parte, CPSF30 conecta con las proteínas CstF vía FIP1 y media la interacción entre los CPSF y otros factores como CLPS3, SYM5 y PCFS4 (Zhao et al., 2009). Por otro lado, se han identificado proteínas específicas de plantas entre las que se encuentra el factor catalizador del corte del pre-mRNA CPSF73 y la proteína FY, ambas involucradas en procesos específicos como el desarrollo sexual y la floración (Xu et al., 2006).

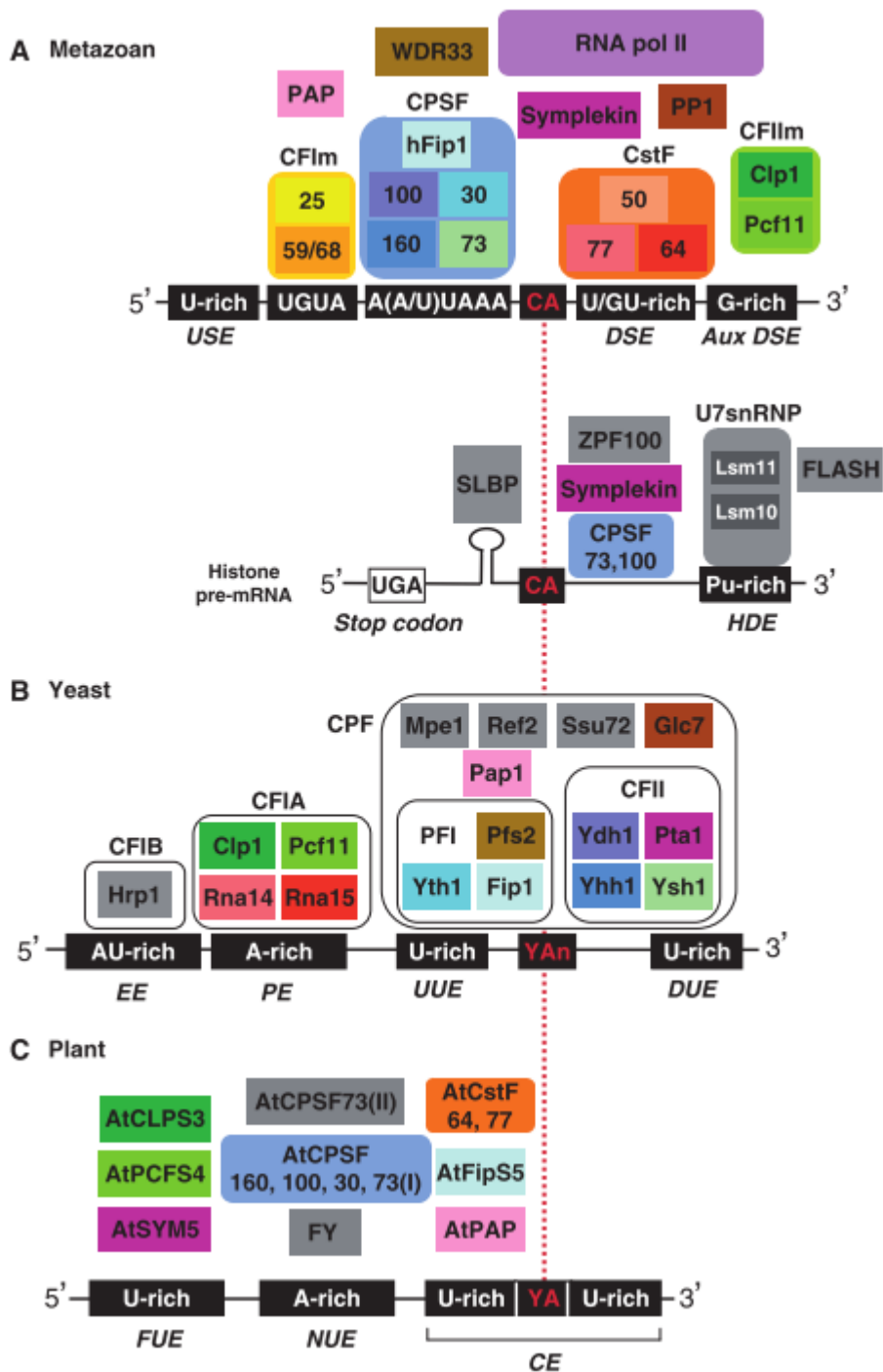


Figura 18: Representación esquemática de las proteínas de la maquinaria de poliadenilación en metazoos, levaduras y plantas (Millevoy, 2009).

Las diferencias fundamentales entre la maquinaria de poliadenilación de plantas y la de otros organismos radican en que los factores de plantas se codifican en familias génicas (Xing et al., 2008) y en que algunos de ellos afectan a funciones biológicas específicas (Xu et al., 2006; Zhang et al., 2008). Entre los últimos, destaca el caso de *CPSF30*, responsable de catalizar el corte del mensajero inmaduro y cuya mutación produce un cambio generalizado en la selección de PAS, aunque sin una tendencia concreta. Se ha propuesto que *CPSF30* podría reconocer específicamente la región NUE del mensajero inmaduro y se

ha observado que la colección de genes que presentan PAS dependientes de CPSF30 está enriquecida en genes reguladores del desarrollo y de respuesta a estrés, lo que sugiere que esta proteína podría conectar las distintas señales de regulación de la expresión génica con el proceso de poliadenilación (Thomas et al., 2012).

El análisis de las posibles interacciones de estas proteínas ha revelado que la maquinaria de poliadenilación se organiza en torno a 3 proteínas clave: CPSF100, CPLS3 y FIP1[V] (Hunt et al., 2008). En el caso de **FIP1[V]**, cuyas interacciones se producen a través del extremo N-terminal, el subcomplejo podría incluir distintas isoformas de PAP, 3 proteínas tipo PABN y algunos miembros de las familias CFIS y CLPS (Figura 19). Este subcomplejo no tiene ortólogo en la maquinaria de poliadenilación de mamíferos o levaduras, pero el hecho de que las PAP interactúen con FIP1[V] en Arabidopsis apoya la importancia de esta proteína en el proceso de poliadenilación.

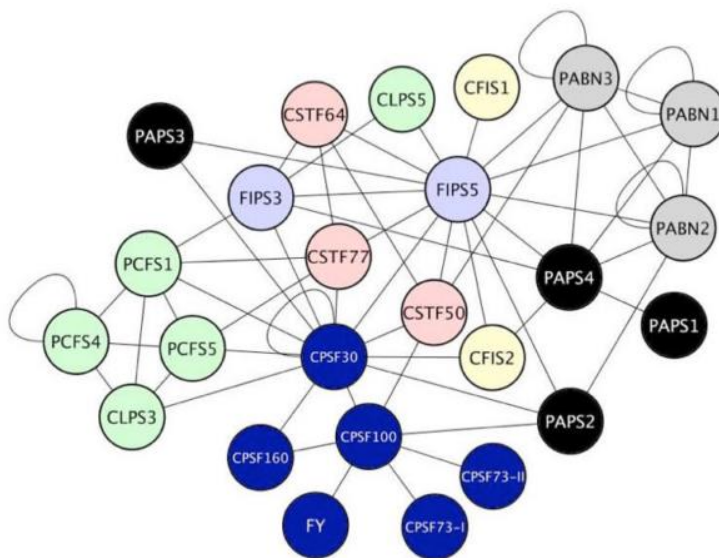


Figura 19: Red de interacciones de la maquinaria de poliadenilación de Arabidopsis (Hunt et al., 2008).

La relación de FIP1 con la poliadenilación se describió por primera vez en levaduras, donde se observó que Fip1p (Factor interacting with Pap1) interactúa con la Poly(A) polimerasa Pap1 (Preker et al., 1995) y funciona como plataforma de unión para otras proteínas del complejo, poniendo en contacto a Pap1 con el pre-mRNA cortado (Ezokwonko et al., 2011). Además, se ha descrito inactivación de la actividad de Fip1p por cambio conformacional mediado por fosforilación que afecta a la interacción con Pap1 (Zieliński et al., 2006).

El análisis de secuencias ha permitido identificar ortólogos de Fip1p en numerosos organismos. La comparación de estos ortólogos, por otro lado, apunta a que la organización de dominios se ha conservado a lo largo de la evolución, de modo que las proteínas FIP1 presentan un extremo N-terminal ácido, una región altamente conservada en el centro de la proteína (dominio PF05182) y una región rica en prolina (Kaufmann et al., 2004). Sin embargo, al margen de estas regiones, la homología entre las proteínas FIP1 identificadas es mínima (Hunt et al., 2012).

En 2004, Kaufmann y colaboradores identificaron el ortólogo de Fip1p en humanos (hFip1) y demostraron que esta proteína interacciona con regiones del pre-mRNA con amplia presencia de uracilos a través de una región rica en argininas y con las proteínas PAP, CPSF30, CPSF160 y CstF77 a través del extremo N-terminal ácido. Así, hFip1 es esencial en el reconocimiento del PAS y el reclutamiento de la poly(A) polimerasa, cuya actividad estimula. Previamente se ha descrito activación de la PAP vía Fip1p en levaduras (Preker et al., 1995; Ezokwonko et al., 2011). Sin embargo, la presencia del dominio de unión a RNA en hFIP1 evidencia diferencias fundamentales en la función de esta proteína en eucariotas superiores (Kaufmann et al., 2004). Estos resultados podrían explicar el papel de hFIP1 en el mantenimiento de la pluripotencia de células embrionarias, ya que hFip1 podría estar controlando el patrón de PAS para optimizar la expresión de genes involucrados en la diferenciación durante la reprogramación somática (Lackford et al., 2014).

En lo que a las plantas se refiere, se han identificado los ortólogos de hFip1 por homología de secuencia en numerosos organismos. Además se ha identificado una duplicación génica que se extiende a las plantas superiores (Figura 20) (Hunt et al., 2012). En Arabidopsis se han identificado dos posibles ortólogos de Fip1p y hFip1: FIP1[III] (At3g66652) y FIP1[V] (At5g58040) (Figura 21). Ambos contienen el dominio FIP, pero sólo FIP1[V] presenta la región rica en argininas responsable de la unión a RNA, aunque la homología con los dominios análogos de mamíferos y levaduras son muy limitadas (Tabla 2). Además, se ha observado que las similitudes en la secuencia de aminoácidos fuera de estos dominios es muy modesta (Forbes et al. 2006).

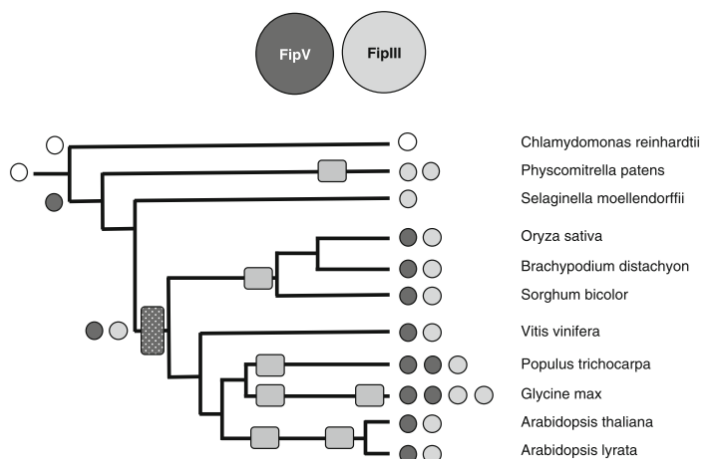


Figura 20: Árbol filogenético de genes con motivo Fip en distintas especies de plantas (Hunt et al., 2012).

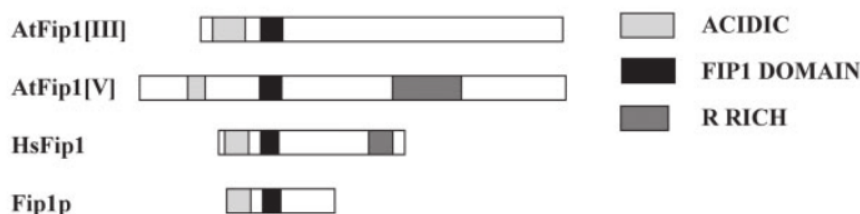


Figura 21: Esquema comparativo de los dominios identificados en los genes que contienen el motivo Fip1 en plantas (AtFip1[III] y AtFip1[V]), humanos (HsFip1) y levaduras (Fip1p) (Forbes et al., 2006).

FIP1[V]	hFip1 (humanos)	Fip1p (levaduras)
Identidad	26%	38%
Similaridad	40%	56%

Tabla 2: Homología de *FIP1[V]* con sus ortólogos en humanos y levaduras (Forbes et al., 2006).

Tanto FIP1[V] como FIP1[III] interactúan a través de la región ácida de su extremo N-terminal con diversos componentes de la maquinaria de poliadenilación: Poly(A) Polimerasa IV, CSF30, CstF77, CFIm-25 y PabN1. Además, el extremo C-terminal de FIP1[V] interactúa con ]Cstf64 (Figura 21) (Forbes et al., 2006). Sin embargo, los resultados publicados por Hunt y colaboradores en 2008 apuntan a FIP1[V] como un elemento nucleador de uno de los subcomplejos. Estas interacciones podrían darse simultáneamente sobre FIP1[V] o podrían reflejar la existencia de diversos subcomplejos que podrían ser fruto de la progresión del proceso de corte y poliadenilación o bien ser combinaciones especializadas en el reconocimiento de distintos PAS (Forbes et al., 2006). En este mismo trabajo se propone que el dominio de unión a RNA de FIP1[V] interactúa con las regiones FUE del mensajero inmaduro, mientras que algunas de sus proteínas interactoras (CPSF30, CFIm25 o PABN1) podrían ser responsables del reconocimiento del resto del PAS.

Por otro lado, se ha observado que el extremo N-terminal de FIP1[V] es capaz de estimular la actividad de la PAP de forma autónoma, mientras que el ortólogo de humanos requiere la actuación de la proteína completa. Se ha sugerido que la activación de la PAP podría darse en varias fases y ser dependiente de la interacción de la polimerasa, FIP1[V] y el mensajero inmaduro (Kaufmann et al., 2004; Forbes et al., 2006).

## Funcionalidad de la regulación vía poliadenilación alternativa

Se ha observado una relación entre la selección de los sitios de poliadenilación y determinados procesos celulares vitales para el desarrollo de la misma en el contexto de un organismo multicelular. Así, se ha asociado el uso de PAS alternativos con el estadio de diferenciación celular, la especificidad de tejido y la respuesta a diferentes estímulos. Este nivel de control permitiría afinar la regulación de la expresión génica en cada una de las células contribuyendo al correcto desarrollo del organismo.

### Poliadenilación alternativa y desarrollo

Se han encontrado numerosas evidencias de la relación entre el tejido analizado y la distribución de PAS utilizados tanto en células animales como en vegetales. El análisis de transcritos de células humanas ha revelado que los niveles de transcripción participan conjuntamente con la regulación vía APA para asegurar la correcta expresión génica. Se ha observado que los genes con expresión específica de tejido tienen tendencia a presentar un sólo PAS, mientras que la mayoría de los genes con expresión ubicua generan múltiples extremos 3'UTR (Lianoglou et al., 2013). Estos autores proponen el uso de PAS específicos de tejido estaría ofreciendo una colección de escenarios sobre los que actuaría el conjunto

de miRNAs. Además, se ha podido relacionar la longitud de los 3'UTR y la proliferación celular y se ha propuesto el proceso de APA como mecanismo de regulación de la expresión génica responsable del desarrollo embrionario y la diferenciación de células adultas en diferentes tejidos. Así, la diferenciación celular progresa coordinadamente con un aumento progresivo de la longitud del 3'UTR, lo que aumenta las posibilidades de control postranscripcional (Sandberg et al., 2008; Ji et al., 2009).

En el caso de Arabidopsis, Wu y colaboradores (2011) mostraron que los extremos 3'UTR de semillas son, en promedio, más cortos que los de hojas. Sin embargo, menos del 2% de los genes con 2 o más PAS expresados en ambos tejidos presenta cambios detectables en la distribución de los mismos. Estos autores sugieren que la regulación de la poliadenilación dependiente de tejido se daría en un conjunto determinado de genes.

Por otro lado, se han hallado numerosas evidencias del papel regulador de la poliadenilación alternativa en algunos procesos del desarrollo y respuesta a estrés de Arabidopsis. Uno de los mecanismos mejor estudiados es el control de la floración, habiéndose descritos eventos de APA en las proteínas FCA y FPA, que a su vez participan en la selección del PAS en antisentido de FLC (Simpson et al., 2003; Liu et al., 2010; Horbyk et al., 2010). En el caso de FCA y FPA, los PAS alternativos están localizados en intrones y dan lugar a mensajeros con distinta composición (Macnight et al., 2002; Quesada et al., 200; Hornyk et al., 2010). Se ha observado que el incremento de la producción de la isoforma larga del mRNA de FCA correlaciona con un aumento de la expresión de FLC y el consiguiente retraso de la floración (Simpson et al., 2003; Xing et al., 2008). En cuanto a FLC, se han detectado dos isoformas distintas de transcritos antisentido y su abundancia relativa se ha relacionado con la presencia de FCA, FY y FPA (Hal-Pogar et al., 2005; Ji et al., 2009; Hornyk et al., 2010; Liu et al., 2010). Además, se ha descrito que FPA podría tener una función más extendida en el procesamiento de los mensajeros inmaduros, ya que su pérdida de función produce transcritos quiméricos y defectos en la poliadenilación (Duc et al., 2013).

Otro de los procesos afectados por la regulación vía APA es la germinación, que es sensible a inhibidores de la poliadenilación y la traducción, pero no a inhibidores de la transcripción, lo que apunta a que el fin de la dormancia se controla en parte a nivel postranscripcional (Thao y Khan, 1976; Data et al., 2003). Además, se ha observado que los mensajeros maduros en semillas tienen mayor porcentaje de eventos de PAS localizados en el CDS, intrones y extremo 5'UTR que otros tejidos, lo que podría estar apuntando a una extensa regulación de la expresión génica a este nivel (Shen et al., 2011). Recientemente se ha descubierto que la proteína DOG1, que previene la germinación de las semillas de Arabidopsis mediante la regulación de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de las giberelinas (Graeber et al., 2014), experimenta regulación por APA (Cyrek et al., 2016). La expresión de este gen se induce por ABA y bajas temperaturas (Chiang et al., 2011; Kendall et al., 2011). Sin embargo, sólo la isoforma corta, que sufre corte y poliadenilación de uno de sus intrones es funcional. La forma larga, por su parte, podría competir con la corta por la maquinaria de traducción y actuar como inhibidor de la expresión (Cyrek et al., 2016).

## Poliadenilación alternativa y respuesta a estrés

El procesamiento de los mensajeros es un factor clave en la respuesta a diferentes estreses abióticos. Se han observado alteraciones de la sensibilidad a ABA y estrés por frío en mutantes afectados el metabolismo del RNA Nuclear (Lee et al., 2006). Además, el análisis de mutantes de diferentes proteínas de la maquinaria de exportación apunta a que el proceso de exportación podría ser clave en el desarrollo de tolerancia a bajas temperaturas en *Arabidopsis* (Gong et al., 2005; Dong et al., 2006; Lee et al., 2006).

En lo que al proceso de poliadenilación propiamente dicho se refiere, se ha identificado la proteína CPSF30 como un regulador temprano de la respuesta a estrés oxidativo (Zhang et al., 2008) y se ha propuesto que esta proteína puede mediar los cambios de expresión derivados del aumento del calcio citoplasmático, que es una de las primeras consecuencias de este tipo de estrés (Price et al., 1994; Rentel et al., 2004; Evans et al., 2005). Se han identificado dianas dependientes de CPSF30 y se ha observado entre ellas sobrerrepresentación de genes reguladores de la respuesta a estrés abiótico. Sin embargo, este grupo de genes afectados supone una pequeña porción de los genes de respuesta a ROS descritos hasta la fecha, lo que ha llevado a proponer un modelo relativamente específico, en el que múltiples mecanismos median distintos niveles de tolerancia (Zhang et al., 2008). Además, se ha asociado la actividad de esta proteína con la resistencia a la infección por *Pseudomonas syringae* gracias a su papel en la regulación del proceso de muerte celular programada (Coll et al., 2011)

Por su parte, el mensajero de *CPSF30* también se ve afectado por procesos de regulación vía APA, lo que confirma la importancia de este proceso en la respuesta a estrés. Así, sólo la versión corta del mensajero maduro (PAS localizado en un intrón) es capaz de recuperar el fenotipo mutante (Delaney et al., 2006).



# **OBJETIVOS**



# Objetivos

- Evaluar el papel de la regulación de la expresión génica mediante APA en el desarrollo radicular de *Arabidopsis thaliana*.
- Analizar el papel de FIP1 en la selección de sitios de poliadenilación (PAS) en, así como su impacto en la distribución de los PAS en las distintas regiones genómicas (3'UTR, 5'UTR, CDS e intrones).
- Identificar genes que experimentan poliadenilación alternativa (APA) en el fondo mutante *fip1-1* en condiciones óptimas de crecimiento.
- Caracterizar el fenotipo del fondo mutante *fip1-1* e identificar rutas de señalización desreguladas como consecuencia de alteraciones en la selección de PAS.
- Evaluar el papel de la regulación de la expresión génica vía APA en la respuesta a diferentes estreses abióticos. Se analizará la distribución de PAS en las distintas regiones genómicas y se identificarán genes regulados por APA como respuesta al estrés.
- Caracterizar la respuesta del mutante *fip1-1* a estos estreses y analizar el impacto de la regulación vía APA en la tolerancia.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



# Materiales y Métodos

## Material vegetal y condiciones de cultivo

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (L.) HEYNH se esterilizaron en una solución de hipoclorito sódico diluida al 50% durante 10 minutos tras lo que se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. En el caso de las semillas dedicadas a la obtención de grandes cantidades de RNA se realizó un paso previo de esterilización en una atmósfera rica en ozono durante 15 minutos.

Las semillas se estratificaron durante 48 horas a 4°C en oscuridad y se sembraron en posición vertical en placas Petri cuadradas de 12cm sobre un medio de cultivo medio Murashige and Skoog (MS) con 0,05% de ácido 2-(N-morpholone)-ethanesulfonic (MES) y 1% de Plant Agar (Duchefa Biochemie B.V.) preparado con la mitad de concentración de sales (MS $\frac{1}{2}$ ) y suplementado con MES 0,05%, sacarosa 1% y Plant-agar 1%. El medio se ajustó a pH 5,7 y se esterilizó en autoclave 20 minutos a 120°C.

Una vez solidificado el medio y estratificadas las semillas, éstas se sembraron en campana de flujo laminar. El método de siembra se seleccionó en función del objetivo propuesto:

- Análisis de fenotipo y selección de cruces con marcadores moleculares: Siembra superficial mediante el uso de pipeta pasteur. Las semillas se alinearon en la parte superior de cada placa separadas entre sí por una distancia aproximada de 10mm. En el caso de los experimentos en los que se buscaba mantener las raíces en oscuridad, las semillas se cubrieron con un peine antes de cubrir la placa con el dispositivo R-Dark (Silva-Navas *et al.*, 2015)
- Extracción de RNA para RNASeq y PATSeq y estudio ionómico: Las semillas se colocaron en alta densidad mediante pipeta pasteur. En el caso de los tratamientos con cloruro sódico la siembra se realizó sobre una tira de papel de filtro estéril para facilitar el traslado de las plántulas a un segundo medio de cultivo.
- Selección de transformantes: Se realizó una siembra en placa horizontal complementada con kanamicina 50uM.

Las placas se sellaron con cinta quirúrgica (MILLIPORE) y se colocaron en una cámara de germinación con 65 % de humedad relativa, iluminación con luz fluorescente blanca fría (75  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{seg}$ ) y fotoperiodo de día largo (ciclos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) a una temperatura de 21/18 °C.

## Condiciones de cultivo de los diferentes tratamientos

- Estrés salino: Las semillas *fip1-1* y su correspondiente control se sembraron en medio de cultivo MS $\frac{1}{2}$  sobre una tira de papel de filtro estéril. 4 días después de la imbibición, las plántulas fueron trasplantadas a un medio MS $\frac{1}{2}$  suplementado con cloruro de sodio 75uM, 100uM y 125uM donde se dejaron crecer 5 días más.
- Déficits nutricionales: Se hizo uso del medio Murashige and Skoog (MS $\frac{1}{2}$ ) sin fósforo (PhytoTechnology Laboratories®) con 0,05% de ácido 2-(N- morpholone)-ethanesulfonic (MES) y 1% de Plant Agar (Duchefa Biochemie B.V.). Para las condiciones de control, este medio se suplementó con sales hasta igualar las concentraciones de los iones con el medio MS $\frac{1}{2}$ . Las medidas radiculares y la recogida de muestras se realizó a los 13 días después de la imbibición.
- Condiciones de luz/oscuridad: Para analizar el efecto de la incidencia de la luz en la raíz se hizo uso del sistema de crecimiento R-Dark, tal y como describen Silva-Navas y colaboradores (2015). Este sistema permite que la plántula se desarrolle en condiciones similares a tierra, manteniendo la raíz protegida de la luz incidente con un dispositivo que se puede retirar para observar el desarrollo radicular.
- Tratamientos hormonales: Las semillas se germinaron en MS $\frac{1}{2}$ , donde se dejaron crecer 5 días, pasados los cuales se trasplantaron a los medios suplementados con los siguientes tratamientos: IAA 10<sup>-6</sup>M, 2,4-D 10<sup>-8</sup>M, ABA 10<sup>-6</sup>M y ACC 10<sup>-6</sup>M. Pasados 3 días, se realizó la medida de la longitud de la raíz principal. En el caso del IAA, también se realizó un análisis del número de raíces laterales y primordios de raíz lateral a los 6 días de tratamiento.

## Análisis morfológico

### Desarrollo radicular

El análisis morfológico radicular se realizó mediante observación a la lupa y conteo del número de RL emergidas. El número de primordios se estableció por clarificación de raíces y observación microscópica y la longitud de la raíz principal se cuantificó mediante el *software* ImageJ (<https://imagej.net/>). El análisis estadístico se realizó mediante T-student en el caso de las comparaciones uno a uno, y ANOVA en el caso de las comparaciones múltiples.

En cuanto al uso de líneas marcadoras, se han realizado distintas aproximaciones. En lo que a la expresión de *SKP2B* y *FIP1* se refiere, se ha hecho uso de la tinción histoquímica GUS por incubación de X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -glucurónico, Duchefa) en presencia de tampón fosfato y, en los casos en los que no se requirió la supervivencia de la plántula, ferrocianuro potásico. Por otro lado, las líneas marcadoras fluorescentes se observaron en un microscopio confocal Leica SP8. Se realizaron preparaciones de raíz de plántulas de 8 días teñidas con con yoduro de propidio y la fluorescencia se cuantificó mediante el *software* Leica Application Suite. Las construcciones utilizadas (*pDR5:GFP*, *pAUX1:YFP*, *pPIN1:GFP*, *pPIN2:GFP*, *pAUX1:YFP*, *pWOX5:YFP*, *pSCR:GFP*, *pCYCB1;1::GFP*) se introdujeron en el fondo genético *fip1-1* mediante cruces y posterior selección de líneas homocigotas.

## Respuesta gravitrópica

Se germinaron plantas silvestres y mutantes en placas verticales y medio MS1/2 y se dejaron crecer durante 5 días. Después, se realizó un giro de 90° de las placas y se realizaron distintas observaciones a distintos tiempos. En primer lugar, se observó el desarrollo de PRL inducidos por estímulo gravitrópico siguiendo el protocolo descrito por Péret y colaboradores (Péret et al., 2012). Se cosecharon y clarificaron las plantas sometidas al estímulo durante 18h (correspondiente a estadio de desarrollo IV-V) y se observaron en un microscopio Zeiss Axiophot con contraste interdifereencial de Nomarski.

En cuanto a la respuesta de la raíz principal, se realizó una tinción con lugol seguida de lavado y montaje con cloralhidrato y se observó la distribución de los gránulos de almidón en un microscopio Leica MD 2000.

## Amplificación, clonaje y análisis de secuencias

### Genotipado de mutantes de inserción SALK

Se analizaron 15 líneas de inserción por T-DNA obtenidas a través de la colección NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre) (Tabla3). La homocigosis del alelo mutante se comprobó por genotipado por PCR. Para ello, se extrajo ADN genómico de una hoja de plantas de aproximadamente 4 semanas siguiendo el protocolo descrito por Bernatzky y Tanksley (1986) y se sometió a amplificación con la polimerasa de la marca comercial Biotools B&M Labs. Los fragmentos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en agarosa al 1%.

### Clonaje de *FIP1* y su promotor para generación de plantas transgénicas

El gen *FIP1[V]/FIP1* (At5g58040) fue clonado a partir de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* L. ecotipo *Columbia* mediante el uso de la polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher) y los oligonucleótidos especificados en la Tabla 4. Para el clonaje de la secuencia genómica se utilizó una estrategia clásica de clonaje en dos partes aprovechando la diana de restricción con corte único en la secuencia PstII (Figura). Los fragmentos C y N-terminal de *FIP1* se clonaron con el kit pGEM®-T Easy (Promega), se sometieron a digestión y se separaron los fragmentos obtenidos por electroforesis en agarosa al 1%. Las bandas obtenidas se purificaron con el kit FavorPrep™ GEL/PCR Purification (Favorgen Biotech. Corp.) y se ligaron mediante la ligasa T4 (Thermo-Fisher). Los clones obtenidos se comprobaron por restricción y se secuenciaron en Secugen S.L. (ABI PRISM 3700, Applied Biosystems). El alineamiento de las secuencias se hizo mediante la herramienta ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)).

NASC code	nombre	AGI
N685733	SALK_041367C	At5g58610
N655234	SALK_005190C	
N389366	GK-035B02.01	At5g59269
N612359	SALK_112359 (BS)	At5g59580
N654043	SALK_002838C	At5g56980
N665855	SALK_041346C	At5g58960
N740000	GK-129F04.01	At5g57370
N816171	SAIL_347_C06	At5g57840
N481455	GK-849D11 [set]	At5g59660
N560622	SALK_060622 (AR)	At5g58880
N815357	SAIL_330_F06	At5g58880
N671650	SALK_085428C	At5g57330
N808586	SAIL_178_A11	
N678589	SALK_063063C	At5g58560
N680058	SALK_099558C	At5g58040
N840107	SAIL_890_H08	At5g57655
N819102	SAIL_413_G09	At5g57830
N871603	SAIL_155_A01	At5g59290

Tabla 3: Mutantes de inserción de los genes situados en el intervalo de segregación de *sbrel52*

Nombre	Secuencia 5→3'
FIP1-FW	GGCCGTTCTTCTTCTTCTCC
FIP1Pst-RV	CCCTGTTGCTGCAGCTAACTC
FIP1Pst-FW	GTTAGCTGCAGCAACAGGGGC
FIP1-RV	TGCGTATTCCTCCCTATTCT
FIP1.prom-FW	GGAGATAGAACCATCGTGGAAACTCGTGACC
FIP1.prom-RV	CCAGAAAGCTGGGTCCATTGGAGTAAAGAG

Tabla 4: Cebadores diseñados para el clonaje del ADN genómico de *FIP1* y de su promotor

Para la complementación del fondo genético *fip1-1* se extrajo la secuencia genómica de *FIP1* del plásmido pGEM®-T Easy mediante el uso de dianas de restricción y se ligó en el plásmido pROKII (Km<sup>R</sup>, Figura 22), con el que se procedió a la transformación de la cepa GV3101 de *Agrobacterium thumefaciens* y a la posterior infección de las plantas *fip1-1*. Las semillas obtenidas se seleccionaron por resistencia a kanamicina y se comprobaron por amplificación de parte de la construcción pROKII-*FIP1*. De forma paralela, se comprobó el fondo genético mediante la metodología dCAPS (Neff et al., 1998) y observados en electroforesis de agarosa al 4%.

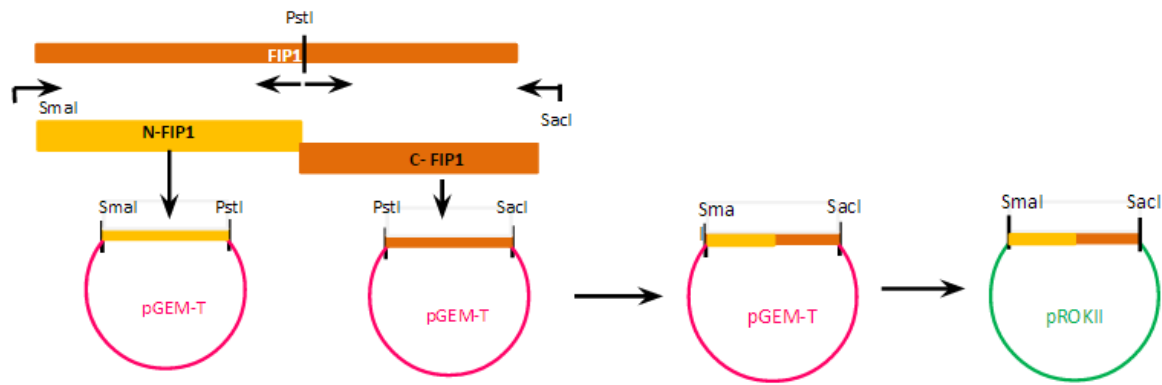


Figura 22: Esquema de la estrategia de clonaje para el ADN genómico de *FIP1*.

Por otro lado, se diseñaron cebadores para amplificar los 5Kb situados aguas arriba del codón START de *FIP1* y se clonaron mediante la metodología Gateway® (Thermo-Fisher) en el plásmido pGWB3. La transformación de plantas silvestres de *Arabidopsis* permitió crear la línea *pFIP:GUS*, que se comprobó por amplificación de la construcción en el ADN genómico de las plantas transformadas.

## Procesamiento de *FIP1*

Para el análisis del procesamiento del Intrón 2 de *FIP1* en los fondos *fip1-1* y control se realizó una extracción de ARN mediante el uso de TRIzol® Reagent (Invitrogen). A continuación se añadió 0,1mL de cloroformo por 1mL de TRIzol, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se centrifugó a 13.000rpm a 4°C durante 15 minutos. La fase soluble se trató con isopropanol y el precipitado se lavó con etanol 80% para después ser resuspendido en 50uL de agua DEPC. El ARN extraído se sometió a una reacción de retrotranscripción con la enzima Superscript®III (Invitrogen) y cebadores oligo d(T). El cDNA obtenido de ambos fondos genéticos se sometió a amplificación con cebadores localizados en el Exón 2 (FW) y Exón 3 (RV) (Tabla 5). Los fragmentos amplificados se separaron en electroforesis de agarosa al 2% y se clonaron en el sistema pGEM®-T Easy (Promega) para proceder a su secuenciación en Secugen S.L.

Nombre	Secuencia 5→3'
FIP1.E2-FW	CATTCTGGAGGTGCTGCATC
FIP1.E3-RV	ATATCTCCAGGGCTTTTCTTC

Tabla 5: Cebadores diseñados para el análisis del procesamiento del Intrón 2 de *FIP1* en los fondos genéticos *fip1-1* y control.

## Análisis transcriptómicos

### Análisis de expresión: RNASeq

Se realizó una extracción de 2 réplicas biológicas de ARN total de plántulas de 12dpi germinadas *in vitro* en las condiciones antes mencionadas por TRIzol® Reagent (Invitrogen) que se purificó mediante el método de columnas RNAeasy® (Qiagen) y se sometió a la metodología RNASeq en los laboratorios BGI Genomics, que también procedió al análisis estadístico. Se han considerado como desregulados los genes con un cambio de expresión igual o superior a 2 y un valor de FDR menor de 0,01.

### Análisis de poliadenilación alternativa: PATSeq

El análisis de APA se realizó en dos experimentos de respuesta a estrés, cada uno de ellos formado por 3 réplicas biológicas independientes: Estrés salino y estrés por ayuno de nitrógeno. En el primer caso, se sometió a plántulas de 4dpi germinadas en MS½ a un tratamiento de 5 días en un medio suplementado con cloruro de sodio 75mM. Por su parte, las plántulas del grupo sin tratamiento se trasladaron a un medio MS½ estándar. Por otro lado, las muestras del ayuno de nitrógeno se tomaron de plantas de 13 dpi germinadas en el medio carente de nitrógeno y su respectivo control suplementado con la concentración de sales propia del medio MS½ completo.

Pasados los tiempos de cultivo, se procedió a la recogida de muestras de raíz (ambos tratamientos) y parte aérea (estrés salino.) Ambas partes se separaron limpiamente con un bisturí estéril y se recogieron en tubos falcon que se trataron con TRIzol® (Invitrogen) para extracción del ARN total.

Debido a que los posteriores tratamientos se realizarían en el laboratorio del Dr. Arthur Hunt en el Plant & Soil department de la Universidad de Kentucky, las muestras de ARN se desecaron mediante tratamiento con el kit RNAsable® y se conservaron a temperatura ambiente durante aproximadamente una semana. Posteriormente, se procedió a su resuspensión en 50uL de agua estéril libre de nucleasas y se purificaron mediante columnas RNAeasy® (Qiagen). Se realizó una medida de la calidad y cantidad del ARN purificado en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 y se procedió a la elaboración de librerías.

### Elaboración de librerías Poly(A) tag (PAT)

Las librerías de poly(A) tags (PAT) se generaron a partir de 0,5-2ug de RNA total en un volumen de 20uL. En primer lugar se fragmentó la muestra mediante un tratamiento de 5 minutos a 70°C con el Buffer de Fragmentación (10x: 100 mM ZnCl<sub>2</sub> en 100 mM Tris-HCl pH 7.0). La reacción se paró mediante incubación 5 minutos a temperatura ambiente en una solución EDTA pH 8. A continuación se sometió a las muestras a un tratamiento de 65°C durante 5 minutos para romper las estructuras secundarias y enriquecieron en RNA poliadenilados mediante incubación con bolas de poly(dT<sub>25</sub>). Para ello, las bolas se resuspendieron 30 minutos en agitación a temperatura ambiente y se repartieron en alícuotas de 20uL. Cada alícuota se lavó 2 veces con 100uL de Buffer de Unión (20mM

Tris–HCl pH 7.5, 1.0M LiCl, 2 mM EDTA) y se resuspendió en 50 uL del mismo buffer. Las beads y las muestras de ARN fragmentado se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo que se lavaron 2 veces con 100uL del Buffer de Lavado (10mM Tris–HCl pH 7.5, 0.15M LiCl, 1mM EDTA. Por último, los fragmentos de ARN poliadenilados se eluyeron de las bolas en 20uL de agua DEPC mediante la incubación a 80°C durante 2 minutos.

Una vez enriquecidas las muestras en fragmentos de ARN poliadenilados se procedió a una primera ronda de retrotranscripción. Para ello, se usó la enzima SMARTScribe™ (que añade 3 citosinas al extremo 3' del cDNA) y uno de los cebadores de la serie PE-RT3, que incluye un código de identificación de 7 nucleótidos. A continuación, se realizó una segunda ronda de retrotranscripción con el cebador genérico SMART7.5, que contiene 3 nucleótidos de guanina en su extremo 5'. Ambos cebadores aportan además un adaptador específico del sistema de secuenciación que además permitirá más adelante amplificar los fragmentos mediante una reacción de PCR con los primers PE-PCR1 y PE-PCR2 (Tabla 6).

Una vez finalizada la retrotranscripción se procedió a una purificación mediante incubación con bolas de AMPure. Esta metodología permite realizar una selección por tamaño según la proporción de bolas utilizada. Se usaron 20uL de bolas por cada 24uL de reacción de retrotranscripción para seleccionar fragmentos de entre 200 y 500 pares de bases. En primer lugar se homogeneizó la solución de bolas 30 minutos en agitación a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces con el Buffer de Unión. Las muestras se incubaron con una alícuota de 20uL de AMPure bolas a temperatura ambiente durante 8 minutos y, a continuación, se lavaron dos veces con una solución de etanol al 80% preparada en el momento y se eluyó el ARN en 50uL de agua libre de nucleasas.

A)

Nombre	Secuencia 5→3'
serie PE-RT3	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNN <del>xxx</del> T TTTTTTTTTTTTTTTTTVN
SMART7.5	CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCTG
PE-PCR1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTTCCGATCT
PE-PCR2	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTCTCGGCATT CCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT

Tabla 6: A) Cebadores utilizados para la retrotranscripción y amplificación de los fragmentos de ARN poliadenilados. La serie PE-RT3 incluye un código de identificación de 7 nucleótidos que se muestran como ~~xxx~~. B) Relación de codigos de la serie PE-RT3.

primers RT-PE3	Código <u>xxx</u>
a	CCCTTTT
b	CGGTTTT
c	AACTTTT
d	AGCTTTT
e	ACGTTTT
f	AGATTTT
g	CCGTTTT
h	CAATTTT
j	CAGTTTT
k	GGATTTT
l	CCATTTT
m	CACTTTT
n	GAGTTTT
o	GCATTTT
p	GAATTTT
q	GGCTTTT
r	ACCTTTT
s	GACTTTT
t	AGGTTTT
u	CGATTTT
v	CGCTTTT
w	GCGTTTT
x	GCCTTTT
y	AAGTTTT
z	AAATTTT

La amplificación de los fragmentos purificados se realizó con la enzima Phire Hot Start II (Thermo Fisher) utilizando los cebadores PE-PCR1 y PE-PCR2 en dos fases. En primer lugar, se realizó una amplificación de 15-18 ciclos que fue comprobada mediante electroforesis en agarosa 2%. Se seleccionaron los fragmentos amplificados entre 300 y 500 pares de bases en el gel, se purificaron y el resultado de dicha purificación fue sometido a una segunda ronda de PCR, esta vez de 12-15 ciclos. El amplicón final se purificó mediante el sistema AMPure y se sometió a un análisis cualitativo y cuantitativo mediante el kit de Agilent Bioanalyzer. Las muestras se cuantificaron una vez más a través del sistema Qubit (Thermo Fisher) y se procedió a la preparación de un pool con 20ug de cada una de ellas. Finalmente, las librerías se secuenciaron mediante la plataforma Illumina.

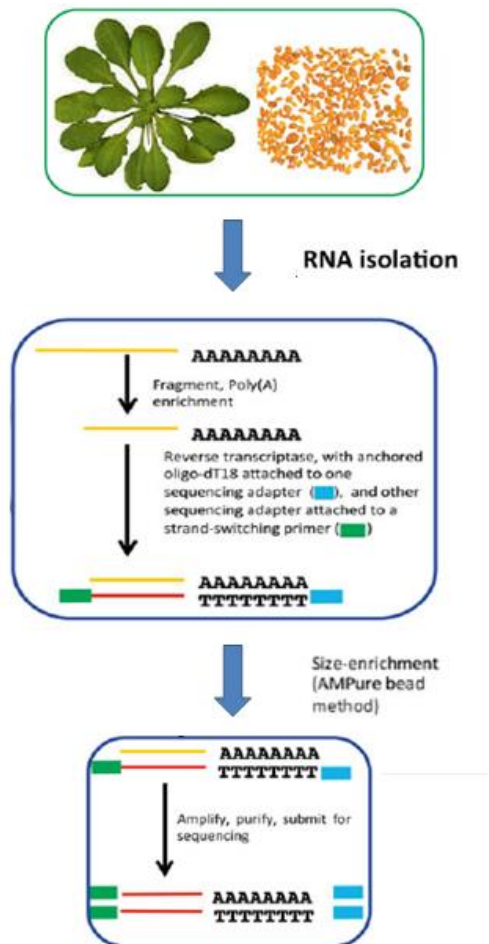


Figura 23: Esquema de trabajo para la elaboración de librerías PATSeq. Adaptado de Polyadenylation in Plants (Adaptado de Hunt & Li, 2015)

### Análisis de las librerías de Poly(A) tag

El resultado de la secuenciación se realizó según el protocolo descrito por Bell y colaboradores (2016). En primer lugar, las secuencias se importaron en el sistema CLC Genomics Workbench, donde se separaron en archivos independientes para cada réplica biológica, fondo genético y medio de crecimiento. Se eliminaron los oligo-dT y adaptadores Illumina residuales y se mapearon en el genoma de referencia TAIR10 ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) y se procesaron mediante la herramienta BEDTools para determinar el número total de Poly(A) tags (PAT) correspondientes a cada uno de los genes anotados.

Así, se realizó una lista de sitios de poliadenilación individuales -Poly(A) sites (PAS)- y de agrupaciones de PAT en clusters de 24 nucleótidos - Poly(A) clusters (PAC)-.

Una vez identificados, los PAS y PAC se analizaron siguiendo 3 estrategias independientes (Figura 24). En primer lugar, se analizaron las diferencias estadísticas en el uso relativo de los diferentes sitios de corte y poliadenilación de cada uno de los genes de interés mediante el método DEXSeq (Anders, Reyes, & Huber, 2012). Este método elabora una tabla en la que se describe el número de lecturas alineadas en cada exón. Sin embargo, si el límite de los exones no es el mismo para todos los transcritos se divide el exón en dos o más partes que se denominarán “bins” (Figura 24).

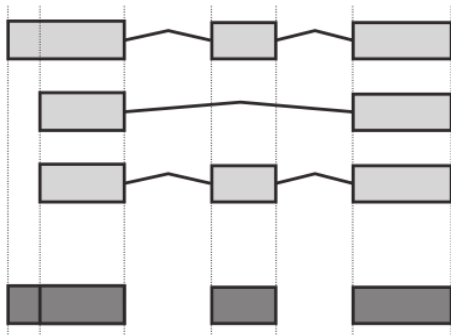


Figura 24: Definición de bin según el método DEXSeq (Anders et al., 2012) En este ejemplo el gen a analizar se expresa mediante 3 transcritos que involucran exones que a su vez presentan límites alternativos (gris claro). Para realizar el conteo de las lecturas se elabora el modelo gris oscuro, en el que el exón de longitud variable se ha dividido en dos bins.

Para poder hacer uso de la herramienta DEXSeq, se exportó el resultado del mapeo en CLC como archivos .bam. Se hizo uso de scripts Python para crear un archivo .gff en el que se contabilizaban las lecturas que se podían asociar a cada uno de los bins. A continuación, este archivo se combinó con los archivos de cada una de las réplicas de cada muestra en un documento maestro que contabiliza las lecturas de cada bin según sus coordenadas cromosómicas. Por último, el análisis estadístico se realizó a través del método DEXSeq implementado como paquete del lenguaje de programación R (Anders et al., 2012). Así, el programa RStudio permitió leer los conteos, estimar tamaños y dispersiones muestrales, ajustar la relación dispersión/media y analizar el uso relativo de cada bin en las distintas condiciones y fondos genéticos. Así, el uso de los distintos sitios de poliadenilación se comparó según la probabilidad hipergeométrica y se consideraron significativos aquellos p-valor menores de 0,05.

Por otro lado, se asignó cada colección de PACs a las diferentes regiones genómicas mediante el mapeo en un archivo .gff que sólo contiene anotaciones para las regiones genómicas y en el que los extremos 3'UTR se han extendido hasta los 120nt. Así, se identificó el número de PACs que localizan en las siguientes regiones: 3'UTR, 5'UTR, intrones, regiones codificantes y regiones ambiguas (amb). Las regiones ambiguas se han definido como aquellas que tienen diferentes anotaciones en diferentes transcritos y se eliminaron del análisis. Se siguió el proceso descrito en (Laura de Lorenzo, sin publicar) según el que se crea una master list de PACs que se anotan según sus coordenadas

cromosómicas y que servirá de guía para realizar el contaje de las lecturas.

Una vez preparado el archivo maestro se realizó un análisis de la frecuencia de PATs para cada PAC y para cada gen. Se excluyeron del análisis todos aquellos PACs definidos por menos de 10 PATs y se procedió a analizar la contribución de cada cluster y cada “*site*” según los niveles de expresión del gen. Este proceso se realizó para cada fondo genético y tratamiento siguiendo la siguiente expresión:

$$\log_2 \frac{PAT_{tratamiento}}{PAT_{control}} = \log_2 \frac{(\#PAC/\#gen)_{tratamiento}}{(\#PAC/\#gen)_{control}}$$

De este modo, se expresa el número de lecturas que mapean en cada cluster en referencia al número de lecturas total del gen. Una vez normalizado este dato, se procedió a comparar tratamientos y fondos genéticos y se representó en gráficos de cajas y bigotes mediante la aplicación online Boxplot (<http://boxplot.tyerslab.com/>). Para el análisis estadístico se utilizó la herramienta Notches, que representa los valores  $\pm 1,58 \cdot IQR / \sqrt{n}$  y que permite identificar diferencias significativas entre dos medias con un 95% de confianza (Chambers *et al.*, 1983).



# RESULTADOS



# Resultados

En este trabajo de tesis se ha identificado *fip1-1*, un mutante viable de la maquinaria de poliadenilación con un fenotipo pleiotrópico que implica alteraciones de desarrollo y respuesta a diferentes estreses. A continuación se exponen los resultados obtenidos en el escrutinio de mutantes que permitió la identificación de *fip1-1*, así como la identificación del gen responsable del fenotipo y la caracterización morfológica y molecular del mutante.

## 1. Identificación del mutante *fip1-1*.

Manzano y colaboradores describieron la expresión de *SKP2B* como marcador de la formación de raíces laterales (2012). Con el objetivo de identificar mutantes con un patrón de expresión de *SKP2B* alterado y/o alteraciones en el desarrollo del sistema radicular lateral se realizó una mutagénesis química con etilmetanosulfonato (EMS) utilizando como fondo genético plantas marcadoras p*SKP2B*::GUS (Manzano et al., 2012). El rastreo de los mutantes resultantes permitió identificar una serie a la que se denominó *sbrel* (*skp2b* *expression less*). Entre ellos, el mutante recesivo *sbrel52* destacó por presentar un patrón de expresión deslocalizado y una drástica reducción del número de raíces laterales con respecto a su control (la línea transgénica p*SKP2B*:GUS, que se utilizará de control en adelante). Además, se observó una leve reducción de la longitud de la raíz principal, así como una clara disminución del tamaño de los cotiledones y el ángulo de inserción de los cotiledones (Figura 25A). Además, este mutante presenta una drástica reducción del número de raíces laterales emergidas (RL) (Figura 25B). Con el objetivo de determinar si este defecto en la formación de RL es consecuencia de alteraciones de la iniciación de primordios de raíz lateral (PRL) o del desarrollo de éste se realizaron observaciones microscópicas de plantas clarificadas que permitió determinar que *fip1-1* experimenta una reducción del 60% en la iniciación de los PRL con respecto a su control (Figura 25C).

Con el fin de identificar el gen mutado, se realizó el cruce del mutante (fondo genético *Columbia*) con plantas del ecotipo *Landsberg*. Mediante un análisis genético con diferentes marcadores (realizado en la Universidad Miguel Hernández, Elche; MR. Ponce y J.L. Micol) se logró delimitar la mutación al cromosoma 5, a una posición situada entre los marcadores polimórficos MUA2 y cer456317 (Figura 26). Este intervalo contiene 154 genes. El análisis genético de diferentes mutantes de genes candidatos, seleccionados en la posible función en desarrollo radicular resultó infructuoso, ya que no identificamos ningún mutante con un fenotipo similar a *sbrel52*. Por ello, se llevó a cabo una secuenciación masiva del ADN del mutante, lo que nos permitió identificar mutaciones en 15 genes candidatos en base a que sus mutaciones podrían conllevar cambio de aminoácido o alteraciones en el procesamiento del mensajero codificado la proteína codificada la producción de proteínas truncadas. Para determinar el gen responsable del fenotipo observado se realizó un análisis morfológico del sistema radicular de mutantes de inserción homocigotos de los genes candidatos (Figura 27A). De entre todas las observaciones destacó el fenotipo de *SALK\_099558* (T-DNA inserto en el primer exón del gen At5g58040 -*FIP1*-), que presenta una drástica reducción en la producción de raíces laterales. Además, las plántulas de esta línea de inserción presentan defectos en el desarrollo de la parte aérea, aunque menos acusados que los observados en *sbrel52*.

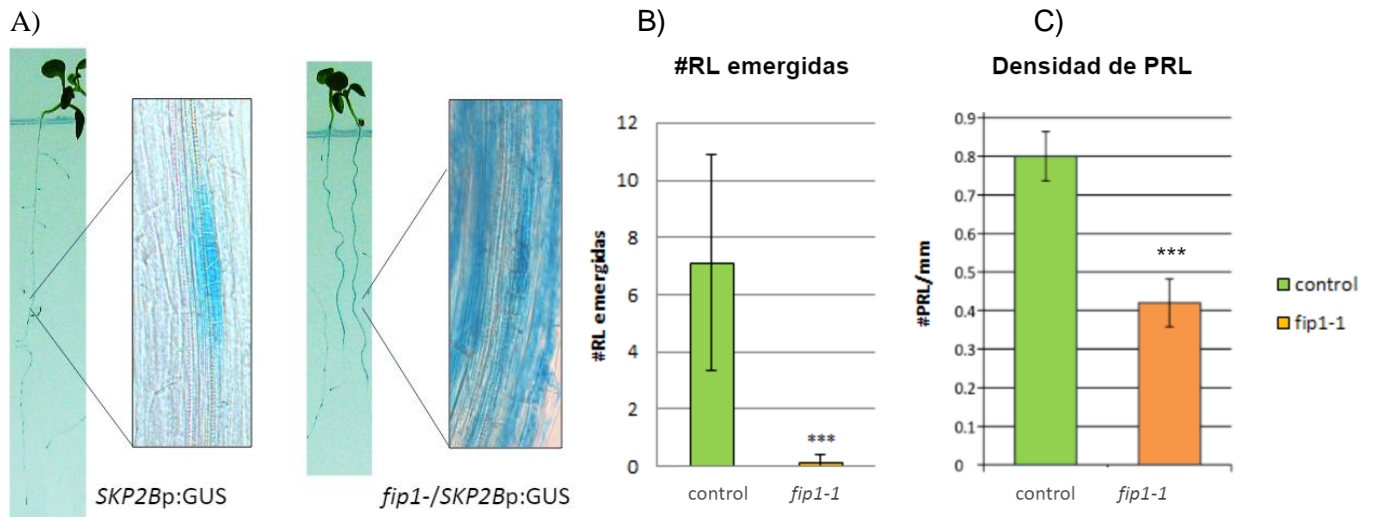


Figura 25: A) Plántulas *pSKP2B:GUS* y *sbrel52/pSKP2B:GUS*. A la derecha de cada raíz se puede observar una ampliación de un PRL en desarrollo. B) Raíces laterales emergidas en plántulas de 10dpi. C) Densidad de raíces laterales emergidas (RL emergidas) y de primordios de raíces laterales (PRL) por milímetro (mm).

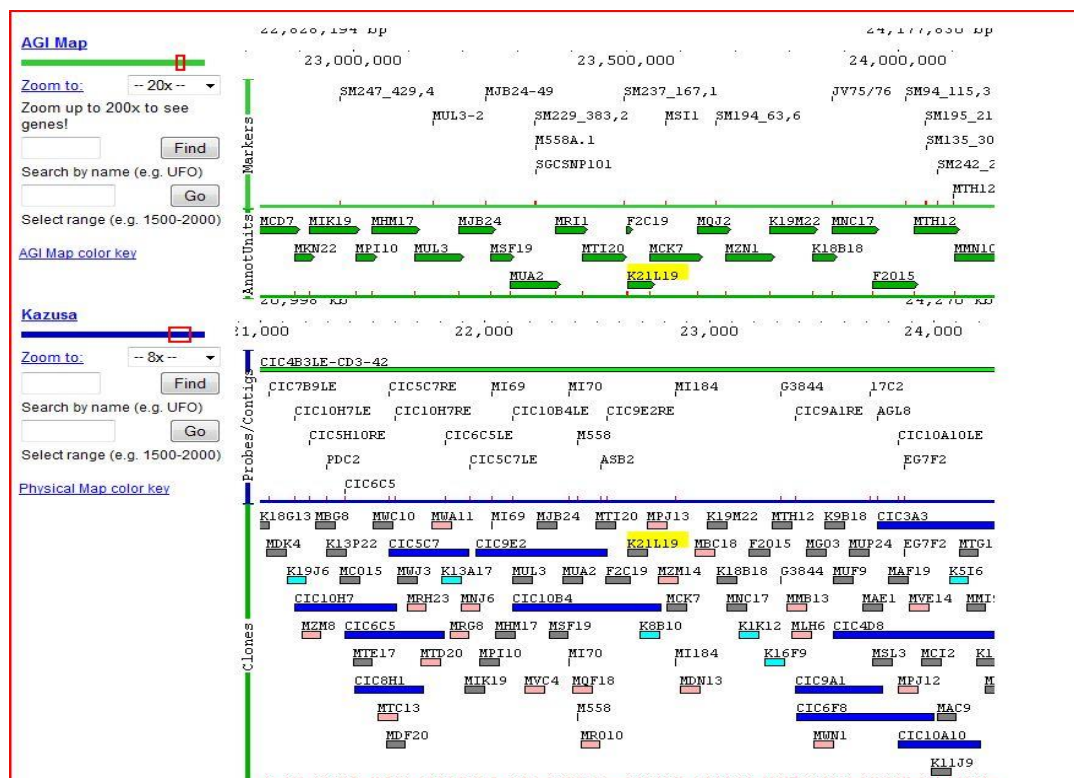


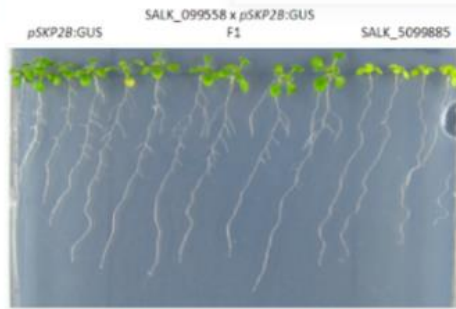
Figura 26: Resultado del mapeo de la mutación responsable del fenotipo de *sbrel52*.

Se realizó un test de dominancia para el mutante *SALK\_099558* y se observó que todas las plántulas de la primera generación del cruce con el control (*pSKP2B::GUS*) recuperan la capacidad de formación de raíces laterales, indicando que *sbrel52* es una mutación recesiva (Figuras 27B y 27C). Para comprobar la interacción genética de ambos mutantes se realizó un test de alelismo que mostró ausencia de raíces laterales emergidas en las 2 primeras generaciones resultantes del cruce *SALK\_099558xsbrel52*. En la Figura 28 se pueden observar los datos correspondientes a la primera generación.

A)

NASC code	name	gene
N685733	SALK_041367C	At5g58610
N655234	SALK_005190C	
N389366	GK-035B02.01	At5g59269
N612359	SALK_112359 (BS)	At5g59580
N654043	SALK_002838C	At5g56980
N665855	SALK_041346C	At5g58960
N740000	GK-129F04.01	At5g57370
N816171	SAIL_347_C06	At5g57840
N481455	GK-849D11 [set]	At5g59660
N560622	SALK_060622 (AR)	At5g58880
N815357	SAIL_330_F06	At5g58880
N671650	SALK_085428C	At5g57330
N808586	SAIL_178_A11	
N678589	SALK_063063C	At5g58560
N680058	SALK_099558C	At5g58040
N840107	SAIL_890_H08	At5g57655
N819102	SAIL_413_G09	At5g57830
N871603	SAIL_155_A01	At5g59290

B)



C)

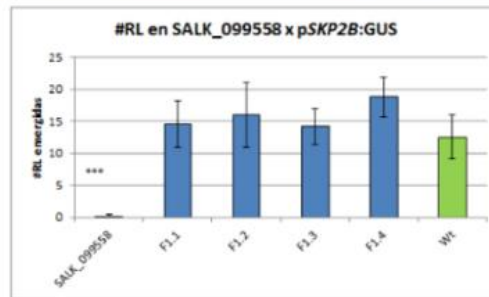


Figura 27: Identificación del gen *SBREL52*. A) Mutantes de inserción de los genes candidatos. Se ha marcado en amarillo la línea seleccionada como candidata por su fenotipo radicular. B) Test de dominancia del mutante *SALK\_099558*, primera generación y parentales. C) Número de raíces laterales emergidas en cada uno de los fondos genéticos analizados en el test de dominancia. Las diferencias estadísticas se han marcado con asteriscos (\*: pvalor<0,05; \*\*:pvalor<0,01, \*\*\*: pvalor<0,001).

SALK\_09951

SALK\_09951 X sbrel52  
F<sub>1</sub>

sbrel52

C

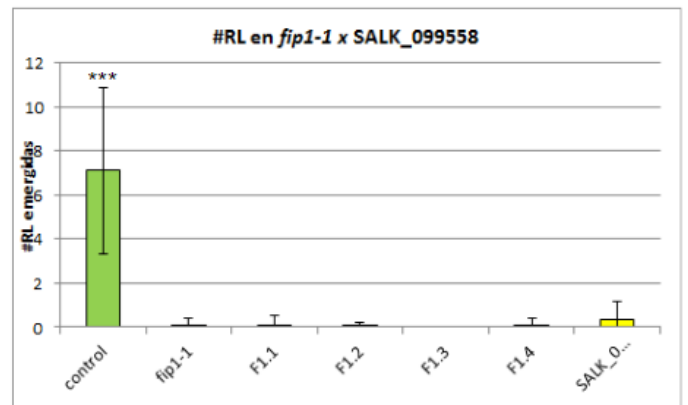
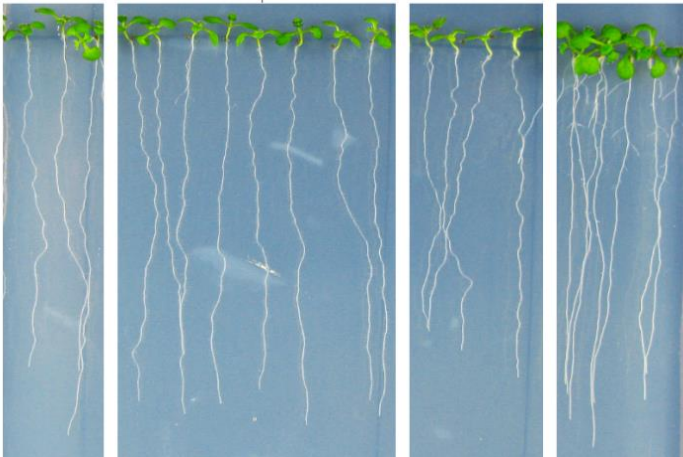


Figura 28: Test de alelismo entre los mutantes *sbrel52* y *SALK\_099558*. A) Plántulas de 7dpi de la primera generación y de sus parentales sometidas a tinción GUS. B) Número de raíces laterales emergidas en los fondos genéticos analizados durante el test de alelismo. Las diferencias estadísticas se han marcado con asteriscos (\*: pvalor<0,05; \*\*:pvalor<0,01, \*\*\*: pvalor<0,001).

## Complementación de *fip1-1*

Con los resultados obtenidos se seleccionó el gen *FIP1* como candidato a ser responsable del fenotipo de *sbrel52*. Para comprobarlo definitivamente, se clonó el ADN genómico silvestre bajo un promotor 35S y se insertó en el genoma de *sbrel52* mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens*. Las semillas transformadas (T0) se seleccionaron por su arquitectura radicular, seleccionando aquellas que formaban raíces laterales. Se extrajo ADN genómico de las plántulas de la generación T1 y se comprobó el fondo genético *sbrel52* mediante la metodología dCAPs para comprobar la integración del transgen silvestre. A continuación se procedió a realizar un análisis morfológico de la arquitectura radicular de las diferentes líneas transgénicas obtenidas, observándose que todas las líneas T1 recuperaban su capacidad de producción de raíces laterales, así como el patrón de expresión *SKP2B*, en  $\frac{3}{4}$  partes de las plántulas analizadas. Además, se observó recuperación del tamaño de los cotiledones y la longitud de la raíz principal (Figura 29). A la vista de los resultados obtenidos, en adelante se utilizará el nombre *fip1-1* para denominar al mutante *sbrel52*.

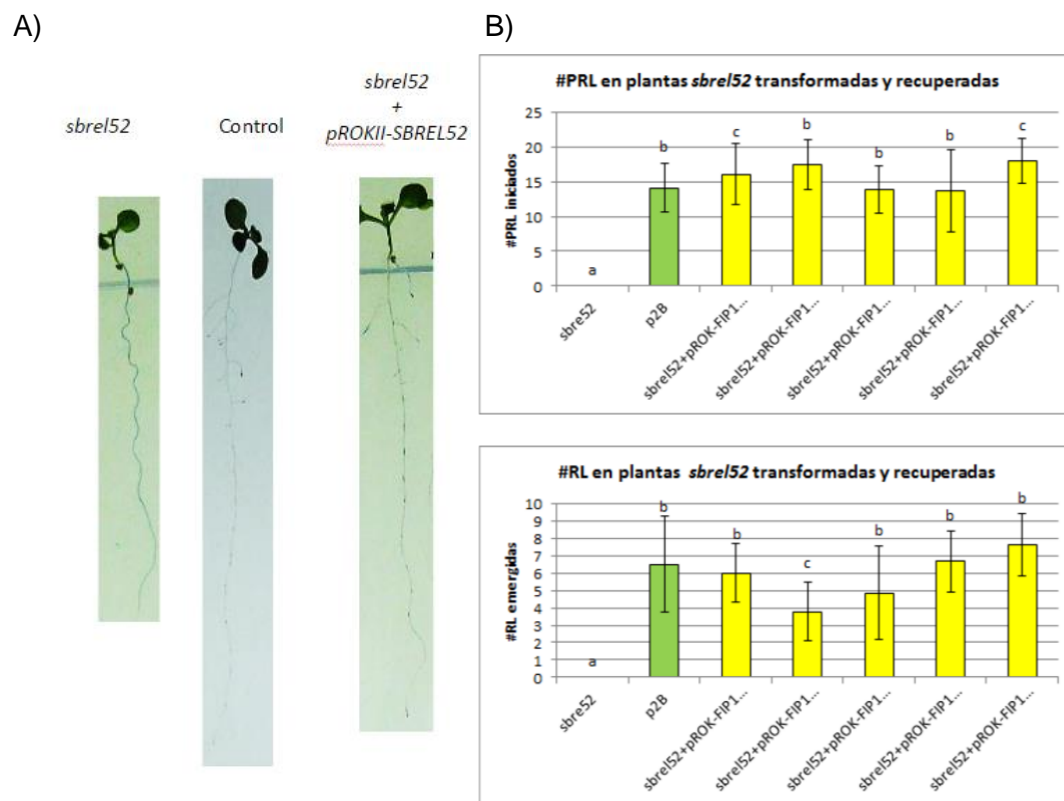


Figura 29: Complementación del mutante *sbrel52* por sobreexpresión de *FIP1*. A) Tinción GUS de los fondos genéticos analizados. B) Número de raíces laterales emergidas y primordios de raíz lateral (medidos como puntos de expresión del marcador *pSKP2B:GUS*) observados en plántulas transformadas de 7dpi.

## Procesamiento de *FIP1* en el fondo genético *fip1-1*.

El mutante *fip1-1* presenta una mutación puntual en la posición 23490391 del cromosoma 5 que introduce una alanina en el lugar de una guanina. Esta coordenada cromosómica corresponde al paso exón2-intrón2. Más concretamente, al primer nucleótido del intrón 2 de *FIP1* (At5g58040). Para comprobar el procesamiento de este intrón se amplificó el cDNA con cebadores específicos del fragmento de interés y se calculó el tamaño de fragmento esperado en caso de que se retire o se mantenga el intrón. Los resultados de la amplificación mostraron que el fondo genético control realiza distintos tipos de procesamiento, entre los que predomina la extracción del Intrón 2. Sin embargo, el mutante *fip1-1* favorece un tipo de procesamiento que podría mantener completa o parcialmente el intrón en el transcrito maduro (Figura 30).

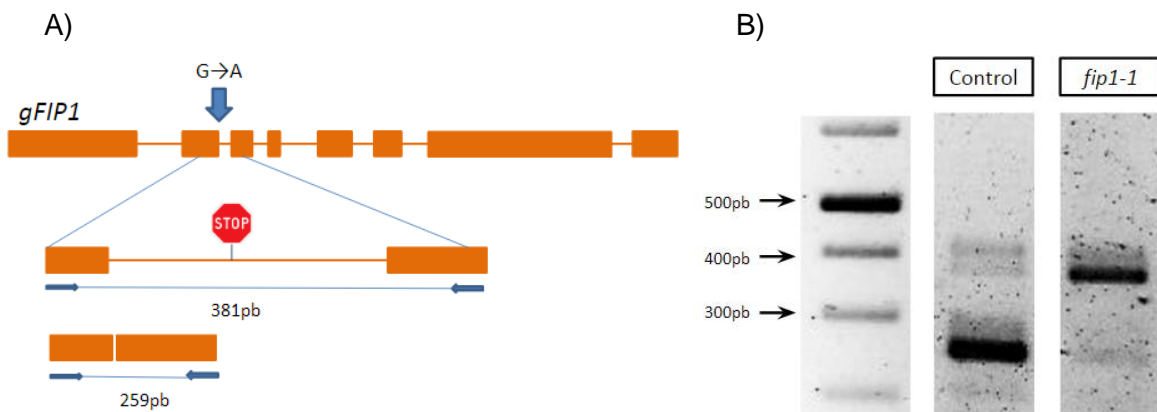


Figura 30: Procesamiento del intrón 2 del gen *FIP1*. A) Esquema de las regiones genómicas de *FIP1* y la posición del SNP. Se han representado los cebadores diseñados como flechas azules y se especifica el tamaño de banda esperado para la amplificación en caso de que se procese o se mantenga el intrón. B) Resultado de la amplificación en los fondos genéticos control y *fip1-1*.

Se clonaron los fragmentos amplificados en el sistema pGEM-Teasy para su posterior secuenciación. El resultado de la secuenciación de las bandas de mayor intensidad se alineó mediante Clustal-Wallis y se comprobó que la banda clonada procedente del transcriptoma de *fip1-1* contiene el intrón 2 completo, mientras que la del control lo ha procesado completamente (Figura 31). Lamentablemente, no fue posible clonar las bandas de menor intensidad, por lo que no se pudo determinar si son amplificaciones inespecíficas o transcritos minoritarios.

```

At5g58040      ATTCCTGGAGGTGCTGCATCTGTTGGTGGACCCCTCCTCAGGTCAAGTTCGTCACCCCGCC 1380
sbre152      -----GTTGTCACCCCGCC 15
Wt           -----CAGNTCGTCACCCCGCC 17
              * *****

At5g58040      AACCTTGGTCTCTATGGCTGGTCGTCAGAGGAGATTGGCGTCCACTGGGAATGAGGAAT 1440
sbre152      AACCTTGGTCTCTATGGCTGGTCGTCAGAGGAGATTGGCGTCCACTGGGAATGAGGAAT 75
Wt           AACCTTGGTCTCTATGGCTGGTCGTCAGAGGAGATTGGCGTCCACTGGGAATGAGGAAT 77
              *****

At5g58040      GCTTCTGCTGCACAGAAAGGGTTCACCAGCCTTGGGGTAGTAATACAGCAGGGCGTGA 1500
sbre152      GCTTCTGCTGCACAGAAAGGGTTCACCAGCCTTGGGGTAGTAATACAGCAGGGCGTGA 135
Wt           GCTTCTGCTGCACAGAAAGGGTTCACCAGCCTTGGGGTAGTAATACAGCAGGGCGTGA 137
              *****

At5g58040      CTGGACTTCACCTCTCCCTCTCACAAATAATTTTTCATCTGTTTCAGGAAGTCTCTCT 1560
sbre152      CTGGACTTCACCTCTCCCTCTCACAAATAATTTTTCATCTGTTTCAGGAAGTCTCTCT 195
Wt           CTGGACTTCACCTCTCCCTCTCACAA----- 163
              *****

At5g58040      AGTAGCTTAGGCTCAIGTCTGCATAICAACTTTTTGACTGATTGTTCTTTGTTTCTTT 1620
sbre152      AGTAGCTTAGGCTCAIGTCTGCATAICAACTTTTTGACTGATTGTTCTTTGTTTCTTT 255
Wt           -----

At5g58040      TATTTGCTGCTACTCTGTGCTTTTTAGGACTATAATTTGAGGTGCACATAGATAGTTTG 1680
sbre152      TATTTGCTGCTACTCTGTGCTTTTTAGGACTATAATTTGAGGTGCACATAGATAGTTTG 315
Wt           -----GACTATAATTTGAGGTGCACATAGATAGTTTG 195
              *****

At5g58040      AAGAAAAGCCCTGGAGATATCCAGGAGTIGAGATGACAGACTACTTCAACTTTGGACTAA 1740
sbre152      AAGAAAAGCCCTGGAGATAT----- 335
Wt           AAGAAAAGCCCTGGAGATATAAN----- 218
              *****

```

Figura 31: Alineamiento de las secuencias obtenidas en el análisis del procesamiento del Intrón 2 de *FIP1*. Se ha recuadrado en naranja la posición del SNP que determina la extracción de dicho intrón y que se encuentra alterado en el mutante *fip1-1*

A continuación, se procedió a realizar un análisis *in silico* de las putativas proteínas codificadas en los transcritos identificados. Mediante el software Chromas Pro se pudo determinar que el Intrón 2 de *FIP1* contiene un codón STOP, por lo que la proteína resultante del transcrito mayoritario en el mutante *fip1-1* sería una proteína truncada. Atendiendo a la distribución de dominios publicada por Forbes y colaboradores en 2006, esta proteína perdería el dominio de unión a ARN, aunque conservaría el dominio de interacción con resto de la maquinaria de poliadenilación (Figura 32).

A)



B)



Figura 32: Secuencia de aminoácidos de la proteína resultante de la traducción de los mensajeros identificados. Se han resaltado los residuos ácidos responsables de la interacción con el complejo de poliadenilación (verde), así como el motivo Fip1 (amarillo) A) Proteína resultante de la traducción del mensajero de *FIP1* maduro correctamente procesado. B) Proteína resultante de la traducción del mensajero al que no se ha retirado el Intrón 2.

Alternativamente, ya que FIP1 está implicada en la poliadenilación de mensajeros, se realizó un análisis de la secuencia genómica de *FIP1* en la herramienta de predicción de sitios de poliadenilación PASPA (Poly(A) Site Prediction in Plant and algae; Ji et al., 2015). Se identificaron 3 áreas con secuencias candidatas a ser reconocidas como PAS: Intrón 1, intrón 5 y extremo 3'UTR (Figura 33). Esta herramienta, además, permite alinear la secuencia introducida con el genoma de *Arabidopsis* y escanear las bases de datos de PAS publicada por Shen y colaboradores en 2008. En el caso de *FIP1* se ha observado una amplia variedad de PAS. Algunos de los más representados se localizan en regiones propuestas por el análisis de secuencia, como es el caso del intrón 1 y el extremo 3'UTR (Figura 34).

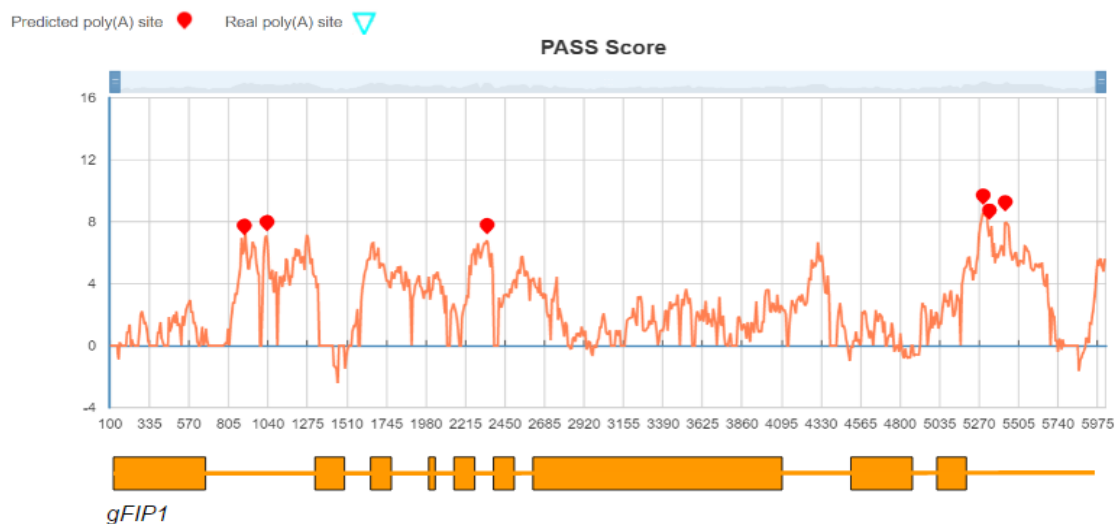


Figura 33: PAS predichos en la secuencia genómica de *FIP1*. A) Este análisis se ha realizado mediante la herramienta PASPA (<http://bmi.xmu.edu.cn/paspa/interface>), que usa un modelo de predicción que asigna a cada nucleótido un valor relativo a su posibilidad para ser objeto de corte y poliadenilación. En el gráfico se representa la curva de valores predichos, así como las regiones con mayor probabilidad de contener un PAS. B) Regiones genómicas de *FIP1*. Las bandas anchas representan a los exones, mientras que la línea recoge intrones y extremo 3'UTR.



Figura 34: Alineamiento de la secuencia analizada mediante la herramienta PASPA (amarillo) y la secuencia genómica de *Arabidopsis* (naranja). Los PAS predichos *in silico* (flecha verde) se pueden comparar con los PAS recogidos en bases de datos (flecha azul). Entre éstos, se ha destacado en azul oscuro aquellos PAS identificados en más de 100 lecturas individuales.

## Expresión de *FIP1*

Con el objetivo de determinar el patrón de expresión de *FIP1* se realizó un clonaje de las 5kb situadas aguas arriba de su codón START, que se introdujeron como reguladoras del gen *GUS*. Se transformaron plantas silvestres con el marcador *pFIP1:GUS* y se observó que el patrón de expresión mayoritario de *FIP1* se restringe a grupos celulares muy concretos entre los que se encuentran los meristemos de las raíces laterales y principal (Figura 35)

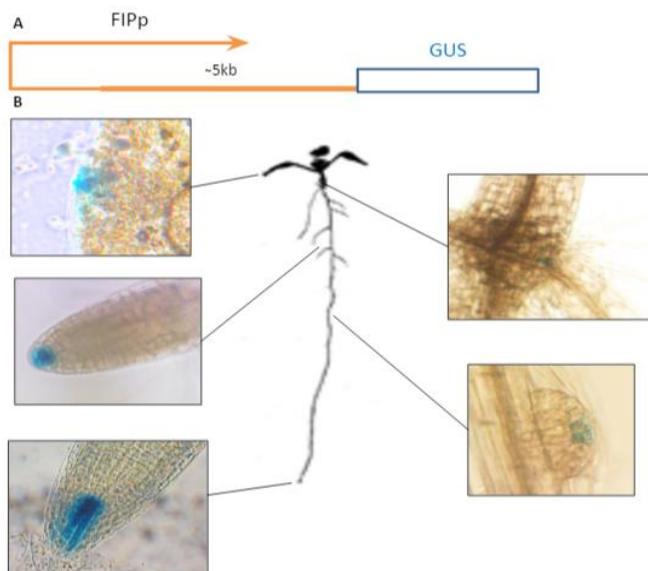


Figura 35: Expresión de *FIP1*. A) Esquema del clonaje realizado. B) Expresión del marcador *pFIP1:GUS* en plántulas de 8dpi.

## 2. Análisis transcriptómico

Una vez confirmada la mutación del gen *FIP1* se puede deducir que el fenotipo del mutante es resultado de alteraciones en el proceso de poliadenilación. Se ha descrito implicación de la proteína FIP1 en la selección del sitio de corte y poliadenilación, además de con la activación de la enzima Poly(A) polimerasa IV (Forbes et al., 2006). Con el objetivo de evaluar el efecto de la mutación del gen *FIP1* en el transcriptoma y de cambios en el sitio de selección de poliadenilación se realizó un doble abordaje. En primer lugar, un análisis de expresión transcriptómica mediante la técnica de RNASeq permitió identificar genes que sufren cambios en su expresión en el mutante *fip1-1*. Además, el apilamiento de las lecturas obtenidas permitieron realizar un análisis preliminar de los sitios de poliadenilación localizados en el extremo 3'UTR, así como la determinación de la longitud del mismo. Por último, una vez que se hubo confirmado que el mutante *fip1-1* presenta alteraciones en la selección de sitios de poliadenilación, se procedió a realizar un protocolo PATSeq. Esta metodología permite enriquecer las muestras secuenciadas en fragmentos cercanos al sitio de poliadenilación, lo que permite dirigir las lecturas a los puntos de interés, así como identificar sitios de poliadenilación alternativa (APA) localizados a lo largo de todo el gen, independiente de la región genómica (intrón, exón o 5'UTR).

### 2.1 Análisis de expresión

Se extrajo ARN de plántulas completas de 13 días crecidas en MS1/2 y se realizó un análisis transcriptómico mediante la tecnología de RNAseq. Este análisis reveló que la mutación *fip1-1* produce cambios significativos de expresión en un elevado número de genes. Se identificaron un total de 1714 genes desregulados en el mutante *fip1-1* (*Fold change* >2,5; *FDR*<0,01), 791 de ellos sobre-expresados y 923 reprimidos (Figura 36).

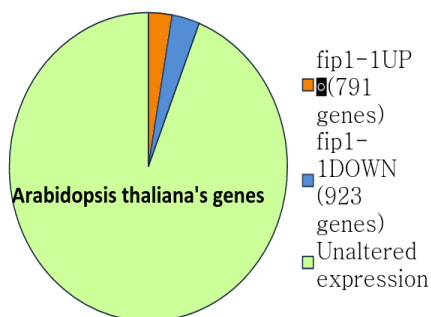


Figura 36: Representación de los genes que sufren cambios en sus niveles de expresión en el fondo mutante *fip1-1* con respecto a su control.

Se analizaron los genes desregulados por acumulación en categorías funcionales y se observó que, entre los genes sobreexpresados, hay un enriquecimiento significativo de genes implicados en desarrollo embrionario, organización de la pared celular y respuesta a hormonas, principalmente al ABA, y estreses como falta de agua, alta intensidad lumínica, REDOX o frío. Entre la función molecular destacan las proteínas constitutivas de pared celular, unión a lípidos o reservas nutricionales (Figura 37). En cuanto a los genes que se encuentran reprimidos a nivel transcripcional en el mutante *fip1-1*, destacan categorías de respuesta a hormonas (auxina, etileno, ácido jasmónico o ácido salicílico), así como a estrés biótico o herida (Figura 38)

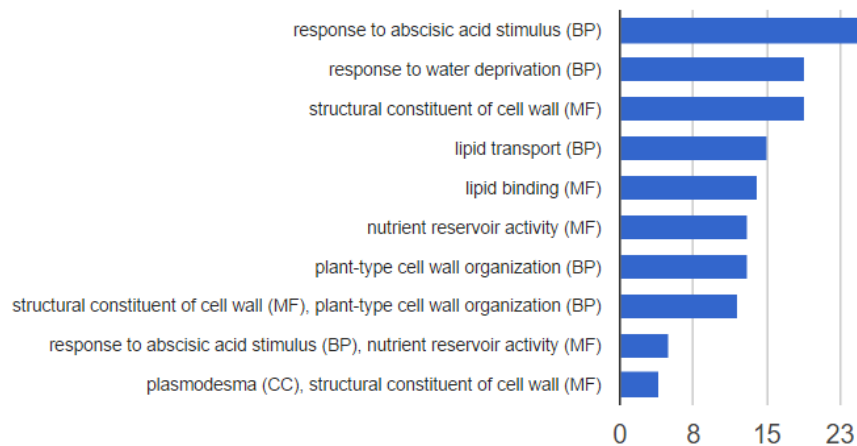


Figura 37: Categorías funcionales enriquecidas entre los genes sobreexpresados en el fondo mutante *fip1-1* (pvalor <0,05)

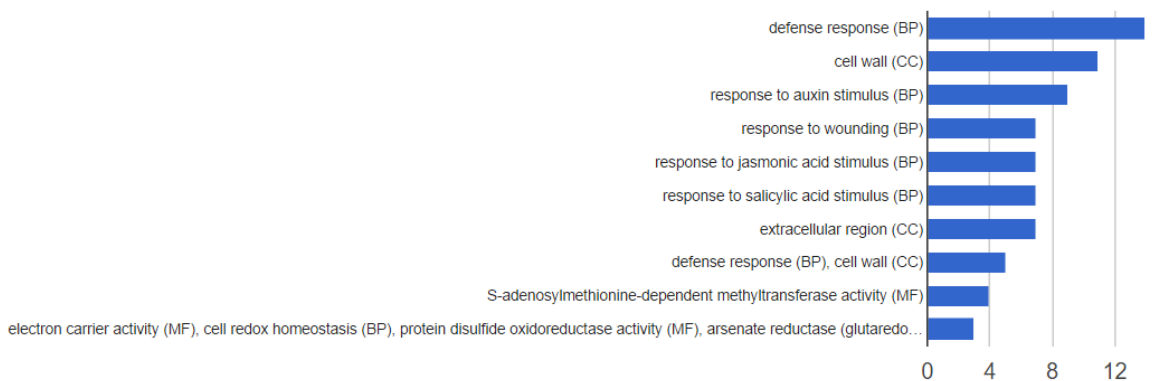


Figura 38: Categorías funcionales enriquecidas entre los genes reprimidos en el fondo mutante *fip1-1* (pvalor<0,05)

### 2.1.1. Análisis preliminar de poliadenilación alternativa en el extremo 3'UTR.

Ya que la tecnología de secuenciación de RNAseq genera un elevado número de secuencias cortas que se pueden alinear con el genoma de referencia, es posible determinar, al menos parcialmente, la localización del posible sitio de poliadenilación y extensión del 3'UTR. Por ello, Se hizo uso de las secuencias obtenidas en el RNASeq para realizar un análisis de la longitud del extremo 3'UTR de los transcritos. Los datos se analizaron gen a gen mediante el protocolo DEXSeq y se identificaron un total de 132 genes con cambios en la longitud del 3'UTR con un nivel de significancia de  $FDR < 0,01$  (criterio estricto) y 818 con un nivel de significancia de  $p\text{valor} < 0,01$  (criterio menos estricto). Se analizó el enriquecimiento en categorías funcionales y, entre el grupo seleccionado con el criterio menos estricto, se identificó una frecuencia significativa de genes relacionados con procesos metabólicos, movimiento microtubular y respuesta a cadmio y daño genético (Figura 39).

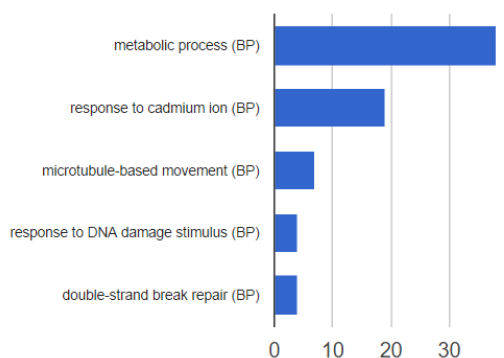


Figura 39: Categorías funcionales enriquecidas entre los genes que sufren alteraciones de la longitud del extremo 3'UTR en el fondo mutante *fip1-1* ( $p\text{valor} < 0,05$ ).

De forma paralela, se analizó la composición de los transcritos maduros mediante el protocolo DEXSeq. Así, se pudieron determinar las diferencias en la acumulación de lecturas a lo largo de todo el ADN genómico entre *fip1-1* y su correspondiente control. Con estos datos es posible identificar transcritos con distinta longitud del extremo 3'UTR, lo que permitió determinar que el mutante *fip1-1* tiene tendencia a seleccionar sitios de poliadenilación más distales (3'UTR largo) con respecto al control (Figura 40).

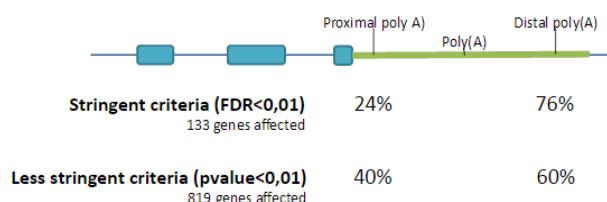
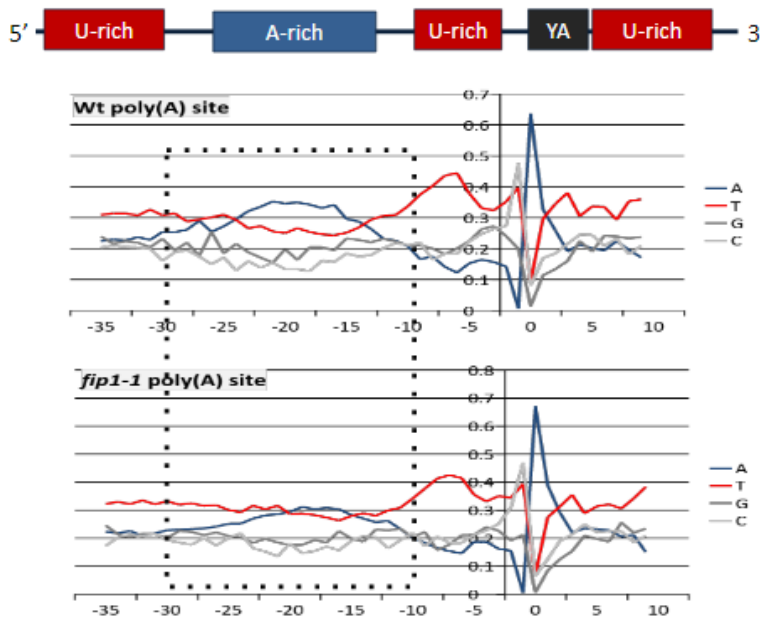


Figura 40: Esquema de los posibles casos de poliadenilación alternativa en el extremo 3'UTR. Se ha determinado el número de genes tienen distinta acumulación de lecturas en el extremo 3'UTR en el fondo *fip1-1* con respecto a su control con dos criterios estadísticos. ( $FDR < 0,01$  y  $p\text{ valor} < 0,01$ ). La figura representa un esquema de ARN mensajero con PAS alternativos, bajo los que se puede observar el porcentaje de genes que experimentan PAS en sitios distales y proximales en *fip1-1* respecto al control.

Por último, el análisis de las secuencias del extremo 3'UTR de los mensajeros maduros permitió determinar la secuencia del sitio de corte y poliadenilación (Poly(A)site, PAS). Se analizó la frecuencia en la que aparecen los distintos nucleótidos en las coordenadas adyacentes al sitio de corte y se observó que el mutante *fip1-1* presenta distinta frecuencia del uso de adeninas y timinas entre los puntos -15 y -25 del PAS, tomando como 0 el punto exacto del corte (Figura 41A). Este resultado supone un cambio en la secuencia seleccionada por la maquinaria de poliadenilación para realizar el corte del mensajero inmaduro, por lo que se analizó la frecuencia del uso de las secuencias canónicas de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados se muestran en la Figura 41B y confirman la reducción del uso de las secuencias canónicas analizadas.

A)



B)

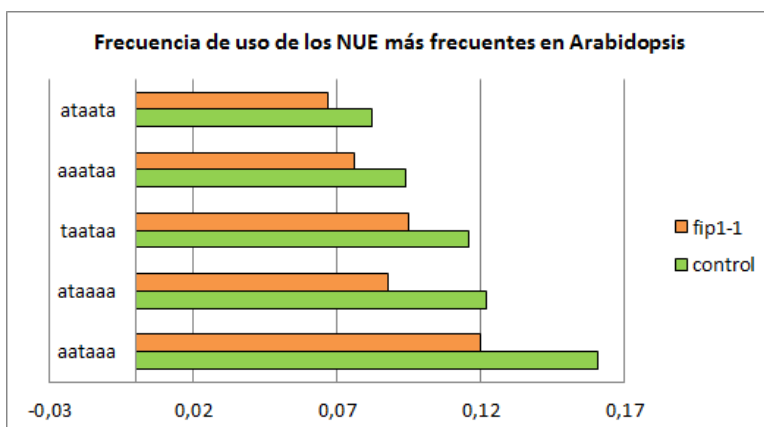


Figura 41: PAS seleccionados en *fip1-1* y su control. A) La frecuencia de cada uno de los nucleótidos según su posición relativa al sitio de corte y poliadenilación (YA, 0) se expresa en líneas de distintos colores. Se han destacado las frecuencias de Adeninas (azul) y Timinas (rojo) para facilitar la lectura de la región situada en el intervalo (-30, -10). B) Frecuencia del uso de las secuencias NUE más frecuentes en Arabidopsis en los fondos *fip1-1* y control.

Una vez realizado el abordaje descriptivo, se trató de relacionar el uso de sitios de poliadenilación alternativa con los resultados obtenidos del análisis de los niveles de expresión. Se ha observado que la gran mayoría de los genes que sufren poliadenilación alternativa en el mutante *fip1-1* no experimentan cambios en su expresión y los que sí lo hacen se encuentran equitativamente repartidos entre los inducidos y los reprimidos (Figura 42)

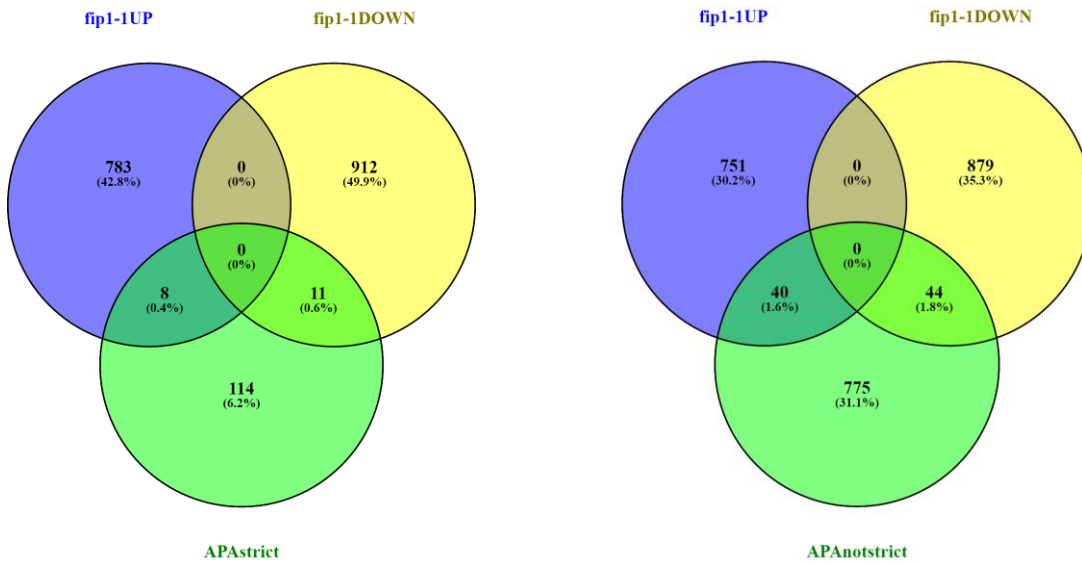


Figura 42: Genes coincidentes entre aquellos que se encuentran desregulados en *fip1-1* y los que sufren APA según los dos criterios estadísticos establecidos. Diagramas de Venn realizados mediante la aplicación Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

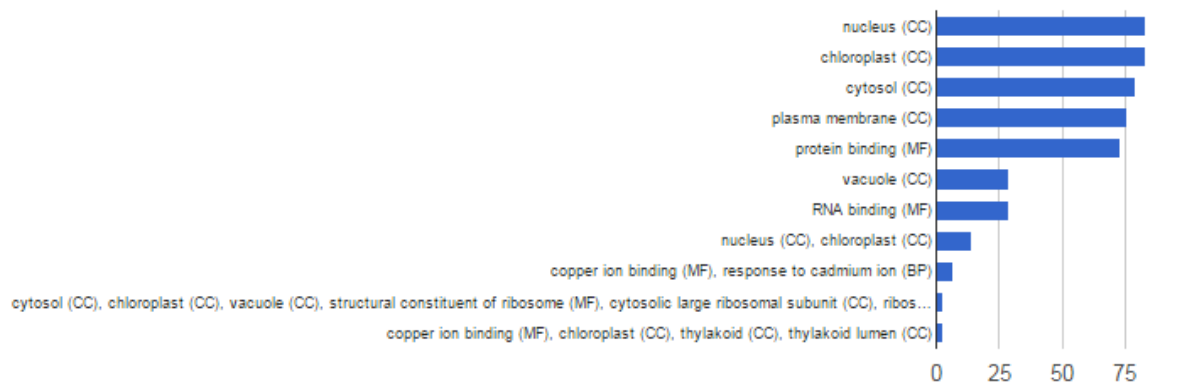
## 2.2 Poliadenilación alternativa en el mutante *fip1-1*

Debido a las limitaciones del procedimiento RNAseq en la identificación de sitios de poliadenilación se realizó una colaboración con el Dr. Arthur Hunt (Universidad de Kentucky) para llevar a cabo un abordaje PATSeq. Este método selecciona fragmentos poliadenilados de entre 300 y 500 pb, lo que permite analizar los sitios de corte y poliadenilación localizados en cualquier región genómica del transcrito. Se aplicó la metodología PATSeq a extractos de ARN de raíz y parte aérea por separado de *fip1-1* y su respectivo control y se identificaron los genes que muestran una poliadenilación alternativa en el mutante. Los resultados fueron los siguientes:

### 2.2.1. Poliadenilación alternativa en mensajeros aislados de raíces de *fip1-1*

Los PAS identificados se agruparon en *clusters* de 24nt para reducir el impacto de la microheterogeneidad en la selección siguiendo la metodología descrita por Wu y colaboradores (2016). Se identificaron un total de 2010 *clusters* de sitios de poliadenilación (5,6% de todos los *clusters* analizados) cuya frecuencia de uso es diferente entre los fondos genéticos *fip1-1* y control con un nivel de significancia menor de 0,05. Entre ellos, se encontraron una serie de categorías funcionales sobrerrepresentadas (Figura 43). Entre ellas, destacan la respuesta a estrés salino, ABA, auxinas y desarrollo radicular.

A)



B)

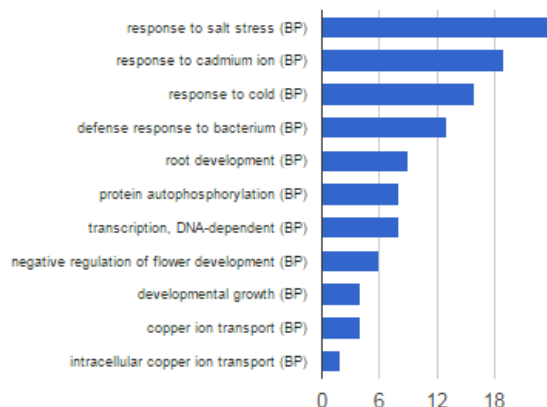


Figura 43: Categorías funcionales enriquecidas entre los eventos de poliadenilación alternativa del mutante *fip1-1*. A) Enriquecimiento modular. B) Enriquecimiento en categorías de función biológica.

Atendiendo a la región genómica en la que se encuentran los sitios de corte y poliadenilación en el mutante *fip1-1* se ha realizado un análisis global de localización de PATs dentro del gen completo o de las diferentes regiones de estos genes ( 5', CDS, intrones o 3') pero sin diferenciar su localización dentro de estas regiones. Así, se ha calculado la aportación de cada *cluster* de PAS (PAC) al total de PACs identificados en cada gen y se han comparado los datos obtenidos en presencia y en ausencia de estrés siguiendo la siguiente fórmula:

Utilizando este tipo de análisis se ha observado un ligero aumento del uso del extremo 5'UTR (Figura 44). Sin embargo, el número total de lecturas alineadas en esta región es mucho menor que en las otras (menor del 1%), por lo que no se descarta que sea un artefacto. En conjunto, no se han encontrado evidencias de que el mutante *fip1-1* tenga preferencia por regiones genómicas distintas a su control.

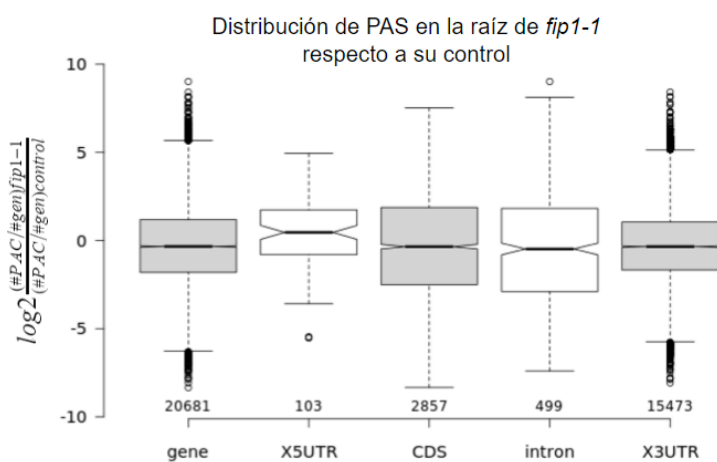


Figura 44: Comparación de la distribución de los sitios de poliadenilación en el mutante *fip1-1* respecto a su control. El gráfico muestra el uso de sitios de corte situados en las distintas regiones genómicas. La contribución relativa de cada PAC al total de lecturas alineadas en cada gen se determinó gen por gen y se calcularon los ratios entre ambos fondos genéticos, que se expresan en escala logarítmica. Así, el apartado “gene” representa la colección completa de PACs mientras que los apartados 5'UTR, CDS, intrón y 3'UTR representan la distribución en regiones genómicas. El número localizado bajo cada uno de los elementos del gráfico es el número total de PACs que alinean en cada una de las regiones genómicas.

Este análisis tiene en cuenta el conjunto de todos los PATs identificados, independientemente de si su contribución es diferente en el fondo mutante. Para analizar únicamente los casos de poliadenilación alternativa estadísticamente significativos gen a gen se identificó la región genómica a la que pertenecen los clusters que están diferencialmente representados con un p valor menor de 0,05. La mayor parte de los sucesos de poliadenilación alternativa (48%) se dan en el extremo 3'UTR (Figura 45).

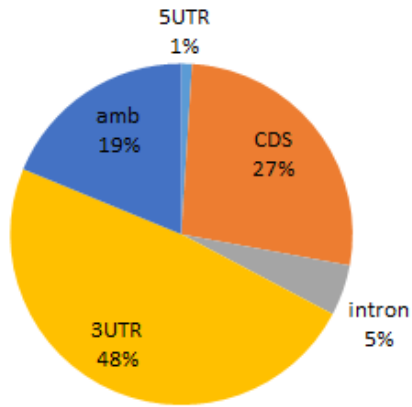


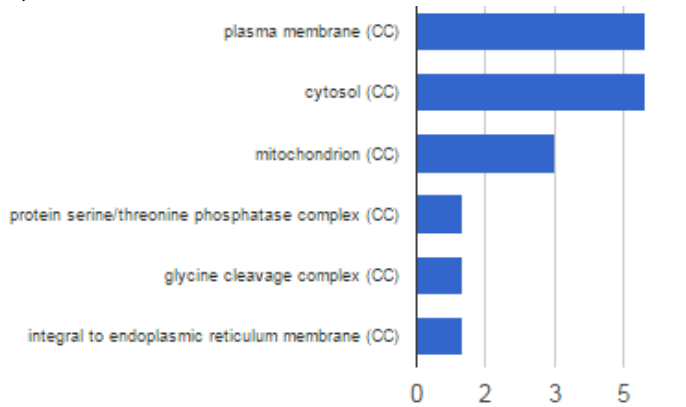
Figura 45: Distribución de los casos identificados de poliadenilación alternativa en el mutante *fip1-1* respecto al control.

Entre los genes que presentan poliadenilación alternativa localizada en el extremo 3'UTR destacan aquellos relacionados con la respuesta a estrés salino, cadmio, frío e infección bacteriana. Además, podemos encontrar categorías relacionadas con el desarrollo radicular y floral, así como con el crecimiento. En cuanto a los componentes celulares, se observa una sobrerrepresentación de genes localizados en núcleo, cloroplasto, citoplasma y membranas celulares (Figura 46).

En cuanto a los casos de APA localizados en el extremo 5'UTR, se observa sobrerrepresentación de genes cuyas proteínas se localizan en membrana plasmática, citosol y mitocondria (Figura 47). Destaca la ausencia del cloroplasto en este análisis, de lo que se puede deducir que la proteína FIP1 no regula mediante esta vía la expresión de genes que tienen su actividad en el cloroplasto. Sin embargo, debido al bajo número de datos no se pueden dictar conclusiones acerca de la función de la poliadenilación en el extremo 5'UTR.

Por otro lado, la poliadenilación del CDS ha sido relacionada con la degradación del mensajero mediante el sistema Non Stop Decay (NSD, Frismeyer et al, 2002; Akimitsu et al., 2007). En el mutante *fip1-1* los eventos de poliadenilación alternativa que afectan al CDS se relacionan con procesos de traducción, respuesta a sal o desarrollo embrionario y floral (Figura 48). Este cambio en el punto de corte y poliadenilación podría estar alterando la regulación de la expresión de genes clave en el desarrollo y la respuesta a estrés que podrían explicar el fenotipo del mutante.

A)



B)

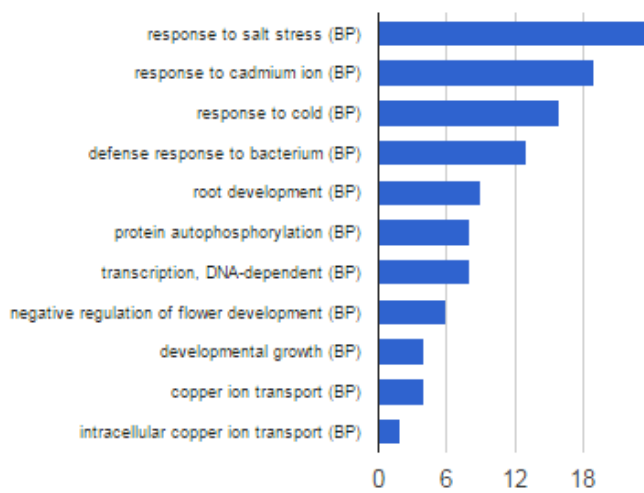


Figura 46: Categorías funcionales enriquecidas en el conjunto de genes cuya poliadenilación alternativa afecta al extremo 3'UTR. A) Análisis modular. B) Análisis de categorías según el proceso biológico.

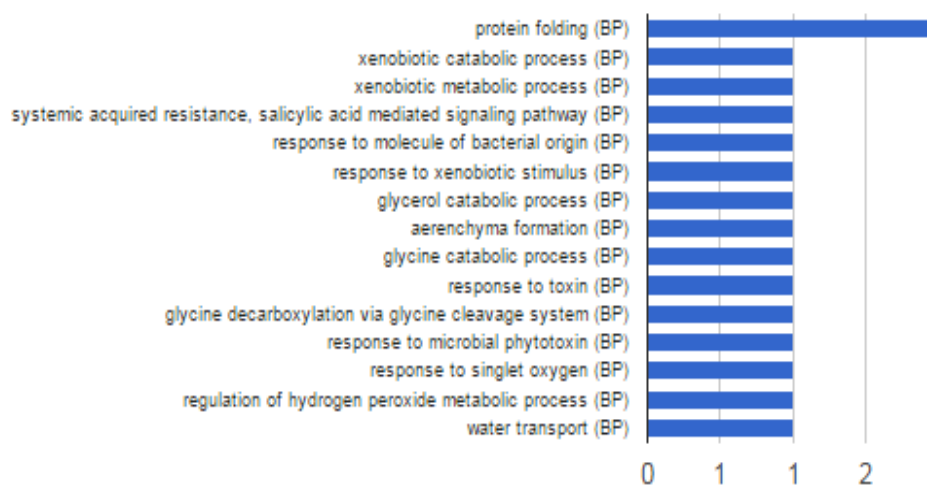


Figura 47: Enriquecimiento de categorías funcionales del conjunto de casos de poliadenilación alternativa que afectan al extremo 5'UTR en el mutante *fip1-1*.

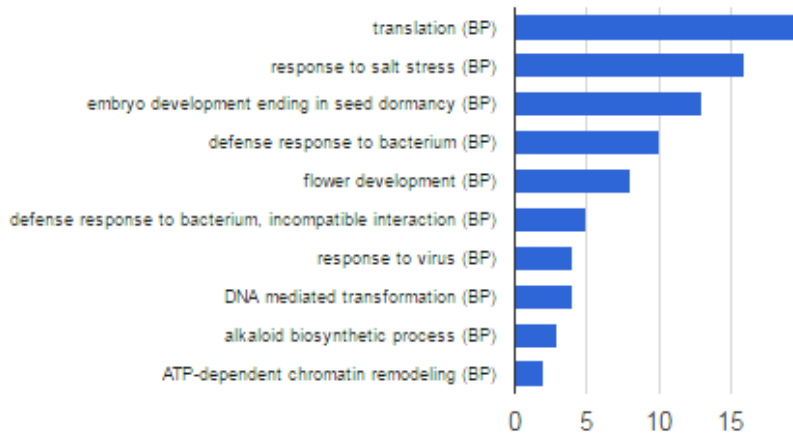


Figura 48: Categorías funcionales sobrerrepresentadas en el conjunto de casos de APA que afectan al CDS.

Por último, la poliadenilación de intrones no presenta enriquecimiento en ninguna categoría funcional a nivel de proceso biológico, pero sí en la localización subcelular en orgánulos tales como plasmodesma o vacuolas. En cuanto a la función molecular, destaca la actividad de factor de transcripción y la unión a ARN. Este resultado podría estar indicando cambios en la secuencia codificante de proteínas reguladoras de la expresión, lo que podría desencadenar cascadas reguladoras que podría explicar los defectos de desarrollo observados en el mutante (Figura 49).

Dado que la poliadenilación de regiones intrónicas se ha relacionado con regulación de la expresión génica mediante el proceso denominado Nonsense-Mediated Decay (NMD, Arciga-Reyes et al., 2002; Hugg et al., 2010), se quiso determinar si hay procesos biológicos concretos regulados por este sistema. Para ello, se analizaron las categorías funcionales de los genes que ven afectada por su regulación por APA en intrones pero no se encontraron categorías de función biológica sobrerrepresentadas.

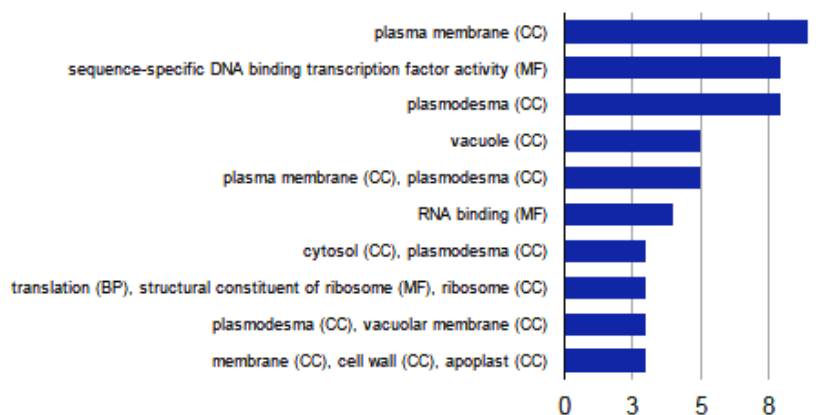


Figura 49: Análisis modular de las categorías funcionales sobrerrepresentadas en el conjunto de casos identificados de APA que afectan a intrones.

## 2.2.2. Poliadenilación alternativa en *fip1-1*: Parte aérea

Se realizó un análisis similar en las muestras procedentes de la parte aérea (Figura 50). En este caso, el número de lecturas obtenidas en la secuenciación es mucho menor debido a problemas técnicos, por lo que el número eventos de poliadenilación alternativa identificados es mucho menor: 78 PACs con distinta representación en los fondos genéticos mutante y control con un nivel de significación menor o igual de 0,05. Estos casos de APA suponen un 0,09% de los clusters analizados. De entre ellos, destacan aquellos relacionados con el proceso de traducción. Sin embargo, los datos no son suficientes para analizar categorías funcionales.

A nivel de gen, destacan *PY/THIC* (cluster localizado en el extremo 3'UTR más utilizado en el fondo salvaje que en el mutante) y *SnRK3.1* (cluster localizado en el CDS más utilizado en el fondo salvaje que en el mutante)

En cuanto a la preferencia por las distintas regiones genómicas se ha observado que el mutante presenta un descenso significativo del uso de intrones para realizar el corte y poliadenilación de mensajeros. Así mismo, hay un aumento del uso de los extremos 5'UTR, de nuevo con un número muy reducido de datos.

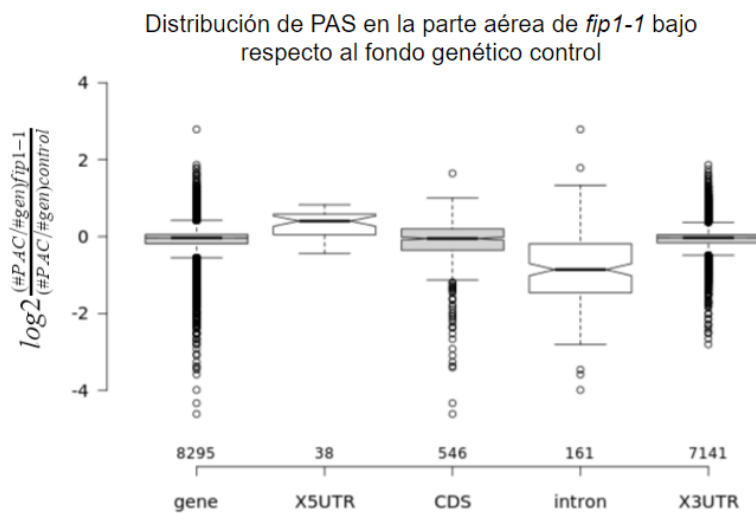


Figura 50: Comparación de la distribución de los sitios de poliadenilación en el mutante *fip1-1* respecto a su control en muestras de parte aérea. El gráfico muestra el uso de sitios de corte situados en las distintas regiones genómicas. Para ello, la contribución relativa de cada PAC se determinó gen por gen y se calcularon los ratios entre ambos fondos genéticos, que se expresan como log2. Así, el apartado "gene" representa la colección completa de PACs mientras que los apartados 5'UTR, CDS, intrón y 3'UTR representan la distribución en regiones genómicas

### 2.2.3. Poliadenilación alternativa en *fip1-1*: Raíz vs parte aérea

Al comparar las muestras de raíz y parte aérea se ha observado que hay 17 genes que sufren poliadenilación alternativa en el mutante *fip1-1* en ambos casos (Figura 51, Tabla 4). El resto de eventos de APA observados son específicos del órgano observado. Sin embargo, debido a problemas técnicos el número total de lecturas obtenidas en las extracciones de parte aérea es mucho menor que en la de raíz. Por ello, no se descarta que pudiera haber más genes regulados por este sistema en el conjunto de la plántula.

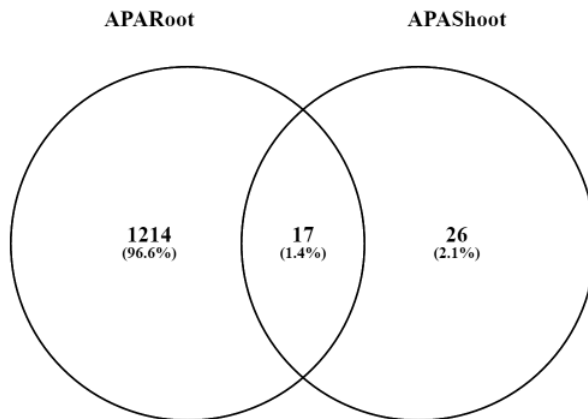


Figura 51: Eventos de poliadenilación alternativa identificados en el mutante *fip1-1* con respecto a su control. Los resultados obtenidos en raíz y parte aérea se representan en un diagrama de Venn (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

AGI	alias
AT1G32050	AtSCAMP5
AT2G03890	ATR4K GAMMA 7 UBDK GAMMA 7
AT2G22430	ATHB6
AT3G83160	OEP6
AT5G86760	SDH1-1
AT1G18540	
AT3G51880	AtHMGB1 NFD1
	ATPK10
	CIRK15
AT5G01810	PKS3 SIF2
	SNRK3.1

AGI	alias
AT1G20100	
AT1G85010	
AT1G78810	
AT2G29630	PY THIC
AT3G53920	SIG3 SIGC
	ATTOC159
	PR2
AT4G02510	TOC160 TOC88
AT5G13010	EMB3011
AT5G40450	
ATMG00080	RPL16

Tabla 4: Genes que sufren APA en el fondo genético *fip1-1* tanto en raíz como en parte aérea.

### 3. Caracterización fenotípica

FIP1 juega un papel importante en el proceso de poliadenilación de mensajeros y tiene un papel regulador en numerosos procesos. Dado el fenotipo pleiotrópico del mutante *fip1-1*, se decidió realizar una caracterización fenotípica general. Se estudiaron aspectos de su morfología que evidencian numerosas alteraciones en el desarrollo. En primer lugar, y dado que el mutante fue identificado por su defecto en la generación de raíces laterales, se realizó una caracterización del sistema radicular mediante observación de plántulas crecidas *in vitro*. Paralelamente, se observó que *fip1-1* también presenta defectos en el desarrollo de su parte aérea, por lo que se realizaron una serie de medidas para describir y cuantificar estas alteraciones.

#### 3.1 Caracterización del sistema radicular

Con el objeto de describir las alteraciones del sistema radicular de *fip1-1* se llevó a cabo diferentes análisis morfológicos durante el desarrollo de la raíz principal y las raíces laterales.

##### 3.1.1 Desarrollo del sistema radicular lateral

El mutante *fip1-1* se identificó por un defecto en la producción de raíces laterales y deslocalización de la expresión de marcador de raíces laterales (RL) *SKP2B::GUS* (Figura 52). La expresión deslocalizada de este marcador impide la cuantificación de PRL a través de los “spots” de expresión que proponen Manzano y colaboradores (2011). Se realizaron una serie de observaciones microscópicas de plántulas sometidas a tinción GUS y se observó que algunos PRL en *fip1-1* no presentan expresión de *SKP2B* mientras que en el control, casi el 100% de los primordios se tiñen para actividad GUS. Por otro lado, este marcador se expresa en altos niveles en tejidos adyacentes del córtex y epidermis en *fip1-1* mientras que está restringido a los PRL en raíces control (Figura 52).

Para determinar si este defecto de tinción podría estar relacionado con el número de raíces laterales formado se analizó si *fip1-1* tiene problemas en la especificación de células fundadoras o en la emergencia de los primordios. Para ello se clarificaron plantas *fip1-1* y se realizó un análisis del número de primordios de raíz lateral (PRL). Se observó que el mutante presenta una reducción del 60% en la formación de PRL (Figura 25C). Por otro lado, se observó que *fip1-1* sufre una acumulación de primordios en estadio IV de desarrollo (Figura 53).

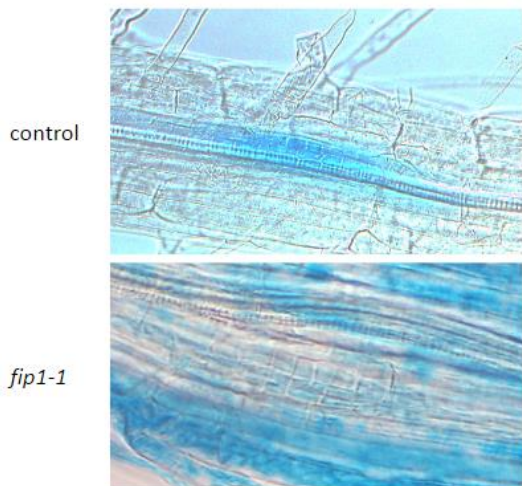


Figura 52: PRL de plántulas *pSKP2B:GUS* y *fip1-1pSKP2B:GUS*. La fotografía superior muestra el fondo genético silvestre, en el que se puede observar la expresión de *SKP2B* en un primordio en desarrollo. En la imagen inferior se muestra un ejemplo de un primordio en el mutante *fip1-1* en el que no se detecta expresión el primordio, mientras que existe mayor tinción en los tejidos adyacentes. .

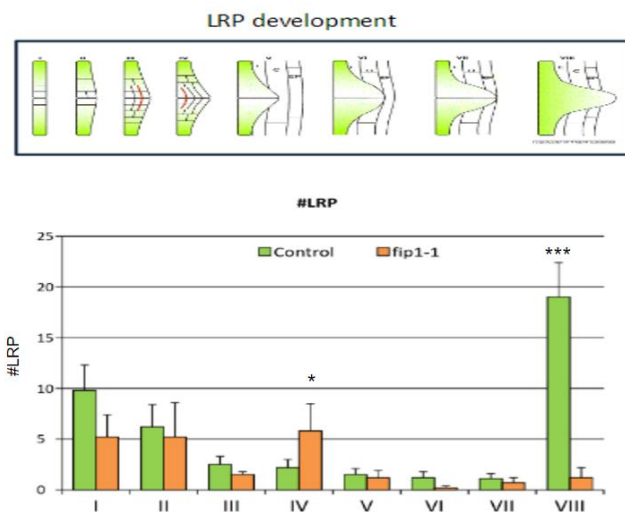


Figura 53: Desarrollo de los PRL. A) Fases del desarrollo (Casimiro et al., 2003). B) Número de PRL en los distintos estadios de desarrollo en plántulas control y *fip1-1*. Las diferencias estadísticas se han marcado con asteriscos (\*:  $p$ valor<0,05; \*\*:  $p$ valor<0,01, \*\*\*:  $p$ valor<0,001).

Para analizar si *fip1-1* también tiene defectos en la emergencia de RL, se llevaron a cabo una serie de tratamientos para forzar la emergencia de los primordios. En primer lugar, se analizó la emergencia de raíces laterales por estímulo gravitrópico (VoB et al., 2015). Así, plántulas sometidas a un giro de 90° durante 36h, se clarificaron y se contabilizaron los primordios en cada uno de los estadios descritos. Se observó que un 70% de las plántulas *fip1-1* no desarrollan primordios en el área de curvatura, mientras que la totalidad de las plantas control presentaban PRL en estadio IV-V. Además, entre los primordios desarrollados se encontraron distintos estadios de desarrollo (Figura 54)

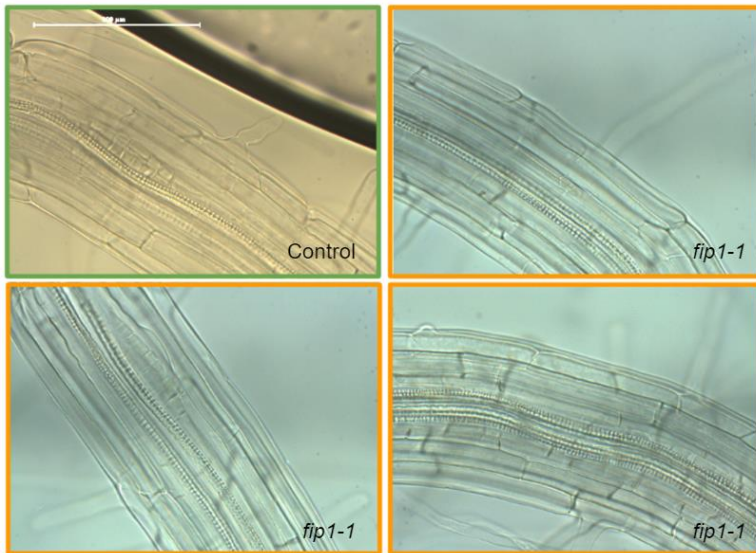


Figura 54: PRL iniciados en el área de curvatura por graviestimulación. Se muestran un ejemplo de primordio en estadio IV-V en plántulas control (verde), así como distintos ejemplos de los resultados obtenidos en *fip1-1* (naranja).

Por otro lado, se sometió a las plántulas a un tratamiento de ácido indol-acético (IAA) durante 6 días para promover la emergencia de raíces laterales. En este experimento se observó que el número de raíces laterales emergidas en el fondo mutante supone solo un 40% del control (Figura 55), lo que sugiere que FIP1 es importante tanto para la especificación como para la emergencia de las raíces laterales.

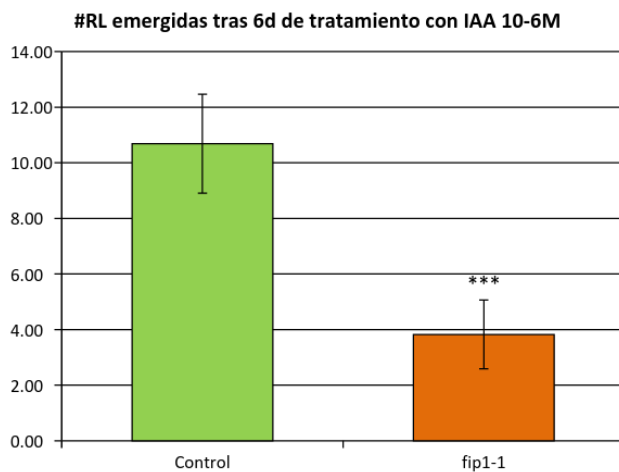


Figura 55: Número de RL emergidas en un tratamiento de 6d con IAA  $10^{-6}$ M. Las diferencias estadísticas se han marcado con asteriscos (\*:  $p$ valor<0,05; \*\*:  $p$ valor<0,01, \*\*\*:  $p$ valor<0,001).

### 3.1.2. Desarrollo de la raíz principal

Para analizar el desarrollo de la raíz principal en *fip1* se llevó a cabo un análisis cinemático del crecimiento de la misma en plantas control y *fip1-1* durante los primeros 10 días después de la germinación. Se observó que el mutante *fip1-1* sufre un retraso en el crecimiento a lo largo del tiempo, siendo la raíz más corta que las de las plantas control. Posteriormente, las diferencias con el control se minimizan y pierden significancia (Figura 56)

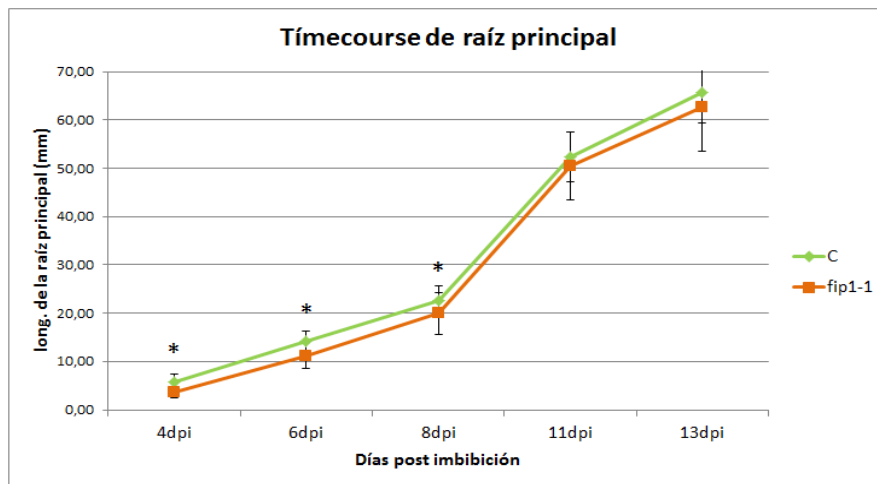


Figura 56: Crecimiento de la raíz principal de *fip1-1* y su control. La longitud de la raíz principal se expresa en milímetros para cada una de las medidas tomadas (4, 6, 8, 11 y 13 días post imbibición). Las diferencias estadísticas se han marcado con asteriscos (\*:  $p$ valor<0,05; \*\*:  $p$ valor<0,01, \*\*\*:  $p$ valor<0,001).

Estos resultados podrían deberse a una alteración en el desarrollo del sistema radicular o un retraso en la germinación por lo que se diseñaron una serie de experimentos para determinar el origen de este retraso en el crecimiento. En primer lugar, se analizó el tiempo de germinación como emergencia de la radícula en semillas estratificadas 48h a 4°C y sembradas en medio MS1/2. Como se puede observar en la Figura 57, las semillas *fip1-1* no mostraron retraso significativo en la germinación.

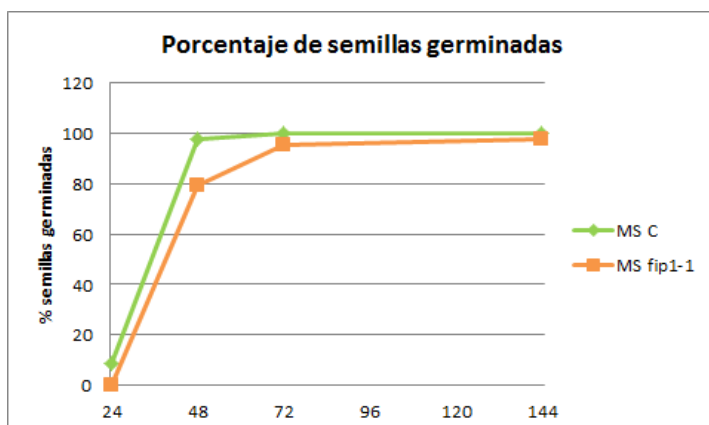


Figura 57: Porcentaje de semillas germinadas en función del tiempo postimbibición (24h, 48h, 72h y 6d).

El crecimiento de la raíz principal es resultado de dos procesos celulares coordinados: proliferación y elongación. Para estudiar si algunos de estos procesos están afectados en *fip1-1* analizamos el tamaño de los meristemos y la elongación celular zona de elongación en raíces de 4, 6 y 8 días después de la imbibición. Se observó que, en todos los casos, el meristemo del mutante *fip1-1* es más largo en longitud que el de su correspondiente control (Figura 58). Es interesante remarcar que mientras que las diferencias en el tamaño de los meristemos se agrandan con el tiempo, la longitud de la raíz se iguala con el paso del tiempo. Este resultado sugiere que las células deben elongar menos en el mutante.

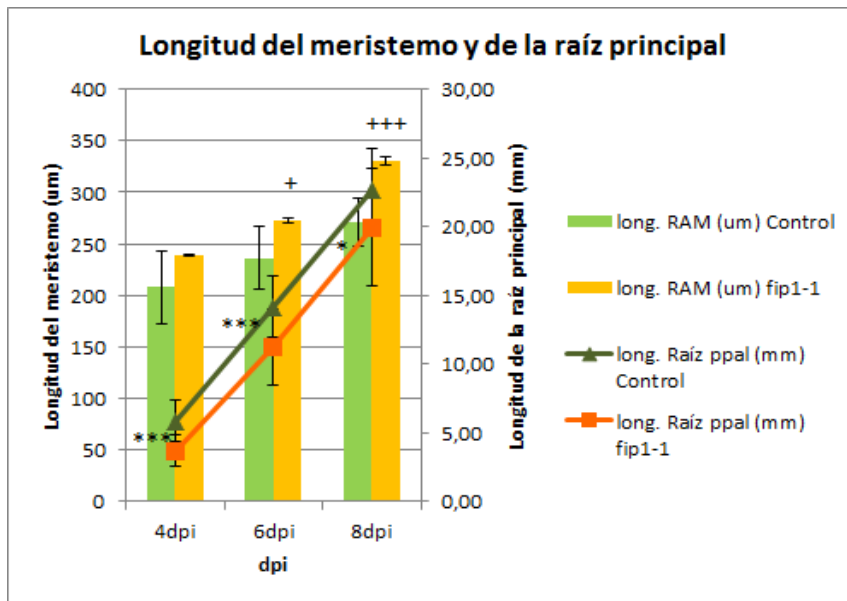


Figura 58: Crecimiento de la raíz principal de Arabidopsis. La longitud del RAM se expresa en forma de barras y las diferencias estadísticas se han marcado con asteriscos (\*: pvalor<0,05; \*\*:pvalor<0,01, \*\*\*: pvalor<0,001). La longitud de la raíz principal se expresa en forma de líneas y las diferencias estadísticas se pueden observar con el carácter + (+: pvalor<0,05; ++:pvalor<0,01, +++: pvalor<0,001).

Asimismo, se decidió cuantificar el tamaño del meristemo en base al número de células corticales meristemáticas en raíces de 8 días, momento en el que la diferencia de longitud de la raíz principal es mayor. Los datos obtenidos revelaron que el meristemo del mutante *fip1-1* es superior en ambos aspectos (Figura 59).

Para comprobar la capacidad de elongación de las células, se realizaron medidas de las primeras 5 células de la zona de transición del meristemo radicular y se compararon según su posición con las células control. Se observó que, en las 5 posiciones observadas, las células de *fip1-1* son más cortas, llegando a suponer una pérdida del 30% de su longitud. El análisis de regresión muestra que la tasa de elongación de *fip1-1* en estas células es la mitad que la de su control (Figura 60).

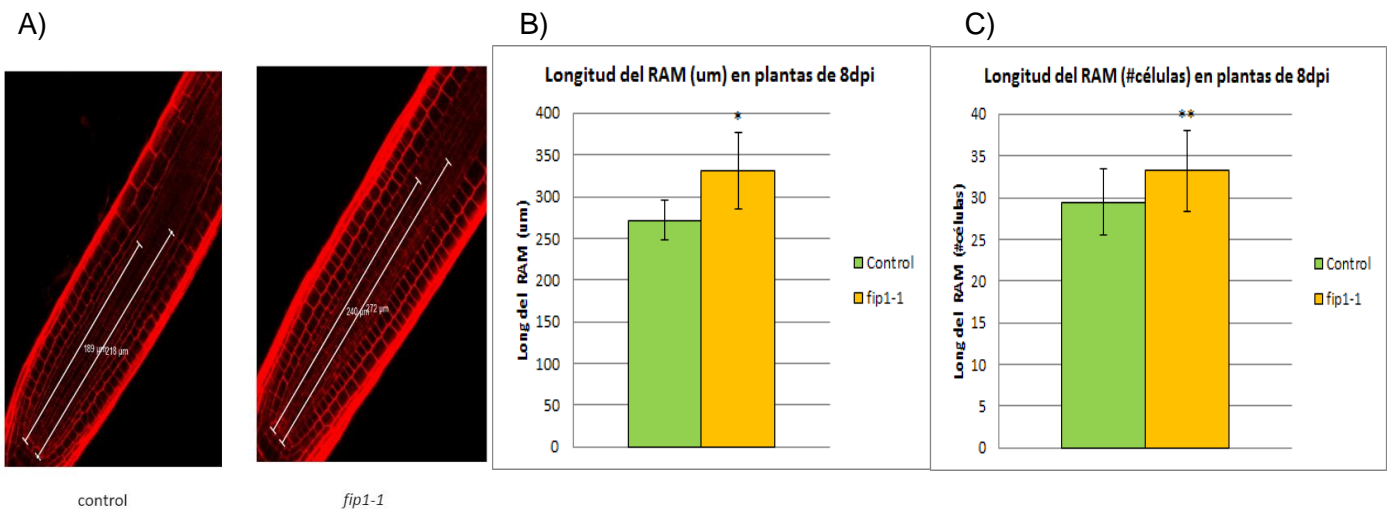


Figura 59: Longitud del RAM en plantas *fip1-1* y control. A) Imagen de microscopía confocal de plantas *fip1-1* y control en la que se ha calculado la longitud del meristemo. B) Longitud del RAM medida en micras en plántulas de 8dpi. C) Longitud del RAM medida en número de células corticales en plántulas de 8di. Las diferencias estadísticas se han marcado con asteriscos (\*: pvalor<0,05; \*\*:pvalor<0,01, \*\*\*: pvalor<0,001).

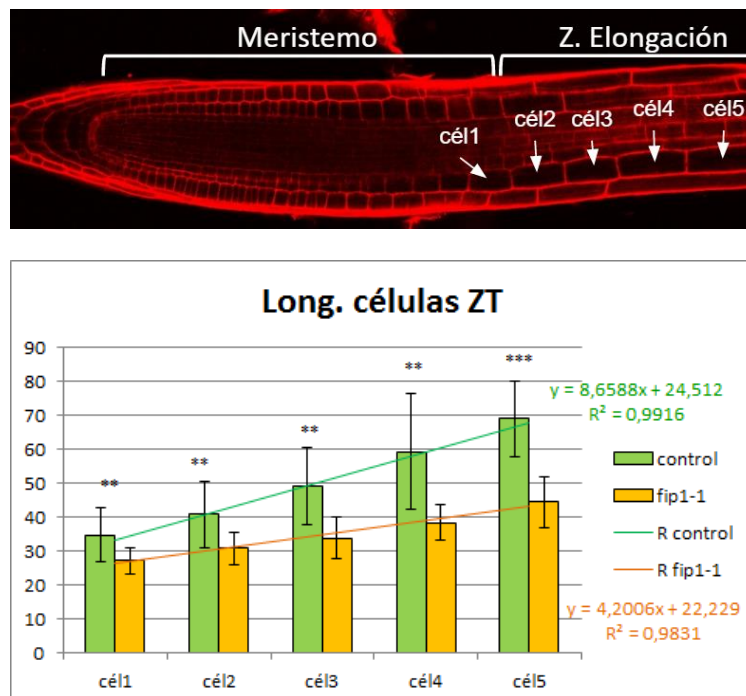


Figura 60: Longitud de las células de la ZT. A) Esquema de las medidas tomadas. B) Longitud (um) de las células evaluadas. Se representa la tasa de crecimiento a través de la recta de regresión de los puntos observados. Las diferencias estadísticas se han marcado con asteriscos (\*: pvalor<0,05; \*\*:pvalor<0,01, \*\*\*: pvalor<0,001).

Los resultados previos podrían estar indicando un desequilibrio hormonal en *fip1-1*, por lo que se intrograsaron diferentes líneas marcadoras mediante cruces con el mutante *fip1*. En primer lugar, durante la identificación de este mutante se había observado una deslocalización de la expresión del gen *SKP2B* (Figura 25A). Ya que el marcador *pSKP2B::GUS* sufre una regulación por auxinas de forma similar en muchos aspectos a el marcador DR5, decidimos analizar la expresión de este marcador de auxinas de forma dinámica. Se corroboró una posible alteración de la respuesta auxinas mediante los marcadores DR5:LUC (a lo largo de la raíz principal) y *pDR5::GFP* (meristemo radicular), que mostraron una deslocalización y un aumento de la respuesta (Figura 61). En cuanto al transporte de auxinas, no se encontraron alteraciones en la expresión de *AUX1*, *PIN1* ni *PIN2* en el meristemo radicular del mutante (Figura 62).

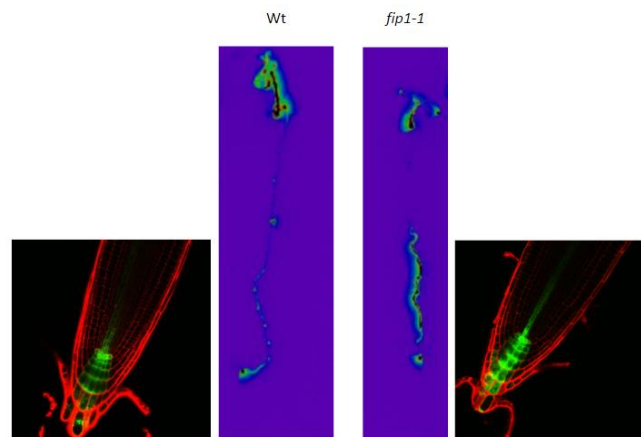


Figura 61: Expresión de los marcadores *pDR5::GFP* (RAM) y *pDR5::Luc* (plántula completa).

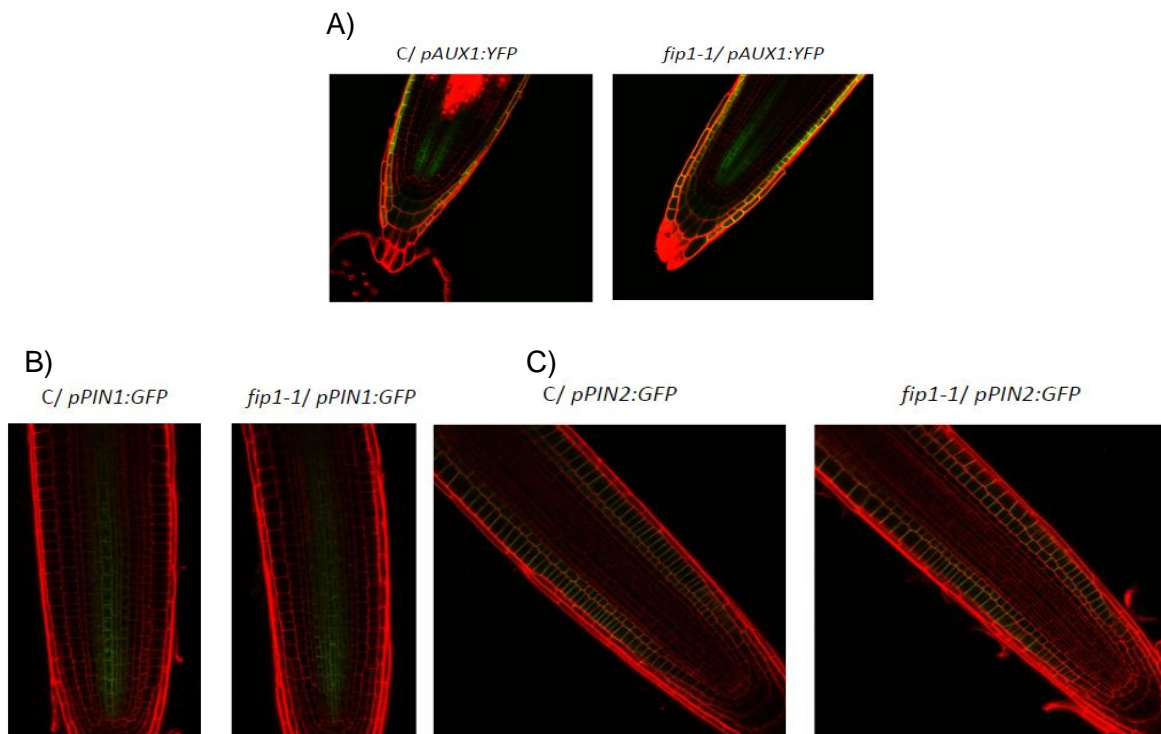


Figura 62: Marcadores de transporte de auxina en los fondos *fip1-1* y control. A) *pAUX1::YFP*, B) *pPIN1::GFP*, C) *pPIN2::GFP*.

El gen *WOX5* está implicado en el mantenimiento de las células del centro quiescente. Ya que *fip1-1* mostraba alteraciones en el número de células meristemáticas, llevamos a cabo un análisis de la expresión del gen *WOX5* (marcador *pWOX5:YFP*) encontrando que en *fip1-1* la expresión de *WOX5* se reduce aproximadamente un 84% (Figura 63). Así mismo, se identificó reducción de la expresión de *CYCB1;1*, marcador de células en fase G2/M, lo que permitió detectar un defecto en la actividad mitótica en *fip1-1* (Figura 64). Por otro lado, se analizó la expresión del gen *SCR*, clave en el desarrollo radicular de *Arabidopsis*, y se observó que el mutante *fip1-1* presenta una reducción de la expresión del 40% respecto al fondo genético control. (Figura 65).

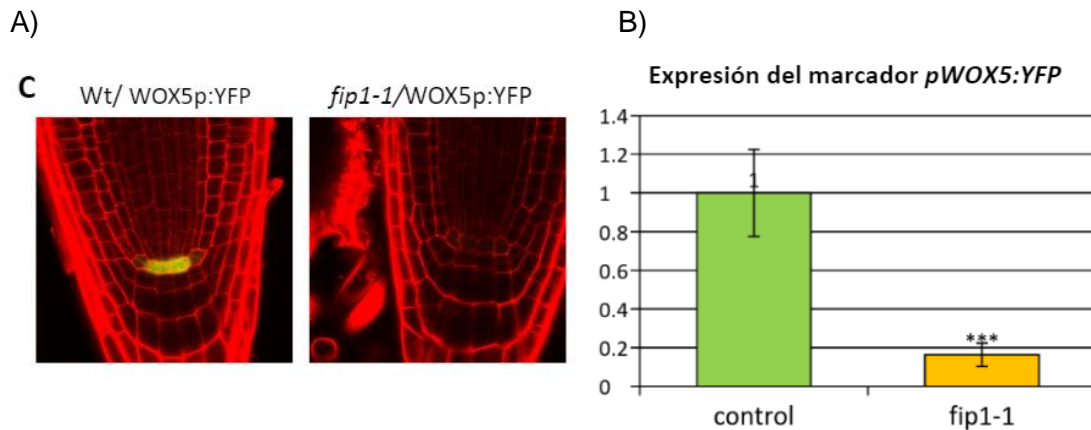


Figura 63: Expresión del marcador *pWOX5:YFP*. A) Imágenes de microscopía confocal en los fondos *fip1-1* y control. B) Niveles de expresión del marcador cuantificados mediante software de análisis Leica. Las diferencias estadísticas se han marcado con asteriscos (\*:  $p$ valor<0,05; \*\*:  $p$ valor<0,01, \*\*\*:  $p$ valor<0,001).

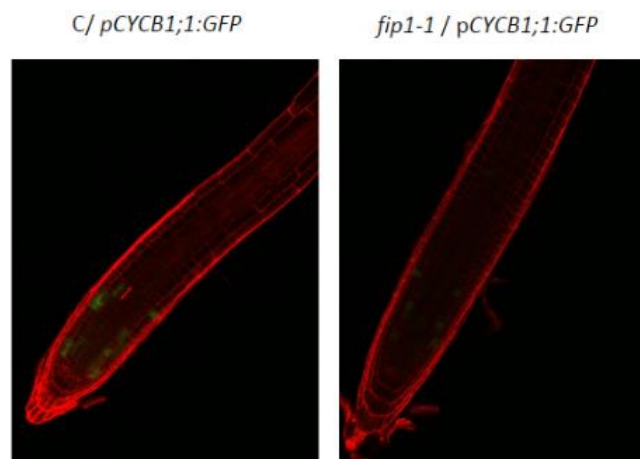


Figura 64: Expresión de distintos marcadores de desarrollo radicular: *pCYCB1;1:GFP*. Imagen de microscopía confocal de plántulas *fip1-1* y control portadoras del marcador

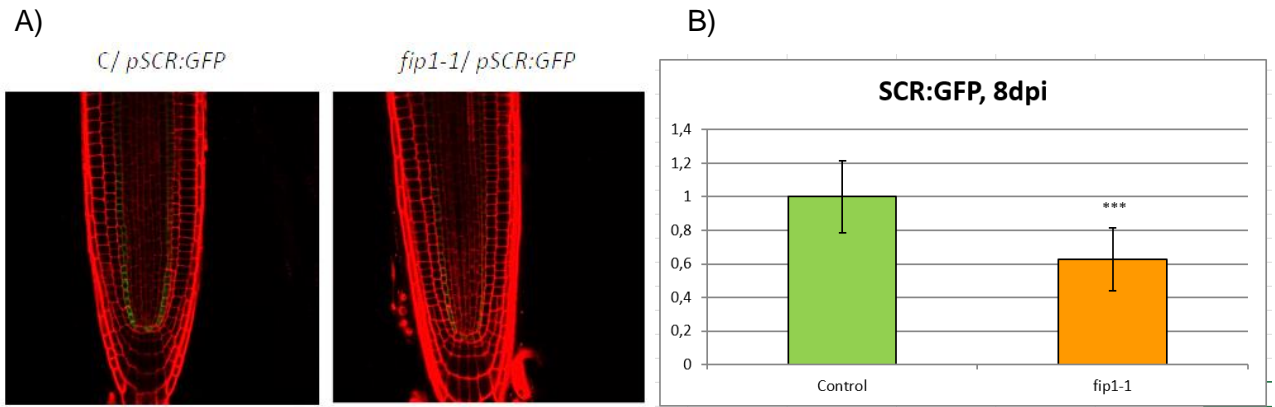


Figura 65: Expresión de distintos marcadores de desarrollo radicular: *pSCR:GFP*. A) Imagen de microscopía confocal de plántulas *fip1-1* y control portadoras del marcador. B) Niveles de expresión del marcador *pSCR:GFP* cuantificados mediante software de análisis Leica. Las diferencias estadísticas se han marcado con asteriscos (\*:  $p$ valor<0,05; \*\*:  $p$ valor<0,01, \*\*\*:  $p$ valor<0,001).

Por último, y dado el marcado efecto ondulatorio en la raíz principal de *fip1-1*, se realizó una tinción de estatolitos mediante lugol y se observó una cierta desorganización de su disposición en el fondo mutante *fip1-1*. Alternativamente, se realizó un test de respuesta a un cambio en la posición de crecimiento de  $90^\circ$  que reveló que el fondo mutante sufre alteraciones en la respuesta a estímulo gravitropico, mostrando una respuesta gravitropica atenuada en unos casos o exacerbada en otros que las raíces control (Figura 66).

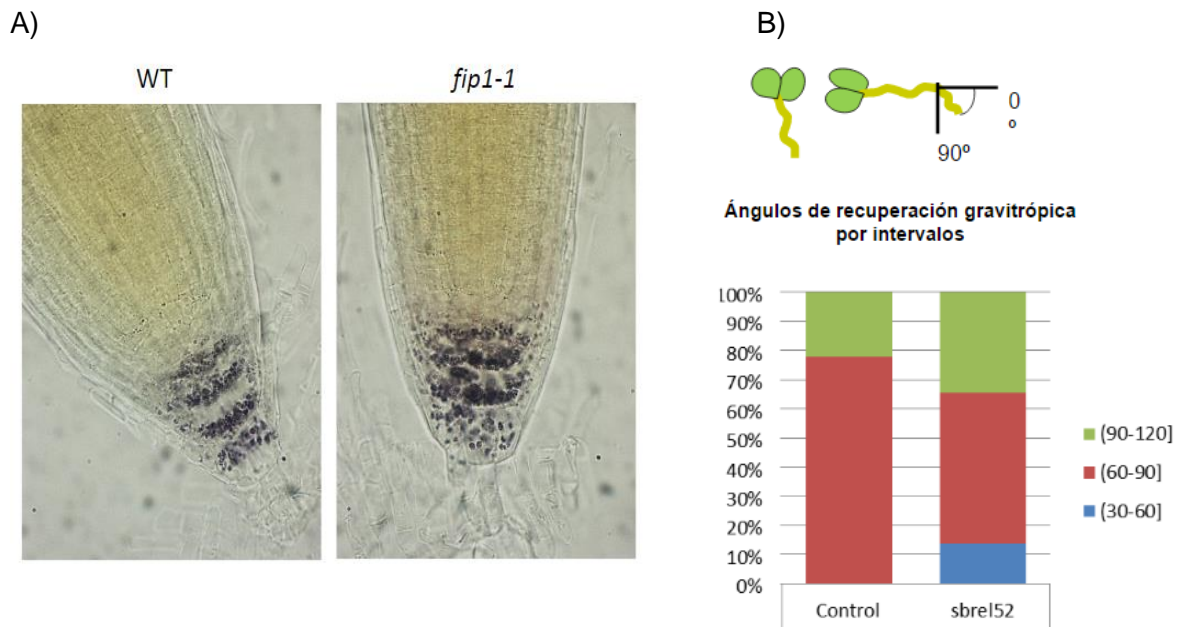


Figura 66: Gravitropismo. A) Tinción de estatolitos en los fondos *fip1-1* y control. B) Respuesta a estímulo gravitropico. En la parte superior de la imagen se muestra un esquema del giro empleado y del modo en el que se han tomado las medidas. En la parte inferior se representa la distribución de ángulos de recuperación gravitropica observados.

Por último, y dado que la regulación del crecimiento radicular de Arabidopsis se regula a través de diversas señales hormonales, se testó la respuesta del mutante a diferentes tratamientos en lo que a la longitud de la raíz principal se refiere (Figura 67). El tratamiento en IAA no arrojó diferencias significativas entre los dos fondos genéticos. Sin embargo, el resto de fitohormonas testadas revelan que *fip1-1* es más sensible a los tratamientos que su correspondiente control.

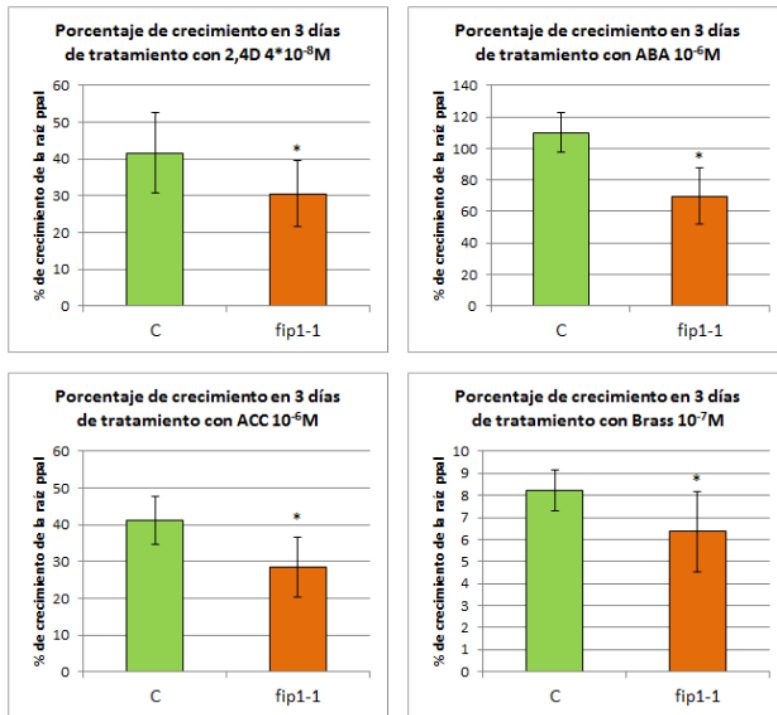


Figura 67: Porcentaje de crecimiento de la raíz principal de Arabidopsis de los fondos genéticos *fip1-1* y control como respuesta a distintos tratamientos hormonales. Las diferencias estadísticas se han marcado con asteriscos (\*: pvalor<0,05; \*\*:pvalor<0,01, \*\*\*: pvalor<0,001).

## 3.2 Caracterización fenotípica de la parte aérea de *fip1-1*

### 3.2.1 Estructura vegetativa

El mutante *fip1-1* presenta una drástica reducción de su talla además de alteración de otros aspectos de su estructura, como la pérdida de dominancia apical (Figura 67). El tamaño de las hojas de la roseta también está afectado en aproximadamente un 70%. Además, se ha observado que la pérdida de superficie foliar se debe a una reducción en el tamaño de las hojas de la roseta (Figura 68). Un análisis microscópico nos permitió determinar que las células epidérmicas del mutante son significativamente más pequeñas que las del control (Figura 69).

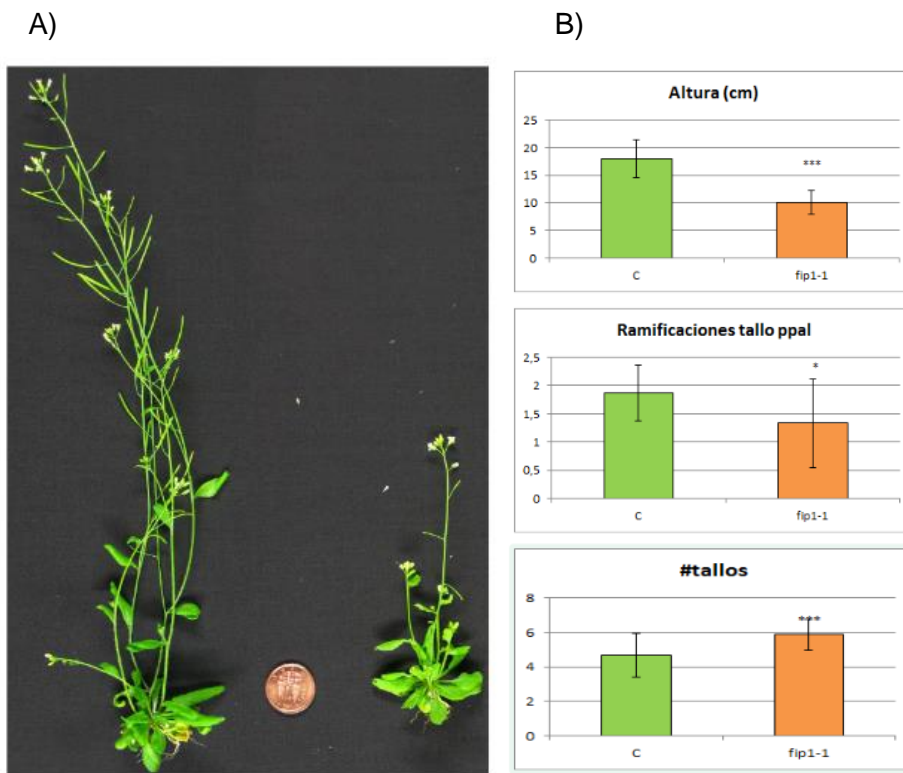


Figura 67: Estructura vegetativa de *fip1-1* y su control. A) Plantas maduras. B) Medida de la altura, número de ramificaciones del tallo principal y número de tallos. Las diferencias estadísticas se han marcado con asteriscos (\*:  $p$ valor $<0,05$ ; \*\*:  $p$ valor $<0,01$ , \*\*\*:  $p$ valor $<0,001$ ).

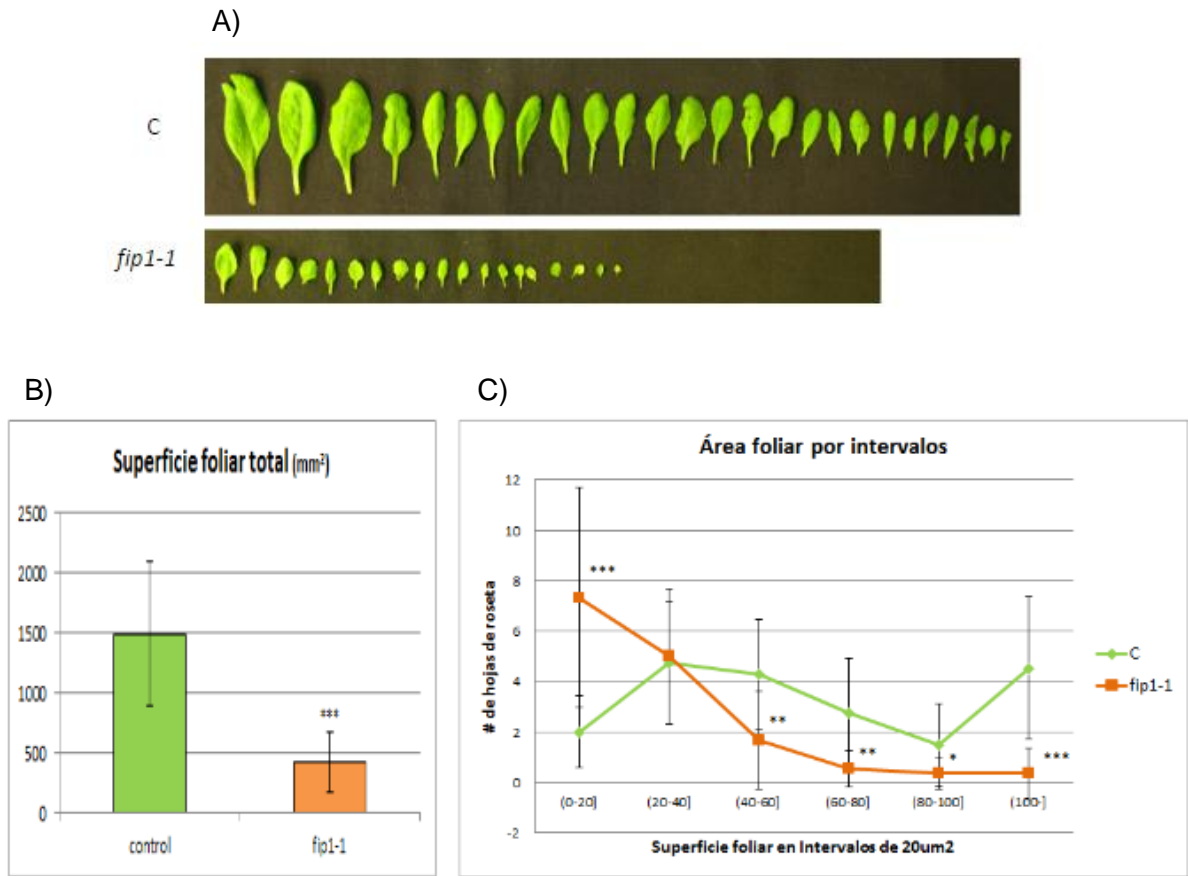


Figura 68: Observaciones de la roseta de *fip1-1*. A) Hojas de la roseta de *fip1-1* y su control. B) Superficie total de la roseta. C) Representación del área foliar por intervalos. Se cuantifica el número de hojas cuya superficie se encuentra en intervalos de 20um<sup>2</sup>. Las diferencias estadísticas se han marcado con asteriscos (\*: pvalor<0,05; \*\*:pvalor<0,01, \*\*\*: pvalor<0,001).

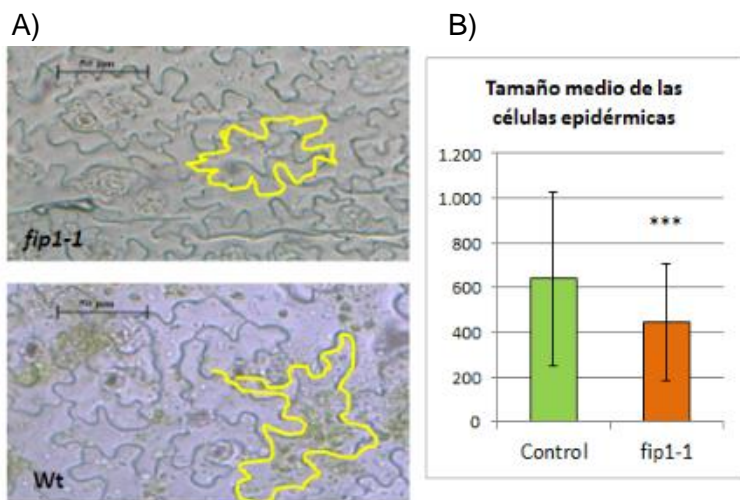


Figura 69: Observaciones de las células epidérmicas de *fip1-1* y su control. A) Imagen de microscopía. Se ha resaltado en amarillo el contorno de una célula como ejemplo. B) Superficie media de las células epidérmicas.

### 3.2.2 Fenotipo del sistema reproductivo de *fip1*

El mutante *fip1-1* presenta alteraciones en el desarrollo de sus órganos reproductores. Entre las alteraciones morfológicas más relevantes cabe destacar la reducción del tamaño de flores y silícuas, así como la producción de silícuas curvadas. Además, se observó una drástica reducción del número de silícuas por planta, así como en el número de semillas por silícula (Figura 70).

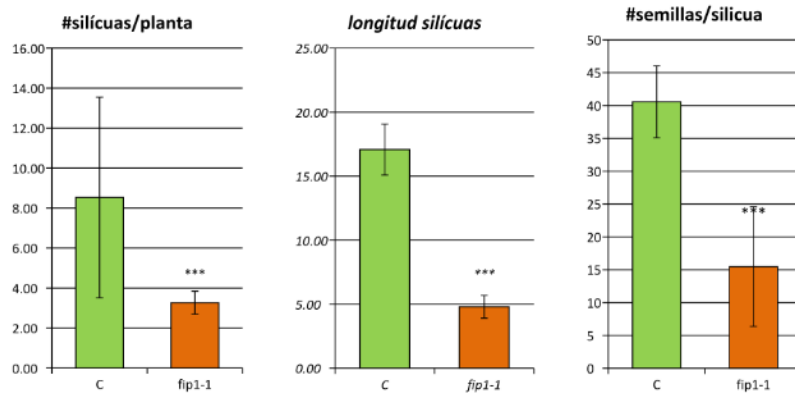
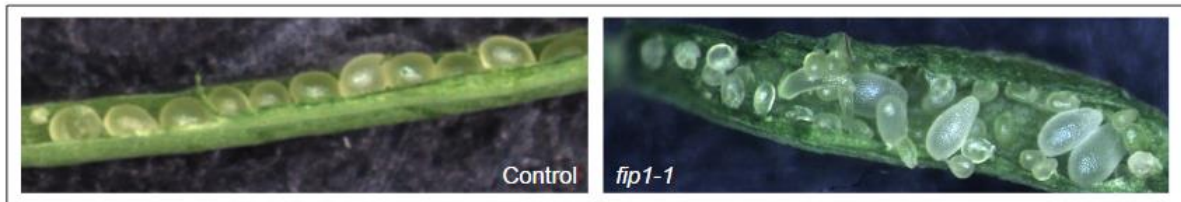


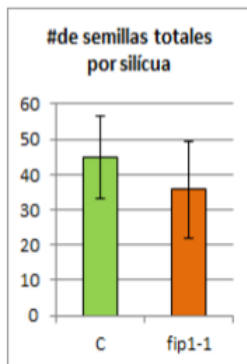
Figura 70: Alteraciones morfológicas en las silícuas de *fip1-1*. A) Número de silícuas por planta. B) Longitud media de la silícula. C) Cálculo del número medio de semillas por silícula. Las diferencias estadísticas se han marcado con asteriscos (\*:  $p$ valor<0,05; \*\*:  $p$ valor<0,01, \*\*\*:  $p$ valor<0,001).

Se determinó que la densidad de semillas en las silícuas de *fip1-1* supone solo un 30% de la del control. Esto puede explicarse por el elevado número de semillas mal desarrolladas que produce el mutante, que supone casi el 80% de su producción total. Entre las semillas mal desarrolladas se encontraron semillas pequeñas y semillas con morfologías aberrantes. Se tomó como referencia la forma y tamaño de las semillas silvestres para identificar las semillas correctamente desarrolladas en el mutante y se calculó que la densidad de semillas en el mutante con fenotipo silvestre supone menos de  $\frac{1}{3}$  que la del control (Figura 71). A la vista de estos resultados, se realizó una observación macroscópica de las semillas maduras de *fip1-1* y su control y se identificaron una serie de semillas de pequeño tamaño o formas aberrantes. Se seleccionaron estas semillas para un análisis de germinación y se observó que estas semillas son capaces de germinar y desarrollarse correctamente (Figura 72). De forma adicional, se testó la capacidad germinativa de las semillas *fip1-1* y control en presencia de la fitohormona ABA en el medio. Se observó que el fondo mutante es más tolerante al tratamiento, ya que su retraso en la germinación en presencia de ABA es mucho menor que el observado en el fondo control (Figura 72C).

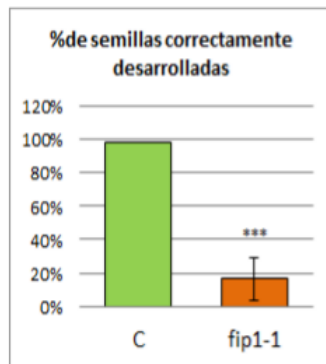
A)



B)



C)



D)

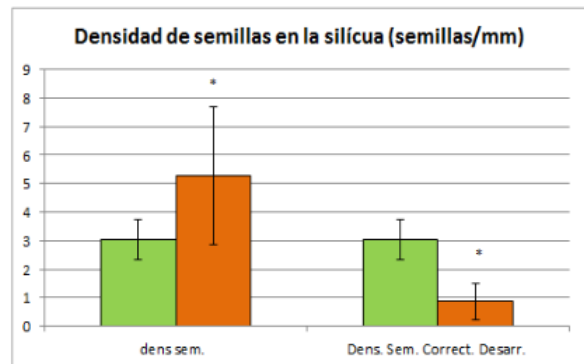


Figura 71: Semillas inmaduras en *fip1-1* y su control. A) Ejemplos de silículas observadas. Las silículas se han abierto mediante un corte limpio longitudinal para exponer las semillas inmaduras. B) Número medio de semillas por silicua. C) Porcentaje de semillas con tamaño y morfología adecuados. D) Densidad de semillas en la silicua. Se representa el número de semillas total y correctamente desarrolladas por unidad de longitud de la silicua. Las diferencias estadísticas se han marcado con asteriscos (\*: pvalor<0,05; \*\*:pvalor<0,01, \*\*\*: pvalor<0,001).

A)

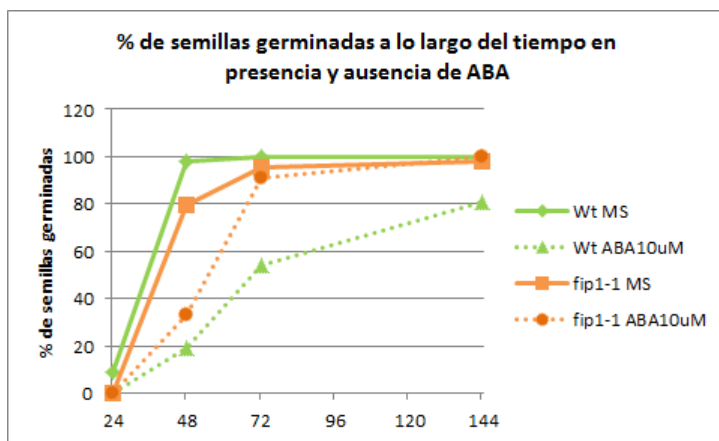
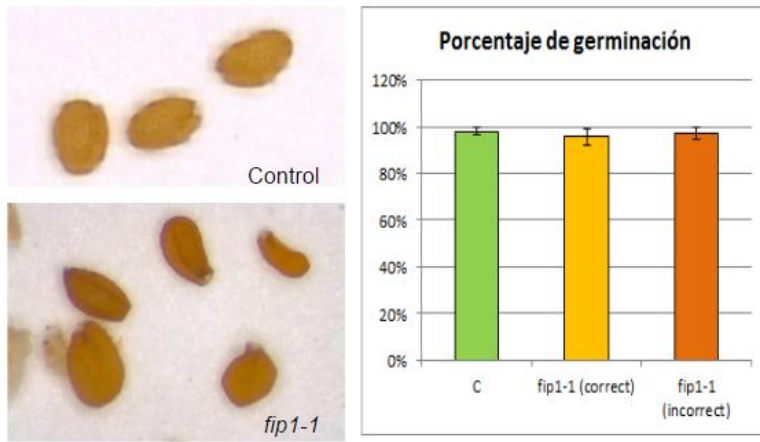


Figura 72: Semillas maduras. A) Imagen de semillas maduras de *fip1-1* y su control. B) Porcentaje de germinación de semillas control, *fip1-1* correctamente desarrolladas (tamaño y forma similar al control) e incorrectamente desarrolladas (de menor tamaño o con formas aberrantes). C) Porcentaje de semillas germinadas en presencia y ausencia de ABA en el medio de cultivo.

## 4. Respuesta a estrés

Los datos obtenidos de los experimentos RNASeq y PATSeq permitieron identificar numerosas alteraciones en la expresión y/o el procesamiento de genes de respuesta a estrés en *fip1-1*, entre los que destaca el mantenimiento del equilibrio hídrico y salino (Figuras 37 y 43). Por ello, decidimos realizar un análisis del comportamiento del mutante ante diferentes estreses y, en el caso del estrés salino, una caracterización de la distribución de PAS. A continuación se exponen los resultados obtenidos.

### 4.1 Estrés salino

#### 4.1.1 Respuesta tisular en la raíz

La respuesta a estrés salino de *fip1-1* se analizó a través de la medida de la longitud de la raíz principal ante distintos tratamientos. Se observó que, prácticamente en todas las condiciones observadas, la reducción del crecimiento debido al estrés es menor en *fip1-1*, lo que apunta a que el mutante es más tolerante a los tratamientos que su control (Figura 73A). Debido a este resultado decidimos evaluar el impacto del estrés salino en el desarrollo del RAM, para lo que seleccionó el tratamiento de cloruro sódico 75mM y se realizaron medidas del meristemo mediante análisis de fotografías obtenidas mediante microscopía confocal (Figura 73B). Se observó que, a diferencia del control, la longitud del RAM de *fip1-1* no sólo no disminuye por el tratamiento con sal, si no que aumenta ligeramente.

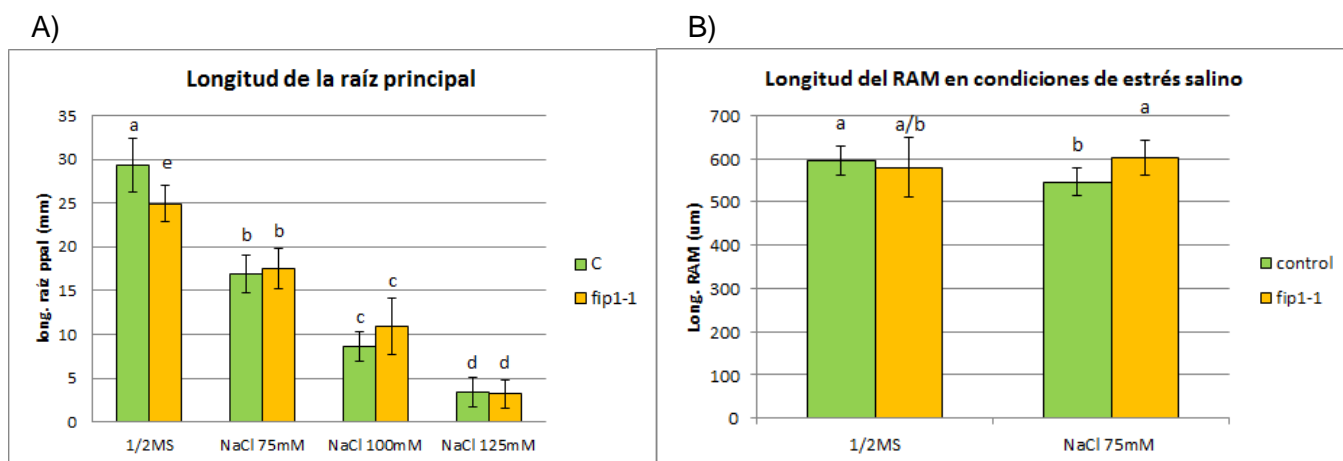


Figura 73: Respuesta de la raíz del mutante *fip1-1* al estrés osmótico y salino en raíz principal. A) Longitud de la raíz principal (mm) en tratamientos con distinto contenido en cloruro sódico. B) Longitud del RAM ( $\mu\text{m}$ ) en tratamiento de 75mM de sal.

Dado el fenotipo de *fip1-1* en el desarrollo de PRL, decidimos evaluar la respuesta a estrés salino del mutante en cuanto al número de PRL iniciados y RL emergidas (Figura 74A). En general, se observó una reducción en la emergencia de RL por el efecto de la sal. Esta reducción fue mayor en el fondo *fip1-1*, cuya producción de RL cae al 9% en 75mM de sal (muy lejos del 45% de las plántulas control). En cuanto a la iniciación de PRL, el exceso de sal en el medio reduce la especificación de PRL al 32% en el fondo genético control y al 12% en *fip1-1* (Figura 74B).

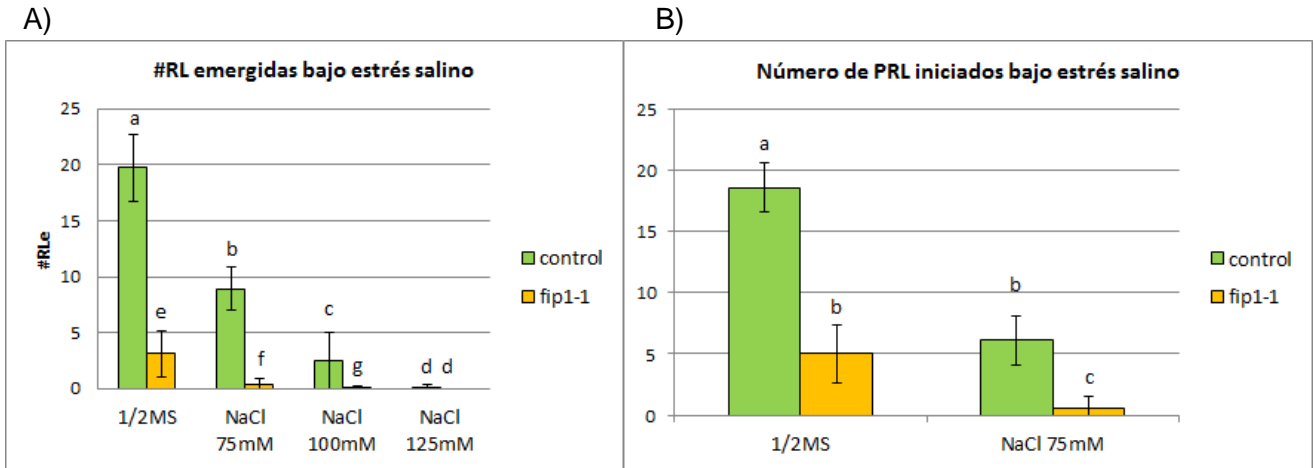


Figura 74: Desarrollo de raíces laterales en condiciones de estrés salino. A) Número de RL emergidas en los fondos genéticos *fip1-1* y control en tratamientos con distinto contenido en cloruro sódico. B) Número de PRL iniciados en tratamiento de 75mM de sal.

#### 4.1.2 Respuesta transcriptómica

A la vista de estos resultados, se trató de analizar la implicación de los genes desregulados en el fondo genético *fip1-1* en esta tolerancia, por lo que se compararon los datos de expresión con publicaciones previas (Dinneny et al., 2008). Se observó que la coincidencia de los genes desregulados en *fip1-1* y las plantas control tratadas con sal se da de forma equitativa, es decir, no hay una relación entre los genes sobreexpresados y reprimidos en ambos fondos genéticos (Figura 75).

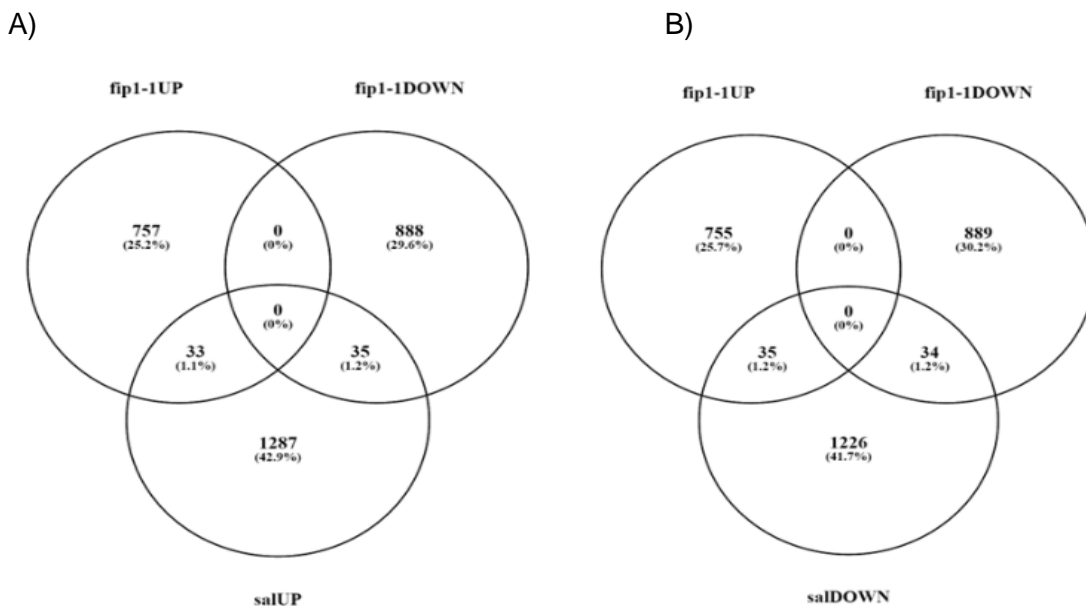


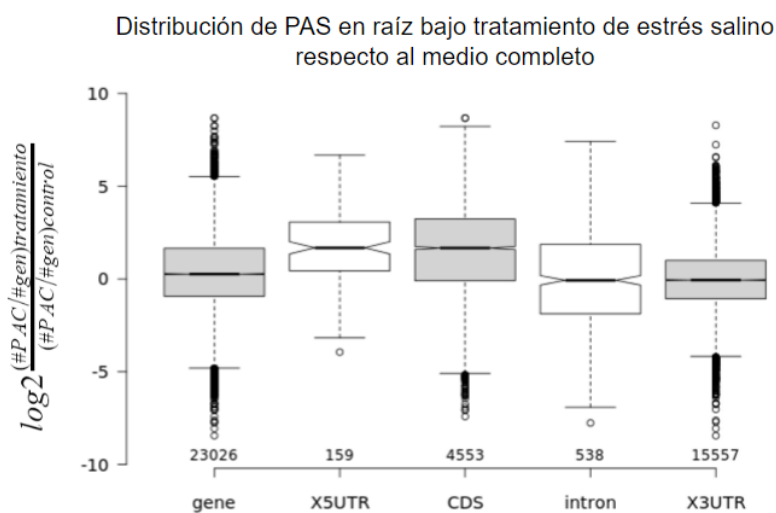
Figura 75: Genes desregulados en *fip1-1* (RNASeq) y plantas control bajo estrés salino (Dinneny et al., 2008). A) Diagrama de Venn mostrando las coincidencias entre los genes desregulados en *fip1-1* y los inducidos bajo estrés salino. B) Diagrama de Venn mostrando las coincidencias entre los genes desregulados en *fip1-1* y los reprimidos bajo estrés salino.

El fenotipo de *fip1-1* es producto de la alteración de la selección de PAS en diversos *loci*. Para identificar PAS asociados a la respuesta a estrés se llevó a cabo un abordaje mediante PATSeq de raíz y parte aérea de *fip1-1* y su control en un tratamiento con sal. Dado que es la primera vez que se realiza este tipo de análisis se han analizado los resultados obtenidos en los dos fondos genéticos de forma independiente y a posteriormente se han comparado entre ellos.

#### 4.1.3 Análisis PATseq en el Sistema radicular en respuesta estrés salino

Se ha observado que el fondo genético silvestre sufre una alteración de la selección de sitios de poliadenilación (PAS) en el tejido radicular, promoviendo el uso de PAS situados en el CDS y el extremo 5'UTR en detrimento de aquellos situados en intrones y 3'UTR (Figura 76A). Se han identificado 2010 eventos de poliadenilación alternativa (APA) entre la muestra sometida a estrés salino y la control (Figura 76B). Se puede observar una visualización de las lecturas alineadas en los genes más relevantes en el Anexo.

A)



B)

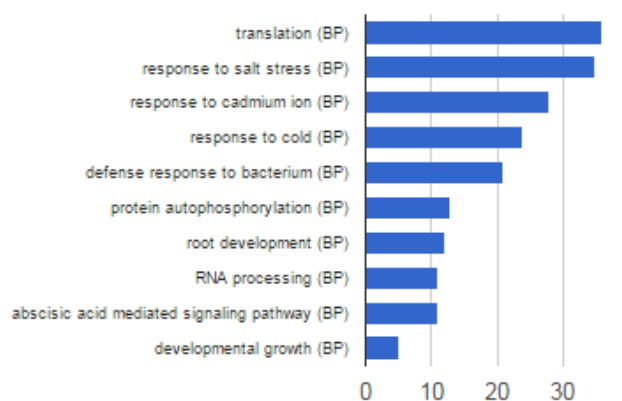
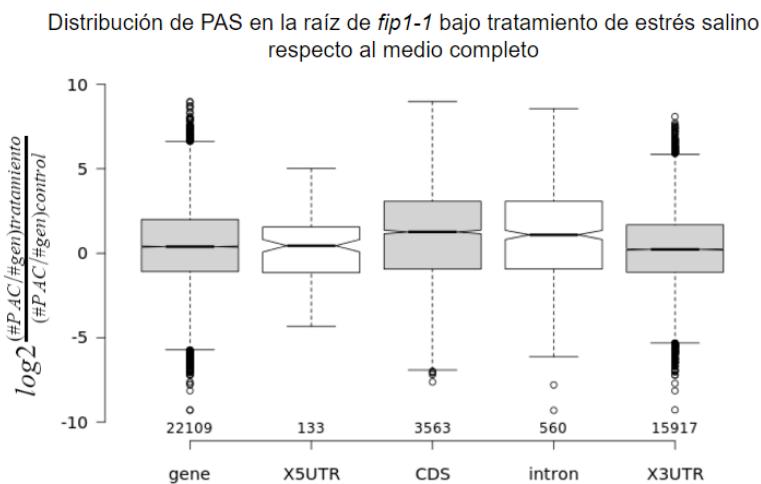


Figura 76: APA en el sistema radicular del fondo genético control bajo estrés salino A) Distribución de PAS en tratamiento de estrés salino respecto al medio de crecimiento estándar. B) Categorías funcionales sobrerrepresentadas entre los genes que sufren APA bajo estrés salino.

Por su parte, el mutante *fip1-1* potencia el uso de PAS localizados en CDS e intrones y disminuye ligeramente el uso del extremo 3'UTR (Figura 77A). Se han detectado más de 2600 eventos de APA, que se han analizado según el enriquecimiento en categorías funcionales. Los resultados obtenidos han sido similares a los observados en el fondo genético control, con una elevada presencia de genes relacionados con la respuesta a estrés salino, traducción, ABA y sequía (Figura 77B). Por otro lado, y dada la tolerancia de *fip1-1* al estrés, se han analizado las coincidencias entre los genes que sufren APA como respuesta al tratamiento en ambos fondos genéticos y se ha podido determinar que sólo un 12,9% de ellos es común a ambos genotipos (Figura 78), lo que sugiere que FIP1 regula el proceso de poliadenilación alternativa durante la respuesta al exceso de sal en el medio. Los listados de genes correspondientes se pueden observar en el Anexo.

A)



B)



Figura 77: APA en el sistema radicular del fondo genético *fip1-1* bajo estrés salino A) Distribución de PAS en tratamiento de estrés salino respecto al medio de crecimiento estándar. B) Categorías funcionales sobrerrepresentadas entre los genes que sufren APA bajo estrés salino.

APA en los fondos *fip1-1* y control como respuesta a estrés salino

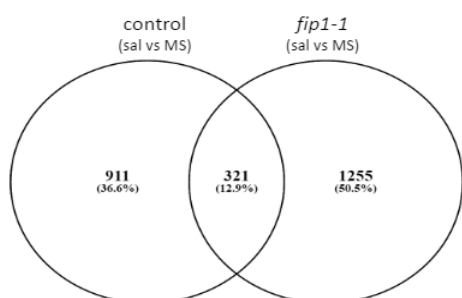


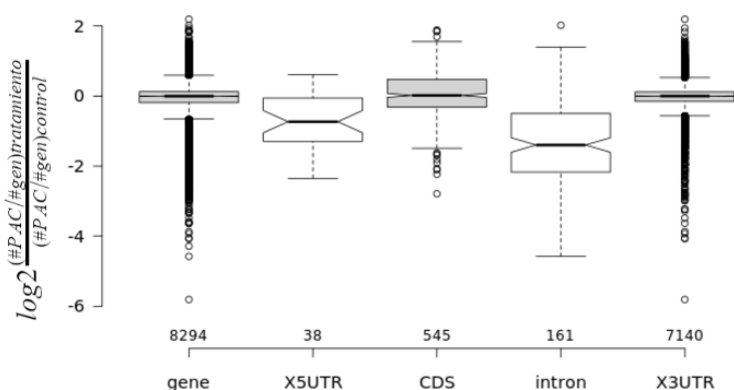
Figura 78: Coincidencias entre los genes que sufren APA en la raíz de los fondos genéticos *fip1-1* y control como respuesta al estrés salino. Diagrama de Venn realizado mediante la aplicación Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

#### 4.1.4 Análisis PATSeq en la parte aérea en respuesta a estrés salino

En lo que a la parte aérea se refiere, el fondo genético salvaje responde ante el estrés salino con una disminución drástica del uso de extremos 5'UTR e intrones (Figura 79A). Además, se han observado diferencias significativas en la selección de PAS como respuesta a estrés en 147 genes. Entre ellos, se encuentran representadas las categorías funcionales que pueden observarse en la Figura 79B.

A)

Distribución de PAS en la parte aérea bajo tratamiento de estrés salino respecto al medio completo



B)

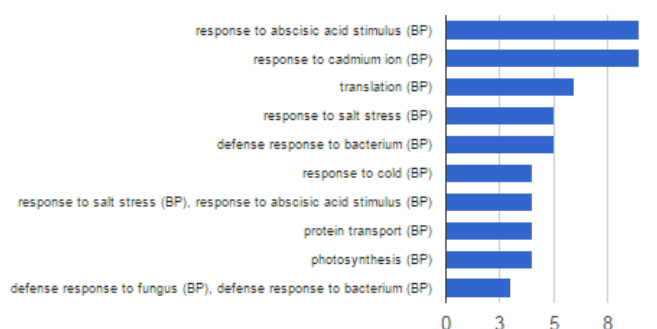
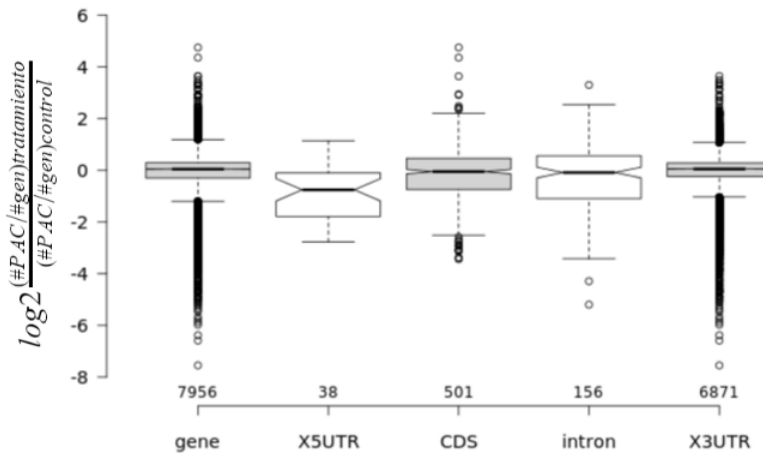


Figura 79: APA en la parte aérea del fondo genético control bajo estrés salino A) Distribución de PAS en tratamiento de estrés salino respecto al medio de crecimiento estándar. B) Categorías funcionales sobrerrepresentadas entre los genes que sufren APA bajo estrés salino.

En la parte aérea *fip1-1* disminuye el uso del extremo 5'UTR e intrones a la hora de seleccionar los PAS, aumentando ligeramente el uso de sitios localizados en el CDS (Figura 80)

A)

Distribución de PAS en la parte aérea de *fip1-1* bajo tratamiento de estrés salino respecto al medio completo



B)

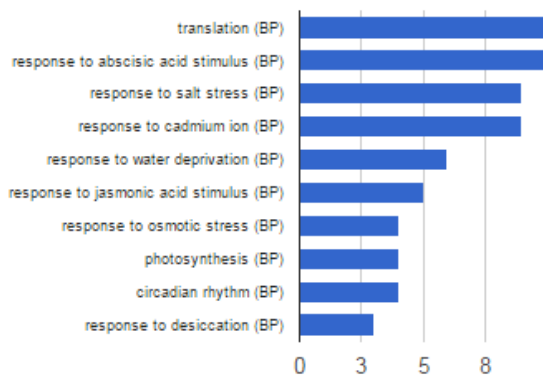


Figura 80: APA en la parte aérea del fondo genético *fip1-1* bajo estrés salino A) Distribución de PAS en tratamiento de estrés salino respecto al medio de crecimiento estándar. B) Categorías funcionales sobrerrepresentadas entre los genes que sufren APA bajo estrés salino.

## 4.2 Estreses nutricionales

### 4.2.1 Crecimiento en condiciones de ausencia de nitratos

Se sometió a las plantas *fip1-1* a un tratamiento de ausencia de nitrógeno inorgánico en el medio de cultivo y se observó que el fondo mutante es tolerante a este estrés. Al contrario de lo que ocurre en plantas control, que reducen significativamente el crecimiento de la raíz principal, las plántulas de *fip1-1* incrementan un 10% su crecimiento respecto al medio completo.. Además, también se observó un ligero aumento de la superficie de los cotiledones, que mantienen un color verde frente al color morado (debido a la acumulación de antocianinas) del control (Figura 81). Además, se observó la capacidad de desarrollo de raíces laterales, aunque no se observaron diferencias significativas entre ambos fondos genéticos (Figura 82).

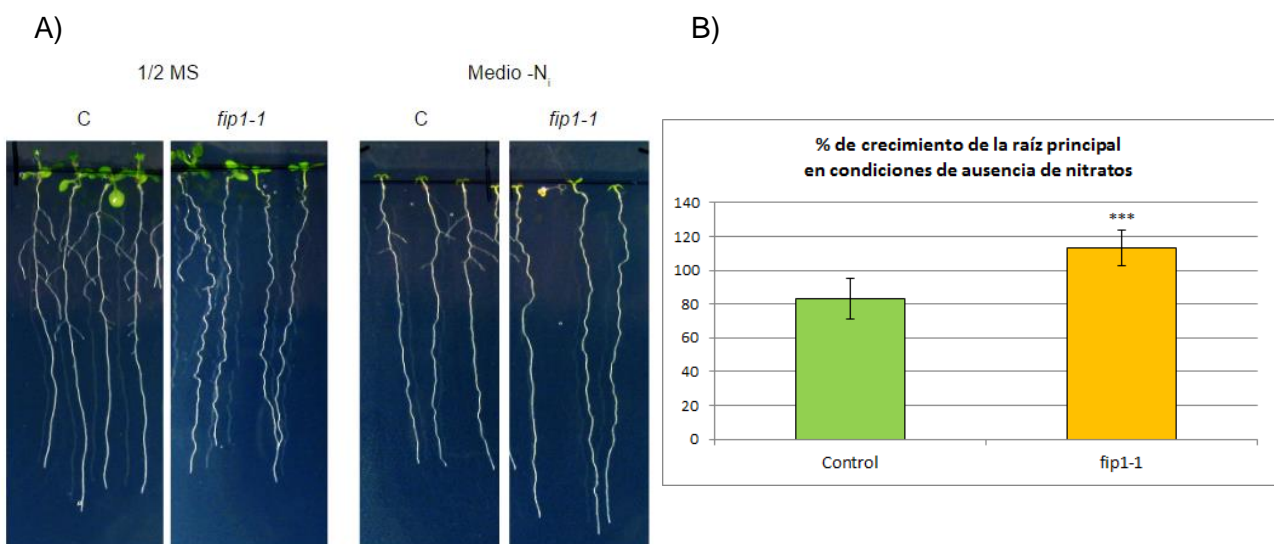


Figura 81: Plántulas de 13dpi *fip1-1* y control crecidas en ausencia de nitrógeno inorgánico (-N<sub>i</sub>) (13dpi) A) Plántulas crecidas en medio completo y -N<sub>i</sub>. B) Porcentaje de crecimiento de la raíz principal en ausencia de nitratos respecto al medio control

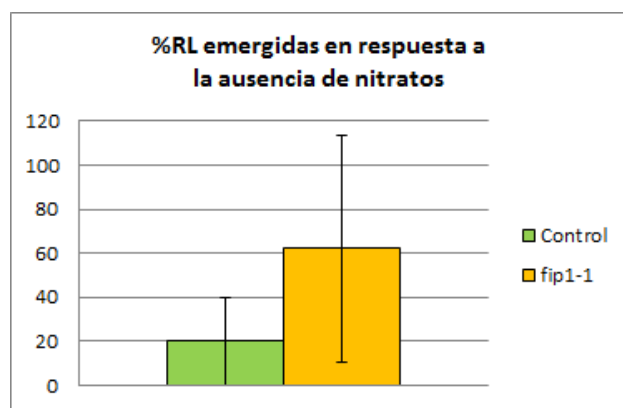
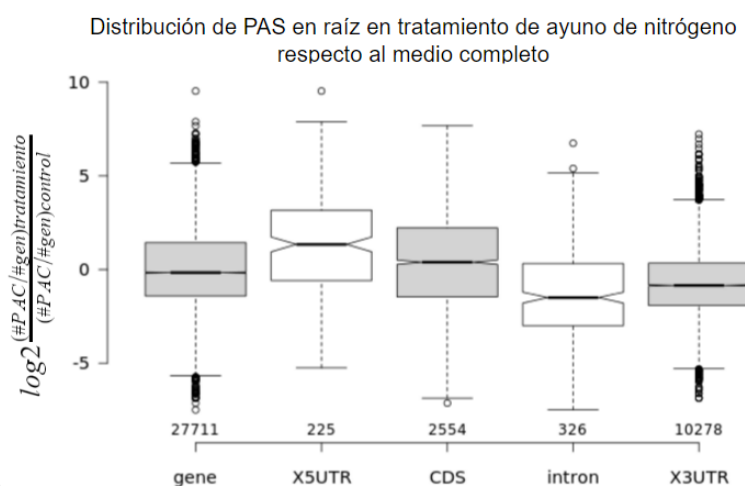


Figura 82: Porcentaje de RL emergidas en tratamiento de ausencia de nitratos en el mutante *fip1-1* y su control respecto a plántulas crecidas en medio completo.

Se realizó un análisis de la respuesta a este estrés mediada por APA mediante el procedimiento PATSeq. De nuevo, como es la primera vez que se aplica este abordaje, se analizarán los fondos genéticos por separado antes de compararlos control y mutante *fip1-1*.

El fondo genético control experimenta alteración en la distribución de PAS entre regiones genómicas ante el déficit de nitratos. El descenso en el uso de intrones se ve compensado por un aumento moderado del uso del CDS, así como un aumento significativo del uso de los extremos 5'UTR. Se identificaron un total de 1051 casos de APA entre los dos medios de crecimiento, entre los que destacan aquellos relacionados con distintos estreses y señales moleculares (Figura 83). Uno de los casos más interesantes de APA en estas condiciones es el del propio *FIP1*, que experimenta corte y poliadenilación en numerosos puntos del CDS, aunque sólo algunos de estos PAC presentan diferencias significativas entre los dos medios de crecimiento.

A)



B)

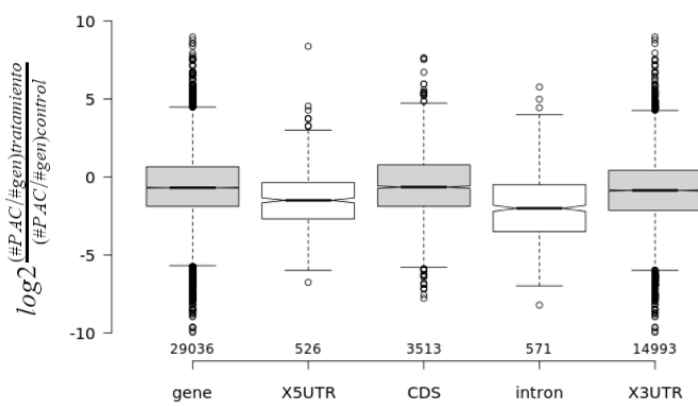


Figura: APA en el sistema radicular del fondo genético control bajo ausencia de nitratos. A) Distribución de PAS en tratamiento respecto al medio de crecimiento estándar. B) Categorías funcionales sobrerrepresentadas entre los genes que sufren APA.

En el caso del fondo mutante *fip1-1*, la variación en la distribución de PAS es menos acusada, aunque tiene en común con el fondo control el descenso en el uso de intrones. Sin embargo, lejos de aumentar la presencia de PAS situados en el extremo 5'UTR, *fip1-1* la disminuye. En cuanto a los casos de APA, se han identificado un total de 1780, entre los que destacan categorías funcionales similares a las del fondo genético control (Figura 84). De todos los genes identificados regulados por APA, sólo el 11.5% es común a ambos fondos genéticos (Figura 85), lo que sugiere que FIP1 regula el proceso de poliadenilación alternativa durante la deficiencia de nitrógeno.

A)

Distribución de PAS en la raíz de *fip1-1* bajo tratamiento de ayuno de nitrógeno respecto al medio completo



B)

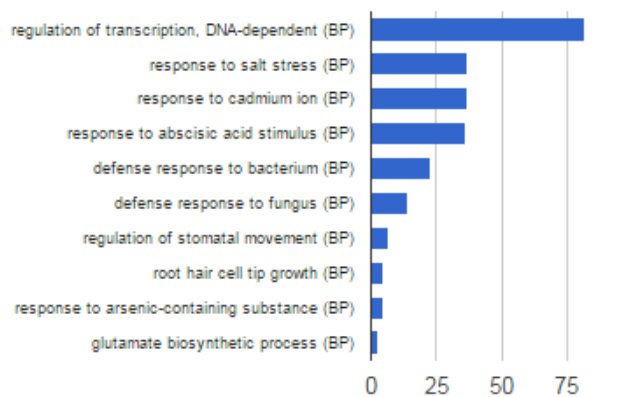


Figura 84: APA en el sistema radicular del fondo genético *fip1-1* bajo estrés por ausencia de nitratos  
 A) Distribución de PAS en tratamiento respecto al medio de crecimiento estándar. B) Categorías funcionales sobrerrepresentadas entre los genes que sufren APA.

APA en los fondos *fip1-1* y control como respuesta a ayuno de nitrógeno

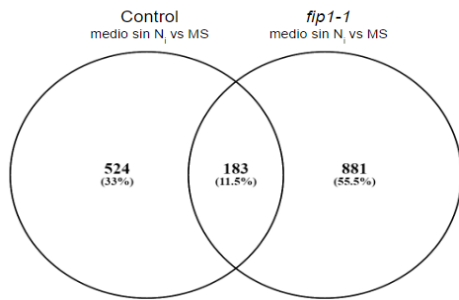


Figura 85: Coincidencias entre los genes que sufren APA en la raíz de los fondos genéticos *fip1-1* y control como respuesta al estrés por ausencia de nitratos.

#### 4.2.2 Crecimiento en condiciones de déficit de fosfatos

Ya que la respuesta a deficiencia de nitrógeno era claramente diferente en *fip1-1*, decidimos analizar otra deficiencia de un macronutriente, para analizar si es específica o puede ser que sea una respuesta muy general a estrés. De forma paralela, se evaluó la respuesta del mutante al crecimiento en ayuno de fosfato, aunque no se han encontrado diferencias significativas en el crecimiento de su raíz principal ni en la emergencia de raíces laterales (Figura 86), sugiriendo que la APA mediada por FIP1 en respuesta a la deficiencia de nitrógeno es específica.

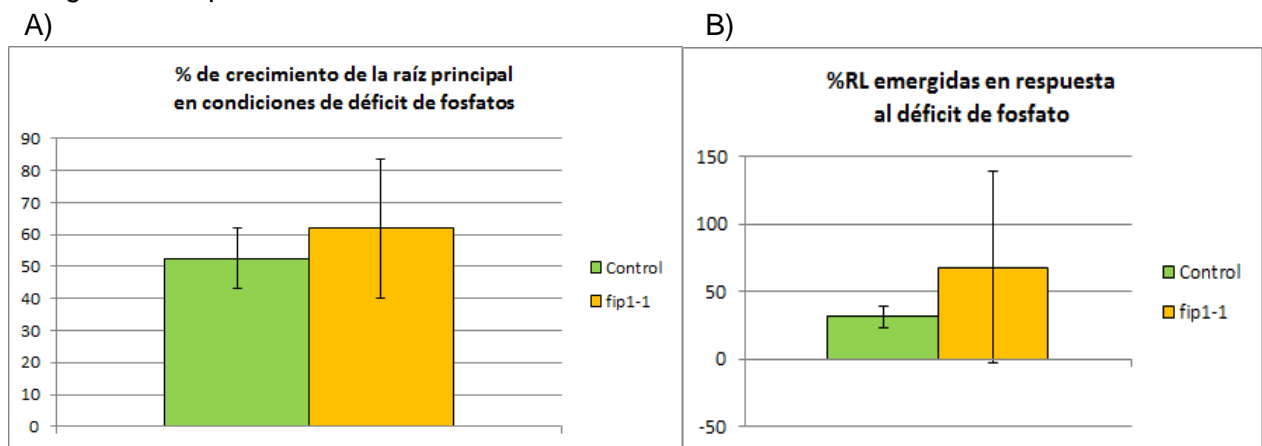


Figura 86: A) Porcentaje de crecimiento de la raíz principal en tratamiento de déficit de fosfato en el mutante *fip1-1* y su control. B) Porcentaje de RL emergidas en tratamiento de déficit de fosfato en el mutante *fip1-1* y su control.

Recientemente se ha descrito un efecto aditivo de la incidencia de la luz en el sistema radicular sobre el estrés por déficits de fosfatos (Silva-Navas y Del Pozo, comunicación personal). En nuestro laboratorio se ha diseñado un dispositivo que permite mantener lo que permite analizar la respuesta del sistema radicular a numerosos estreses (Silva-Navas et al., 2015). Se ha hecho uso de este dispositivo para analizar la respuesta del mutante *fip1-1* a la incidencia de luz y el déficit de fosfatos de forma conjunta. Se ha observado que, en ayuno de fosfato y en condiciones de oscuridad el crecimiento de la raíz principal se incrementa significativamente mientras que en condiciones en las que la luz incide sobre la raíz no se observan diferencias (Figura 87).

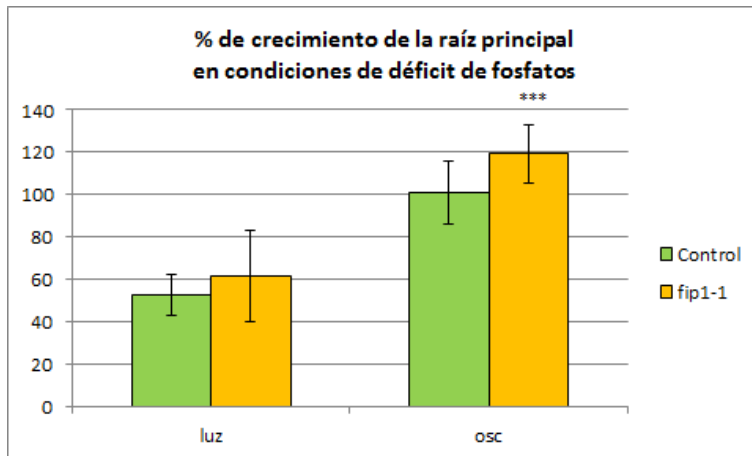


Figura 87: Porcentaje de crecimiento de la raíz principal en ausencia de fosfatos respecto al medio completo. Se han tomado medidas de plántulas de 12dpi crecidas en placa petri vertical (luz) y bajo el sistema D-Root (osc)

# DISCUSIÓN



# Discusión

La poliadenilación es un proceso clave en la expresión génica de todas las células eucariotas. Recientemente se han identificado numerosas evidencias del papel regulador de los elementos localizados en el extremo 3'UTR en la estabilidad, exportación y localización subcelular de los mensajeros maduros. Además, el uso de PAS en regiones no canónicas (aguas arriba del último exón) introduce una nueva variable al afectar al contenido de la proteína además de a la estabilidad del mensajero. El conjunto de estas observaciones, así como la amplia representación de sus mecanismos reguladores entre células eucariotas, apuntan a la existencia de un nuevo nivel de regulación de la expresión génica.

Este trabajo de tesis doctoral ha permitido identificar un mutante viable de una de las proteínas clave del complejo de corte y poliadenilación de *Arabidopsis thaliana*: FIP1. Esta proteína se identificó en levaduras como activador de la enzima Poly(A) polimerasa (PAP) y elemento nucleador del complejo de poliadenilación, siendo necesaria para poner en contacto la PAP y el mensajero inmaduro (Preker et al., 1995; Ezokwonko et al., 2011). Los ortólogos de humano, ratón, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, por otra parte, presentan además un dominio de unión de ARN que ha sido relacionado con la selección específica del PAS en hsFip1 (Kaufmann et al., 2004). Estos autores proponen que el reclutamiento de la polimerasa a una región concreta de ARN podría ser una función específica de la proteína FIP1 de eucariotas superiores, lo que concuerda con la identificación de un motivo de unión a ARN en la proteína FIP1[V] de *Arabidopsis thaliana*. Se cree que este dominio dirige la maquinaria de poliadenilación a determinadas señales localizadas en las áreas FUE de los mensajeros inmaduros y estimula la actividad de la PAP a través de sus extremos C y N-terminal respectivamente (Forbes et al., 2006). Además, el análisis de las interacciones entre los componentes de la maquinaria de poliadenilación ha revelado que FIP1[V] actúa como elemento nucleador del complejo (Hunt et al., 2008).

## 1. Identificación del alelo *FIP1-1*

Previamente se ha descrito que el gen *FIP1[V]* es esencial para el desarrollo de *Arabidopsis*, ya que mutaciones que eliminan la función de este gen son letales (Forbes et al., 2006). Sin embargo, en este trabajo de tesis se han identificado un mutante viable que afecta a la función del gen FIP1. El mutante *fip1-1* presenta un fenotipo pleiotrópico derivado de alteraciones en el proceso de poliadenilación. Este alelo *fip1-1* corresponde a una mutación puntual recesiva que afecta a un paso intrón-exón del gen *FIP1*, alterando el procesamiento de uno de sus intrones. Se ha comprobado que el intercambio de guanina por alanina en el primer nucleótido del Intrón 2 de *FIP1* concluye en un evento de procesamiento alternativo en el que este intrón no se retira durante el procesamiento que da lugar al ARN mensajero maduro. Se han descrito diferentes métodos de degradación para los mensajeros maduros aberrantes en *Arabidopsis thaliana* (Wagner et al., 2002; Frismeyer et al., 2002; Arciga-Reyes et al., 2016; Akimitsu et al., 2007). Sin embargo, los datos de expresión obtenidos por las metodologías RNASeq y PATSeq no muestran cambios de expresión de *FIP1* en el fondo mutante, por lo que se descarta que el mensajero maduro

sea degradado antes de su exportación al citoplasma. En su lugar, ya que la presencia del intrón introduce un STOP prematuro, es muy probable que este mensajero sea traducido en una proteína truncada que conservaría el dominio ácido responsable de la interacción con las proteínas del complejo de poliadenilación. Sin embargo, esta proteína carecería del dominio de unión a ARN, lo que impediría el reclutamiento de la maquinaria a secuencias específicas, así como de una importante porción estructural.

Por otro lado, se ha observado que el mutante alélico *SALK\_099558*, que contiene un fragmento de T-DNA insertado en el primer exón, presenta un fenotipo menos acusado que el de *fip1-1*. Estos datos podrían estar apuntando a que la proteína truncada *fip1-1* podría estar ejerciendo un efecto de dominancia negativa al entrar a formar parte del complejo de corte y poliadenilación. Así, en ausencia de FIP1 la maquinaria de poliadenilación vería afectado su criterio de selección de Poly(A) sites, pero podría realizar con normalidad una gran cantidad de ellos que serían independientes de FIP1. Sin embargo, la interacción de la proteína truncada estaría distorsionando el funcionamiento del complejo y, por tanto, aumentando los eventos de poliadenilación alternativa (APA). Además, y dado que el extremo N-terminal de FIP1 es el responsable de la activación de la PAP, la proteína *fip1-1* podría intensificar la poliadenilación de los PAS alternativos seleccionados por las otras proteínas del complejo de poliadenilación

El hecho de que los mutante *fip1-1* y *SALK\_099558* sean viables podría deberse a: 1) la actividad de un homólogo de FIP1[V] que pudiera asegurar determinados procesos, 2) que FIP1 afecta sólo a la poliadenilación de un conjunto de genes determinados, 3) al efecto redundante de diferentes secuencias FUE reconocidas por distintas proteínas o 4) a la participación de transcritos alternativos de *FIP1*.

## 1.1 FIP1-like

Se ha identificado un homólogo de *FIP1[V]* denominado *FIP1[III]*. Sin embargo, este gen no presenta dominio de unión a ARN (Forbes et al., 2006) y sus interacciones con las proteínas del complejo de poliadenilación son muy limitadas (Hunt et al., 2008). Además, se ha realizado una observación morfológica preliminar de un mutante de inserción de *FIP1[III]* y éste no presenta el acusado fenotipo de raíz observado en *fip1-1*. En conjunto, estos datos apuntan a que la función selectora de PAS que se ha asociado a las proteínas FIP de eucariotas superiores sería exclusiva de *FIP1[V]*. Por ello, se pasará a denominar a *FIP1[V]* como *FIP1* en adelante. Sin embargo, no se descarta que la proteína FIP1[III] tenga alguna función en la formación del complejo de poliadenilación de determinados procesos, respuestas o tipos celulares.

## 1.2 Especificidad de FIP1

Se han descrito 2016 eventos de APA en el sistema radicular de *fip1-1*, lo que apunta a que FIP1 es importante para la selección de PAS en un conjunto determinado de genes. Forbes y colaboradores propusieron en 2006 que la selección del PAS podría deberse a la acción conjunta de proteínas que reconocieran distintas regiones del mensajero inmaduro. Propusieron a FIP1[V] como proteína de unión a las regiones FUE y a CPFS30 y PabN1 como candidatas a reconocer las regiones NUE. En este escenario, la selección del PAS dependería del balance de las interacciones de estas proteínas, por lo que la mutación de *FIP1* podría verse parcialmente compensada por acción de otras proteínas del complejo.

Además, se ha observado que el ensamblaje de este complejo puede realizarse con diferentes combinaciones de proteínas (Forbes et al., 2006), lo que podría apuntar a que estas combinaciones serían específicas de proceso, respuesta o tipo celular. Así, la ausencia de FIP1 afectaría únicamente a un conjunto específico de procesos. Los resultados obtenidos del análisis de expresión del promotor de FIP1 apoyan esta teoría ya que FIP1 se expresa en regiones discretas relacionadas con la proliferación celular. Sin embargo, no podemos descartar que, aunque ese ha utilizado una región promotora suficientemente larga, hayamos omitido elementos reguladores en cis en otras regiones. Sin embargo, es muy probable que la actividad de FIP1 esté asociada a la expresión de esta en tejidos concretos

### 1.3 FUEs redundantes

La selección de PAS es un proceso coordinado en el que intervienen diferentes motivos del mensajero inmaduro (Danckwardt et al. 2008). Además, se ha observado que los transcritos inmaduros podrían contener varias regiones FUE con función redundante (Mogen et al., 1992; Rothnie et al., 1994). Forbes y colaboradores proponen que en cada complejo podría haber varias proteínas con capacidad de reconocer secuencias FUE e identifican a CFIm25 como uno de los candidatos (Forbes et al., 2006). Este escenario permite deducir que la ausencia de FIP1 podría estar compensada por la acción de otras proteínas del complejo, lo que podría producir un balance entre distintos tipos de procesamiento, pero con consecuencias en el fenotipo final de las plantas.

### 1.4 Regulación de la expresión de *FIP1* mediante la producción de transcritos alternativos.

Se han identificado transcritos alternativos en el procesamiento de hFip (Kauffman et al., 2004). Por su parte, la predicción de PAS en *FIP1* mediante la herramienta PASPA muestra posibles sitios de reconocimiento en los intrones 1 y 5. Además, resultados recientes de Hunt y colaboradores (datos sin publicar) apuntan a la producción de múltiples transcritos de *FIP1* en plantas silvestres y condiciones óptimas. Más concretamente, estos autores proponen que *Arabidopsis* produciría un transcrito estable que daría lugar a una proteína que sólo contendría el primer exón de *FIP1*. Esta proteína conservaría el dominio de unión a las proteínas del complejo de poliadenilación y carecería del conservado Fip1 y el dominio de unión a ARN. De momento se desconoce cuál sería su papel en la regulación de la expresión génica, por lo que en el futuro diseñaremos un experimento de complementación del mutante *fip1-1* con ambos transcritos, además de un análisis de su traducción por unión a diferentes marcadores moleculares.

Este nivel de regulación a través de transcritos alternativos es consistente con las observaciones publicadas por Delaney y colaboradores (2006), en las que se destaca la regulación de la actividad de CPSF30 mediante procesamiento alternativo. Así, la proteína CPSF30 activa sería resultado de la selección de un PAS localizado en el segundo intrón, mientras que el transcrito largo daría lugar a una proteína que contiene un motivo que se ha relacionado con procesamiento en mamíferos. En conjunto, estos resultados sugieren que podría haber un mecanismo de regulación mediante modificaciones post-transcripcionales, lo que evidencia la importancia del procesamiento de los mensajeros en la expresión génica. En este contexto, es plausible que *Arabidopsis* regule la actividad de *FIP1* mediante

la producción de diferentes transcritos, algunos de los cuales no se verían afectados por la mutación *fip1-1*.

En cuanto al mutante *SALK\_087117*, descrito como letal por Forbes et al (2006), es necesario realizar un análisis más exhaustivo de los dominios presentes en estos transcritos. De momento no podemos explicar por qué es letal este alelo, por lo que serán necesarias nuevas observaciones para describir el procesamiento de estos transcritos, así como los niveles de expresión de la proteína FIP1. Sin embargo, no se debería descartar la presencia de un segundo T-DNA ligado que junto con la mutación en *fip1* causa un fenotipo letal.

## 2. Alteraciones de la poliadenilación en *fip1-1*

La proteína FIP1 forma parte activa de la maquinaria de poliadenilación de *Arabidopsis thaliana* como elemento nucleador del complejo y activador de la PAP. Además, hay evidencias de que esta proteína podría reconocer específicamente determinadas secuencias FUE, dirigiendo así la selección de los PAS (Forbes et al., 2006; Hunt et al., 2008). Sin embargo, hasta la fecha no había sido posible determinar las alteraciones producidas por un defecto en su función. En este trabajo de tesis se ha identificado el primer mutante de *FIP1* viable que ha permitido llevar a cabo un análisis masivo de sus eventos de poliadenilación. Se ha observado una alteración significativa en la selección de múltiples PAS, lo que permite corroborar la actividad de esta proteína en la regulación de la expresión vía APA. Además, este cambio en la distribución de PAS se ha asociado con la presencia del dominio de unión a ARN, lo que apoya la función de FIP1 en la selección de secuencias del sitio de poliadenilación, tal y como proponen Forbes y colaboradores (2006).

El número de PAS dependientes de FIP1 es más bajo del esperado dado el fenotipo pleiotrópico del mutante. Sin embargo, si estos cambios afectan a genes reguladores maestros del desarrollo (o respuestas a estímulos) podría afectar transcripcionalmente a un amplio número de genes y explicar el fenotipo pleiotrópico observado. Esta última hipótesis podría ser posible ya que a nivel transcripcional hemos observado que en el mutante *fip1-1* existe un alto número de genes con niveles de acumulación de transcrito diferentes a plantas control. Esto sugiere que FIP1 podría promover o inhibir el uso de sitios de corte y poliadenilación en una colección concreta de genes reguladores claves. Así, entre los eventos de APA identificados en *fip1-1* destacan determinados genes clave en la regulación de distintos procesos de desarrollo o las rutas de señalización por ABA y auxinas, dos hormonas que controlan un alto número de procesos de desarrollo y de respuestas a estreses abióticos. Así, FIP1 podría contribuir a la regulación de la expresión de determinados genes clave en el desarrollo y la respuesta a estrés que provocarían alteraciones generalizadas en la señalización hormonal.

Por otro lado, se ha observado que FIP1, entre otras proteínas de la maquinaria de poliadenilación, puede verse afectada por modificaciones por fosforilación (Hunt et al., 2014). Estos resultados, unidos a la presencia de transcritos alternativos de *FIP1* y a la elevada presencia de genes de respuesta a estrés entre los casos de APA identificados en el mutante *fip1-1*, permiten proponer a FIP1 como nexo entre la señalización celular y la

regulación de las respuestas ambientales mediante APA. Así, determinados tipos celulares respondería a determinadas señales alterando la expresión de *FIP1*, que a su vez desencadenaría una cascada de cambios de expresión en determinados genes que participan en una respuesta determinada, posiblemente de forma específica de tipo celular.

El análisis de la respuesta a estrés abiótico se comentará más adelante. De momento, nos centraremos en el efecto de la distribución de PAS en el desarrollo.

## 2.1. Alteraciones generales de la poliadenilación *fip1-1* en el sistema radicular

Se identificaron más de 2000 eventos de poliadenilación alternativa en el sistema radicular de *fip1-1*, la mitad de ellos localizados en el extremo 3'UTR. Recientemente, Wu y colaboradores publicaron evidencias de que *Arabidopsis* establece una regulación de la expresión génica a través de la poliadenilación alternativa de diferentes regiones genómicas (2016). Los resultados obtenidos en este trabajo mediante experimentos de PATSeq sobre el fondo genético control asignan a las distintas regiones genómicas un uso similar al publicado por estos autores, lo que permite validar los datos obtenidos por esta metodología y proceder al análisis de la distribución de PAS en el fondo mutante *fip1-1*.

Este análisis no ha detectado diferencias significativas en la selección de regiones genómicas, lo que evidencia que la presencia de FIP1 no desplaza la maquinaria de poliadenilación a ninguna región en concreto. Poco se sabe de las características de las secuencias PAS exclusivas de las distintas regiones genómicas, aunque se han descrito diferencias en las secuencias NUE de los PAS localizados en el CDS con respecto a extremos UTR e intrones (Shen et al., 2011). Dado que se ha propuesto que FIP1 interaccione con las secuencias FUE (Far Upstream Element) (Forbes et al., 2006), serán necesarios análisis detallados de las secuencias obtenidas en el abordaje PATSeq para determinar la frecuencia de uso de estos motivos en el mutante *fip1-1*. Este abordaje, además, permitiría identificar cuáles son las secuencias FUE mayoritarias y cuál es su distribución entre las distintas regiones genómicas, datos aún desconocidos incluso en el fondo genético silvestre. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, por otra parte, apuntan a que las secuencias FUE reconocidas por FIP1 podrían estar distribuidas independientemente de la región genómica.

Se han identificado categorías funcionales sobrerrepresentadas en distintos tipos de APA que podrían conllevar inhibición de la expresión mediante miRNAs o los sistemas de degradación NSD y NMD, que disminuyen la estabilidad de los mensajeros poliadenilados en regiones no canónicas (Frischmeyer et al., 2002; Van Hoof et al., 2002; Arciga-Reyes et al., 2006; Hurang et al., 2011). Sin embargo, se han descrito otros mecanismos que podrían actuar favoreciendo la expresión, localización o composición de los mensajeros (Sandberg et al., 2008; Geisberg et al., 2014; Oikonomou et al., 2014; Chen y Shyu, 2016), por lo que no es posible realizar una valoración global del efecto de estos eventos de APA. Será necesario realizar análisis de expresión de algunos genes candidatos, utilizando primers en diferentes regiones del mensajero, en el fondo *fip1-1* para determinar el efecto concreto de la selección de los PAS alternativos.

Entre las rutas de regulación alteradas destacan la respuesta a ABA y a auxinas, entre las que se han encontrado numerosos genes con poliadenilación alternativa en *fip1-1*. Estos resultados podrían explicar los cambios fenotípicos observados en el fondo mutante. Además, las evidencias de la especificidad de tejido en la selección de PAS descritas en la bibliografía (Wu et al., 2011; Shen et al., 2011) sugieren que sería necesario analizar la expresión de los genes afectados por APA en los diferentes tipos celulares para determinar de qué manera se altera la señalización hormonal en la raíz de *fip1-1*. Asimismo, no se puede descartar que haya otros eventos de APA en genes clave que se den en un número limitado de células y se hayan perdido en el análisis del tejido radicular total. Esta teoría es consistente con el patrón de expresión de *FIP1*, concentrado en células proliferativas. Así, el efecto de la mutación *fip1-1* sería máximo en las células meristemáticas, lo que podría explicar las alteraciones de la regulación hormonal del crecimiento.

Por otro lado, la expresión máxima de *FIP1* en células meristemáticas podría estar revelando especificidad de tejido. Así, la tendencia en la producción de mensajeros con extremo 3'UTR largo observada en *fip1-1* podría estar relacionada con el estado de diferenciación de las células afectadas, tal y como se ha observado en células animales (Elkon et al., 2012; Hoque et al., 2013; Taliaferro et al., 2016). Así, *FIP1* podría favorecer la selección de PAS proximales en células proliferativas, asegurando así la expresión de genes clave para la división. En el fondo mutante estos genes tendrían un procesamiento post-transcripcional diferentes (Bartel et al., 2009; Sandberg et al., 2008; Ji et al., 2009; Lianoglou et al., 2013), lo que conllevaría defectos en el desarrollo. Entre estos genes destacan aquellos implicados en procesos de autofosforilación, crecimiento y desarrollo radicular y se han seleccionado algunos de ellos para una discusión en profundidad en el capítulo "Discusión: Caracterización fenotípica de *fip1-1*". Al margen de estos potenciales candidatos a reguladores del desarrollo, entre los genes con PAS distal destaca el caso de *CPSF30*, cuyo cambio de expresión podría amplificar el efecto de la mutación de *FIP1* en lo que a la distribución de PAS se refiere.

## 2.2. Alteraciones generales de la poliadenilación en *fip1-1*: Parte aérea

Las secuencias obtenidas de las muestras de parte aérea, debido a problemas técnicos, fueron muy inferiores en número a las de raíz, por lo que el análisis ha sido menos exhaustivo. Los sitios de poliadenilación (PAS) identificados revelaron cambios en la distribución a lo largo de las distintas regiones genómicas con tendencia a disminuir el uso de PAS localizados en intrones y aumentar el de aquellos situados en el extremo 5'UTR. Sin embargo, estos resultados deben comprobarse de forma independiente, ya que estas regiones genómicas son las menos representadas en el conjunto de PAS identificados y podrían haberse enriquecido por problemas asociados a la experimentación.

Por otro lado, los análisis gen a gen han revelado diferencias significativas en el uso de determinados PAS, lo que ha permitido identificar una serie de genes candidatos a explicar el fenotipo de la parte aérea de *fip1-1*. Entre ellos destacan los reguladores negativos de la señalización por ABA *SnRK3.1* (PAS en el CDS en el mutante *fip1-1*) (Anexo: Figura 18) y *HB6* (PAS distal en el extremo 3'UTR en *fip1-1*) (Anexo: Figura 19). También se han podido identificar el factor de crecimiento *RGF9* (PAS distal en el 3'UTR) (Anexo: Figura 20), así

como la enzima (*THIC*) *THIAMINC*, responsable de la síntesis de vitamina B1 (Anexo: Figura 21). Este último caso es especialmente interesante ya que, además de haber sido relacionada con la respuesta a estrés osmótico y salino, categorías funcionales enriquecidas en *fip1-1*, (Rapala-Kozik et al., 2012), se han encontrado evidencias de que su patrón de expresión se regula mediante modificaciones post-transcripcionales. Así, la actividad de *THIC* depende de la unión del metabolito TPP, responsable del mantenimiento del intrón 1 en el mensajero maduro y su consiguiente traducción (Cressina et al., 2011; Bokobza et al., 2013). El PAS dependiente de FIP1 en este mensajero se encuentra localizado aguas abajo de este intrón, en el extremo 3'UTR. Sin embargo, no se descarta que el gen *THIC* esté regulado por diferentes modificaciones postranscripcionales, cuyo equilibrio podría asegurar unos niveles de expresión específicos de tejido.

### 2.3. Alteraciones generales de la poliadenilación en *fip1-1*: Especificidad de órgano

La comparación de los resultados del experimento PATSeq obtenidos en raíz y parte aérea ha permitido identificar eventos de APA específicos del órgano analizado. Las conclusiones obtenidas de este análisis deben ser confirmadas con un mayor número de lecturas en la parte aérea, pero de momento es posible especular con la posibilidad de que la función de FIP1 sea diferencial en distintos órganos. El número de genes afectados por APA en *fip1-1* en ambos órganos supone un 1.4% del total del genoma de *Arabidopsis*, y entre ellos se encuentran algunos de los comentados anteriormente como *SnRK3.1*, *HB6* o *THIC*. Es de suponer que *FIP1* ejerce un control sobre la expresión de estos genes a nivel global. Sin embargo, se han analizado los eventos de APA identificados en el fondo mutante en ambos órganos y se ha observado que sólo 1 de los 17 genes experimenta el mismo cambio en raíz y en parte aérea. Estos resultados apoyan los resultados que apuntan a un efecto regulador específico de tejido en animales (Lianoglou et al., 2012; Sandberg et al., 2008; Ji et al., 2009) y plantas (Wu et al., 2011). Así, podría ser que en *Arabidopsis* regulara la expresión de genes ubicuos a nivel postranscripcional específico de tejido. El papel de FIP1 es necesario para la selección de determinados PAS y su efecto depende del órgano observado, por lo que no se descarta que su actividad sea modulada por señales externas como ocurre en CPSF30 (Delaney et al., 2006; Chakrabarti y Hunt, 2015). Alternativamente, estas diferencias podrían deberse a la formación de complejos de poliadenilación específicos, de modo que la selección del PAS dependería de la combinación de las distintas proteínas de la maquinaria de poliadenilación tal y como proponen Forbes y colaboradores (2006).

### 3. Caracterización fenotípica de *fip1-1*

La arquitectura radicular es clave para el correcto desarrollo de la planta. El grado de ramificación de las raíces, así como la profundidad alcanzada, tienen un impacto directo en la absorción de agua, la adquisición de nutrientes y el anclaje al suelo. Gracias a diferentes observaciones del organismo modelo *Arabidopsis thaliana* se han descrito numerosas aportaciones a las rutas moleculares que regulan los procesos de iniciación y emergencia de las raíces laterales. Concretamente, el laboratorio del Dr. Del Pozo ha desarrollado la línea *pSKP2B:GUS* que ha resultado ser un excelente marcador del desarrollo de raíces laterales, ya que permite analizar las señales internas y externas y diferentes marcas epigenéticas que podrían estar regulando la formación y desarrollo de las raíces laterales (Manzano et al., 2012). Con el objetivo de identificar nuevos genes con un sistema radicular modificado y/o un patrón de expresión de *SKP2B* alterado se realizó una mutación por EMS de líneas transgénicas portadoras del marcador que permitió identificar una serie de mutantes afectados en el desarrollo de raíces laterales. Uno de estos mutantes es *fip1-1*.

El mutante *fip1-1* presenta una deslocalización de la expresión de *SKP2B*, así como por una serie de alteraciones en su desarrollo que podrían apuntar a un desequilibrio de la regulación hormonal. En conjunto, estos resultados revelan la importancia de la regulación de la expresión génica vía APA, así como su efecto en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. A continuación se analizan los procesos desregulados en el fondo mutante. Sin embargo, es necesario tener en cuenta un enfoque global, ya que la alteración de los sistemas de regulación hormonal observados pueden explicar gran parte del fenotipo observado.

#### 3.1. Sistemas de regulación alterados en *fip1-1*

##### 3.1.1. Regulación del desarrollo radicular mediada por auxinas/citoquininas

El mutante *fip1-1* se identificó por la expresión deslocalizada de *SKP2B::GUS* y la reducción en número de RL. La deslocalización de la respuesta a auxinas observada en sección longitudinal mediante los marcadores *pSKP2B:GUS* y *pDR5:GUS* apunta a una disrupción general del gradiente de auxinas descrito en condiciones durante el desarrollo (Sabatini et al., 1999). Esta alteración de la respuesta a auxinas podría deberse a alteraciones en el gradiente o en los mecanismos que median la respuesta. Por un lado, se ha asociado la disipación del gradiente radial de auxinas con la imposibilidad de formación de RL (De Smet et al., 2007), lo que podría explicar la pérdida de PRL iniciados en *fip1-1*. Se han descrito numerosas rutas de regulación en la que los procesos de señalización y respuesta a auxinas se retroalimentan, por lo que es muy complicado dilucidar si las alteraciones en distribución de marcadores son consecuencia de alteraciones de la distribución de auxinas o de determinados elementos implicados en la respuesta. A continuación se analizan las familias génicas implicadas en ambos procesos y afectadas generalizadamente en el mutante *fip1-1*.

La distribución de auxinas en el sistema radicular depende de los procesos de síntesis y transporte (Ljung et al., 2001; Swarup et al., 2001; Blakeslee et al., 2005). La síntesis podría estar alterada en el mutante *fip1-1*, ya que se han identificado alteraciones en la expresión

de genes como **YUC**, **ASB** o **HEMG2**. Por otro lado, el transportador del precursor de auxina AIB (Ácido Indol-Butírico), **ABCG37**, experimenta APA en el mutante *fip1-1* (Anexo: Figura 2). El PAS específico del fondo mutante se localiza en el exón 5 y su hipotético efecto represor a través del sistema NSD concuerda con el fenotipo mutante de hipersensibilidad a auxinas (Ružicka et al., 2010). Además, se han analizado los sistemas de transporte polar y floemático, responsables del crecimiento radicular y la iniciación de PRL (Ljung et al., 2005). Observaciones preliminares revelaron que no hay diferencias significativas en la expresión de *PIN1* y *PIN3*, dos de los principales transportadores acropétalos, aunque no se descarta una afectación del transporte de auxinas mediada por otras proteínas.

Se han detectado numerosos genes desregulados en *fip1-1* relacionados con el transporte polar de auxinas (**ASA1**, **ABCB10**, **CYP711A1**). Entre ellos destaca **ASA1**, que conecta las rutas de regulación del crecimiento radicular de auxinas, ácido jasmónico y citoquininas (Sun et al., 2009; Guo et al., 2013; Di et al., 2016). El gene **ASA1** está inducido en *fip1-1* y además muestra un uso de un PAS específico del mutante *fip1-1* en el exón 8. Este PAS podría suponer la producción de un mensajero que careciera de dianas para determinados reguladores negativos, tal y como proponen Lianoglou y colaboradores (2012). Queda por determinar si la sobreexpresión de **ASA1** en *fip1-1* es la consecuencia de un intento de compensar la represión postranscripcional debido a una poliadenilación incorrecta dentro de un exón. Se ha descrito un papel de **ASA1** en la acumulación de auxina radicular (Di et al., 2016; Mao et al., 2016) y en la especificación de células fundadoras (López-Bucio et al., 2005). Así, el mutante *asa1* incrementa la biosíntesis de citocininas como respuesta a la baja concentración de auxinas, lo que altera la homeostasis de la raíz y produce defectos en el desarrollo de las raíces principal y laterales (López-Bucio et al., 2005; Di et al., 2016). La sobreexpresión de **ASA1** en el fondo mutante podría ser en parte responsable de un aumento del contenido en auxinas que explicaría la respuesta masiva observada a través de los marcadores *SKP2B* y *DR5*.

En cuanto a los cambios en las rutas de respuesta a auxina, la mayoría de los genes de respuesta rápida se pueden agrupar en 3 familias: AUX/IAAs, GRETCHEN HAGEN3s (GH3s) y SAURs (Hagen and Guilfoyle, 2002). Se han observado numerosos genes de respuesta desregulados, especialmente entre los reprimidos. Entre éstos últimos destacan **IAA6/SHY2**, **IAA19**, **IAA32** y **GH3.3**, además de una amplia colección de genes de la familia **SAUR**. La familia **SAUR** se ha relacionado con elongación celular, tropismos y desarrollo radicular, procesos que están alterados en *fip1-1*. Estos resultados confirman la alteración de la respuesta a auxinas y permiten dilucidar algunas de las rutas que pueden estar aletradas y ser responsable, al menos parcialmente, del fenotipo observado.

Por otro lado, entre los casos de APA detectados, destacan fosfatasa **DFL1** (Anexo: Figura 4), implicada en la sensibilidad de la respuesta a auxinas a distintos niveles (Ueda, 2001), algunos reguladores tipo Aux/IAA-ARF como *ARF3*, *IAA9*, *IAA16* o *IAA17*. Entre estos genes destaca **IAA17/AXR3** (Anexo: Figura 5), implicado en el mantenimiento de la pared celular (Leyser et al., 1996; Vissenberg, 2005), la iniciación de primordios de raíz lateral (Péret et al., 2013), formación de pelos radiculares (Knox et al., 2003) y de la comunicación cruzada (*crosstalk*) entre auxinas y citoquininas (Swarup et al., 2008), además de en otra colección de rutas no dependientes de auxinas (Overhooorde et al., 2005). Aunque no se han observado cambios en los niveles de expresión de **AXR3** en el fondo *fip1-1*, no podemos descartar que la regulación a través de APA se produzca en pasos posteriores (eficiencia

de la traducción, estabilidad del mensajero, etc). Así, es posible proponer que el cambio en el sitio de corte y poliadenilación observado, que conlleva la producción de un extremo 3'UTR más largo en el mutante, se traduce en cambios en la disponibilidad de la proteína AXR3, lo que podría explicar las alteraciones generales de la respuesta a auxinas en *fip1-1*. En base a estos datos, se puede proponer que la APA regulada por FIP1 es importante para mantener una respuesta correcta a las auxinas durante el desarrollo del sistema radicular.

### 3.1.2. Regulación del desarrollo radicular mediada por ABA

Los datos morfológicos y transcriptómicos obtenidos han permitido detectar numerosas evidencias de desregulación de la respuesta al Ácido Abscísico (ABA) en *fip1-1* que podrían contribuir al fenotipo del mutante. Así, se han identificado eventos de APA en receptores como *PYL4* (Anexo: Figura 6) o *PYR1* (Anexo: Figura 7) y efectores de la respuesta como *SnRK2.4/ASK1*, *SnRK2.7*, *SnRK3.1*, *CPL1*. Por otro lado, también hemos encontrado que la mutación *fip1-1* altera los niveles de expresión de los genes *SnRK3.20* y *SnRK3.25*. Por otro lado, también se ha observado una elevada representación de genes relacionados con la respuesta a estrés salino. Estos últimos experimentan tanto cambios de expresión como APA, por lo que se deduce que la señalización vía ABA podría estar altamente alterada en el fondo mutante. Dada la relación de la señalización por ABA con la respuesta a estrés (Revisado por Rowe et al., 2016), no podemos descartar que el fenotipo mutante se deba a la activación de ciertas rutas de esta respuesta aún en ausencia de estrés. Esto explicaría por qué *fip1-1* presenta defectos del desarrollo en condiciones óptimas de crecimiento pero es más tolerante a estrés osmótico y salino. De hecho el patrón de expresión de SKP2B::GUS dentro de *fip1-1* es similar en muchos aspectos al de las plantas control SKP2B::GUS tratadas con ABA (Manzano et al., 2012).

Por otro lado, hemos encontrado que muchos de los procesos regulados por ABA están alterados en *fip1-1*: mantenimiento de la quiescencia en el RAM (Zhang et al., 2010), elongación celular (Sharp et al., 2004), iniciación y elongación de RL (Signora et al., 2001; Cheng et al., 2002; Van Norman et al., 2014) y germinación (Philips et al., 1997). Asimismo, también hemos encontrado similitudes con las respuesta a estrés salino y a ayuno de nitratos (Signora et al., 2001; Duan et al., 2013). El mutante *fip1-1* muestra APA y cambios de expresión de numerosos genes regulados por estos dos estreses, lo que sugiere que las rutas de regulación dependientes de ABA podrían estar totalmente desreguladas en el fondo mutante. Los resultados obtenidos indican que *fip1-1* desencadena la respuesta a ABA incluso con una señal mínima.

Uno de los eventos de poliadenilación identificados en *fip1-1* que podrían explicar esta sensibilidad a ABA se encuentra en el gen ***FRY2*** (Anexo: Figura 9). Este gen experimenta un aumento significativo de la poliadenilación en una región correspondiente al primer exón en el fondo mutante, lo que podría estar favoreciendo la degradación del transcrito mediante NMD (Arciga-Reyes et al., 2006; Hurang et al., 2010). *FRY2* induce la expresión de diferentes miRNAs, que inhiben la expresión de numerosos genes de respuesta a estrés y a su vez su expresión se inhibe en presencia de ABA (Xiong et al., 2002; Chen et al., 2015). Así, la hipotética inhibición de su expresión vía APA podría explicar el retraso en el crecimiento de *fip1-1*, así como la sobreexpresión de genes relacionados con la respuesta a estrés y su tolerancia a las condiciones subóptimas observadas. En concreto, el mutante

*fip1-1* experimenta sobreexpresión de algunos de los genes descritos por Xiong y colaboradores (2002) como regulados por *FRY2* en respuesta a ABA, como son *RD29A*, *COR15A* y *KIN1*. Te adjunto un paper donde hablan de *FRY2* y poliA

Se han observado numerosas evidencias de la relación entre el procesamiento de los pre-miRNAs y los mensajeros dianas de estos (Laubinger et al., 2008; Turner et al., 2013; Raczynska et al., 2014; Chen et al., 2015). En 2015, Chen y colaboradores identificaron una ruta de regulación en la que *FRY2* desfosforila a *HOS5* y ésta, junto con los factores de transcripción *RS40* y *RS45*, modula el procesamiento de determinados miRNA, entre los que destacan aquellos relacionados con la respuesta a auxina. Los mutante *fry2* presentan tolerancia a estrés salino, así como hipersensibilidad a ABA (Xiong et al., 2002). Ya que *fip1-1* es sensible a ABA y tolerante a sales es posible que la APA de *FRY2* observada en *fip1-1* conlleva una pérdida de función de este gen.

Además, se ha identificado APA en el gen ***RS40*** (Anexo: Figura 10), que se expresa a lo largo de todo el sistema radicular con especial intensidad en el RAM y cuyo mutante es hipersensible a la auxina. El uso de un sitio poly(A) localizado en el CDS del gen podría estar favoreciendo la degradación del mensajero mediante NMD (Arciga-Reyes et al., 2006; Hurang et al., 2011). Sin embargo, no se ha detectado cambios en la expresión de los genes identificados como targets de *RS40*, lo que podría deberse a que *RS40*, *RS45* y *HOS5* tienen una función redundante (Chen et al., 2015). Por ello, nuevos experimentos encaminados a aclarar esta posibilidad serán necesarios en el futuro.

Uno de los targets de *HOS5/RS40/RS45* es ***miR162***, cuya actividad depende de su correcto procesamiento (Chen et al., 2015; Knop et al., 2015), así como de la inhibición de la expresión de *DCL1*, que codifica otra de las proteínas que forman parte de la maquinaria de formación de miRNAs reguladores de la respuesta a ABA (Pias et al., 2005). En este punto se debe remarcar que la expresión de *miR162A* en el mutante *fip1-1* es de casi 20 veces menos. Además *fip1-1* muestra alteraciones en el procesamiento del fragmento contenido entre el Exón 2 y el Exon 4 del *miR162A* (Anexo: Figura 11). Se ha descrito regulación de la actividad de *miR162A* por *splicing alternativo*, así como acumulación de la isoforma funcional como respuesta a estrés (Hirsch et al., 2006; Knop et al., 2015). De acuerdo con estos autores, la funcionalidad de *miR162A* iría asociada con el mantenimiento el Intrón 3 y/o el Exón 3, ambos representados en muy baja frecuencia en el fondo mutante. Esta alteración del procesamiento podría deberse a la función anómala del complejo *HOS5/RS40/RS45*, que a su vez se ve afectado por los casos de APA en *RS40* y *FRY2*.

También se ha descrito regulación vía APA el gen *miR162*, de modo que la isoforma funcional es aquella con PAS distal (exón 5 respecto a exón 2) (Knop et al., 2015). No se han detectado cambios estadísticamente significativos en la distribución de sitios de corte y poliadenilación en el fondo mutante. Sin embargo, en *fip1-1*, el número de lecturas que alinean en este gen es insuficiente para realizar un análisis estadístico de sitios de poliadenilación, por lo que no se descarta que *FIP1* pueda participar en la selección de PAS en *miR162A* y, por tanto, en la estabilidad de su mensajero.

***DCL1***, responsable de la maduración de numerosos pre-miARNs (Parker et al., 2002), es una de las dianas descritas de *miR162*. Se ha propuesto que ambas podrían participar en un proceso de retroalimentación negativa en el que uno de las dianas expresadas por la actividad de *DCL1* sería un inhibidor de su propia actividad. Esta diana se ha identificado

como *miR162A* (Xie et al., 2003). La presencia de DCL1 es necesaria para la expresión de *miR162A* (Hirsch et al., 2006), por lo que se puede afirmar que el origen de la desregulación de este proceso se encuentra en la propia actividad de DCL1. No se han identificado cambios de expresión en el fondo mutante *fip1-1*, aunque sí un aumento de la poliadenilación en el CDS que codifica para *DCL1* (Anexo: Figura 12). Es posible que este cambio en el sitio de poliadenilación marcara el mensajero para degradación vía NMD, de modo que la pérdida de estabilidad del mensajero conllevaría un descenso de la presencia de la proteína DCL1 que podría explicar la caída en la expresión de *miR162A* en el fondo mutante *fip1-1*.

Por otro lado, se ha observado que la ausencia de *miR162A* en el mutante *dcl1* se ve compensada por un aumento de la expresión de *miR162B* (Hirsch et al., 2006). Sin embargo, no se ha detectado cambios de expresión de este gen en el fondo mutante *fip1-1*. En este escenario, la inactividad de *miR162A* en el fondo *fip1-1* no desencadenaría aumento de la expresión de *DCL1*, ya que éste se vería inhibido vía APA, y por lo tanto no se activaría la expresión de *miR162B*.

En conjunto, estos resultados apuntan a que *fip1-1* podría presentar una alteración de la expresión de genes de respuesta a estrés mediada por miRNAs. La poliadenilación alternativa de *DCL1*, *FRY2* y *RS40* produciría inhibición de la expresión y/o maduración de los miRNAs, entre los que se incluye *miR162A*. Estos procesos podrían explicar, al menos en parte, la sobreexpresión de genes relacionados con la respuesta a ABA y auxinas en el mutante *fip1-1*, bien como efecto directo de la APA o como respuesta de la planta a ésta.

## 3.2. Caracterización fenotípica de *fip1-1*: Desarrollo de raíces laterales

La caracterización morfológica del sistema radicular en *fip1-1* revela importantes alteraciones del desarrollo de tanto la raíz principal como de las laterales. En primer lugar, se observó que la drástica disminución en la producción de raíces laterales en *fip1-1* es consecuencia de una disfunción de dos procesos clave: especificación de células fundadoras de primordio de raíz lateral y elongación de dicho primordio.

### 3.2.1. Especificación de Células Fundadoras

En primer lugar, se pudo determinar que el mutante *fip1-1* sufre un defecto en la capacidad de especificación, llegando a producir sólo un 40% de los primordios que produce la planta silvestre. En trabajos anteriores se ha descrito que el proceso de señalización celular que marca la especificación de las células del periciclo está relacionado con picos oscilatorios de respuesta a auxina (De Smet et al., 2007). La deslocalización de la expresión de los marcadores de auxinas *SKP2B* (Manzano et al., 2012) y *DR5* (Benková et al., 2003; Dubrovsky et al., 2008) apuntan a una alteración de la respuesta a la señalización por auxinas en el mutante y que ésta afecta significativamente su capacidad de formación RL.

Las imágenes tomadas mediante microscopía confocal revelaron que el patrón de respuesta a auxinas en el meristemo apical radicular (RAM) basadas en expresión de DR5::GFP se mantiene en el mutante *fip1-1*, aunque la intensidad del marcaje es mayor. En conjunto,

estos resultados revelan un aumento de la respuesta a auxinas en el RAM de *fip1-1* que conllevaría una deslocalización de la señal y podría apuntar a una desregulación generalizada de este sistema de señalización hormonal. Ya que la especificación de las células fundadoras se da en el meristemo basal (Beemster et al., 2003), tal vez esta alteración de la homeostasis de las auxinas en el meristemo afecte a la capacidad de especificación en plantas *fip1-1*. De hecho un trabajo reciente apunta a la posibilidad de que para la especificación de células fundadoras de primordios se debe atenuar la señalización por auxinas en unas células determinadas (Benková et al., 2003; Dubrovsky et al., 2008). Por ello, es posible especular que el incremento de señalización de esta hormona en el RAM, junto con otros defectos asociados a la mutación *fip1-1*, impidan una especificación correcta y regular.

### 3.2.2. Iniciación de primordios de raíz lateral

La iniciación de la formación de raíz lateral está regulada por la auxina que se produce en el meristemo de la raíz principal (Casimiro et al., 2001; De Smet et al., 2007), por lo que estos resultados podrían estar revelando un aumento de la producción de auxina meristemática o una desregulación del transporte basipétalo. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la expresión del marcador pPIN2:PIN2:GFP, por lo que de momento no es posible asociar el aumento de la respuesta a auxinas con un incremento en el transporte de auxina meristemática a través de este transportador.

Se ha descrito que la acumulación local de auxinas en las células XPP es esencial para la migración nuclear y la primera división asimétrica (Swarup et al., 2008; Péret et al., 2009; Péret et al., 2013). De forma similar, la señal de auxina también activa las células corticales (Palme y Teale, 2013) y endodérmicas (Vermeer et al., 2014) para que, mediante modificaciones de la pared celular, relajen su tensión y permitan la emergencia del PRL en desarrollo. La activación masiva de la respuesta a auxinas en el mutante *fip1-1* en cortex y epidermis apunta a una alteración en la distribución radial de auxinas que estaría interrumpiendo la iniciación tal y como describen De Smet y colaboradores (2007). Esta distribución radial depende del transporte polar y floemático (Ljung et al., 2005) y del transporte radial, que a su vez es dependiente del transportador PIN3 (Friml et al., 2002), cuya actividad es necesaria para la correcta distribución del transportador **LAX3** (Palme y Teale, 2013). Así, la desregulación de genes relacionados con el transporte polar (*ASA1*, *ABCB10*, *CYP711A1*) podría estar favoreciendo la acumulación de auxinas en el sistema radicular y distorsionando la distribución, lo que explicaría la disminución de PRL iniciados. Así, alteraciones en la distribución radial de auxinas podría estar impidiendo la emergencia de los primordios a través de las sucesivas capas radiales de la raíz, defecto observado en *fip1-1*, que acumula primordios en estadio V.

Una vez disparada la señal de auxinas en las células fundadoras, la respuesta se modula a través de una complicada red de expresión génica que implica la integración de diversas señales hormonales. Uno de los genes responsables de la transducción de la señal, **ABI3**, se encuentra sobreexpresado más de 15 veces en el fondo mutante. Esta inducción está directamente relacionada con la señal de auxina en raíz (Brady et al., 2003), lo que permite corroborar que el incremento de la respuesta a auxinas se traduce a los siguientes estadios de la ruta en el mutante *fip1-1*. Se ha descrito la proteína ERA1 como regulador

directo de la expresión de *ABI3* en raíces de Arabidopsis (Brady et al., 2003). Sin embargo, no se ha identificado ninguna alteración en la expresión o el procesamiento del ARN mensajero de este gen en el fondo mutante, lo que apunta a que la expresión de *ABI3* podría estar controlada a través de otros mecanismos aún por determinar.

*ABI3* se expresa en tejidos quiescentes (Parcy et al., 1994; Rohde et al., 1999) y, entre otras funciones, se le ha atribuido la modulación de la iniciación de PRL a través de la respuesta a auxina (Brady et al., 2003). Dado que la deslocalización de la respuesta a auxina se da a lo largo de toda la raíz, es de suponer que este evento es anterior y, por lo tanto, inductor, de los elevados niveles de *ABI3* en el fondo mutante. Por otro lado, y dado que se ha descrito a este gen como un modulador que no es esencial en la formación de RL (Brady et al., 2003), se puede deducir que la sobreexpresión de *ABI3* no es el único responsable del fenotipo radicular de *fip1-1*. No se descarta, sin embargo, que haya un efecto cooperativo entre *ABI3* y otros efectores de la señal de auxinas, por lo que deberá analizarse el fenotipo del doble mutante *fip1-1/abi3-1*

### 3.2.3. Desarrollo del PRL y elongación de la RL

El mutante *fip1-1* no sólo se ve reducido el número de PRL iniciados, si no que aquellos que logran realizar los primeros pasos de su desarrollo se ven arrestados mayoritariamente en el estadio IV. Estos resultados apoyan las publicaciones más recientes, en las que se propone que los procesos de iniciación y emergencia de los PRL son independientes (Benkova et al., 2003; Diteglou et al., 2008). Así, *fip1-1* vería alterada la formación de PRL en dos fases diferentes del proceso: en la especificación y en la emergencia.

La elongación del PRL se regula principalmente a través del gradiente de auxinas, citoquininas y ABA (Benková et al., 2003; Okushima et al., 2007; Bhalerao et al., 2007; Swarup et al., 2008; Bielach et al., 2012; Chen et al., 2012). Por una parte, la desregulación de la respuesta a auxinas podría afectar a la emergencia de PRL de forma paralela a la iniciación, por lo que se han estudiado las rutas descritas en publicaciones anteriores. Se ha propuesto que los transportadores **PIN1** y **AUX1** podrían ser responsables de la respuesta como retroalimentadores (Diteglou et al., 2008; Laskowski et al., 2008). Sin embargo, el mutante *fip1-1* no presenta diferencias en la expresión de los marcadores *pAUX1:YFP* en primordios ni *pPIN1:GFP* en el RAM. No se descarta que *PIN1* se encuentre afectado únicamente en los PRL, así como que haya cambios demasiado sutiles en la presencia de *AUX1* como para que sea posible advertir diferencias cualitativas. Tampoco se encuentran cambios en la expresión o procesamiento postranscripcional de estos genes en el fondo mutante, por lo que parece que el defecto en la emergencia de PRL se encuentra mayoritariamente afectado a nivel de respuesta.

Por otro lado, el desbalance en la respuesta a auxinas observada en *fip1-1* podría estar modificando la actividad de **LAX3** tal y como proponen Swarup y colaboradores (2008). *LAX3* regula la expresión dependiente de auxina de un grupo de enzimas remodeladoras de pared celular (CWR) en las células que rodean al primordio (Cosgrove, 2000; Marín-Rodríguez et al., 2002; Vissenberg et al., 2005; Wen et al., 2006). En el mutante *fip1* se han encontrado diversos cambios en la expresión y la distribución de sitios de corte y poliadenilación de numerosos genes relacionados con la remodelación de la pared celular,

lo que sugiere que estos cambios de expresión (dependientes de LAX3) y postranscripcionales en enzimas remodeladoras podrán bloquear la emergencia de los primordios. Sin embargo, no se han detectado eventos de regulación transcripcional o post-transcripcional en el gen *LAX3*. No obstante, no es posible descartar esta hipótesis ya que la regulación de la expresión podría darse a nivel de determinados tipos celulares, tal y como proponen publicaciones anteriores (Wu et al., 2011; Shen et al., 2011), y los resultados podrían verse enmascarados en el análisis de RNA a nivel de todo el sistema radicular. Así, y dado que la expresión de *LAX3* depende de PIN3 (Palme y Teale, 2013), sería necesario realizar un análisis de líneas marcadoras para este transportador que permitiera determinar si la deslocalización de la señal de auxinas en el PRL en desarrollo podría estar afectando a la distribución de *LAX3*. Idealmente, para determinar si modificaciones de APA en *LAX3* y *PIN3* regulan estos procesos se debería llevar a cabo un análisis de enriquecimiento celular mediante *cell sorting* y un posterior análisis de PATseq.

Otro de los efectores de la señal de auxina desregulado en *fip1-1* es **IAA6/SHY2**, que está reprimido más de 3 veces en el fondo mutante. Su expresión depende del equilibrio entre distintas rutas de señalización hormonal (citoquinina y auxina) y su mutación de ganancia de función inhibe la emergencia de los PRL (Goh et al, 2013). Además, SHY2 participa en la expresión de enzimas remodeladoras de la pared en la endodermis, lo que permite que la relajación de la pared de las células adyacentes al primordio se produzcan adecuadamente (Vermeer et al., 2014). Por otro lado, Dello Iorio y colaboradores publicaron en 2007 y 2010 resultados que vinculan la actividad de SHY2 con el gen de respuesta a citoquininas *ARR1*, a su vez dependiente de *SCR* y, por consiguiente, de la distribución de auxinas (Moubayidin et al., 2013). La suma del efecto de estas rutas de regulación conlleva la baja expresión de *SHY2* observada en *fip1-1* y ésta, a su vez, se traduce en un defecto en el desarrollo de los PRL. ¿Como se reprime SHY2 en *fip1*? Es posible que se reprima a través del módulo SLR/ARF7/ARF19 (Goh et al, 2013) que está activado en el mutante *fip1*. Sin embargo, a la fecha, no podemos descartar la activación a través de otras vías.

Por otro lado, se ha observado que el defecto en el desarrollo de los PRL es compensado en el mutante *shy2* por una iniciación masiva de PRL en respuesta a auxinas vía activación de la expresión de *LBD16* vía *SLR/ARF7/ARF19* (Goh et al., 2013). Este proceso no se aprecia en *fip1-1* debido a que este mutante tiene afectada la iniciación de los primordios a múltiples niveles, incluida la especificación, por lo que no sería capaz de compensar los defectos de desarrollo aumentando la iniciación.

De forma paralela, se han descrito numerosas evidencias del papel regulador de la auxina a nivel de la regulación mecánico-hidráulica (Ditenglou et al., 2008; Laskowski et al., 2008; Péret et al., 2012). Así, la alteración de los mecanismos de respuesta a auxinas podrían estar impidiendo la correcta acumulación de aquaporinas y, por lo tanto, impidiendo las deformaciones celulares necesarias para el desarrollo del PRL (Péret et al., 2012). Dado el elevado número de genes desregulados en *fip1-1* relacionados con el estrés hídrico, no se descarta que este mutante se vea afectado en la acumulación local de agua que facilita la emergencia de la RL.

Llegados a este punto del análisis no se puede pasar por alto que *fip1-1* presenta una acumulación de primordios en estadio IV de desarrollo. Esta fase de desarrollo implica superar un punto de control clave en la emergencia de RL: La ruptura de la Banda de Caspary (Alassimone et al., 2010). Publicaciones recientes han identificado algunos de los

genes responsables de la formación y el mantenimiento de esta barrera apoplástica (Ropollo et al., 2011). Entre estos genes destaca la familia **CASP** (**CASPARIAN STRIP MEMBRANE DOMAIN PROTEINS**), que codifican una serie de proteínas transmembrana responsables de la restricción de la difusión de proteínas, además de participar en la formación de la Banda de Caspary favoreciendo la remodelación de la pared celular y el depósito de lignina (Ropollo et al., 2011; Lee et al., 2013). No se han detectado diferencias significativas ni en la expresión ni en la selección de PAS de los genes que participan en el proceso en el fondo mutante *fip1-1*. Sin embargo, debido al interés en este proceso, se han visualizado y analizado de forma manual mediante el visor IGV las lecturas de PATSeq obtenidas para los genes implicados y se han podido identificar evidencias de una posible regulación de su expresión por APA (Anexo: Figuras 13-15). El hecho de que estos eventos de APA hayan quedado fuera del análisis estadístico podría ser consecuencia de la selección de PAS específicos de tejido, así como del modo en el que se realiza el análisis. El protocolo DEXSeq compara la frecuencia de secuencias alineadas en unas coordenadas concretas del genoma de Arabidopsis. Sin embargo, no tiene en cuenta la acumulación de los extremos 5' de esas secuencias (correspondiente al punto de corte y poliadenilación). La visualización del alineamiento, sin embargo, ha permitido identificar posibles diferencias en la selección de PAS. Así, se observa una tendencia a seleccionar PAS distales en el *fip1-1* en los genes *CASP1*, *SGN3*, *ESB1*, *LOTR1* y *MYB36*.

Estos genes muestran un uso de PAS distales en el 3'UTR. Aunque no se sabe la consecuencia de este cambio, es posible que se incrementara la acumulación de estas enzimas o se expresaran en nuevos tipos celulares, generando una banda de Caspary más rígida que impidiese la emergencia de los PRL. Esta hipótesis es consistente con los resultados obtenidos de la observación de los mutantes de los genes implicados, cuya deposición de lignina es deslocalizada e irregular. Además, los mutantes *casp1*, *casp3* y *esb1* presentan sobreproducción de lignina, así como aumento de la presencia de suberina en estadios tempranos del desarrollo. Por su parte el mutante *sgn3* es extremadamente sensible a cambios ambientales y es incapaz de compensar la pérdida del depósito de lignina mediante suberización (Hosmani et al., 2013; Pfister et al., 2014). Será necesario realizar análisis de la deposición de lignina y suberina en los fondos *fip1-1* y control para determinar posibles defectos que explicaran la acumulación de PRL en estadio IV.

### 3.3. Caracterización fenotípica de *fip1-1*: Raíz principal

El mutante *fip1-1* presenta un retraso en el crecimiento de su raíz principal durante los primeros 10 días de crecimiento. Se ha descartado que este retraso puede derivar de un retraso en la germinación, lo que indica que las diferencias observadas se deben a problemas de desarrollo. El crecimiento de la raíz principal es el resultado de dos procesos: multiplicación de las células meristemáticas y posterior elongación (Beemster et al., 2003). Se ha podido relacionar las diferencias en el crecimiento de la raíz principal con un aumento de la longitud del meristemo radicular apical (RAM) tanto en micras como en número de células en estado de división. Sin embargo, las diferencias en la longitud del RAM en ese mismo periodo son más acusadas, de lo que se puede deducir que la plántula *fip1-1* recupera la longitud de su raíz principal aumentando la capacidad proliferativa de su meristemo. Sin embargo, la expresión del marcador *pCYCB1;1:GFP* se ve reducida en el

fondo mutante, lo que podría sugerir que *fip1-1* ve acelerado su paso por las fases G2/M en la progresión del ciclo de división celular.

La actividad proliferativa del sistema radicular de *Arabidopsis* se regula a través del balance de diferentes fitohormonas, entre las que destaca el efecto antagónico de auxinas y citoquininas (Dello Iorio et al., 2007; Pernisová et al., 2011; Vanstraelen and Benková, 2012; El-Showk et al., 2013). El aumento de longitud del meristemo en el fondo mutante podría estar apuntando a que el equilibrio auxinas/citoquininas se encuentra desplazado en *fip1-1*. Como se ha discutido anteriormente, el mutante *fip1-1* presenta una desregulación de la respuesta a auxinas a lo largo de la raíz principal. Además, se han detectado cambios de expresión, así como en la distribución de PAS de numerosos genes relacionados con la respuesta a citoquininas, lo que podría estar indicando alteraciones de las rutas de regulación que dependen de ellas. A continuación se analizan los cambios observados en la expresión de genes clave para este proceso en el fondo mutante *fip1-1*.

En el ápice radicular, donde la señalización por auxinas es máxima, se promueve la proliferación del centro quiescente (Dello Iorio et al., 2007). Se realizaron una serie de observaciones preliminares que revelaron que no hay diferencias significativas en la expresión de PIN1 y PIN3, dos de los principales transportadores acropétalos. Con los datos obtenidos no es posible determinar si el equilibrio auxinas/citoquininas se encuentra desplazado en el fondo mutante ni apuntar a una causa de este posible desplazamiento. Se prevé realizar próximamente una descripción detallada de las señales meristemáticas en el mutante *fip1-1* con el objeto de identificar el proceso de señalización celular alterado.

Uno de los factores de transcripción fundamentales en el desarrollo radicular es **WOX5**, responsable del mantenimiento de las células adyacentes al CQ, así como de prevenir su división (Sarkar et al., 2007; Forzani et al., 2014). El mutante *fip1-1* experimenta una drástica reducción de la expresión del marcador *pWOX5:GFP*. En lo que a la distribución de PAS se refiere, apenas se han obtenido lecturas correspondientes a este mensajero en nuestros análisis. Esto podría deberse a su expresión localizada en células que suponen una aportación mínima al tejido radicular. Estos tipos celulares, además, co-localizan con el patrón de expresión observado de *FIP1*, por lo que no se descarta que la expresión de *WOX5* se regule mediante APA.

Se ha descrito que la expresión de *WOX5* se induce por el sistema SCR/SHR (Sarkar et al., 2007). No se han detectado cambios de expresión ni APA en estos genes, aunque el limitado número de lecturas de nuevo permite especular con la posibilidad de que estos cambios no se hayan detectado por limitaciones de la técnica (Anexo: Figura 16). Esta hipótesis es consistente con la reducción de la expresión del marcador *pSCR:GFP* en la endodermis de *fip1-1*.

Otro de los mecanismos reguladores de la expresión de *WOX5* implica un proceso de retroalimentación negativa entre ésta y **AXR3/IAA17** en el RAM (Tian et al., 2014). El mutante de ganancia de función *axr3-1* experimenta un aumento de la respuesta a auxinas en el CQ, así como una disminución en las células de la columela, lo que se traduce en un aumento de la intensidad y el área de expresión de *WOX5*. Por su parte, el mutante de pérdida de función produce represión de su transcripción mediada por proteínas ARF. En este contexto, una hipotética represión de *AXR3* vía APA en el mutante *fip1-1* podría influir en la expresión de *WOX5*.

A medida que la raíz va creciendo y las células meristemáticas se alejan del ápice radicular el equilibrio entre auxinas y citoquininas se desplaza, lo que dispara los mecanismos de diferenciación celular (Dello loio *et al.*, 2007). De forma paralela, se ha observado que las células meristemáticas de *fip1-1* que han entrado en la zona de transición no son capaces de elongar correctamente en el mutante. Así, la pérdida en la capacidad de crecimiento de la raíz principal podría explicarse por los defectos de elongación observados. Los resultados obtenidos apuntan a que el mutante trata de compensar este defecto de elongación aumentando su tasa de división y, por tanto, la longitud del meristemo desde el centro quiescente a la zona de transición.

No se ha detectado APA ni cambios de expresión en los genes descritos como reguladores de este proceso, por lo que se puede sugerir que se deba al desajuste hormonal. Sin embargo, no se puede descartar que las alteraciones observadas en la expresión de genes relacionados con formación de la pared celular influyan en este proceso. Así mismo, se han identificado casos de APA en algunos genes que participan en el proceso de elongación mediada por auxinas. Uno de los casos más interesantes es el de **SGT1** (Anexo: Figura 17), que presenta un PAS proximal alternativo en el fondo *fip1-1*. SGT1 es una glicosiltransferasa que se ha relacionado con los procesos de remodelación de la pared celular y con el crecimiento radicular mediado por auxinas (Gray *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). Su mutación provoca alteraciones en el proceso de elongación que se traducen en raíces y rosetas de menor tamaño que los del fondo salvaje (Saito *et al.*, 2014), por lo que la producción de una isoforma larga en el fondo *fip1-1* podría estar afectando el desarrollo radicular.

En conjunto, los resultados de la caracterización del sistema radicular han revelado alteraciones en la señalización hormonal de *fip1-1* que pueden explicar el fenotipo mutante, al menos en una buena parte. Gracias a la deslocalización de los marcadores de respuesta a auxinas y al aparente desplazamiento del equilibrio auxinas/citoquininas en el RAM, se ha observado que hay procesos de señalización celular alterados en el mutante. Así, es posible afirmar que los eventos de poliadenilación alternativa que sufre *fip1-1* provocan alteraciones de la señalización y éstas, a su vez, defectos en el desarrollo.

## 4. Respuesta a estrés

El mutante *fip1-1* presenta desregulación y APA de numerosos genes relacionados con la respuesta a estrés abiótico, así como con la señalización por ABA, una de las fitohormonas clave en la inducción de dichas respuestas. Se ha testado la tolerancia del mutante a algunos de estos estreses a través del análisis del desarrollo de su sistema radicular y se ha detectado que su respuesta es más eficiente en algunos aspectos. A continuación se discutirán los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos.

### 4.1 Estrés salino

La elevada salinidad es un problema agronómico de gran relevancia que causa daños en la planta, entre otros, por estrés osmótico y por exceso de iones de sodio (Flowers et al., 1997; Munns, 2002; Xiong y Zhu, 2002). El cloruro de sodio activa cambios de expresión génica mediados en parte por la fitohormona ABA (Zhu, 2002; Fujita et al., 2011) que producen inhibición del crecimiento (Finkelstein y Rock, 2002; Achard et al., 2006), así como una respuesta que regula la apertura estomática (Nemhauser et al., 2006; Huang et al., 2008). A continuación se analizará la respuesta de los fondos genéticos control y *fip1-1* al tratamiento de estrés salino, así como la distribución de PAS en dichas condiciones. Dado el elevado porcentaje de genes regulados por APA en estas condiciones en ambos fondos genéticos se comentará también la implicación de ésta en la respuesta a salinidad.

#### 4.1.1 APA inducida por estrés salino en el sistema radicular

##### *Distribución de PAS en la raíz del fondo genético control como respuesta a estrés salino*

La alteración masiva de selección de PAS en condiciones de estrés salino indica la existencia de un nuevo nivel de regulación de la respuesta que no se ha estudiado hasta la fecha. Así, hemos podido observar que las plántulas sometidas al tratamiento con cloruro de sodio desplazan la selección de PAS para favorecer el uso de aquellos situados en la región codificante y el extremo 5'UTR en detrimento de los localizados en intrones. Esto podría estar indicando una disminución de la degradación de mensajeros vía NMD, que es consistente con los resultados publicados por Shaul y colaboradores en 2005, donde mostraban una inhibición de este sistema de control de calidad en condiciones de estrés.

En el caso de los PAS localizados en el CDS y 5'UTR, es de esperar que los transcritos sean degradados a través del sistema NSD entre otros (Frismeyer et al., 2002; Akimitsu et al., 2007; Hogg y Goff, 2010; Hwuang y Maquat, 2011). Sin embargo, entre ellos, destacan algunos genes de respuesta a estrés cuya actividad se regula mediante *splicing* alternativo y que podrían ser constitutivamente activos en las hipotéticas formas cortas producidas como consecuencia de la poliadenilación del CDS.

### *Distribución de PAS en la raíz del fondo genético *fip1-1* como respuesta a estrés salino*

El mutante *fip1-1* apenas sufre alteraciones en la distribución general de PAS como respuesta al tratamiento. Dada la modificación del uso de todas las regiones genómicas observada en el fondo genético control, es interesante recalcar que el fondo mutante sólo aumenta ligeramente el uso de PAS situados en CDS e intrones. Estos resultados evidencian la participación de la proteína FIP1 en la regulación de la expresión génica que media la respuesta a estrés salino.

Entre los genes que experimentan APA cuando *fip1-1* es sometido a estrés salino destacan aquellos relacionados con la señalización por ABA y el distintos aspectos clave del desarrollo radicular. Estos cambios de expresión de genes maestros desencadenarían una serie de cascadas de señalización que posiblemente serían responsables de la tolerancia del mutante al tratamiento. Para determinar los genes responsables de esta tolerancia se han estudiado los genes regulados por APA en ambos fondos genéticos como respuesta al estrés. Es de esperar que entre los genes comunes se encuentren aquellos responsables de la respuesta primaria, mientras que los exclusivos de *fip1-1* podrían explicar la tolerancia observada en el mutante. A continuación se analizan los eventos de APA identificados y su posible implicación en la respuesta al tratamiento.

### *Implicación de la regulación por APA en la respuesta a estrés salino*

#### Rutas de señalización por ABA: Familia ABF/AREB

Uno de los elementos clave en la respuesta a ABA es la familia de factores de transcripción *ABA-RESPONSE ELEMENT BINDING FACTOR (ABF/AREB)*. Más concretamente, *ABF2*, *ABF3* y *ABF4* son reguladores clave de la respuesta a ABA en condiciones de estrés hídrico, osmótico y salino. Su función es cooperativa y comparten algunas dianas, aunque se han identificado algunos roles específicos (Fujita et al., 2005; Yoshida et al., 2010). Así, *ABF2/AREB1* se ha relacionado específicamente con la respuesta a estrés hídrico y osmótico (Kim et al., 2004; Fujita et al., 2005; Yoshida et al., 2015). Por su parte, *ABF3* es más efectivo que sus homólogos en procesos como el crecimiento apical o la respuesta a ABA (Yoshida et al., 2010).

La actividad de ***ABF2*** se regula mediante procesamiento alternativo del mensajero, siendo la forma activa aquella que mantiene el primero y el último de los dominios conservados propios de la familia. La sobreexpresión de esta forma activa produce hipersensibilidad a ABA y tolerancia a sequía (Fujita et al., 2005). Además, estos autores observaron que el extremo N-terminal de la proteína actúa como activador transcripcional incluso en ausencia del dominio de unión a ADN, localizado en el C-terminal. Así, esta proteína delecionada es capaz de activar la expresión de numerosos genes de respuesta a ABA en ausencia de ésta y confiere a la planta tolerancia a estrés hídrico. En condiciones de estrés salino, *Arabidopsis* desplaza la selección de PAS y da lugar a dos nuevos transcritos de *ABF2* que sólo contienen los primeros 130 y 306 nucleótidos del CDS respectivamente (Anexo: Figura 22). El fragmento activador identificado por Fujita y colaboradores (2005) comprende los primeros 61 aminoácidos, por lo que es plausible pensar que estos transcritos específicos de estrés salino podrían dar lugar a activadores transcripcionales constitutivos.

Estos nuevos PAS aparecen como respuesta al estrés salino en el fondo genético control. En *fip1-1*, sin embargo, su presencia es minoritaria, pero se ve incrementada hasta 3 veces en las raíces sometidas al tratamiento por sal. Estos resultados podrían estar apuntando a que la regulación de *ABF2* vía APA es específica de la respuesta a estrés, tal y como proponen Fujita y colaboradores (2005), y parcialmente dependiente de la actividad de FIP1. Así, el desequilibrio originado en el mutante *fip1-1* puede promover su uso en pequeña medida, lo que podría contribuir a la inhibición del crecimiento observada en el mutante. En condiciones de estrés salino, el mutante estaría promoviendo el uso de los PAS localizados en el exón 1 por acción cooperativa de distintas proteínas del complejo entre las que se encuentra FIP1. Así, *fip1-1* generaría la forma constitutivamente activa de *ABF2* en respuesta al estrés con menos eficiencia de lo que lo hace el fondo genético control.

Por otro lado, también se ha observado APA en el gen ***ABF3*** (Anexo: Figura 22). En este caso, la selección de PAS en el exón 2 del mensajero inmaduro en condiciones de estrés en el fondo control está presente también en las muestras de *fip1-1*, y en su caso es independientemente del tratamiento. En esta coyuntura, es factible proponer que FIP1 inhibe la selección del PAS de respuesta a estrés localizado en el exón 2, tal vez mediante promoción del uso de alguno de los sitios de corte localizados en el extremo 3'UTR, cuyo análisis se ve dificultado por la proximidad el gen contiguo. Además, se ha identificado un PAS en el exón 3 exclusivo de las raíces sometidas a estrés salino común a ambos fondos genéticos. Este PAS podría estar regulado por FIP1, ya que su uso es mayor en el fondo mutante.

El mutante *fip1-1* experimenta una acumulación de transcritos de genes regulados por la ruta *ABF*: *AIA1*, *RD29B*, *AIL1* y *RAB18*. Todos ellos se expresan en plantas transgénicas sobreexpresoras de la forma activa de *ABF2* en ausencia de ABA, aunque su inducción es mucho menor que la obtenida en plantas sobreexpresoras de la forma inactiva en presencia de ABA (con excepción de *AIA1*) (Fujita et al., 2005). *AIA1* y *RDB29B* se han propuesto como dianas directas de *ABF2* (Fujita et al., 2005). Por otro lado, se ha observado que la expresión de *RD29B*, *AIL1* y *RAB18* es mayoritariamente regulada vía *ABF3* (Yoshida et al., 2010). Además, se ha observado que *ABF3* tiene un antagonista en la regulación de la expresión de *RD29B*: *NAC072* (Li et al., 2016). Es interesante remarcar que la expresión de *NAC072* está reprimida en *fip1-1*. Dada la regulación de *ABF2* por procesamiento alternativo, es posible proponer que el uso de PAS propios de respuesta a estrés en *fip1-1* podría estar generando proteínas *ABF2* y *ABF3* constitutivamente activas que explicaran, al menos en parte, la sobreexpresión de los genes de respuesta a ABA.

Otro de los casos de APA más interesantes entre los ocurridos como respuesta a estrés salino en la raíz es el de ***NPX1*** (Anexo: Figura 24), un regulador negativo de la transcripción de diversos genes de respuesta a ABA y cuya sobreexpresión provoca insensibilidad a ABA e hipersensibilidad a estrés hídrico (Kim et al., 2009). El perfil de PAS en condiciones de crecimiento óptimas y en estrés salino muestra una colección de transcritos entre las que destacan PAS localizados en los exones 5 y 6 en el medio de cultivo control y numerosos PAS en el exón 7 en el medio suplementado con sal. En *fip1-1*, por otra parte, se observa mayor simplicidad en la selección de PAS localizados en el exón 7, así como una tendencia a seleccionar PAS distales en el 3'UTR. Este perfil podría favorecer la degradación del mensajero por medio del sistema NSD o miRNAs, lo que explicaría la sobreexpresión de

genes de respuesta a ABA en el fondo mutante. En conjunto, la complejidad de esta colección de PAS dificulta una predicción de la traducción de este gen, y apunta a que su regulación está mediada por APA. Por otro lado, la aparición de multitud de eventos de APA en el mismo gen podría estar apuntando a que este nivel de regulación modula la expresión de *NPX1* a través de la selección de distintos PAS en distintos tipos celulares, como se propone en la bibliografía (Wu et al., 2011; Shen et al., 2011).

#### Rutas de señalización por ABA: ABIs y CPKs

Otro de los casos de APA identificados afecta al regulador positivo **CDPK6/CPK3** (Anexo: Figura 25), que están reprimidos en ausencia de ABA por ABI1 y ABI2 (Geiger et al., 2010) y relacionado con la aclimatación a largo plazo mediante fosforilación de distintas proteínas en una ruta independiente del sistema MAPK (Mehlmer et al., 2010). Estos autores observaron que la actividad de CPK3 es constitutiva tanto en raíz como en parte aérea y que el mutante sobreexpresor presenta tolerancia a estrés salino.

Se han identificado dos PAS localizados en el CDS de los transcritos de *CDPK6* producidos bajo estrés salino en plantas control. El mutante *fip1-1* no experimenta niveles significativos de poliadenilación en el CDS, pero sí experimenta APA en el extremo 3'UTR. Así, *fip1-1* presenta tendencia a utilizar PAS distales en medio estándar con respecto al fondo genético control. Además, en condiciones de estrés salino selecciona un PAS localizado en una posición más distal, con lo que el mensajero es aún más largo que en condiciones de crecimiento óptimas. Estos fenómenos de APA podrían conllevar degradación del mensajero o, en caso de que éste pudiera traducirse, darían lugar a distintas proteínas truncadas. Estas proteínas carecerían de uno o más dominios EF, necesarios para la regulación de su actividad (Geiger et al., 2010). De acuerdo con esta hipótesis, la proteína truncada *CDPK6* estaría constitutivamente activa. Se desconoce la función de esta proteína en el sistema radicular de *Arabidopsis*. Sin embargo, se ha relacionado con el cierre estomático mediado por ABA, ya que es fundamental para la activación de canales de calcio en las células de guarda (Mori et al., 2006). Además, se ha observado que *CDPK6* es necesaria para la activación de los canales de potasio tipo TPK1 en las vacuolas de las células foliares (Latz et al., 2014). En conjunto, estos resultados apuntan a que *CDPK6* podría tener un papel en la respuesta a estrés salino en el sistema radicular y que la APA podría jugar un papel en la regulación de su expresión y/o actividad.

#### Otras rutas de señalización afectadas por APA

**AHK3** (*ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3*) es un receptor de citoquininas expresado en las células de la zona de transición del RAM de *Arabidopsis* responsable de la activación de los genes *ARR1* (*ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 1*) y *ARR12* (Hwang et al., 2012), que a su vez promueven la transcripción del inhibidor de la señal de auxinas *SHY2* (*SHORT HYPOCOTYL 2*) (Tian et al., 2002; Dello Iorio et al., 2008). *AHK3* presenta diversos PAS alternativos presentes en el fondo control bajo tratamiento salino, así como en *fip1-1*, independientemente del tratamiento (Anexo: Figura 26). Además, el fondo mutante carece de PAS proximales en el extremo 3'UTR. Sin embargo, no se ha detectado desregulación de los genes inducidos por *AHK3* en *fip1-1*, lo que dificulta establecer una

conexión entre la APA y la actividad de la proteína. Por otro lado, se ha identificado un PAS en el último exón que aparece en ambos fondos genéticos, pero sólo en presencia de estrés salino. La selección de este PAS parece ser independiente de la actividad de FIP1, lo que evidencia la formación de distintos complejos de poliadenilación formados por una combinación concreta de las proteínas de la maquinaria, tal y como proponen Forbes y colaboradores (2006). En conjunto, la complejidad en la selección de PAS apunta a que la poliadenilación alternativa podría ser un método de regulación clave en la expresión de *AHK3*.

Otra de las categorías funcionales sobrerrepresentadas entre los casos de APA en el sistema radicular como respuesta a estrés salino es el desarrollo radicular. Se puede deducir que estos PAS podrían estar implicados en la inhibición del desarrollo de la raíz principal de una forma directa o indirecta tras el estímulo producido por el cloruro sódico. Uno de los más notables es la aparición de múltiples PAS en los exones 8 y 12 de **ASA1** (ANTHRANILATE SYNTHASE 1) (Anexo: Figura 27). Dado que la proteína ASA1 es responsable de la inhibición del crecimiento radicular vía etileno (Mao et al., 2016) y que es necesario para la activación de las células fundadoras de PRL (López-Bucio et al., 2005), es plausible pensar que la selección de PAS en el CDS podría ser un medio para inhibir la actividad de ASA1 en condiciones de estrés salino.

#### 4.1.2 APA inducida por estrés salino en la parte aérea

En lo que a la parte aérea se refiere, la desviación de la distribución de PAS se asemeja a la observada en raíz, lo que evidencia el efecto del estrés salino en la regulación de la expresión vía PAS. De nuevo, debido al pequeño número de lecturas obtenidas en el experimento PATSeq, se han identificado menos de 200 casos de APA, por lo que su análisis es únicamente orientativo. Algunos de los genes relacionados con la respuesta a sal afectados por APA son **AHA1** (Anexo: Figura 28), que participa en la regulación de la apertura estomática (Yamauchi et al., 2016) y **LOS2** (Anexo: Figura 29), relacionado con la respuesta a ABA y la adquisición de pluripotencia en las raíces laterales (Kang et al., 2013).

## 4.2 Ayuno de nitrógeno

La disponibilidad de nitrógeno es uno de los factores determinantes en el crecimiento vegetativo y la productividad. Aunque las plantas son capaces de absorber nitrógeno orgánico e inorgánico, las formas inorgánicas son las más ampliamente distribuidas en los suelos. Su disponibilidad generalmente es baja, aunque depende de factores como el percolado y la actividad del microbioma del suelo (Jackson y Caldwell, 1993; Miller y Cramer, 2004). Debido a las estimaciones del crecimiento demográfico uno de los nuevos retos de la agricultura sostenible es aumentar la producción de los cultivos limitando el uso de fertilizantes nitrogenados, ya que su producción es el proceso energéticamente más costoso de los asociados con la agricultura moderna (Tilman et al., 2002; Good et al., 2004; Gross, 2012).

Para hacer frente a la escasez de nitrógeno, algunas plantas han desarrollado una serie de mecanismos y respuestas que mejoran su eficiencia de su captación (Good et al., 2004; Hermans et al., 2006; Nacry et al., 2013). Nacry y colaboradores (2013) agrupan estas respuestas en 3 clases: i) Absorción de nitrógeno, ii) plasticidad de la arquitectura radicular y iii) modulación del crecimiento de la parte aérea. Los dos primeros tienen el objetivo de mejorar la eficiencia en la captación, mientras que el último reduce la demanda de nitrógeno de la planta.

La respuesta fisiológica observada en las plántulas control ante el ayuno de nitrógeno es la esperada ante una limitación severa de nitrógeno en el medio (Araya et al., 2015): reducción de la longitud de la raíz principal y del número de raíces laterales emergidas. El mutante *fip1-1*, sin embargo, no ve reducida la capacidad de crecimiento de su raíz principal ni experimenta acumulación de antocianinas en los cotiledones. Estos resultados apuntan a que la regulación de la expresión génica vía APA juega un papel importante en la tolerancia al ayuno de nitrógeno, por lo que a continuación se pasan a analizar los perfiles de selección de PAS de las plantas control y mutante en respuesta al tratamiento.

### *Distribución de PAS en el fondo genético control como respuesta al ayuno de nitrógeno*

Tal y como se había observado en condiciones de estrés salino, el ayuno de nitratos provoca alteración en la distribución de PAS a lo largo del sistema radicular con aumento del uso del extremo 5'UTR y el CDS y disminución del uso de intrones. Este paralelismo entre ambas respuestas evidencia la importancia de este tipo de regulación postranscripcional de la expresión en respuesta a estrés abiótico. De nuevo, el perfil general apunta a cambios de la estabilidad de determinados mensajeros mediante el corte y poliadenilación de PAS situados aguas arriba del último exón, lo que podría afectar a la estabilidad de los mensajeros (Frismeyer et al., 2002; Akimitsu et al., 2007; Arciga-Reyes et al., 2006; Hogg y Goff, 2010; Hwuang y Maquat, 2011).

Entre los genes que experimentan regulación por APA en el fondo genético control como respuesta al ayuno de nitrógeno destacan categorías relacionadas con la respuesta a numerosos estímulos externos. La agrupación por categorías funcionales sólo aporta 4 genes implicados en la asimilación de nitratos. Sin embargo, se han identificado numerosos genes que participan en distintas rutas de regulación del desarrollo radicular, algunos de ellos relacionados con la respuesta a nitratos en el medio. Estos resultados apuntan a que

la selección de PAS no es específica de la sensibilidad o transporte de nitrógeno, si no de la respuesta. La posible implicación de la regulación vía APA en la señalización se discutirá de forma conjunta con los resultados obtenidos en *fip1-1*, con objeto de asociar la selección de PAS con la tolerancia al ayuno de nitrógeno.

#### *Distribución de PAS en el fondo genético *fip1-1* como respuesta al ayuno de nitrógeno*

La implicación de FIP en la respuesta al ayuno de nitrógeno se puede observar en la disminución de la frecuencia de uso de PAS localizados en intrones y extremos 5'UTR. Estos eventos de APA podrían marcar para degradación vía NMD numerosos transcritos (Arciga-Reyes et al., 2006; Hogg y Goff, 2010; Hwuang y Maquat, 2011). Por otro lado, y al igual que observamos en el fondo genético control, la agrupación por categorías funcionales de los genes que experimentan APA como respuesta al tratamiento, no arroja datos concluyentes en cuanto a la adquisición de nitrógeno. Estos resultados, de nuevo, apuntan a que la implicación de FIP1 en la tolerancia al ayuno de nitrógeno se relaciona con las rutas de respuesta y no con la adquisición del mismo.

#### *Implicación de la regulación por APA en la respuesta al ayuno de nitrógeno*

##### *FIP1*

Uno de los casos de APA más interesantes entre los observados en el tratamiento de ayuno de nitrógeno es el propio *FIP1* (Anexo: Figura 30). Mientras que la planta control en condiciones óptimas de crecimiento presenta 5 PAS bien definidos, en condiciones de ayuno de nitrógeno experimenta corte y poliadenilación en numerosos puntos de los exones 7 y 8. La representación de cada PAS es mínima, por lo que la mayoría de estas lecturas se han eliminado del análisis estadístico. Además, el PAS localizado en el intrón 7 en condiciones normales no se utiliza en ayuno de nitrógeno. En conjunto constituyen una evidencia de que la expresión de *FIP1* se regula mediante APA como respuesta a este estrés nutricional.

El mensajero *fip1-1*, por su parte, también experimenta corte y poliadenilación del exón 7 en condiciones control, aunque la colección de PAS es más amplia en las muestras sometidas a la deficiencia de N. Además, el PAS situado en el intrón 7 apenas cuenta con un par de lecturas, independientemente del medio de crecimiento. Algunos de los transcritos resultantes conservarían la región responsable de la unión a ARN (Forbes et al., 2006), lo que podría sustentar la hipótesis de que se produzcan múltiples transcritos funcionales de *FIP1* de Hunt y colaboradores (comunicación personal). Por otro lado, la variada colección de PAS observada en respuesta a estrés podría ser el resultado de una modulación de la expresión de *FIP1* a nivel celular. Así, las células de una región podrían activar su transcripción y, mediante expresión de formas con distintas regiones reguladoras, modular la traducción a nivel postranscripcional, como proponen Lianoglou y colaboradores (2013).

Por último, y dadas las diferencias en la distribución de PAS en *FIP1* en los fondos genético *fip1-1* y control, es posible afirmar que FIP1 participa en la regulación de su propia expresión en plántulas en este estadio de desarrollo, inhibiendo la selección de determinados PAS localizados en el CDS y probablemente promoviendo el uso del PAS

situado en el intrón 7. Dada la respuesta del mutante a los distintos tratamientos, este efecto podría resultar en la activación constitutiva de la respuesta a estreses abióticos, lo que podría explicar el retraso general en el crecimiento, así como la tolerancia observada.

### Ruta de señalización dependiente de auxinas

El estrés por ayuno de nitrógeno induce el uso de un PAS localizado en el exón 3 del receptor de auxinas **AFB3**, que es clave en el control de la densidad de raíces laterales en respuesta a la disponibilidad de nitratos (Vidal et al, 2010). Así, la inhibición de su expresión mediante APA en condiciones de ayuno podría explicar el descenso en el número de RL observada en el fondo control. En *fip1-1*, pese a que el número de lecturas de este PAS es menor del que se ha establecido como mínimo para llevar a cabo el análisis estadístico, se han encontrado evidencias de que podría usarse de forma minoritaria independientemente del medio de crecimiento (Anexo: Figura 31).

Por otro lado, se ha descrito que la expresión de *AFB3* se regula mediante el *miR939* (Vidal et al., 2013). Desafortunadamente, este gen se encuentra muy próximo a su contiguo en el extremo 3'UTR, lo que dificulta el análisis estadístico de las lecturas. Sin embargo, se han identificado alteración en la regulación por APA de otros genes implicados en esta ruta. Se ha observado que *AFB3* estimula la expresión del factor de transcripción *NAC4* en un mecanismo dependiente de la actividad del transportador de nitratos *NRT1.1*, que a su vez depende de la activación que ejerce *CIPK23*. Así, la acción conjunta de *AFB3*, *NRT1.1* y *CIPK23* induce la expresión de *NAC4* en las células del periciclo y estimula un aumento de densidad de las raíces laterales emergidas (Liu et al., 2002; Ho et al., 2009; Vidal et al., 2013; Vidal et al., 2014).

Se han detectado casos de regulación por APA en *NAC4* y *CIPK23* en el fondo mutante que evidencian el papel de la regulación por APA en la respuesta a nitratos. Por un lado, el perfil de sitios de poliadenilación de ***NAC4*** evidencia la elevada complejidad de este nivel de regulación (Anexo: Figura 32). En primer lugar, se ha observado que ambos fondos genéticos utilizan PAS exclusivos del medio completo que se localiza en el exón 2 (fondo genético control) y el intrón 2 (fondo genético *fip1-1*). La localización de este PAS es dependiente de *FIP1*, por lo que el mutante podría seleccionar un PAS inhibitorio alternativo que tendría el mismo efecto final. Estos transcritos serían degradados mediante los sistemas NMD y NSD (Frismeyer et al., 2002; Akimitsu et al., 2007; Hogg y Goff, 2010; Hwuang y Maquat, 2011), lo que supondría una inhibición de la expresión de *NAC4* en condiciones óptimas de crecimiento en ambos fondos genéticos. En condiciones de ayuno de nitrógeno, sin embargo, el desplazamiento de la maquinaria de poliadenilación al extremo 3'UTR activaría la expresión de *NAC4*, contribuyendo así a promover el desarrollo de RL con objeto de aumentar la superficie de absorción.

Además, se ha observado que el fondo mutante presenta PAS distales en el extremo 3'UTR con independencia del medio de crecimiento. Así, *fip1-1* podría estar generando mensajeros de *NAC4* con un extremo 3'UTR largo, que podrían ser objeto de degradación por miRNAs (Bartel et al., 2009; Sandberg et al., 2008; Ji et al., 2009; Lianoglou et al., 2013). Esta hipótesis es razonable dada la elevada implicación de la regulación vía miRNAs en la respuesta a la disponibilidad de nitratos (Vidal et al., 2010; Liang et al., 2012; Liang et al.,

2015; Nguyen et al., 2015).

Por otro lado, se ha observado que el mensajero de **CIPK23** presenta una elevada variabilidad en los PAS situados en el extremo 3'UTR, lo que da lugar a una colección de transcritos con un extremo corto (Anexo: Figura 33). Estos transcritos podrían evitar la degradación mediada por miRNAs, lo que induciría la expresión de *NAC4* en condiciones de estrés (Liu et al., 2003; Ho et al., 2009). Este efecto es independiente del fondo genético, por lo que FIP1 no interviene en su selección y, por tanto, no experimenta sobreexpresión de *NAC4*.

### Ruta de señalización dependiente etileno

Se han identificado casos de regulación por APA en algunos genes que participan en la señalización por etileno. Se han aportado evidencias de que la señalización por etileno es clave en la respuesta a una alta concentración de nitratos (Tian et al., 2009), pero poco se sabe de su efecto en condiciones de deficiencia. Por otro lado, trabajos previos han observado que la regulación postranscripcional de la expresión tiene un papel en la respuesta a etileno. En concreto, se sabe que el transductor de señal **EIN2** (**ETHYLENE-INSENSITIVE 2**), en presencia de etileno, es capaz de unirse al extremo 3'UTR de los mensajeros de *EFB1* (*EIN3 BINDING E-BOX1*) y *EFB2* y marcarlos para degradación (Li et al., 2015). Además, su extremo C-terminal es capaz de translocarse al núcleo, donde tiene una acción doble: Por un lado reprime la inhibición que ejercen EBF1/2 sobre determinados genes de respuesta a etileno, como es el caso de *EIN3* (An et al., 2010; Ju et al., 2012; Wen et al., 2012). Por otro lado, estabiliza la interacción de *EIN3* con otras proteínas coactivadoras de la respuesta directa a etileno (Ju et al., 2012; Wen et al., 2012; Chang et al., 2013). Se ha identificado selección de un nuevo PAS en *EIN2* en condiciones de estrés por ayuno de nitrógeno (Anexo: Figura 34). Este PAS está localizado en el primer tercio del exón 6 y está presente en el fondo genético *fip1-1* con independencia de las condiciones de crecimiento. Estos transcritos podrían ser degradados por el mecanismo NSD (Frismeyer et al., 2002; Akimitsu et al., 2007) o, en el caso de que fueran traducidos, dar lugar a una proteína EIN2 truncada que carecería del dominio de localización nuclear descrita por Alonso y colaboradores (1999), así como de los dominios de interacción con los receptores de la familia del etileno (Li et al., 2010).

Dado que el mutante *fip1-1* en medio completo selecciona este PAS se puede deducir que FIP1 participa en la selección del sitio de corte y poliadenilación de *EIN2*, aunque no se ha observado desregulación de los genes *EFB1/2* en el fondo mutante. Por otro lado, la actividad de EIN2 depende de diversas modificaciones postraduccionales que se dan en el extremo C-terminal (Brisson y Groth, 2010), lo que podría explicar las similitudes en la expresión de los genes *EFB*, por inhibición de la actividad de EIN2 en el fondo control.

Alternativamente, se han encontrado otros casos de APA en los genes de esta ruta de regulación. Se ha identificado un segundo caso de APA en el gen *EIN2* que implica la selección de un nuevo PAS en el último exón, en una región muy próxima al codón STOP. Ese PAS se presenta en condiciones de estrés por ayuno de nitratos, con independencia del fondo genético. Además, se ha detectado que el mutante *fip1-1* potencia el uso de un PAS distal en el extremo 3'UTR de **EIN3** (Anexo: Figura 35), aunque su uso vuelve a niveles

normales en ayuno de nitrógeno. En conjunto, estos resultados evidencian la importancia de la regulación vía APA en la señalización por etileno como respuesta al déficit de nitrógeno, aunque serán necesarias observaciones posteriores para determinar cuáles son los mecanismos subyacentes y cuál es el papel de FIP1 en el proceso.

En conjunto, estos resultados apuntan a que la regulación postranscripcional mediante poliadenilación alternativa juega un papel importante en las respuestas a numerosos estreses. En este trabajo hemos encontrado que la respuesta a salinidad y deficiencia de nitrógeno está parcialmente regulada por APA y que FIP1 juega un papel importante en esta regulación mediante la selección de PAS de genes implicados en las respuestas. Aunque es prematuro asignar esta función, es muy posible que FIP1 participe en la generación de nuevos transcriptomas a nivel de tejido y/o tipos celulares en respuestas a determinados estímulos ambientales o señales endógenas del desarrollo. Bajo esta premisa, es posible proponer que el fenotipo de *fip1-1* en condiciones normales de crecimiento podría ser consecuencia de la generación de un transcriptoma propio de respuesta a estrés, lo que permite asociar FIP1 con la selección de PAS propios del desarrollo en condiciones óptimas. Además, esta hipótesis encaja con la presunción de que FIP1 es promotor de transcriptomas propios de células en bajo estado de diferenciación, tal y como sugiere su patrón de expresión y la tendencia a seleccionar PAS proximales.

# **CONCLUSIONES**



# Conclusiones

- La regulación de la expresión génica vía poliadenilación alternativa (APA) participa en la modulación del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.
- FIP1 tiene un papel determinante en la selección de sitios de poliadenilación y su ausencia provoca APA en un conjunto de genes entre los que destacan el desarrollo radicular, la respuesta a la fitohormona ABA y el estrés salino.
- Los eventos de APA que sufre *fip1-1* provocan alteraciones en diferentes rutas de señalización celulares y éstas, a su vez, defectos en el desarrollo.
- La regulación de la expresión génica vía APA participa en la regulación de las respuestas al estrés inducido por salinidad y deficiencia de nitrógeno. La distribución de sitios de poliadenilación a lo largo de las distintas regiones genómicas (3'UTR, 5'UTR, CDS e intrones) se ve ampliamente alterada, lo que sugiere que la respuesta a estrés podría implicar diferentes mecanismos de control de calidad de los mensajeros.
- FIP1 juega un papel importante en la selección de sitios de poliadenilación de los genes implicados en la respuesta a salinidad y deficiencia de nitrógeno.

El patrón de expresión de *FIP1*, así como su tendencia a seleccionar PAS proximales permiten proponer que el fenotipo de *fip1-1* en condiciones estándar de crecimiento podría ser consecuencia de la generación de un transcriptoma propio de respuesta a estrés.



# **BIBLIOGRAFÍA**



# Bibliografía

- Ahmed, F., Benedito, V. A., & Zhao, P. X. (2011). Mining Functional Elements in Messenger RNAs: Overview, Challenges, and Perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 2(November), 84. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00084>
- Akimitsu, N., Tanaka, J., & Pelletier, J. (2007). Translation of nonSTOP mRNA is repressed post-initiation in mammalian cells. *The EMBO Journal*, 26(9), 2327–2338. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601679>
- Altamura, M. M. (2010). The Arabidopsis BET bromodomain factor GTE4 regulates the mitotic cell cycle. *Plant Signaling & Behavior*, 5(6), 677–680. Retrieved from [www.landesbioscience.com](http://www.landesbioscience.com)
- Anders, S., Reyes, A., & Huber, W. (2012). Detecting differential usage of exons from RNA-seq data. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.133744.111>
- Arciga-Reyes, L., Wootton, L., Kieffer, M., & Davies, B. (2006). UPF1 is required for nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and RNAi in Arabidopsis. *Plant Journal*, 47(3), 480–489. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2006.02802.x>
- Atkinson, J. A., Rasmussen, A., Traini, R., Voss, U., Sturrock, C., Mooney, S. J., ... Bennett, M. J. (2014). Branching Out in Roots: uncovering form, function and regulation. *Plant Physiology*, 166(2), 538–550. <https://doi.org/10.1104/pp.114.245423>
- Bandyopadhyay, A. (2009). Analysis of the Arabidopsis Polyadenylation Factors PAP1, CstF64 and CstF77 and their characteristic. Thesis.
- Barrada, A., Montané, M. H., Robaglia, C., & Menand, B. (2015). Spatial regulation of root growth: Placing the plant TOR pathway in a developmental perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 19671–19697. <https://doi.org/10.3390/ijms160819671>
- Belda-Palazon, B., Rodriguez, L., Fernandez, M. A., Castillo, M.-C., Anderson, E. A., Gao, C., ... Rodriguez, P. L. (2016). FYVE1/FREE1 Interacts with the PYL4 ABA Receptor and Mediates its Delivery to the Vacuolar Degradation Pathway. *The Plant Cell*, 4, tpc.00178.2016. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00178>
- Bell, S. A., & Hunt, A. G. (2010). The Arabidopsis ortholog of the 77kDa subunit of the cleavage stimulatory factor (AtCstF-77) involved in mRNA polyadenylation is an RNA-binding protein. *FEBS Letters*, 584(8), 1449–1454. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.007>
- Benfey, P. N. (2016). Defining the Path from Stem Cells to Differentiated Tissue (pp. 35–43). <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.12.002>
- Bhalerao, R. P., Eklöf, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M., & Sandberg, G. (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in Arabidopsis seedlings. *Plant Journal*, 29(3), 325–332. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01217.x>
- Bisson, M. M. A., & Groth, G. (2010). New insight in ethylene signaling: Autokinase activity of ETR1 modulates the interaction of receptors and EIN2. *Molecular Plant*, 3(5), 882–889. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq036>
- Brady, S. M., Sarkar, S. F., Bonetta, D., & McCourt, P. (2003). The ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root

development in Arabidopsis. *Plant Journal*, 34(1), 67–75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01707.x>

Bueso, E., Rodriguez, L., Lorenzo-Orts, L., Gonzalez-Guzman, M., Sayas, E., Muñoz-Bertomeu, J., ... Rodriguez, P. L. (2014). The single-subunit RING-type E3 ubiquitin ligase RSL1 targets PYL4 and PYR1 ABA receptors in plasma membrane to modulate abscisic acid signaling. *Plant Journal*, 80(6), 1057–1071. <https://doi.org/10.1111/tpj.12708>

Carol S. Lutz1, and A. M. (2012). Alternative mRNA polyadenylation in eucaryotes: an effective regulator of gene expression, 2(1), 23–31. <https://doi.org/10.1002/wrna.47>. Alternative

Carrari, F., Coll-Garcia, D., Schauer, N., Lytovchenko, A., Palacios-Rojas, N., Balbo, I., ... Fernie, A. R. (2005). Deficiency of a plastidial adenylate kinase in Arabidopsis results in elevated photosynthetic amino acid biosynthesis and enhanced growth. *Plant Physiology*, 137(1), 70–82. <https://doi.org/10.1104/pp.104.056143>

Chakrabarti, M., & Hunt, A. (2015). CPSF30 at the Interface of Alternative Polyadenylation and Cellular Signaling in Plants. *Biomolecules*, 5(2), 1151–1168. <https://doi.org/10.3390/biom5021151>

Chakrabarty, R., Banerjee, R., Chung, S.-M., Farman, M., Citovsky, V., Hogenhout, S. A., ... Goodin, M. (2007). pSITE Vectors for Stable Integration or Transient Expression of Autofluorescent Protein Fusions in Plants: Probing Nicotiana benthamiana- Virus Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(7), 740–750. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-7-0740>

Chakraborty, N., Sharma, P., Kanyuka, K., Pathak, R. R., Choudhury, D., Hooley, R., & Raghuram, N. (2015). G-protein  $\beta$ -subunit (GPA1) regulates stress, nitrate and phosphate response, flavonoid biosynthesis, fruit/seed development and substantially shares GCR1 regulation in *A. thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 89(6), 559–576. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0374-2>

Chakraborty, N., Sharma, P., Kanyuka, K., Pathak, R. R., Choudhury, D., Hooley, R., & Raghuram, N. (2015). G-protein  $\alpha$ -subunit (GPA1) regulates stress, nitrate and phosphate response, flavonoid biosynthesis, fruit/seed development and substantially shares GCR1 regulation in *A. thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 89(6), 559–576. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0374-2>

Chakraborty, N., Singh, N., Kaur, K., & Raghuram, N. (2015). G-protein Signaling Components GCR1 and GPA1 Mediate Responses to Multiple Abiotic Stresses in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1000. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01000>

Chang, L., Ramireddy, E., & Schmölling, T. (2013). Lateral root formation and growth of Arabidopsis is redundantly regulated by cytokinin metabolism and signalling genes. *Journal of Experimental Botany*, 64(16), 5021–5032. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert291>

Chen, C. Y. A., & Shyu, A. Bin. (2016). Emerging Themes in Regulation of Global mRNA Turnover in cis. *Trends in Biochemical Sciences*, xx, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.08.014>

Chen, H., Li, Z., & Xiong, L. (2012). A plant microRNA regulates the adaptation of roots to drought stress. *FEBS Letters*, 586(12), 1742–1747. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.013>

Chen, Q., Liu, Y., Maere, S., Lee, E., Van Isterdael, G., Xie, Z., ... Vanneste, S. (2015). A coherent transcriptional feed-forward motif model for mediating auxin-sensitive PIN3 expression during lateral root development. *Nature Communications*, 6, 8821. <https://doi.org/10.1038/ncomms9821>

Chen, T., Cui, P., & Xiong, L. (2015). The RNA-binding protein HOS5 and serine/arginine-rich proteins RS40 and RS41 participate in miRNA biogenesis in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 43(17), 8283–8298. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv751>

- Cui, P., Chen, T., Qin, T., Ding, F., Wang, Z., Chen, H., & Xiong, L. (2016). The RNA Polymerase II C-Terminal Domain Phosphatase-Like Protein FIERY2/CPL1 Interacts with eIF4AIII and Is Essential for Nonsense-Mediated mRNA Decay in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 28(3), 770–785. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00771>
- Cui, P., Chen, T., Qin, T., Ding, F., Wang, Z., Chen, H., & Xiong, L. (n.d.). The RNA Polymerase II C-Terminal Domain Phosphatase-Like Protein FIERY2/CPL1 Interacts with eIF4AIII and Is Essential for Nonsense-Mediated mRNA Decay in Arabidopsis[OPEN]. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00771>
- Cyrek, M., Fedak, H., Ciesielski, A., Guo, Y., Sliwa, A., Brzezniak, L., ... Swiezewski, S. (2016). Seed Dormancy in Arabidopsis Is Controlled by Alternative Polyadenylation of DOG1. *Plant Physiology*, 170(2), 947–55. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01483>
- Dautel, R., Wu, X. N., Heunemann, M., Schulze, W. X., & Harter, K. (2016). The Sensor Histidine Kinases AHK2 and AHK3 Proceed into Multiple Serine/Threonine/Tyrosine Phosphorylation Pathways in Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant*, 9(1), 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.10.002>
- De Rybel, B., Vassileva, V., Parizot, B., Demeulenaere, M., Grunewald, W., Audenaert, D., ... Beeckman, T. (2010). A novel Aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Current Biology*, 20(19), 1697–1706. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.007>
- De Smet, I., Signora, L., Beeckman, T., Inzé, D., Foyer, C. H., & Zhang, H. (2003). An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of Arabidopsis. *Plant Journal*, 33(3), 543–555. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01652.x>
- De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., Frei dit Frey, N., Laplaze, L., Casimiro, I., ... Beeckman, T. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. *Development (Cambridge, England)*, 134(4), 681–90. <https://doi.org/10.1242/dev.02753>
- De Smet, I., Zhang, H., Inzé, D., & Beeckman, T. (2006). A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends in Plant Science*, 11(9), 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.07.003>
- Deinlein, U; Stephan, A; Horie, T; Lu, W; Xu, G; Schroeder, J. (2015). NIH Public Access. *Biophysical Chemistry*, 19(6), 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.02.001>
- Delaney, K. J. (2006). Calmodulin Interacts with and Regulates the RNA-Binding Activity of an Arabidopsis Polyadenylation Factor Subunit. *Plant Physiology*, 140(4), 1507–1521. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070672>
- Dello Ioio, R., Linhares, F. S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., & Sabatini, S. (2007). Cytokinin Determine Arabidopsis Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation. *Current Biology*, 17(8), 678–682. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.047>
- Des Marais, D. L., Skillern, W. D., & Juenger, T. E. (2015). Deeply diverged alleles in the arabidopsis AREB1 transcription factor drive genome-wide differences in transcriptional response to the environment. *Molecular Biology and Evolution*, 32(4), 956–969. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu401>
- Di, D.-W., Wu, L., Luo, P., Zhang, L., Zhang, T.-Z., Sun, X., ... Guo, G.-Q. (2016). Analysis the role of arabidopsis CKRC6/ASA1 in auxin and cytokinin biosynthesis. *Journal of Plant Biology*, 59(2), 162–171. <https://doi.org/10.1007/s12374-016-0396-6>
- Dreher, K. A., Brown, J., Saw, R. E., & Callis, J. (2005). The Arabidopsis Aux / IAA Protein Family Has Diversified in Degradation and Auxin Responsiveness. *Society*, C(18), 699–714. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039172.1>

- Drisch, R. C., & Stahl, Y. (2015). Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Frontiers in Plant Science*, 6, 505. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00505>
- Drisch, R. C., & Stahl, Y. (2015). Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Frontiers in Plant Science*, 6(July), 505. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00505>
- Duan, L., Dietrich, D., Ng, C. H., Chan, P. M. Y., Bhalerao, R., Bennett, M. J., & Dinneny, J. R. (2013). Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Cell*, 25(1), 324–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.107227>
- Ezeokonkwo, C., Zhelkovsky, A., Lee, R., Bohm, A., & Moore, C. L. (2011). A flexible linker region in Fip1 is needed for efficient mRNA polyadenylation. *RNA (New York, N.Y.)*, 17(4), 652–664. <https://doi.org/10.1261/rna.2273111>
- Fakult, M. (2014). Functional specialization of *Arabidopsis* poly ( A ) polymerases in relation to flowering time and stress. Thesis.
- Feng, G., Liu, G., & Xiao, J. (2015). The *Arabidopsis* EIN2 restricts organ growth by retarding cell expansion. *Plant Signaling & Behavior*, 10(5), e1017169. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1017169>
- Fernández-Marcos, M., Desvoyes, B., Manzano, C., Liberman, L. M., Benfey, P. N., del Pozo, J. C., & Gutierrez, C. (2017). Control of *Arabidopsis* lateral root primordium boundaries by MYB36. *New Phytologist*, 213(1), 105–112. <https://doi.org/10.1111/nph.14304>
- File, S. (n.d.). CPSF73 - I CPSF100 CPSF73 - II, 73(I), 1–14.
- Forbes, K. P., Addepalli, B., & Hunt, A. G. (2006). An *Arabidopsis* Fip1 homolog interacts with RNA and provides conceptual links with a number of other polyadenylation factor subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 281(1), 176–186. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510964200>
- Frischmeyer, P. A. (2002). An mRNA Surveillance Mechanism That Eliminates Transcripts Lacking Termination Codons. *Science*, 295(5563), 2258–2261. <https://doi.org/10.1126/science.1067338>
- Fujita, K., Horiuchi, H., Takato, H., Kohno, M., & Suzuki, S. (2012). Auxin-responsive grape Aux/IAA9 regulates transgenic *Arabidopsis* plant growth. *Molecular Biology Reports*, 39(7), 7823–7829. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1625-9>
- Fujita, Y. (2005). AREB1 Is a Transcription Activator of Novel ABRE-Dependent ABA Signaling That Enhances Drought Stress Tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 17(12), 3470–3488. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035659>
- Fukaki, H., & Tasaka, M. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 437–449. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9417-2>
- Gao, S., Gao, J., Zhu, X., Song, Y., Li, Z., Ren, G., ... Kuai, B. (2016). ABF2, ABF3, and ABF4 Promote ABA-Mediated Chlorophyll Degradation and Leaf Senescence by Transcriptional Activation of Chlorophyll Catabolic Genes and Senescence-Associated Genes in *Arabidopsis*. *Molecular Plant (Vol. 9)*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.06.006>
- Geng, Y., Wu, R., Wee, C. W., Xie, F., Wei, X., Chan, P. M. Y., ... Dinneny, J. R. (2013). A spatio-temporal understanding of growth regulation during the salt stress response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(6), 2132–54. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.112896>

- Goh, T., Joi, S., Mimura, T., & Fukaki, H. (2012). The establishment of asymmetry in Arabidopsis lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. *Development*, 139(5), 883–893. <https://doi.org/10.1242/dev.071928>
- Goh, T., Kasahara, H., Mimura, T., Kamiya, Y., & Fukaki, H. (2012). Multiple AUX/IAA-ARF modules regulate lateral root formation: the role of Arabidopsis SHY2/IAA3-mediated auxin signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1595), 1461–1468. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0232>
- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., & Probst, N. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science*, 5(April), 151. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00151>
- Goodin, M. M., Dietzgen, R. G., Schichnes, D., Ruzin, S., & Jackson, A. O. (2002). pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *The Plant Journal*, 31(3), 375–383. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01360.x>
- Guo, C., Spinelli, M., Liu, M., Li, Q. Q., & Liang, C. (2016). A Genome-wide Study of “Non-3UTR” Polyadenylation Sites in Arabidopsis thaliana. *Scientific Reports*, 6(May), 28060. <https://doi.org/10.1038/srep28060>
- Guo, X., Lu, W., Ma, Y., Qin, Q., & Hou, S. (2013). The BIG gene is required for auxin-mediated organ growth in Arabidopsis. *Planta*, 237(4), 1135–1147. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1834-4>
- Harris, J. (2015). Abscisic Acid: Hidden Architect of Root System Structure. *Plants*, 4(3), 548–572. <https://doi.org/10.3390/plants4030548>
- Harris, J. (2015). Abscisic Acid: Hidden Architect of Root System Structure. *Plants*, 4(3), 548–572. <https://doi.org/10.3390/plants4030548>
- Heidstra, R., & Sabatini, S. (2014). Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(5), 301–12. <https://doi.org/10.1038/nrm3790>
- Herna, E., Bartel, B., Herrera-estrella, L., Herrera-estrella, L., Biology, C., & Biology, C. (2005). ) and Low (1. *Society*, 137(February), 681–691. <https://doi.org/10.1104/pp.104.049577.to-shoot>
- Herna, E., Herna, E., Sa, L., Sa, L., Rampey, R. a, Rampey, R. a, ... Biology, C. (2005). ) and Low (1. *Society*, 137(February), 681–691. <https://doi.org/10.1104/pp.104.049577.to-shoot>
- Hirsch, J., Lefort, V., Vankersschaver, M., Boualem, A., Lucas, A., Thermes, C., ... Crespi, M. (2006). Characterization of 43 non-protein-coding mRNA genes in Arabidopsis, including the MIR162a-derived transcripts. *Plant Physiology*, 140(4), 1192–204. <https://doi.org/10.1104/pp.105.073817>
- Historia, F. D. E. G. E. (2016). Universidad complutense de madrid.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J., & Schilperoort, R. A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid. *Nature*, 303(5913), 179–180. <https://doi.org/10.1038/303179a0>
- Hogg, J. R., & Goff, S. P. (2010). Upf1 senses 3'UTR length to potentiate mRNA decay. *Cell*, 143(3), 379–389. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.005>
- Hong, S. H., Kim, H. J., Ryu, J. S., Choi, H., Jeong, S., Shin, J., ... Nam, H. G. (2008). CRY1 inhibits COP1-mediated degradation of BIT1, a MYB transcription factor, to activate blue light-dependent gene expression in Arabidopsis. *Plant Journal*, 55(3), 361–371. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03508.x>

- Hughes, T. A. (2006). Regulation of gene expression by alternative untranslated regions. *Trends in Genetics*, 22(3), 119–122. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.01.001>
- Hunt, A. G. (2011). RNA regulatory elements and polyadenylation in plants. *Frontiers in Plant Science*, 2(January), 109. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00109>
- Hunt, A. G. (2014). The Arabidopsis polyadenylation factor subunit CPSF30 as conceptual link between mRNA polyadenylation and cellular signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.07.002>
- Hunt, A. G., & Li, Q. Q. (2014). Polyadenylation in plants: Methods and protocols. *Polyadenylation in Plants: Methods and Protocols*, 1255, 1–221. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2175-1>
- Hunt, A. G., & Li, Q. Q. (Eds.). (2015). *Polyadenylation in Plants* (Vol. 1255). New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2175-1>
- Hunt, A. G., Xing, D., & Li, Q. Q. (2012). Plant polyadenylation factors: conservation and variety in the polyadenylation complex in plants. *BMC Genomics*, 13(1), 641. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-641>
- Hunt, A. G., Xu, R., Addepalli, B., Rao, S., Forbes, K. P., Meeks, L. R., ... Ideker, T. (2008). Arabidopsis mRNA polyadenylation machinery: comprehensive analysis of protein-protein interactions and gene expression profiling. *BMC Genomics*, 9(1), 220. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-220>
- Hwang, J., & Maquat, L. E. (2011). NIH Public Access. *NI*, 21(4), 442–439. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.017>. Two-stage
- Ishida, K., Yamashino, T., & Mizuno, T. (2008). Expression of the cytokinin-induced type-A response regulator gene ARR9 is regulated by the circadian clock in Arabidopsis thaliana. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(11), 3025–3029. <https://doi.org/10.1271/bbb.80402>
- Ji, G., Wu, X., Li, L., Li, Q. Q., Wu, X., Fu, J., & Chen, G. (2014). PASPA: A web server for mRNA poly(A) site predictions in plants and algae. *Bioinformatics*, 31(10), 1671–1673. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv004>
- Ji, G., Zheng, J., Shen, Y., Wu, X., Jiang, R., Lin, Y., ... Li, Q. (2007). Predictive modeling of plant messenger RNA polyadenylation sites. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 43. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-43>
- Ji, Z., Lee, J. Y., Pan, Z., & , Bingjun Jiang, and B. T. (2009). Progressive lengthening of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation during mouse embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(23), 7028–7033. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900028106>
- Jiang, L., Matthys, C., Marquez-Garcia, B., De Cuyper, C., Smet, L., De Keyser, A., ... Goormachtig, S. (2016). Strigolactones spatially influence lateral root development through the cytokinin signaling network. *Journal of Experimental Botany*, 67(1), 379–389. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv478>
- Ju, C., Yoon, G. M., Shemansky, J. M., Lin, D. Y., Ying, Z. I., Chang, J., ... Chang, C. (2012). CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(47), 19486–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214848109>
- Kalve, S., De Vos, D., & Beemster, G. T. S. (2014). Leaf development: a cellular perspective. *Frontiers in Plant Science*, 5(July), 362. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00362>

- Kaufmann, I., Martin, G., Friedlein, A., Langen, H., & Keller, W. (2004). Human Fip1 is a subunit of CPSF that binds to U-rich RNA elements and stimulates poly(A) polymerase. *Embo J*, 23(3), 616–626. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600070> [pii]
- Keunen, E., Remans, T., Opendakker, K., Jozefczak, M., Gielen, H., Guisez, Y., ... Cuypers, A. (2013). A mutant of the *Arabidopsis thaliana* LIPOXYGENASE1 gene shows altered signalling and oxidative stress related responses after cadmium exposure. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.12.005>
- Kiba, T., & Krapp, A. (2016). Plant nitrogen acquisition under low availability: Regulation of uptake and root architecture. *Plant and Cell Physiology*, 57(4), 707–714. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw052>
- Kim, H. J., Ryu, H., Hong, S. H., Woo, H. R., Lim, P. O., Lee, I. C., ... Hwang, I. (2006). Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 814–819. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505150103>
- Kim, M. J., Shin, R., & Schachtman, D. P. (2009). A nuclear factor regulates abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 151(3), 1433–1445. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144766>
- Kim, M.-H., Sato, S., Sasaki, K., Saburi, W., Matsui, H., & Imai, R. (2013). COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 is involved in salt and drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *FEBS Open Bio*, 3, 438–42. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2013.10.003>
- Knop, K., Jarmolowski, A., & Szweykowska-kulinska, Z. (2015). *Arabidopsis thaliana* microRNA162 level is posttranscriptionally regulated via splicing and polyadenylation site selection, 63(4), 2015. [https://doi.org/10.18388/abp.2016\\_1349](https://doi.org/10.18388/abp.2016_1349)
- Krzywińska, E., Bucholc, M., Kulik, A., Ciesielski, A., Lichocka, M., Dębski, J., ... Dobrowolska, G. (2016). Phosphatase ABI1 and okadaic acid-sensitive phosphoprotein phosphatases inhibit salt stress-activated SnRK2.4 kinase. *BMC Plant Biology*, 16(1), 136. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0817-1>
- Kumar, M. N., & Verslues, P. E. (2015). Stress physiology functions of the *Arabidopsis* histidine kinase cytokinin receptors. *Physiologia Plantarum*, 154(3), 369–380. <https://doi.org/10.1111/ppl.12290>
- Kumimoto, R. W., Zhang, Y., Siefers, N., & Holt, B. F. (2010). NF-YC3, NF-YC4 and NF-YC9 are required for CONSTANS-mediated, photoperiod-dependent flowering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 63(3), 379–391. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04247.x>
- Lackford, B., Yao, C., Charles, G. M., Weng, L., Zheng, X., Choi, E. A., ... Shi, Y. (2014). Fip1 regulates mRNA alternative polyadenylation to promote stem cell self-renewal. *EMBO Journal*, 33(8), 878–889. <https://doi.org/10.1002/embj.201386537>
- Larochelle, M., Hunyadk??rti, J., & Bachand, F. (2016). Polyadenylation site selection: linking transcription and RNA processing via a conserved carboxy-terminal domain (CTD)-interacting protein. *Current Genetics*, 1–5. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0645-8>
- Leyser, H. M. O., Pickett, F. B., Dharmasiri, S., & Estelle, M. (1996). Mutations in the AXR3 gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter. *Plant Journal*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1996.10030403.x>
- Li, W., Ma, M., Feng, Y., Li, H., Wang, Y., Ma, Y., ... Guo, H. (2015). EIN2-Directed Translational Regulation of Ethylene Signaling in *Arabidopsis*. *Cell*, 163(3), 670–683. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.037>

- Li, X., Li, X., Li, M., Yan, Y., Liu, X., & Li, L. (2016). Dual Function of NAC072 in Gene Regulation in Arabidopsis, 7(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01075>
- Liang, G., He, H., & Yu, D. (2012). Identification of Nitrogen Starvation-Responsive MicroRNAs in Arabidopsis thaliana. PLoS ONE, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048951>
- Lianoglou, S., Garg, V., Yang, J. L., Leslie, C. S., & Mayr, C. (2013). Ubiquitously transcribed genes use alternative polyadenylation to achieve tissue-specific expression. Genes and Development, 27(21), 2380–2396. <https://doi.org/10.1101/gad.229328.113>
- Lieberman, L. M., Sparks, E. E., Moreno-Risueno, M. A., Petricka, J. J., & Benfey, P. N. (2015). MYB36 regulates the transition from proliferation to differentiation in the Arabidopsis root. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112(39), 12099–104. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515576112>
- Liu, M., Wu, X., & Li, Q. Q. (2015). DNA/RNA Hybrid Primer Mediated Poly(A) Tag Library Construction for Illumina Sequencing (pp. 175–184). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2175-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2175-1_15)
- Liu, M., Wu, X., & Li, Q. Q. (2015). DNA/RNA Hybrid Primer Mediated Poly(A) Tag Library Construction for Illumina Sequencing (pp. 175–184). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2175-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2175-1_15)
- Liu, M., Xu, R., Merrill, C., Hong, L., Von Lanken, C., Hunt, A. G., ... Hunt, A. (2014). Integration of Developmental and Environmental Signals via a Polyadenylation Factor in Arabidopsis. PLoS ONE, 9(12), e115779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115779>
- Liu, W., Li, R.-J., Han, T.-T., Cai, W., Fu, Z.-W., & Lu, Y.-T. (2015). Salt stress reduces root meristem size by nitric oxide-mediated modulation of auxin accumulation and signaling in Arabidopsis. Plant Physiology, 168(1), pp.00030.2015. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00030>
- Liu, W., Li, R.-J., Han, T.-T., Cai, W., Fu, Z.-W., & Lu, Y.-T. (2015). Salt stress reduces root meristem size by nitric oxide-mediated modulation of auxin accumulation and signaling in Arabidopsis. Plant Physiology, 168(1), pp.00030.2015. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00030>
- Ma, L. (2013). The Role of Polyadenylation in seed germination, 190–190.
- Ma, L., Guo, C., & Li, Q. Q. (2014). Role of alternative polyadenylation in epigenetic silencing and antisilencing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(1), 9–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321025111>
- Ma, L., Guo, C., & Li, Q. Q. (n.d.). Role of alternative polyadenylation in epigenetic silencing and antisilencing. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321025111>
- Manzano, C., Ramirez-Parra, E., Casimiro, I., Otero, S., Desvoves, B., De Rybel, B., ... C Del Pozo, J. (2012). Auxin and epigenetic regulation of SKP2B, an F-box that represses lateral root formation. Plant Physiology, 160(2), 749–62. <https://doi.org/10.1104/pp.112.198341>
- Mao, J. L., Miao, Z. Q., Wang, Z., Yu, L. H., Cai, X. T., & Xiang, C. Bin. (2016). Arabidopsis ERF1 Mediates Cross-Talk between Ethylene and Auxin Biosynthesis during Primary Root Elongation by Regulating ASA1 Expression. PLoS Genetics, 12(1), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005760>
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P. J., Bennett, M., & Sandberg, G. (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. The Plant Cell, 14(3), 589–97. <https://doi.org/10.1105/tpc.010354>

- Mayr, C. (2016). Evolution and Biological Roles of Alternative 3'UTRs. *Trends in Cell Biology*, 26(3), 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.012>
- Meeks, L. R., Addepalli, B., & Hunt, A. G. (2009). Characterization of Genes Encoding Poly(A) Polymerases in Plants: Evidence for Duplication and Functional Specialization. *PLoS ONE*, 4(11), e8082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008082>
- Millevoi, S., & Vagner, S. (2009). Molecular mechanisms of eukaryotic pre-mRNA 3' end processing regulation. *Nucleic Acids Research*, 38(9), 2757–2774. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1176>
- Mochizuki, S. (2005). The Arabidopsis WAVY GROWTH 2 Protein Modulates Root Bending in Response to Environmental Stimuli. *The Plant Cell Online*, 17(2), 537–547. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.028530>
- Mochizuki, S., Harada, A., Inada, S., Sugimoto-Shirasu, K., Stacey, N., Wada, T., ... Sakai, T. (2005). The Arabidopsis WAVY GROWTH 2 protein modulates root bending in response to environmental stimuli. *The Plant Cell*, 17(2), 537–47. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.028530>
- Mohannath, G., Jackel, J. N., Lee, Y. H., Buchmann, R. C., Wang, H., Patil, V., ... Citovsky, V. (2014). A Complex Containing SNF1-Related Kinase (SnRK1) and Adenosine Kinase in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 9(1), e87592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087592>
- Molitor, A., Latrasse, D., Zytnicki, M., Andrey, P., Houba-Hérin, N., Hachet, M., ... Gaudin, V. (2016). The Arabidopsis hnRNP-Q Protein LIF2 and the PRC1 subunit LHP1 function in concert to regulate the transcription of stress-responsive genes. *The Plant Cell*, tpc.00244.2016. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00244>
- Möller, B. K., Xuan, W., & Beeckman, T. (2017). Dynamic control of lateral root positioning. *Current Opinion in Plant Biology*, 35, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.09.001>
- Moreno-Risueno, M. a., & Benfey, P. N. (2011). Time-based patterning in development: The role of oscillating gene expression. *Transcription*, 2(3), 124–129. <https://doi.org/10.4161/trns.2.3.15637>
- Moreno-risueno, M. A., Norman, J. M. Van, Moreno, A., Zhang, J., Ahnert, S. E., & Benfey, P. N. (2011). NIH Public Access, 329(5997), 1306–1311. <https://doi.org/10.1126/science.1191937.Oscillating>
- Moreno-Risueno, M. A., Sozzani, R., Yardımcı, G. G., Petricka, J. J., Vernoux, T., Bllilou, I., ... Benfey, P. N. (n.d.). Transcriptional control of tissue formation throughout plant root development. <https://doi.org/10.1126/science.aad1171>
- Moreno-Risueno, M. A., Van Norman, J. M., Moreno, A., Zhang, J., Ahnert, S. E., & Benfey, P. N. (2010). Oscillating gene expression determines competence for periodic Arabidopsis root branching. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5997), 1306–11. <https://doi.org/10.1126/science.1191937>
- Moubayidin, L., Di Mambro, R., & Sabatini, S. (2009). Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends in Plant Science*, 14(10), 557–562. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.06.010>
- Moubayidin, L., Di Mambro, R., & Sabatini, S. (2009). Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends in Plant Science*, 14(10), 557–562. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.06.010>
- Moubayidin, L., Di Mambro, R., Sozzani, R., Pacifici, E., Salvi, E., Terpstra, I., ... Sabatini, S. (2013). Spatial coordination between stem cell activity and cell differentiation in the root meristem. *Developmental Cell*, 26(4), 405–15. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.025>

- Moubayidin, L., Salvi, E., Giustini, L., Terpstra, I., Heidstra, R., Costantino, P., & Sabatini, S. (2016). A SCARECROW-based regulatory circuit controls *Arabidopsis thaliana* meristem size from the root endodermis. *Planta*, 243(5), 1159–1168. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2471-0>
- Muraro, D., Wilson, M., & Bennett, M. J. (2011). Root development: Cytokinin transport matters, too! *Current Biology*, 21(11), R423–R425. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.04.048>
- Myers, Z. A., Kumimoto, R. W., Siriwardana, C. L., Gayler, K. K., Risinger, J. R., Pezzetta, D., ... Weigel, D. (2016). NUCLEAR FACTOR Y, Subunit C (NF-YC) Transcription Factors Are Positive Regulators of Photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics*, 12(9), e1006333. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006333>
- Nacry, P., Bouguyon, E., & Gojon, A. (2013). Nitrogen acquisition by roots: Physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant and Soil*, 370(1–2), 1–29. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1645-9>
- Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2014). The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Frontiers in Plant Science*, 5(May), 170. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00170>
- Nakazawa, M., Yabe, N., Ichikawa, T., Yamamoto, Y. Y., Yoshizumi, T., Hasunuma, K., & Matsui, M. (2001). DFL1, an auxin-responsive GH3 gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. *Plant Journal*, 25(2), 213–221. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.00957.x>
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D. T., Kojima, M., Werner, T., ... Tran, L.-S. P. (2011). Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic Acid responses, and abscisic Acid biosynthesis. *The Plant Cell*, 23(6), 2169–2183. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087395>
- Overvoorde, P., Fukaki, H., & Beeckman, T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(6), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001537>
- Overvoorde, P., Okushima, Y., Alonso, J., Chan, A., Chang, C., Ecker, J. R., ... Theologis, A. (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 17(December), 3282–3300. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036723.2>
- Palme, K., & Teale, W. (2013). Root systems analysis branches out. *Molecular Systems Biology*, 9(698), 698. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.51>
- Peret, B., Swarup, K., Ferguson, A., Seth, M., Yang, Y., Dhondt, S., ... Swarup, R. (2012). AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 24(7), 2874–2885. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.097766>
- Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplaze, L., ... Bennett, M. J. (2009). *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science*, 14(7), 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.05.002>
- Péret, B., Li, G., Zhao, J., Band, L. R., Voß, U., Postaire, O., ... Bennett, M. J. (2012). Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nature Cell Biology*, 14(10), 991–8. <https://doi.org/10.1038/ncb2573>
- Péret, B., Middleton, A. M., French, A. P., Larrieu, A., Bishopp, A., Njo, M., ... Bennett, M. J. (2013). Sequential induction of auxin efflux and influx carriers regulates lateral root emergence. *Molecular Systems Biology*, 9(1), 699. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.43>

- Petrasek, J., & Friml, J. (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136(16), 2675–2688. <https://doi.org/10.1242/dev.030353>
- Pfister, A., Barberon, M., Alassimone, J., Kalmbach, L., Lee, Y., Vermeer, J. E. M., ... Geldner, N. (2014). A receptor-like kinase mutant with absent endodermal diffusion barrier displays selective nutrient homeostasis defects, 1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.03115>
- Piast, M., Kustrzeba-Wójcicka, I., Matusiewicz, M., & Banaś, T. (2005). Molecular evolution of enolase. *Acta Biochimica Polonica*, 52(2), 507–513. <https://doi.org/10.1016/S>
- Rao, S., Dinkins, R. D., & Hunt, A. G. (2009). Distinctive interactions of the Arabidopsis homolog of the 30 kD subunit of the cleavage and polyadenylation specificity factor (AtCPSF30) with other polyadenylation factor subunits. *BMC Cell Biology*, 10(1), 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-51>
- Rodrigo-Moreno, A., Andrés-Colás, N., Poschenrieder, C., Gunsé, B., Peñarrubia, L., & Shabala, S. (2013). Calcium- and potassium-permeable plasma membrane transporters are activated by copper in Arabidopsis root tips: Linking copper transport with cytosolic hydroxyl radical production. *Plant, Cell and Environment*, 36(4), 844–855. <https://doi.org/10.1111/pce.12020>
- Roppolo, D., Boeckmann, B., Pfister, A., Boutet, E., Rubio, M. C., Dénervaud-Tendon, V., ... Geldner, N. (2014). Functional and evolutionary analysis of the CASPARIAN STRIP MEMBRANE DOMAIN PROTEIN family. *Plant Physiology*, 165(August), 1709–1722. <https://doi.org/10.1104/pp.114.239137>
- Rowe, J. H., Topping, J. F., Liu, J., & Lindsey, K. (2016). Abscisic acid regulates root growth under osmotic stress conditions via an interacting hormonal network with cytokinin, ethylene and auxin. *New Phytologist*, 211(1), 225–239. <https://doi.org/10.1111/nph.13882>
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., ... Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell*, 99(5), 463–472. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81535-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81535-4)
- Sakuraba, Y., Kim, Y.-S., Han, S.-H., Lee, B.-D., & Paek, N.-C. (2015). The Arabidopsis Transcription Factor NAC016 Promotes Drought Stress Responses by Repressing AREB1 Transcription through a Trifurcate Feed-Forward Regulatory Loop Involving NAP. *The Plant Cell*, 27(6), 1771–87. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00222>
- Sandberg, R., Neilson, J. R., Sarma, A., Sharp, P. a, & Burge, C. B. (2008). Proliferating cells express mRNAs with shortened 3 UTRs and fewer microRNA target sites. *Science*, 320(5883), 1643–1647. <https://doi.org/10.1126/science.1155390.Proliferating>
- Schaller, G. E., Bishopp, A., & Kieber, J. J. (2015). The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *The Plant Cell*, 27(1), 44–63. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133595>
- Shao, F., Qiu, D., & Lu, S. (2015). Comparative analysis of the Dicer-like gene family reveals loss of miR162 target site in SmDCL1 from *Salvia miltiorrhiza*. *Scientific Reports*, 5(March), 9891. <https://doi.org/10.1038/srep09891>
- Shen, Y., Venu, R. C., Nobuta, K., Wu, X., Notibala, V., Demirci, C., ... Li, Q. Q. (2011). Transcriptome dynamics through alternative polyadenylation in developmental and environmental responses in plants revealed by deep sequencing. *Genome Research*, 21(9), 1478–1486. <https://doi.org/10.1101/gr.114744.110>
- Sherstnev, A., Duc, C., Cole, C., Zacharaki, V., Hornyik, C., Ozsolak, F., ... Simpson, G. G. (2012). Direct sequencing of Arabidopsis thaliana RNA reveals patterns of cleavage and polyadenylation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(8), 845–852. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2345>

- Silva-Navas, J., Moreno-Risueno, M. A., Manzano, C., Pallero-Baena, M., Navarro-Neila, S., Téllez-Robledo, B., ... Del Pozo, J. C. (2015). D-Root: A system for cultivating plants with the roots in darkness or under different light conditions. *Plant Journal*, 84(1). <https://doi.org/10.1111/tpj.12998>
- Silva-Navas, J., Moreno-Risueno, M. A., Manzano, C., Téllez-Robledo, B., Navarro-Neila, S., Carrasco, V., ... Del Pozo, J. C. (2016). Flavonols mediate root phototropism and growth through regulation of proliferation-to-differentiation transition. *Plant Cell*, 28(6). <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00857>
- Somssich, M., Khan, G. A., & Persson, S. (2016). Cell Wall Heterogeneity in Root Development of Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1242. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01242>
- Sparks, E. E. (2015). Genes and networks regulating root anatomy and architecture Tansley review Genes and networks regulating root anatomy and architecture, (May). <https://doi.org/10.1111/nph.13469>
- Sun, J., Xu, Y., Ye, S., Jiang, H., Chen, Q., Liu, F., ... Li, C. (2009). Arabidopsis ASA1 is important for jasmonate-mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation. *The Plant Cell*, 21(5), 1495–511. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064303>
- Tao, J.-J., Chen, H.-W., Ma, B., Zhang, W.-K., Chen, S.-Y., & Zhang, J.-S. (2015). The Role of Ethylene in Plants Under Salinity Stress. *Frontiers in Plant Science*, 6(November), 1059. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01059>
- Teo, Z. W. N., Song, S., Wang, Y. Q., Liu, J., & Yu, H. (2014). New insights into the regulation of inflorescence architecture. *Trends in Plant Science*, 19(3), 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.001>
- Tian, B., & Manley, J. L. (2016). Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(1), 18–30. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.116>
- Tian, B., & Manley, J. L. (2013). Alternative cleavage and polyadenylation: The long and short of it. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(6), 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.03.005>
- Tian, H., Wabnik, K., Niu, T., Li, H., Yu, Q., Pollmann, S., Ding, Z. (2014). WOX5-IAA17 feedback circuit-mediated cellular auxin response is crucial for the patterning of root stem cell niches in arabidopsis. *Molecular Plant*, 7(2), 277–289. <https://doi.org/10.1093/mp/sst118>
- Tian, Q. Y., Sun, P., & Zhang, W. H. (2009). Ethylene is involved in nitrate-dependent root growth and branching in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist*, 184(4), 918–931. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03004.x>
- Ueda, A., Li, P., Feng, Y., Vikram, M., Kim, S., Kang, C. H., ... Koiwa, H. (2008). The Arabidopsis thaliana carboxyl-terminal domain phosphatase-like 2 regulates plant growth, stress and auxin responses. *Plant Molecular Biology*, 67(6), 683–697. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9348-y>
- van Hoof, A., Frischmeyer, P. A., Dietz, H. C., & Parker, R. (2002). Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5563), 2262–4. <https://doi.org/10.1126/science.1067272>
- Van Norman, J. M., Xuan, W., Beeckman, T., & Benfey, P. N. (2013). To branch or not to branch: the role of pre-patterning in lateral root formation. *Development (Cambridge, England)*, 140(21), 4301–10. <https://doi.org/10.1242/dev.090548>
- Vanneste, S., De Rybel, B., Beemster, G. T. S., Ljung, K., De Smet, I., Isterdael, G. Van, ... Beec. (2005). Cell Cycle Progression in the Pericycle Is Not Sufficient for SOLITARY ROOT / IAA14-

- Mediated Lateral Root Initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 17(November), 3035–3050. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035493.1>
- Vasudevan, S., Peltz, S. W., & Wilusz, C. J. (2002). Non-stop decay - A new mRNA surveillance pathway. *BioEssays*, 24(9), 785–788. <https://doi.org/10.1002/bies.10153>
- Vermeer, J. E. M., & Geldner, N. (2015). Lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*: a force awakens. *F1000prime Reports*, 7(March), 32. <https://doi.org/10.12703/P7-32>
- Vi, S. L., Trost, G., Lange, P., Czesnick, H., Rao, N., Lieber, D., ... Lenhard, M. (2013). Target specificity among canonical nuclear poly(A) polymerases in plants modulates organ growth and pathogen response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(34), 13994–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303967110>
- Vidal, E. A., Alvarez, J. M., & Gutiérrez, R. A. (2014). Nitrate regulation of AFB3 and NAC4 gene expression in *Arabidopsis* roots depends on NRT1.1 nitrate transport function. *Plant Signaling & Behavior*, 9(3), e28501. <https://doi.org/10.4161/psb.28501>
- Vidal, E. a, Araus, V., Lu, C., Parry, G., Green, P. J., Coruzzi, G. M., & Gutiérrez, R. a. (2010). Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4477–4482. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909571107>
- Vidal, E. A., Moyano, T. C., Riveras, E., Contreras-López, O., & Gutiérrez, R. A. (2013). Systems approaches map regulatory networks downstream of the auxin receptor AFB3 in the nitrate response of *Arabidopsis thaliana* roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110(31), 12840–12845. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310937110>
- Von Lanken, C., & Hunt, A. G. (2015). Transient Expression Using Agroinfiltration to Study Polyadenylation in Plants (pp. 127–133). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2175-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2175-1_11)
- Wachsman, G., Sparks, E. E., & Benfey, P. N. (2015). Genes and networks regulating root anatomy and architecture. *New Phytologist*, 208(1), 26–38. <https://doi.org/10.1111/nph.13469>
- Wagner, E., & Lykke-Andersen, J. (2002). mRNA surveillance: the perfect persist. *J. Cell. Sci.*, 115, 3033–3038.
- Wang, J., Wang, Y., Yang, J., Ma, C., Zhang, Y., Ge, T., ... Kang, Y. (2015). *Arabidopsis* ROOT HAIR DEFECTIVE3 is involved in nitrogen starvation-induced anthocyanin accumulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57(8), 708–721. <https://doi.org/10.1111/jipb.12320>
- Withers, J. C., Shipp, M. J., Rupasinghe, S. G., Sukumar, P., Schuler, M. A., Muday, G. K., & Wyatt, S. E. (2013). Gravity persistent signal 1 (GPS1) reveals novel cytochrome P450s involved in Gravitropism. *American Journal of Botany*, 100(1), 183–193. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200436>
- Wu, X., Gaffney, B., Hunt, A. G., Li, Q. Q., Xing, D., Li, Q., ... Watanabe, C. (2014). Genome-wide determination of poly(A) sites in *Medicago truncatula*: evolutionary conservation of alternative poly(A) site choice. *BMC Genomics*, 15(1), 615. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-615>
- Wu, X., Liu, M., Downie, B., Liang, C., Ji, G., Li, Q. Q., & Hunt, A. G. (2011). Genome-wide landscape of polyadenylation in *Arabidopsis* provides evidence for extensive alternative polyadenylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(30), 12533–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019732108>
- Wu, X., Liu, M., Downie, B., Liang, C., Ji, G., Li, Q. Q., & Hunt, A. G. (2011). Genome-wide landscape of polyadenylation in *Arabidopsis* provides evidence for extensive alternative polyadenylation.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(30), 12533–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019732108>

Wu, X., Liu, M., Downie, B., Liang, C., Ji, G., Li, Q. Q., & Hunt, A. G. (n.d.). Genome-wide landscape of polyadenylation in Arabidopsis provides evidence for extensive alternative polyadenylation. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019732108>

Wu, X., Zhang, Y., & Li, Q. Q. (2016). PlantAPA: A Portal for Visualization and Analysis of Alternative Polyadenylation in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7(June), 70–79. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00889>

Xing, D., & Li, Q. Q. (2011). Alternative polyadenylation and gene expression regulation in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2(3), 445–458. <https://doi.org/10.1002/wrna.59>

Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M., Tanaka, Y., Stevenson, B., Koiwa, H., ... Zhu, J.-K. (2002). Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10899–904. <https://doi.org/10.1073/pnas.162111599>

Yamaguchi, N., Suzuki, M., Fukaki, H., Morita-Terao, M., Tasaka, M., & Komeda, Y. (2007). CRM1/BIG-mediated auxin action regulates arabidopsis inflorescence development. *Plant and Cell Physiology*, 48(9), 1275–1290. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm094>

Yang, Q., Gilmartin, G. M., & Doublé, S. (2010). Structural basis of UGUA recognition by the Nudix protein CFI(m)25 and implications for a regulatory role in mRNA 3' processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(22), 10062–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000848107>

Yeh, H.-S., & Yong, J. (2016). Alternative Polyadenylation of mRNAs: 3'-Untranslated Region Matters in Gene Expression. *Molecules and Cells*, 39(4), 281–5. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0035>

Yoshida, T., Fujita, Y., Maruyama, K., Mogami, J., Todaka, D., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*, 38(1), 35–49. <https://doi.org/10.1111/pce.12351>

Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., ... Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant Journal*, 61(4), 672–685. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04092.x>

Zhang, J., Addepalli, B., Yun, K.-Y., Hunt, A. G., Xu, R., Rao, S., ... Falcone, D. L. (2008). A Polyadenylation Factor Subunit Implicated in Regulating Oxidative Signaling in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, 3(6), e2410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002410>

Zhao, H., Xing, D., & Li, Q. Q. (2009). Unique features of plant cleavage and polyadenylation specificity factor revealed by proteomic studies. *Plant Physiology*, 151(3), 1546–56. <https://doi.org/10.1104/pp.109.142729>

Zieliński, R., Hellman, U., Kubiński, K., & Szyszka, R. (2006). Fip1 - An essential component of the *Saccharomyces cerevisiae* polyadenylation machinery is phosphorylated by protein kinase CK2. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 286(1–2), 191–197. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-9104-4>

# **ANEXO**

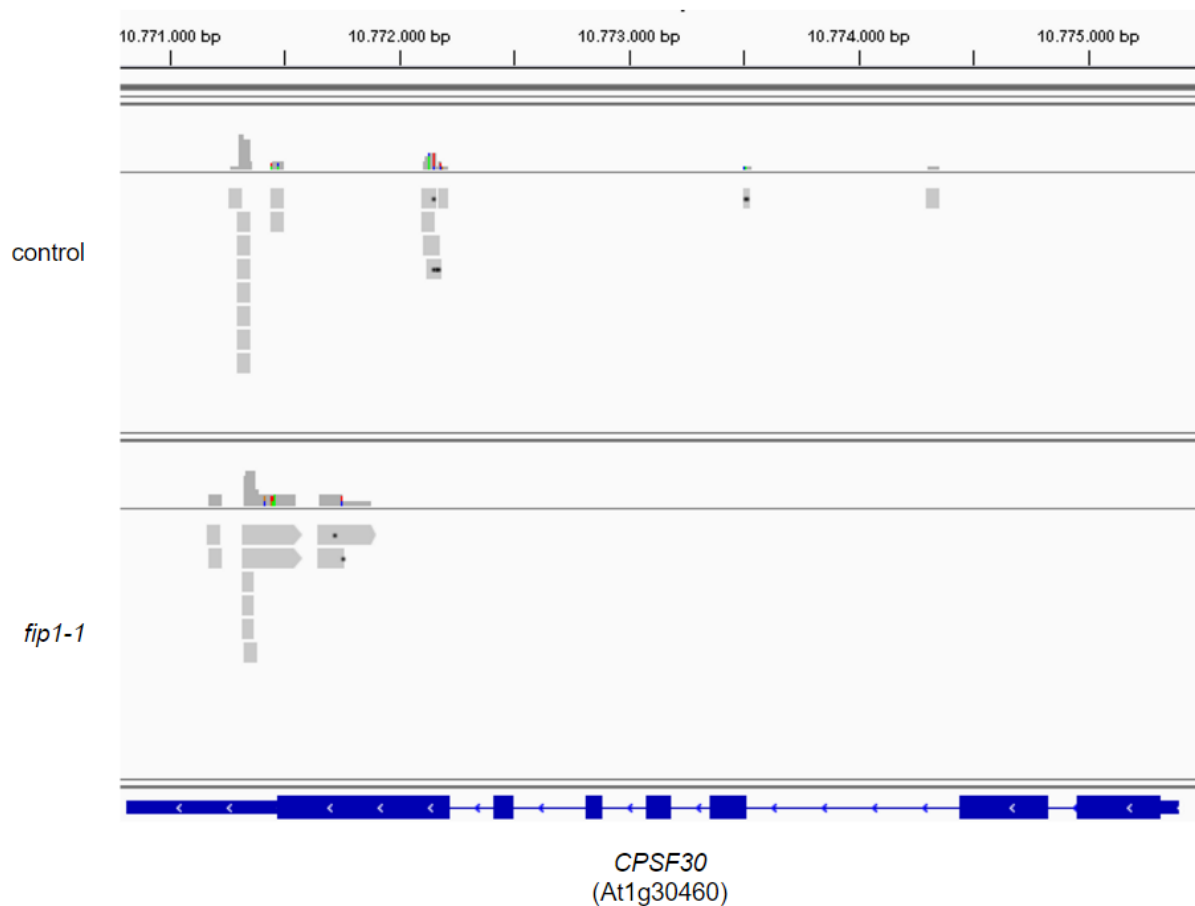


# Anexo

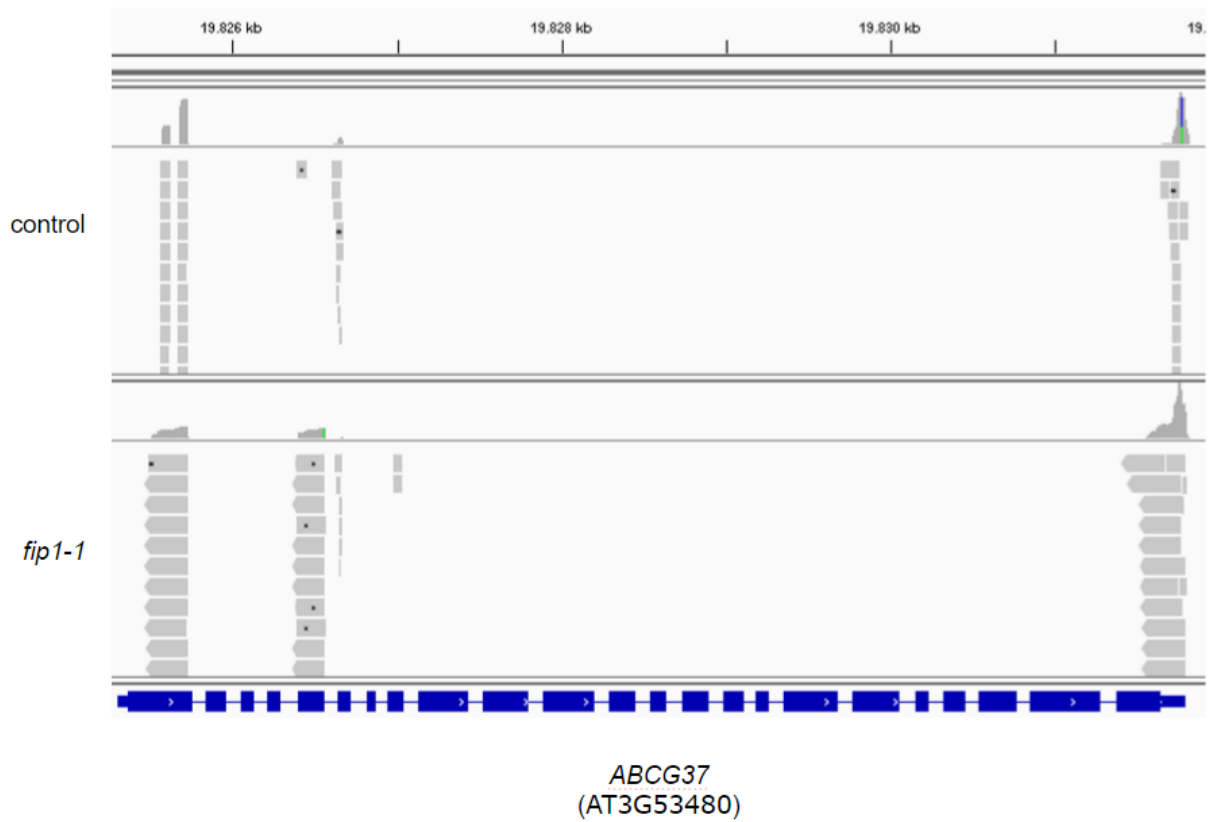
## 1. Poliadenilación alternativa: Selección de Poly(A) Sites

Poliadenilación alternativa en genes seleccionados. A continuación se muestran capturas del programa IGV en las que se muestra del alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq.

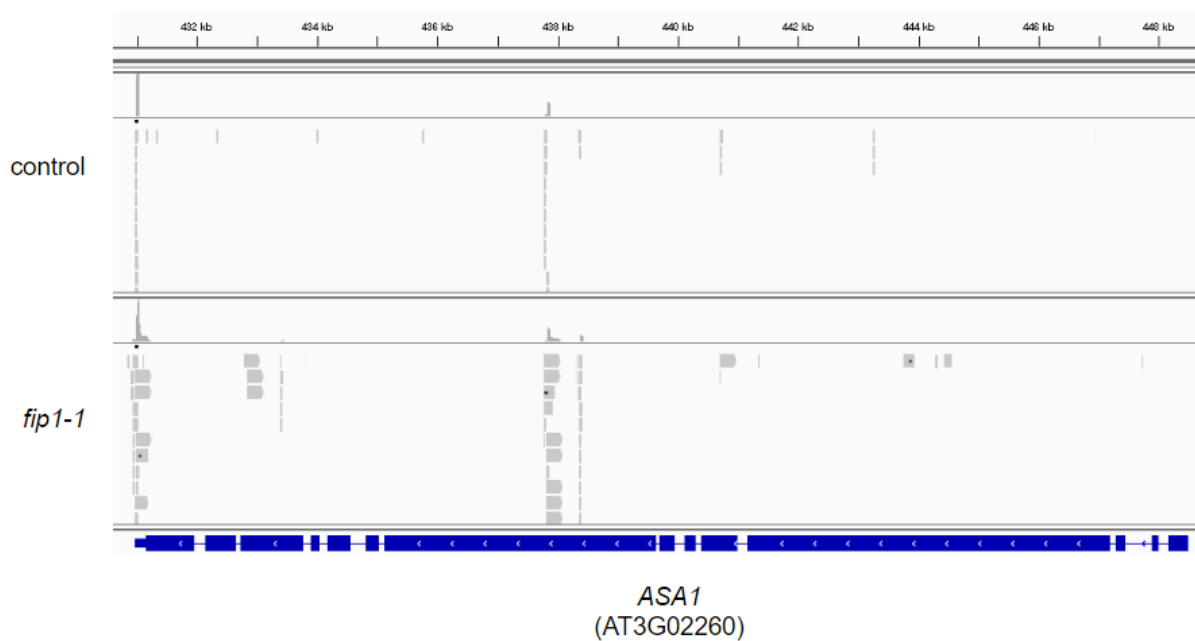
Poliadenilación alternativa en la raíz de *fip1-1* respecto a su control



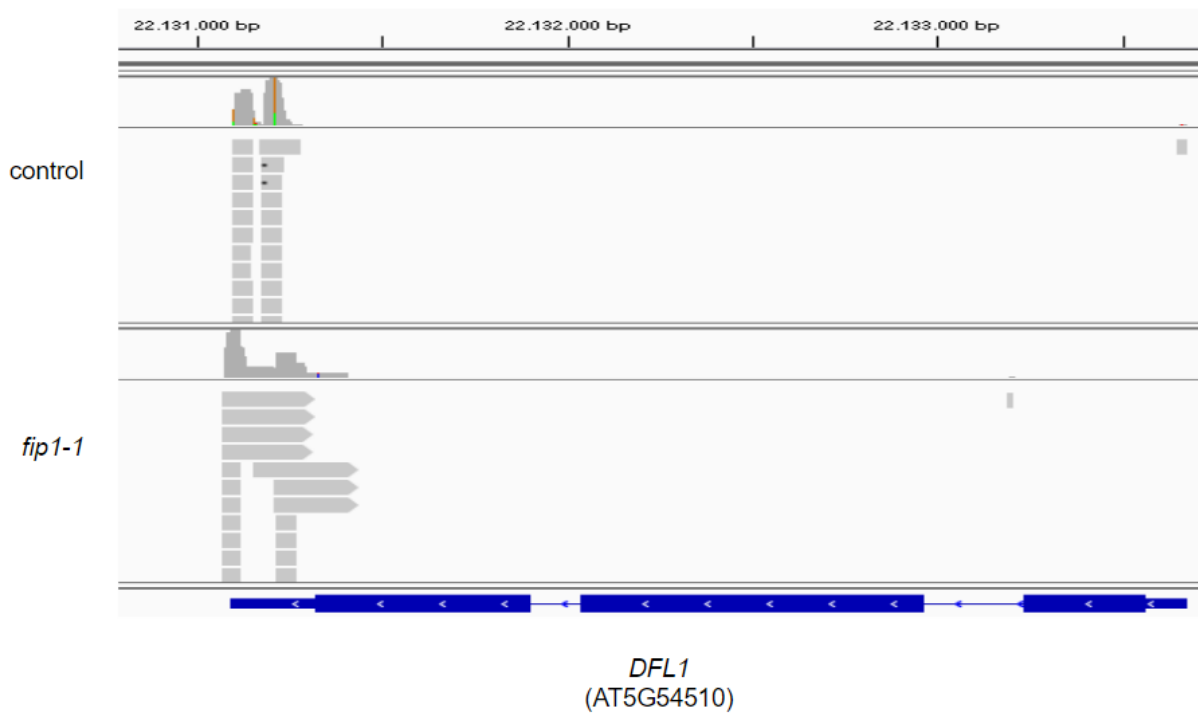
Anexo: Figura 1: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *CPSF30*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.



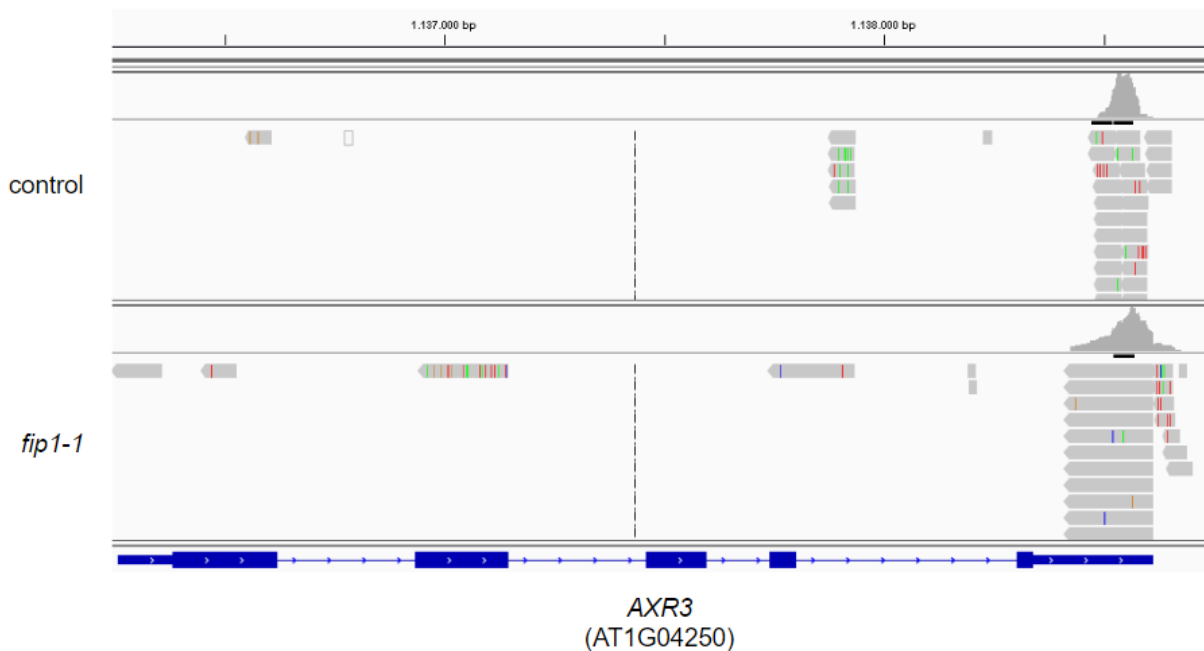
Anexo: Figura 2: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *ABCG37*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.



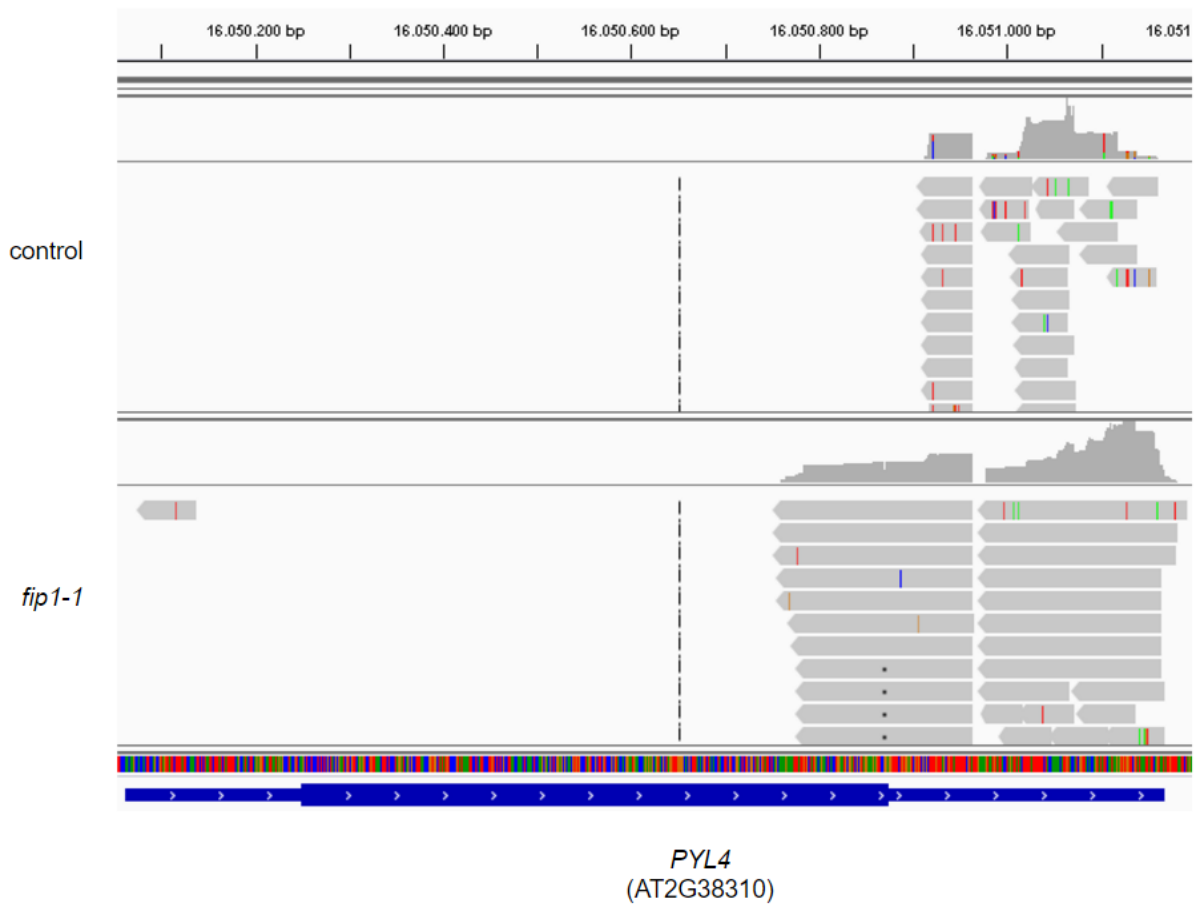
Anexo: Figura 3 Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *ASA1*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.



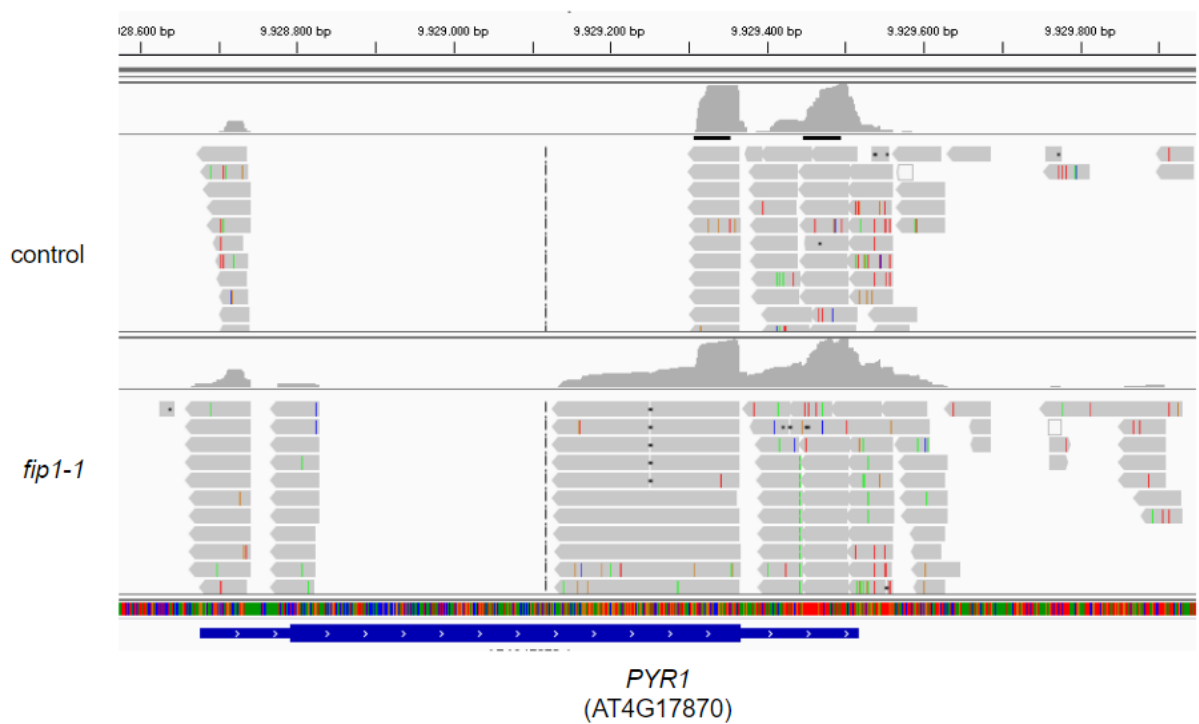
Anexo: Figura 4: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *DFL1*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.



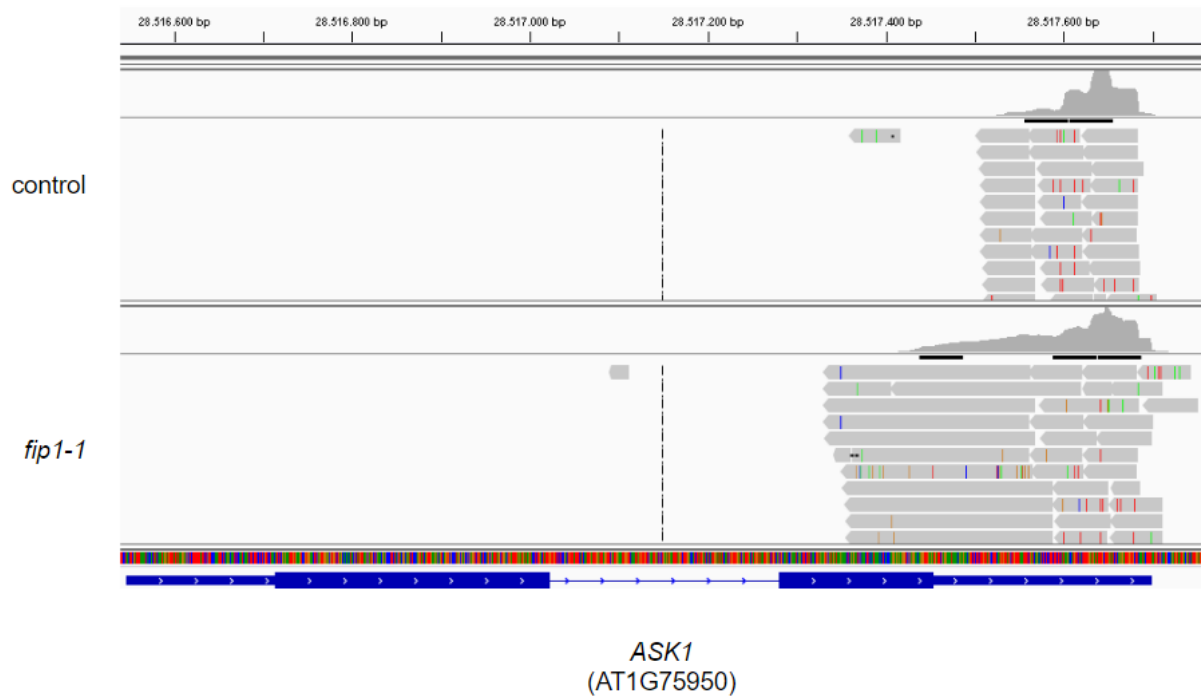
Anexo: Figura 5: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *AXR3*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.



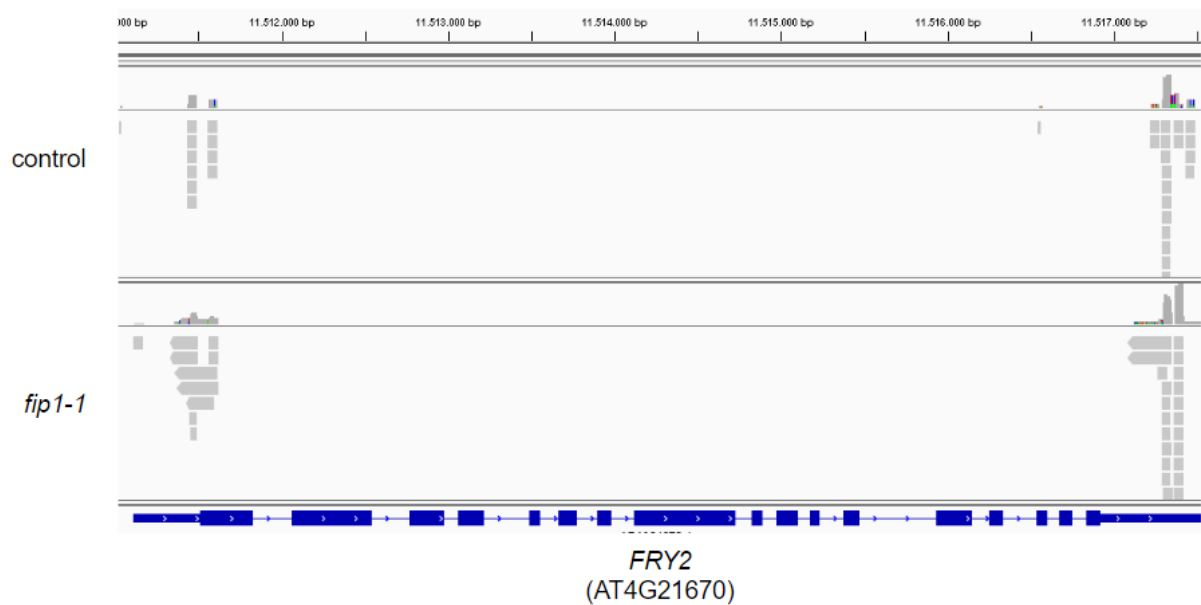
Anexo: Figura 6: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *PYL4*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.



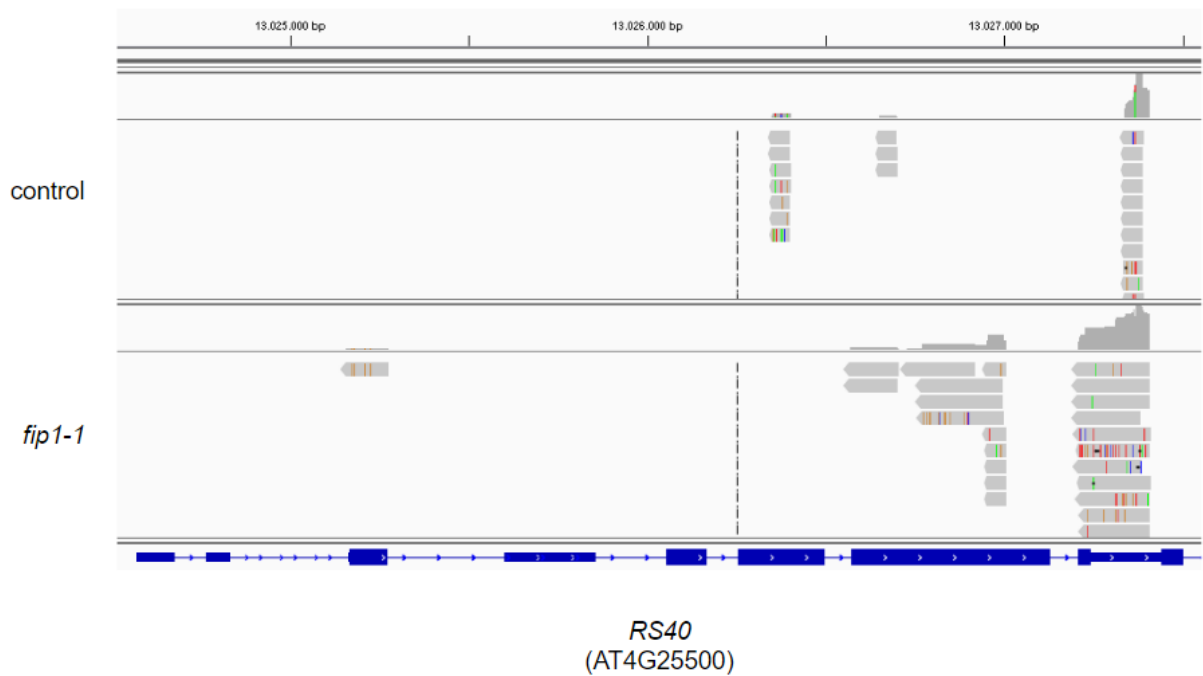
Anexo: Figura 7: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *PYR1*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.



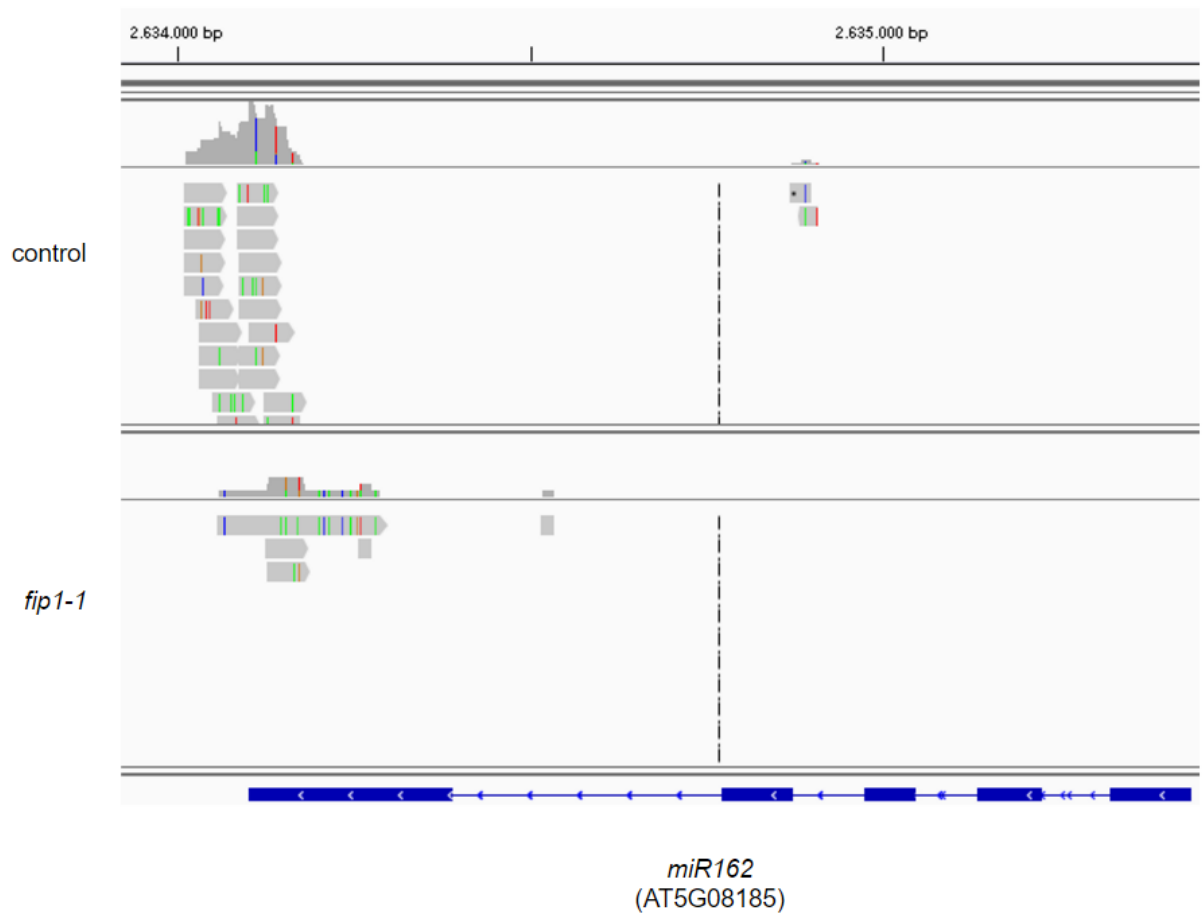
Anexo: Figura 8: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *ASK1*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.



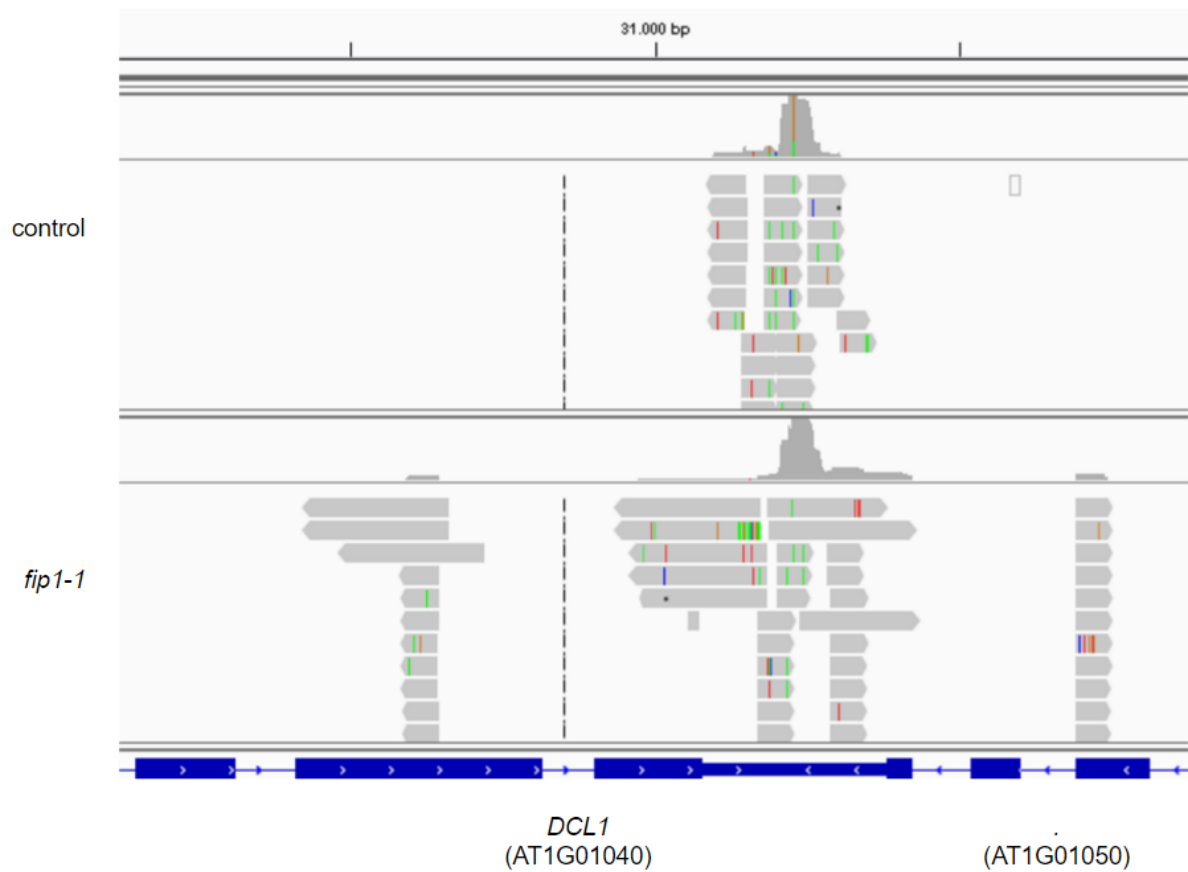
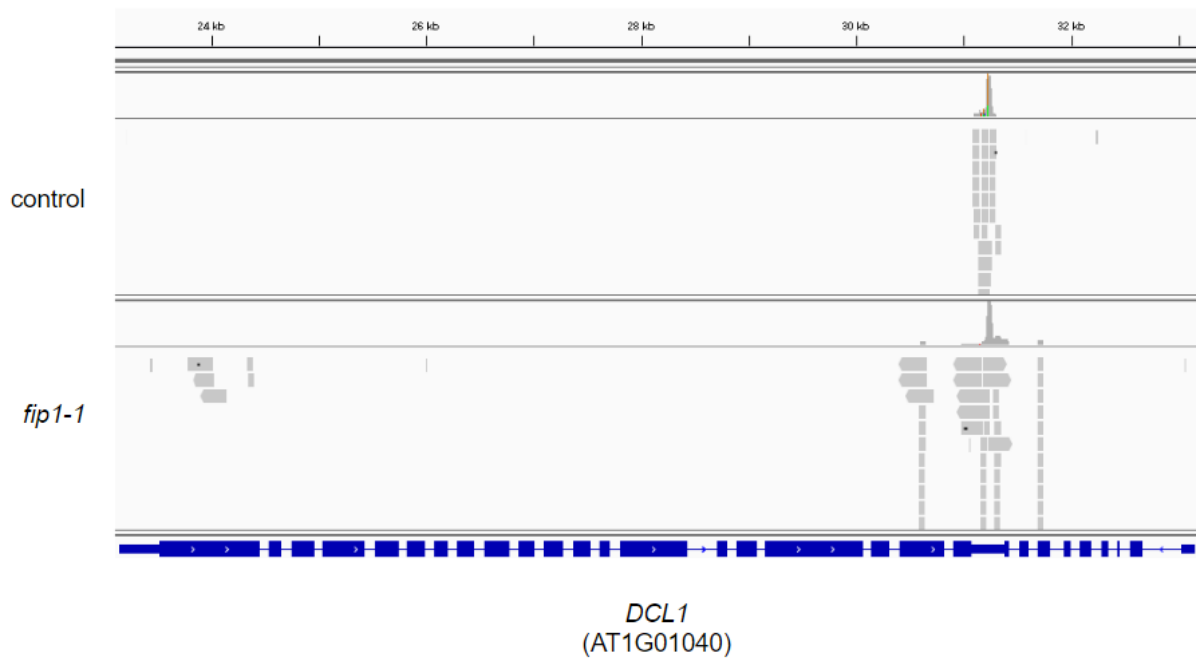
Anexo: Figura 9: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *FRY2*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.



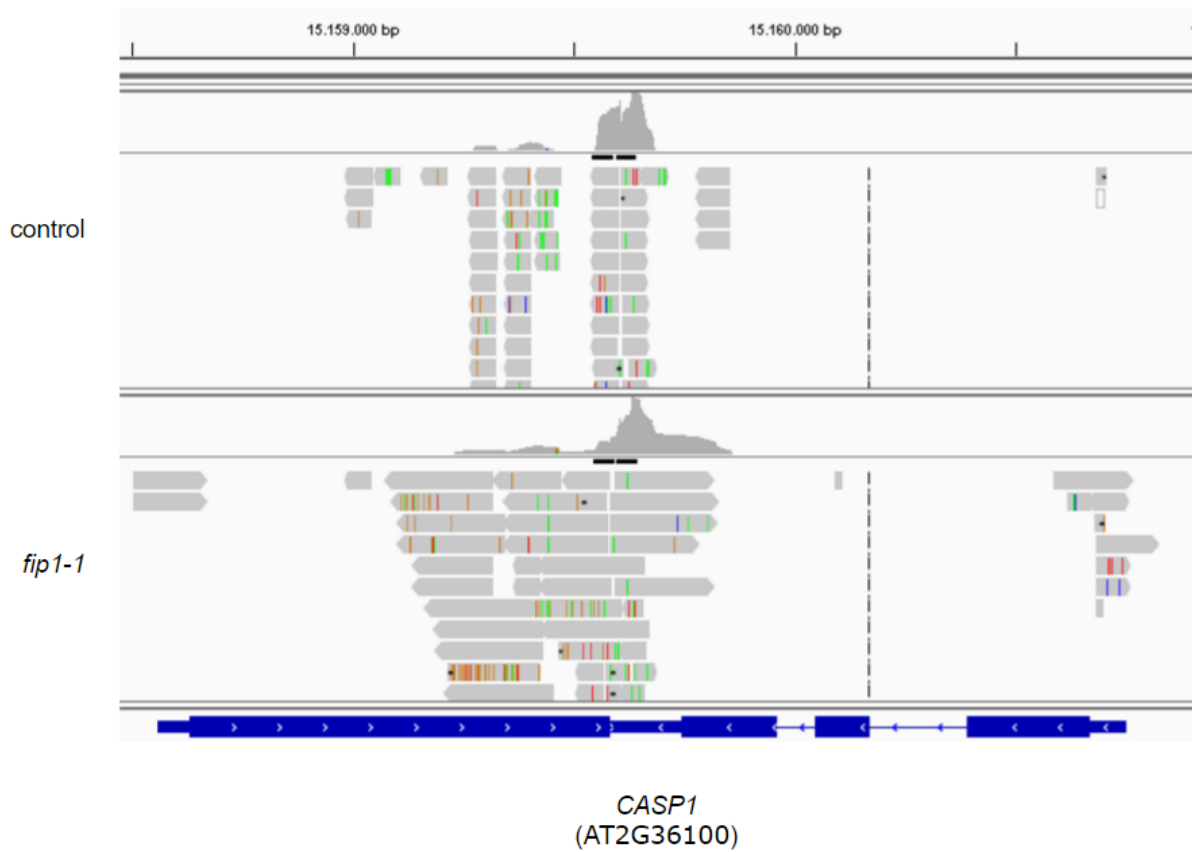
Anexo: Figura 10: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *RS40*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.



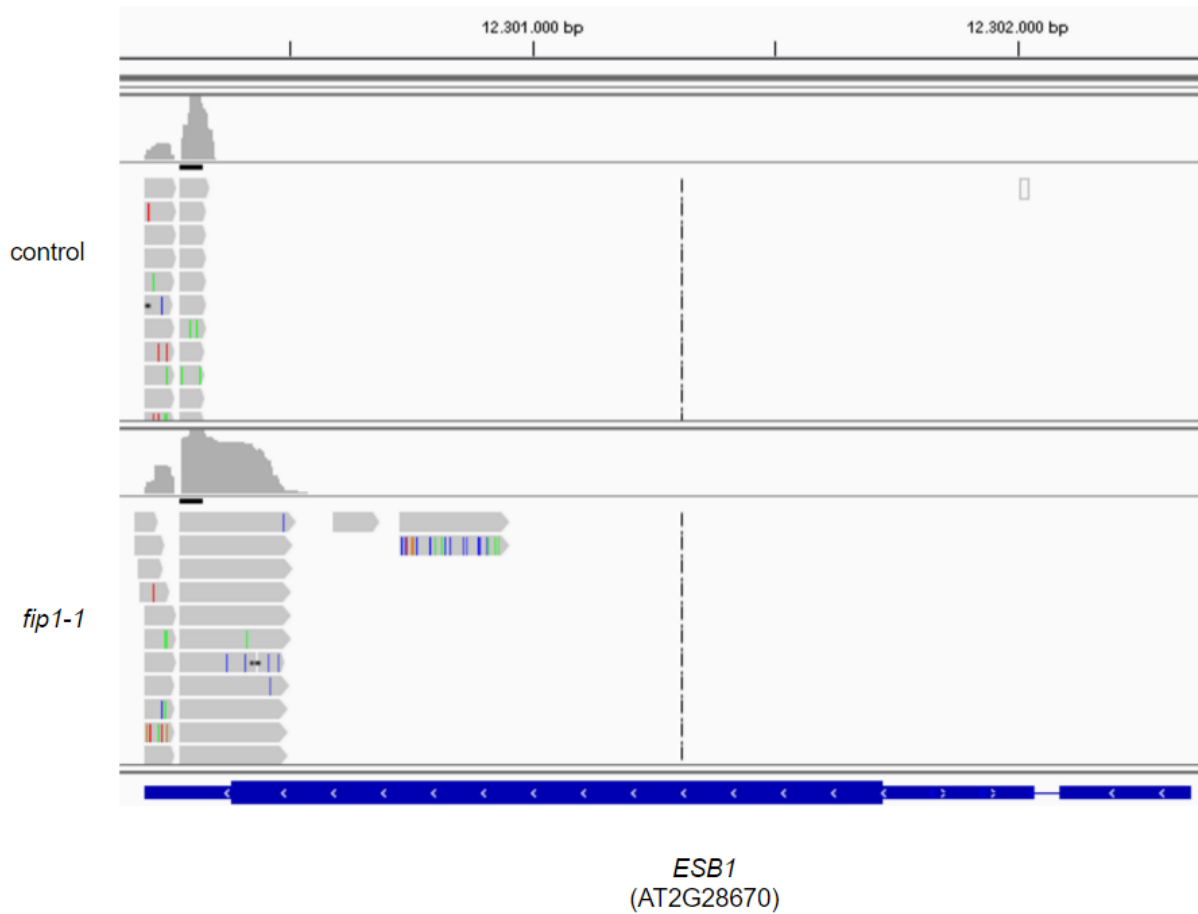
Anexo: Figura 11: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *miR162*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.



Anexo: Figura 12: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *DCL1*. La Anexo: Figura inferior muestra una ampliación del extremo 3'UTR. Muestras de raíz de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.

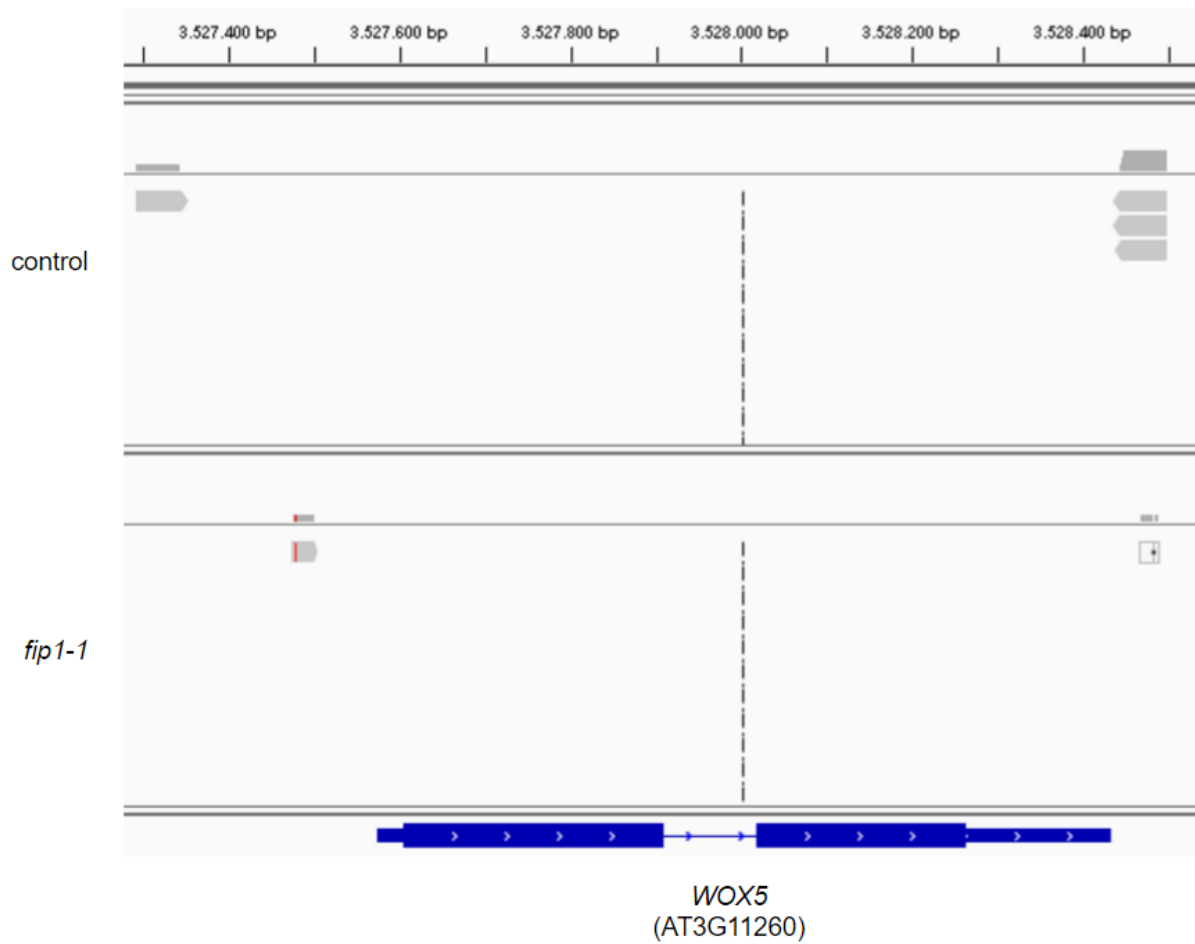


Anexo: Figura 13: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *CASP1*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.

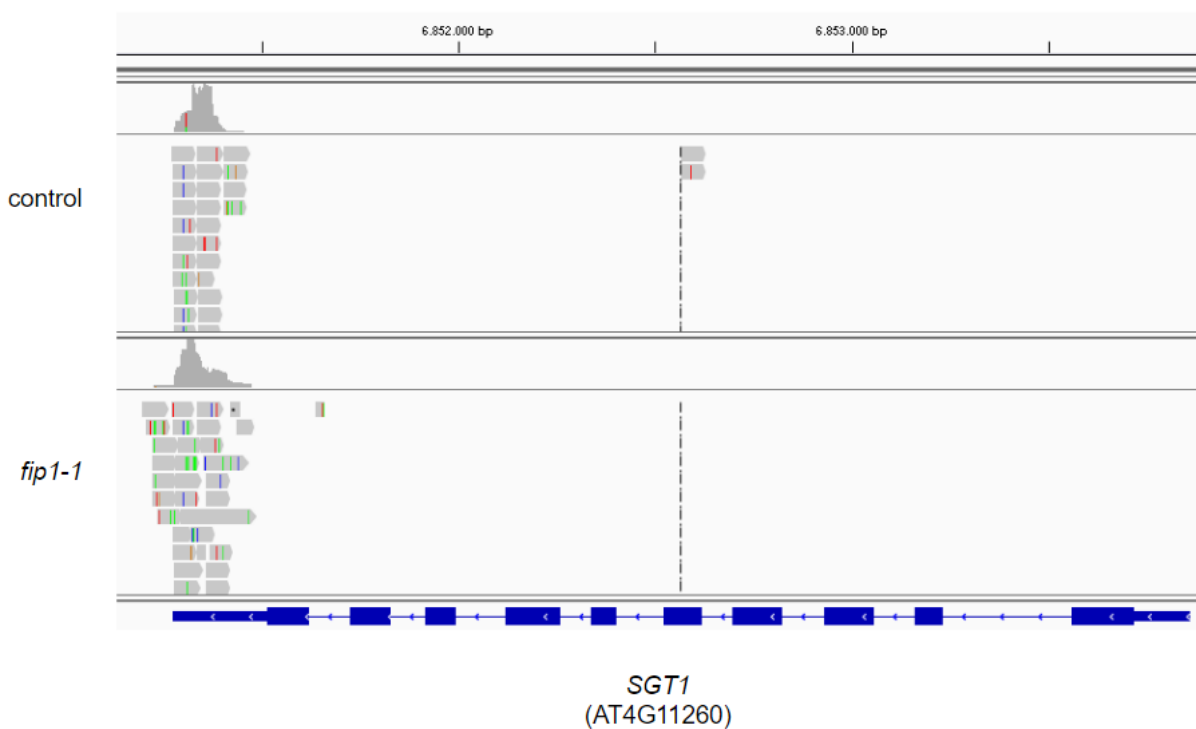


Anexo: Figura 14: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *ESB1*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.



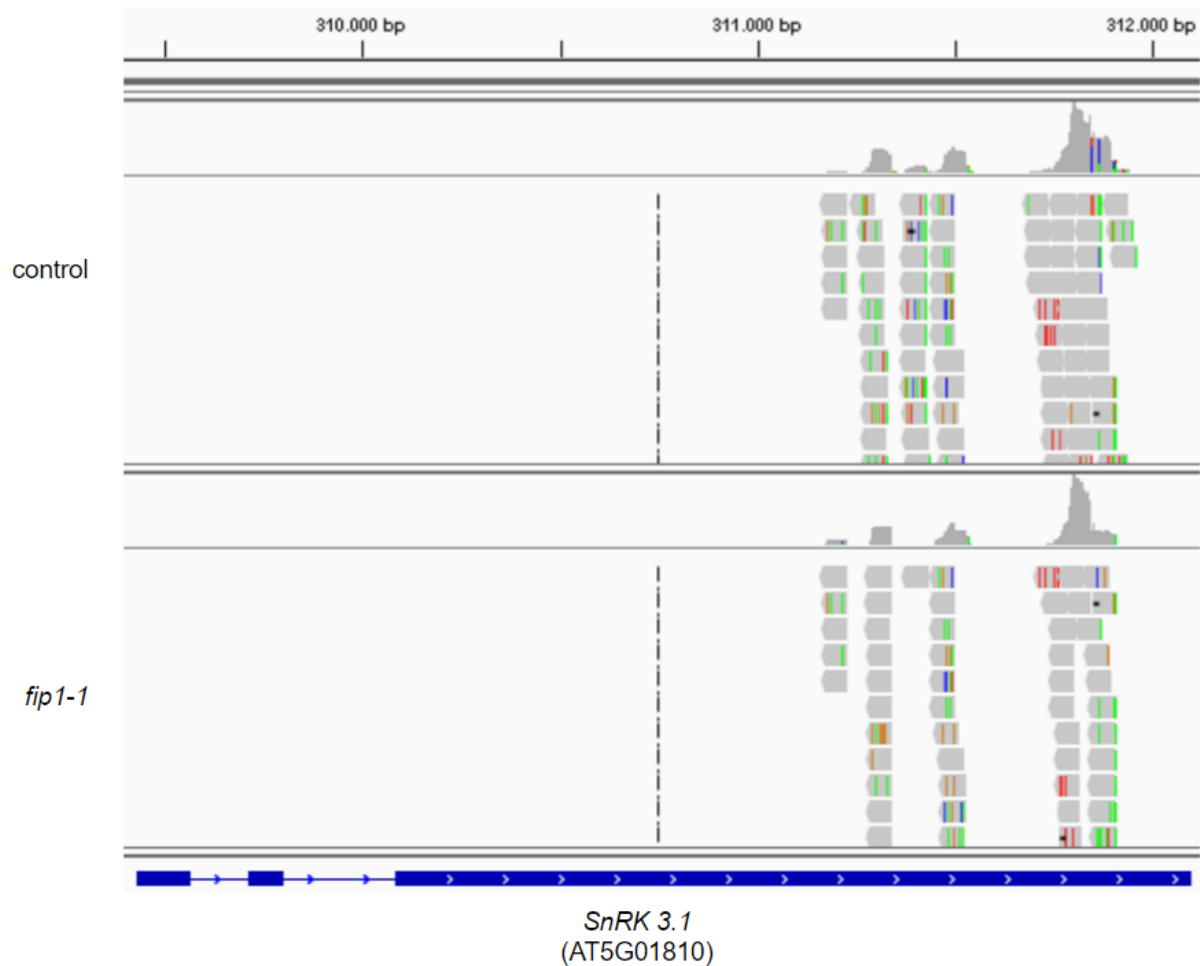


Anexo: Figura 16: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *WOX5*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.

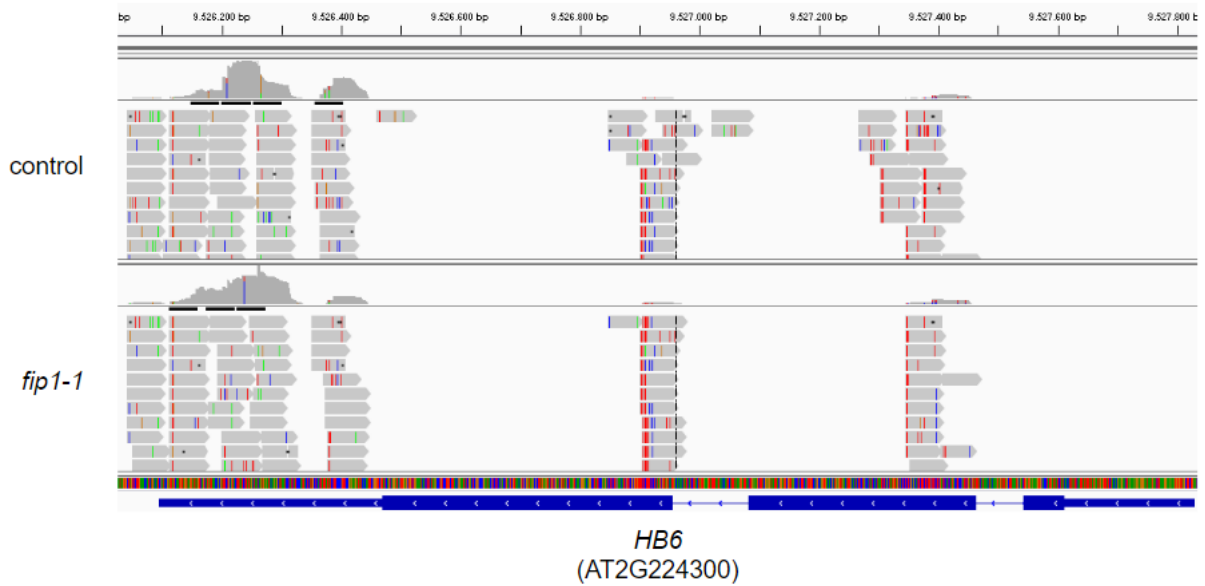


Anexo: Figura 17: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *SGT1*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.

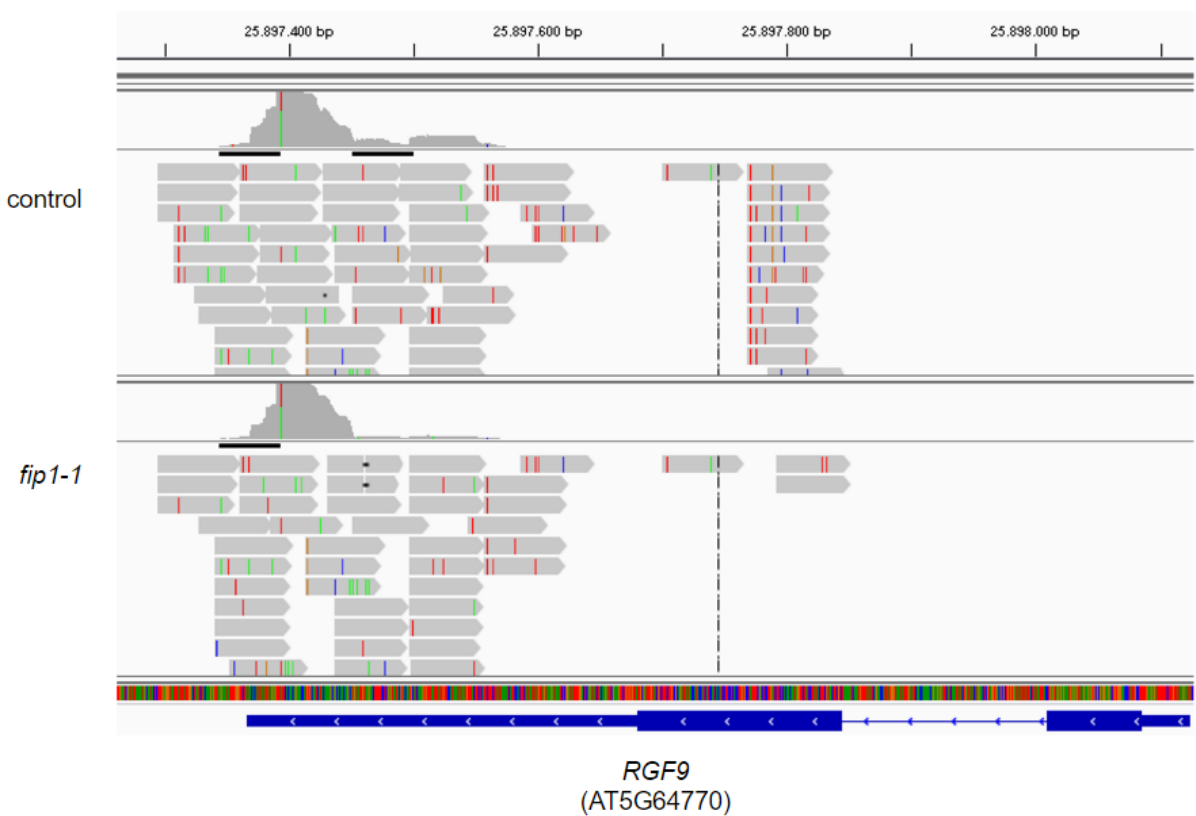
Poliadenilación alternativa en la parte aérea de *fip1-1* respecto a su control



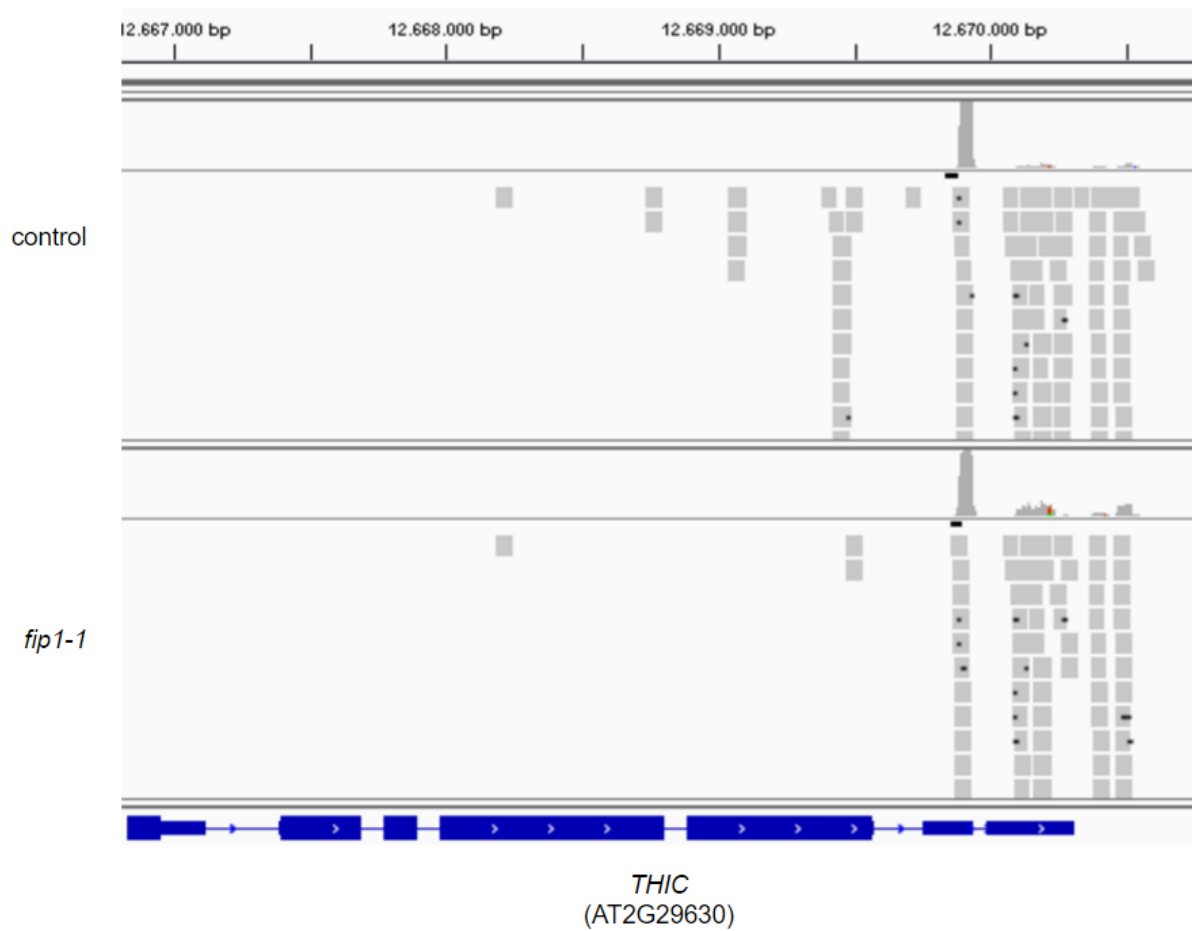
Anexo: Figura 18: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *SnRK3.1*. Muestras de parte aérea de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.



Anexo: Figura 19: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *HB6*. Muestras de parte aérea de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.

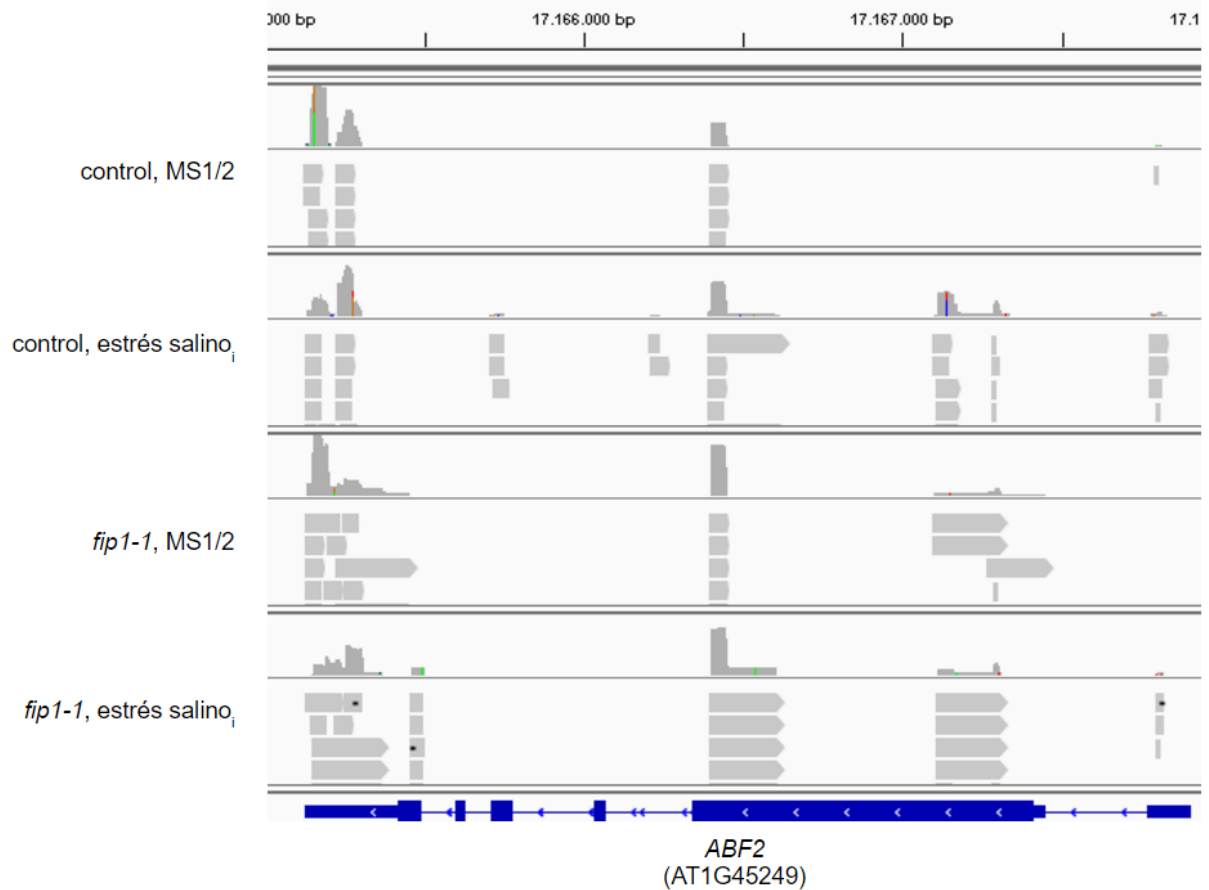


Anexo: Figura 20: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *RGF9*. Muestras de parte aérea de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.

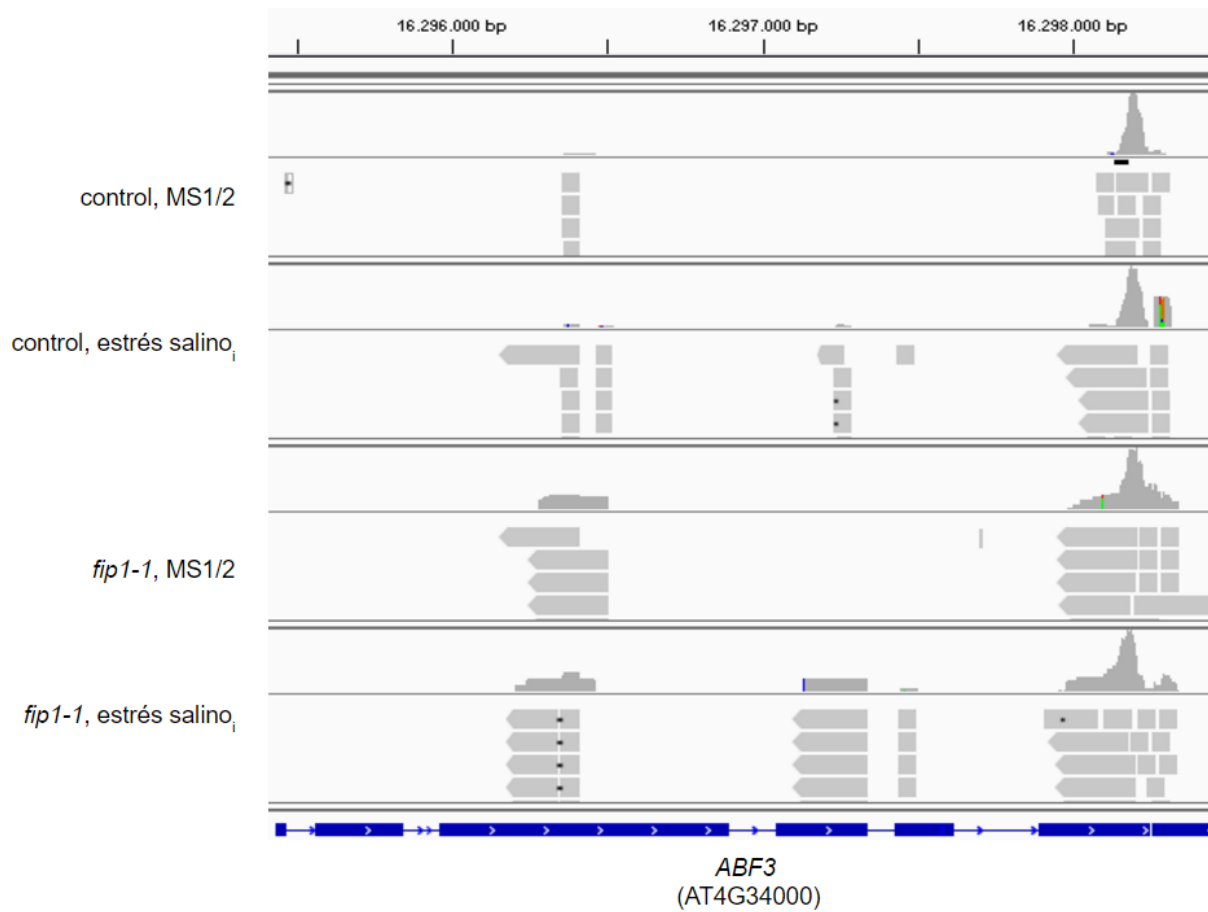


Anexo: Figura 21: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *THIC*. Muestras de parte aérea de *fip1-1* y control crecidas en MS1/2.

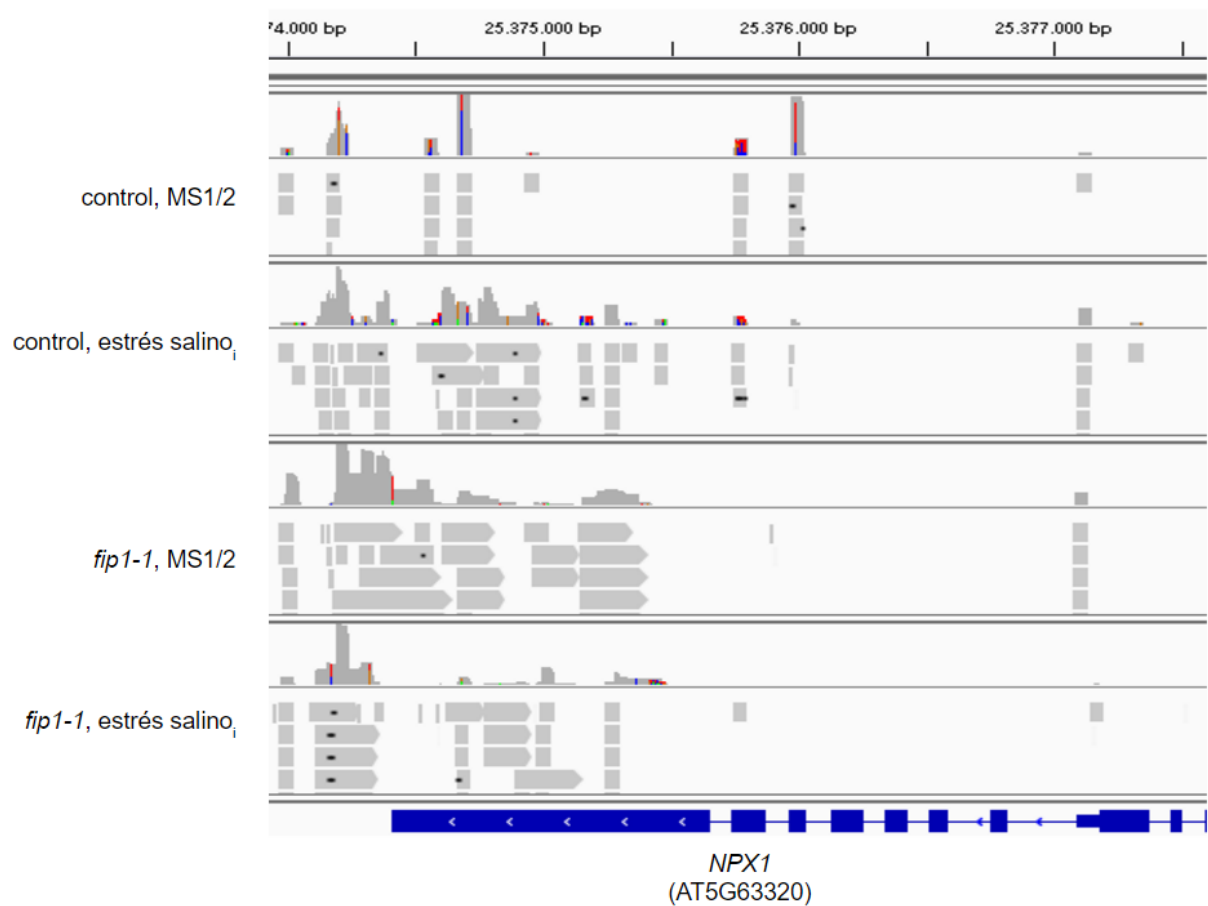
## Poliadenilación alternativa en raíz como respuesta a estrés salino



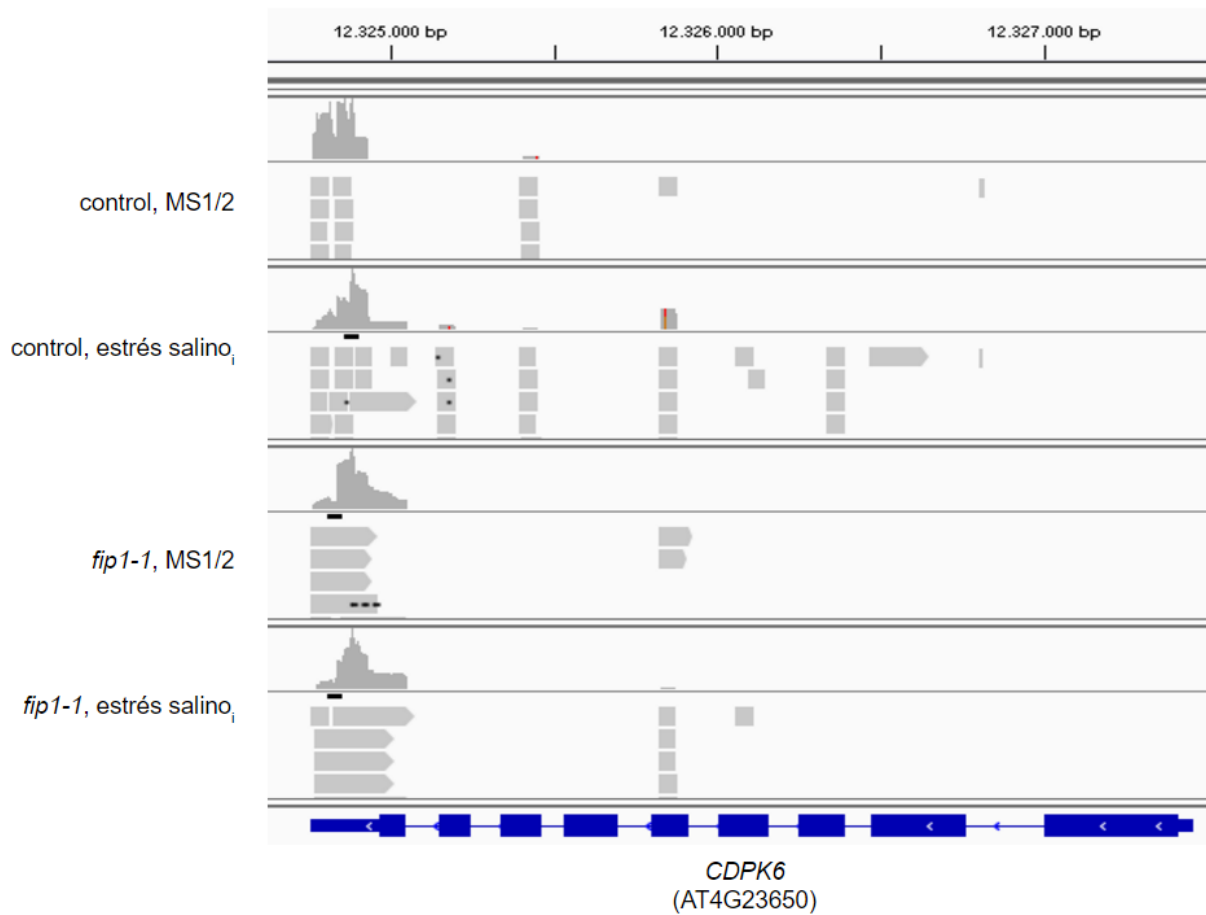
Anexo: Figura 22: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *ABF2*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control sometidas a tratamiento de estrés salino.



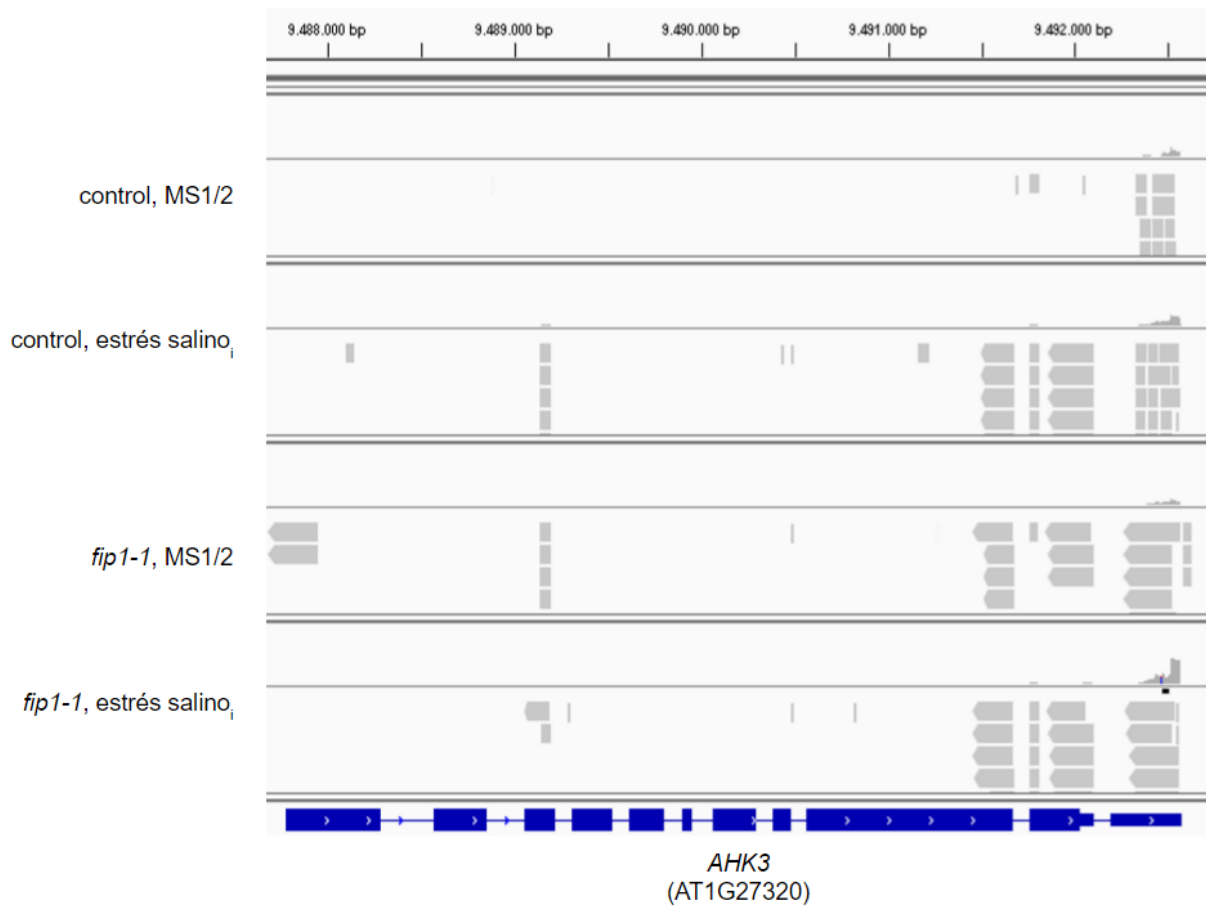
Anexo: Figura 23: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *ABF3*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control sometidas a tratamiento de estrés salino.



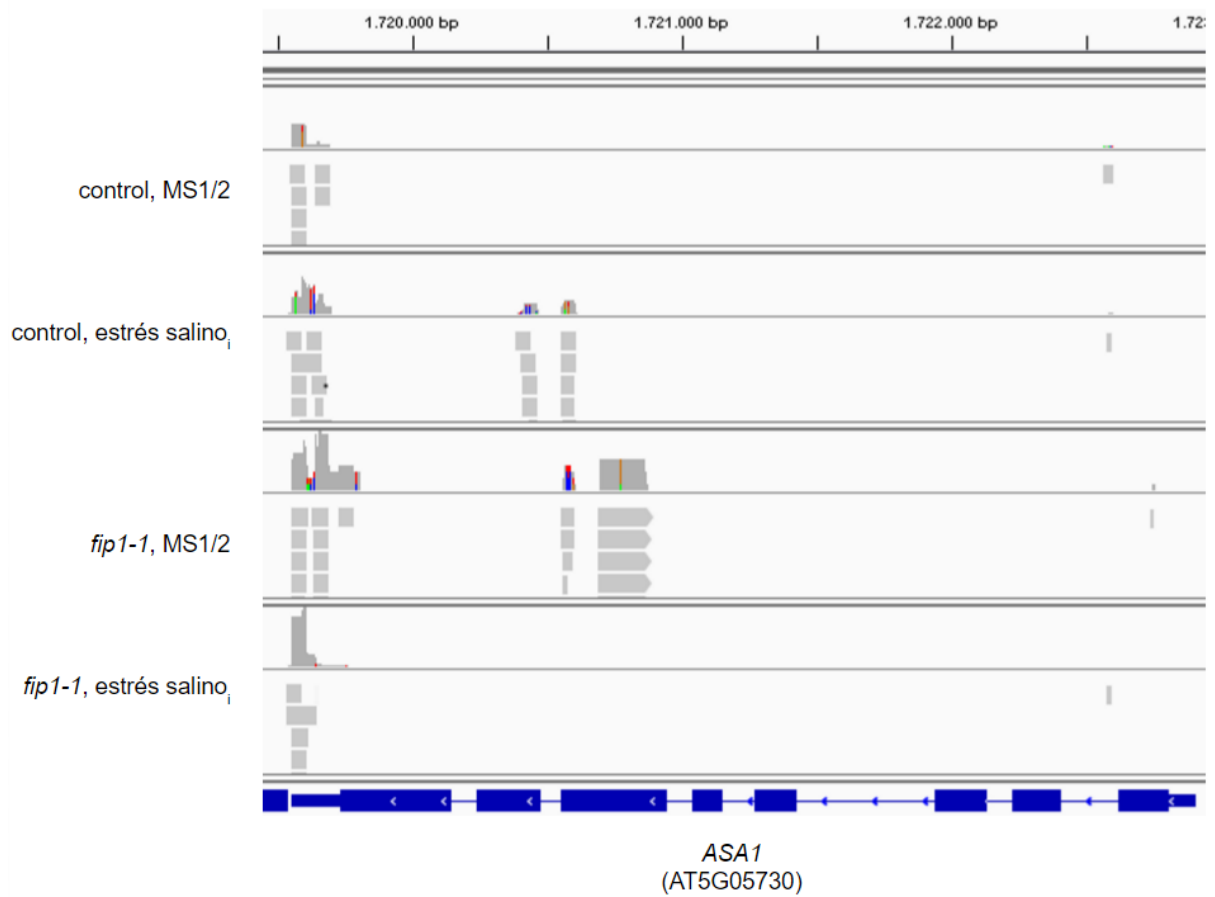
Anexo: Figura 24: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *NPX1*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control sometidas a tratamiento de estrés salino.



Anexo: Figura 25: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *CDPK6*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control sometidas a tratamiento de estrés salino.

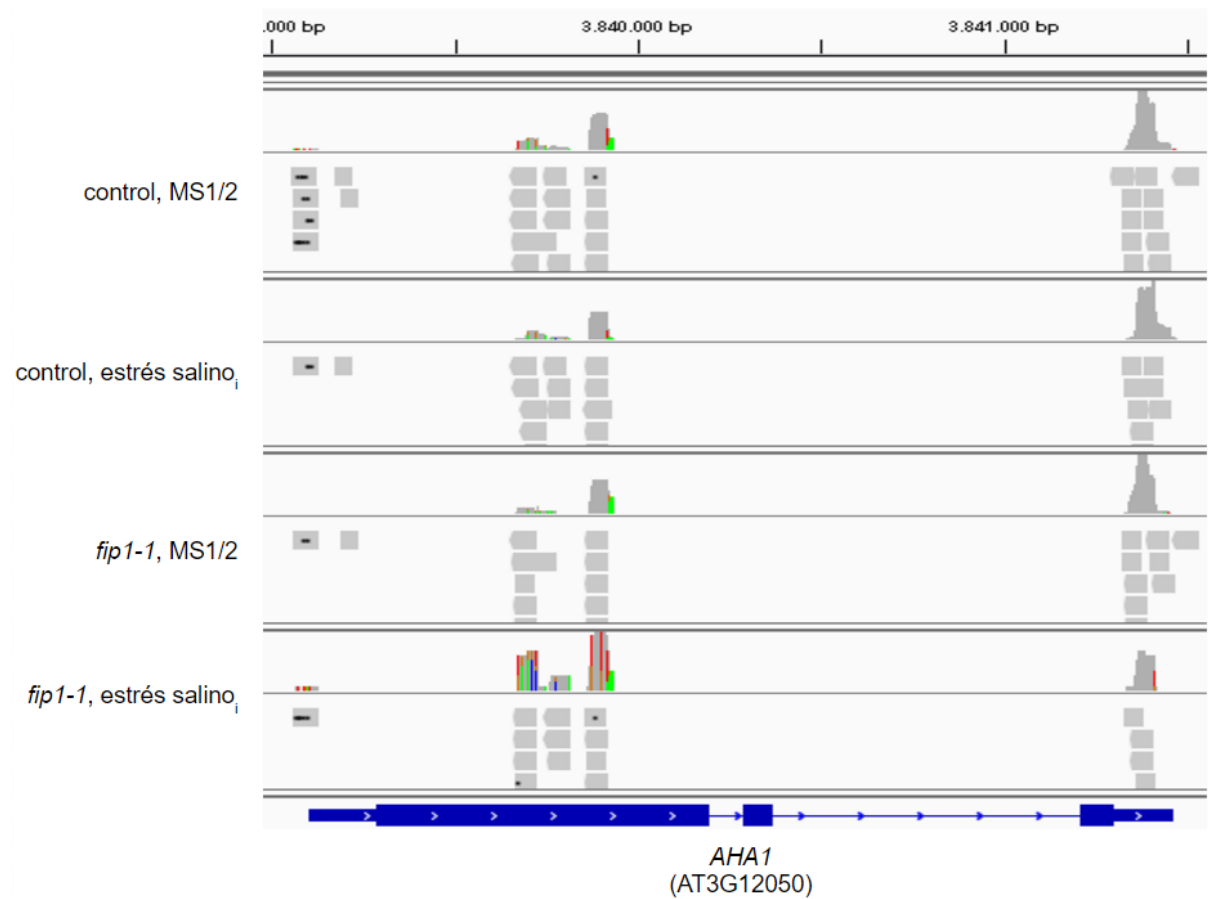


Anexo: Figura 26: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *AHK3*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control sometidas a tratamiento de estrés salino.

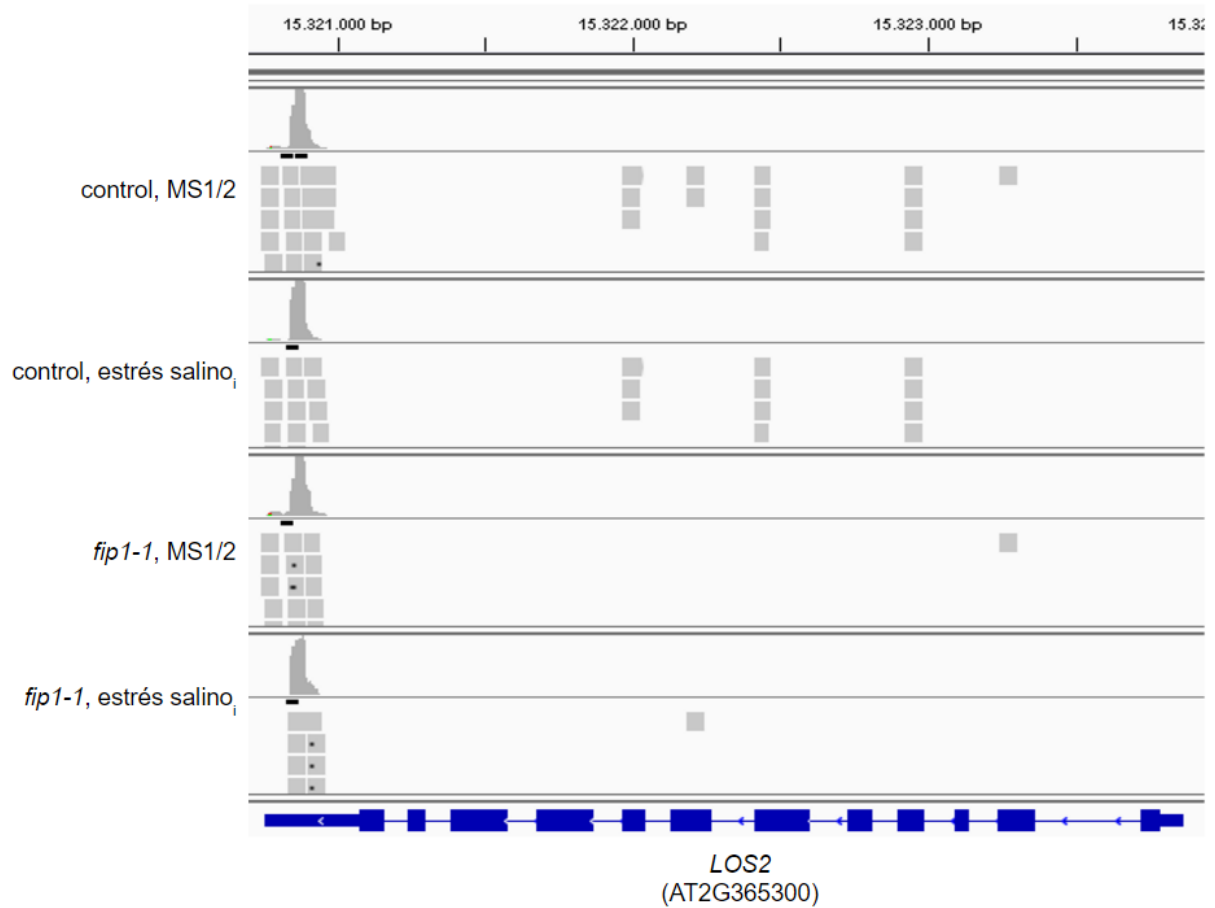


Anexo: Figura 27: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *ASA1*. Muestras de raíz de *fip1-1* y control sometidas a tratamiento de estrés salino.

## Poliadenilación alternativa en parte aérea como respuesta a estrés salino

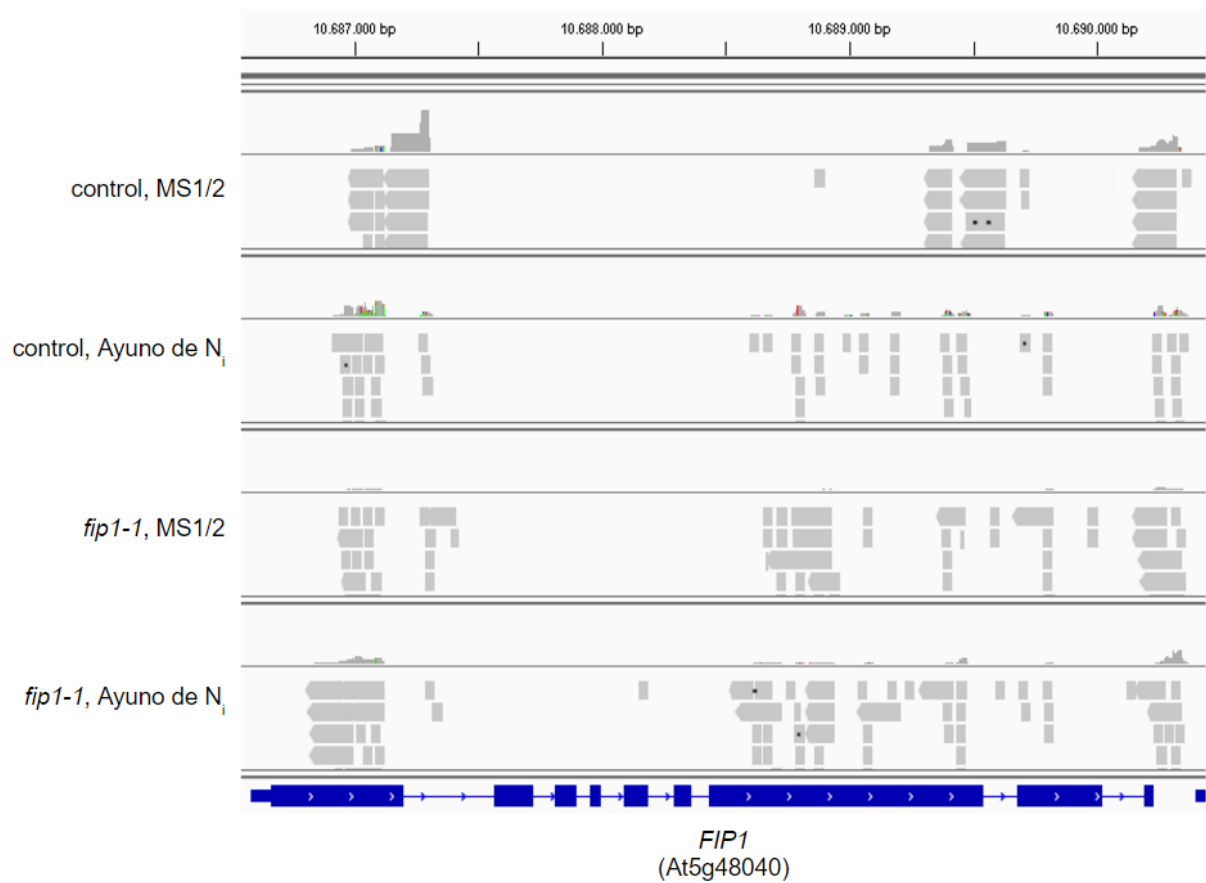


Anexo: Figura 28: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *AHA1*. Muestras de parte aérea de *fip1-1* y control sometidas a tratamiento de estrés salino.

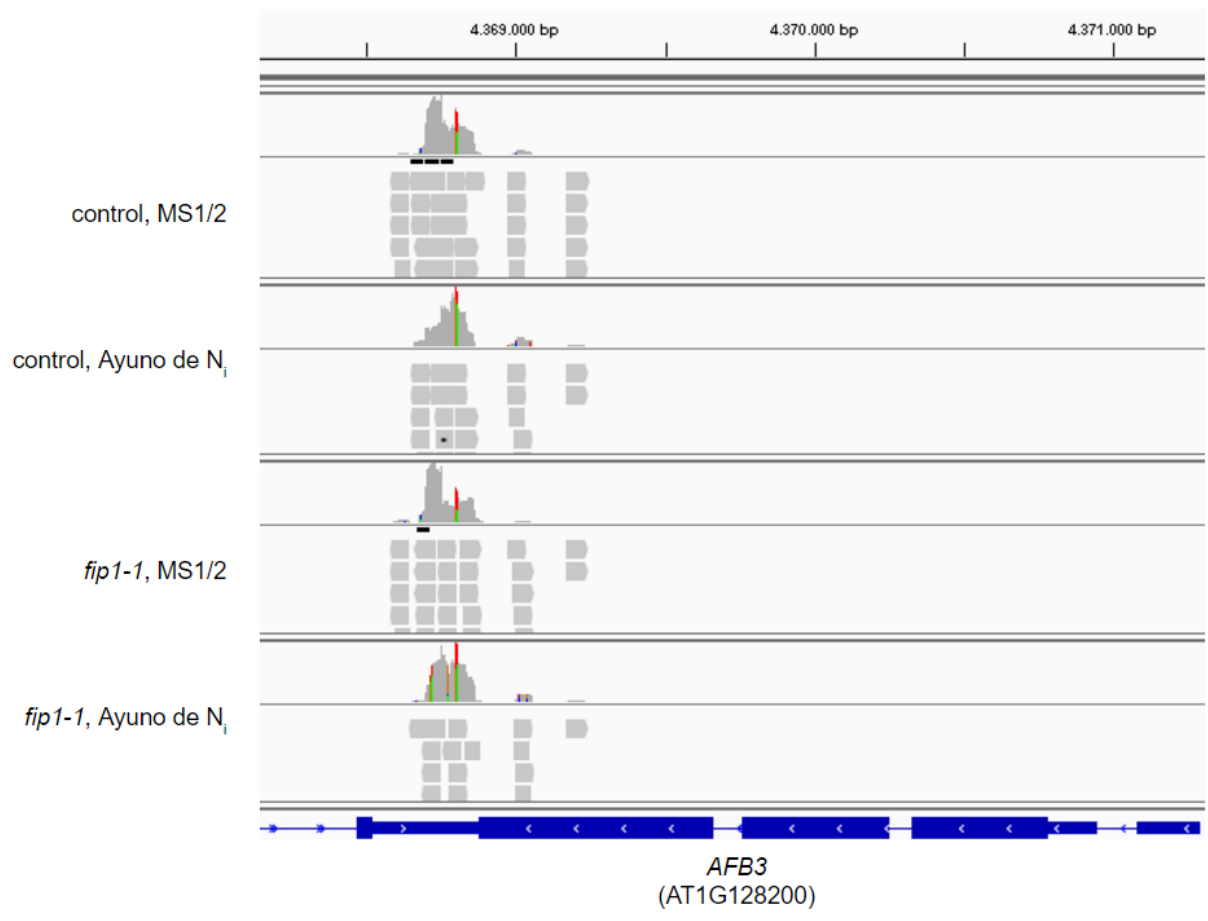


Anexo: Figura 29: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *LOS2*. Muestras de parte aérea de *fip1-1* y control sometidas a tratamiento de estrés salino.

Poliadenilación alternativa como respuesta a estrés salino

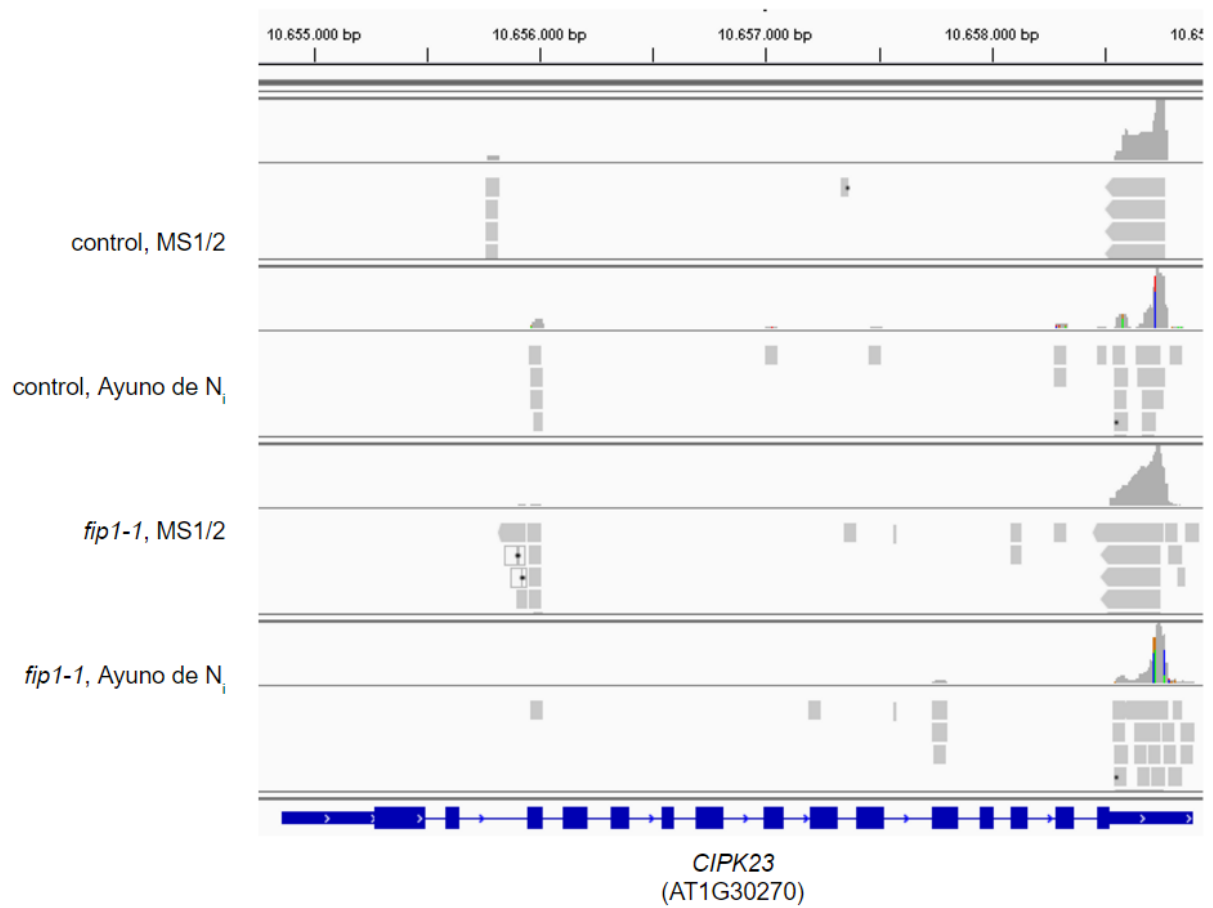


Anexo: Figura 30: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *FIP1*. Muestras de parte raíz de *fip1-1* y control sometidas a tratamiento de ayuno de nitrógeno.

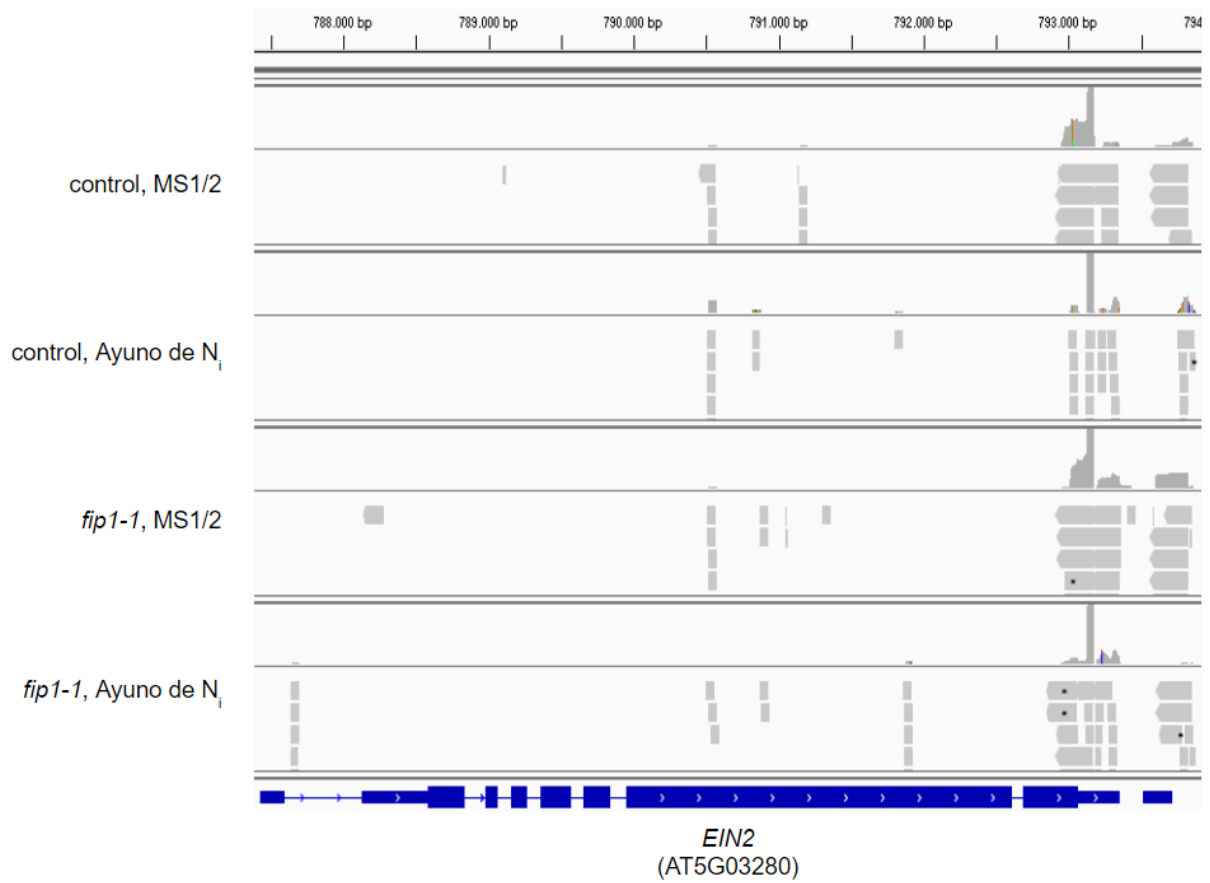


Anexo: Figura 31: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *AFB3*. Muestras de parte raíz de *fip1-1* y control sometidas a tratamiento de ayuno de nitrógeno.

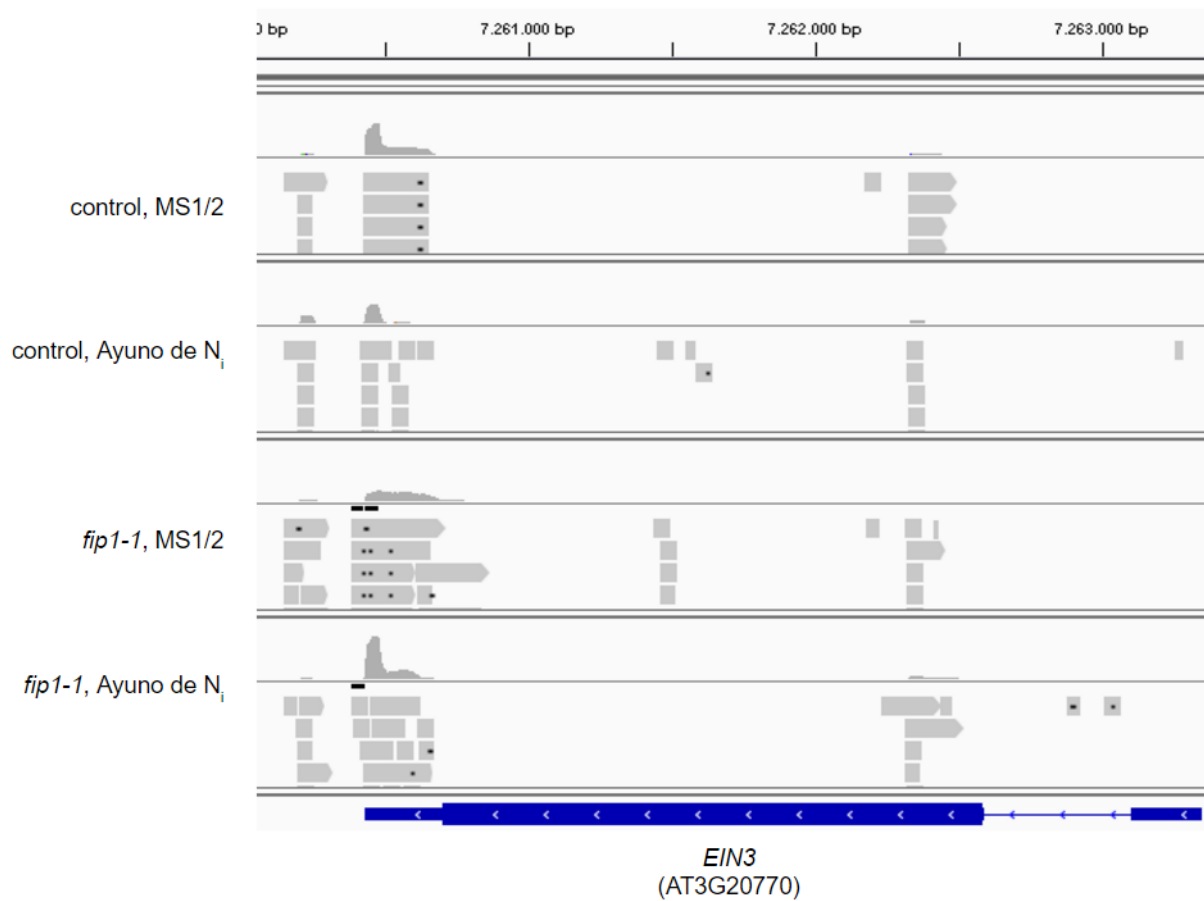




Anexo: Figura 33: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *CIPK23*. Muestras de parte raíz de *fip1-1* y control sometidas a tratamiento de ayuno de nitrógeno.



Anexo: Figura 34: Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *EIN2*. Muestras de parte raíz de *fip1-1* y control sometidas a tratamiento de ayuno de nitrógeno.



Anexo: Tabla Alineamiento de las secuencias obtenidas gracias al procedimiento PATSeq en lo que se refiere al gen *EIN3*. Muestras de parte raíz de *fip1-1* y control sometidas a tratamiento de ayuno de nitrógeno.

## 2. Poliadenilación alternativa: Genes regulados por APA en *fip1-1*

AGI	alias
AT3G16640	TCTP
AT5G59030	COPT1
AT3G53480	ABCG37
	ATPDR9
	PIS1
AT5G20520	WAV2
AT1G55020	ATLOX1
AT1G06230	GTE4
AT5G58710	ROC7
AT5G47990	CYP705A5
	THAD
	THAD1
AT2G37250	ADK
	ATPADK1
AT3G02260	ASA1
	BIG
	CRM1
	DOC1
	LPR1
	TIR3
	UMB1
AT5G17690	AtLHP1
	TFL2
AT1G30000	MNS3

Anexo: Tabla 1: Relación de genes regulados por APA en el mutante *fip1-1* con respecto al fondo genético control que pertenecen a la categoría funcional Desarrollo Radicular (GO: 0048364).

AGI	alias	AGI	alias
AT1G16850			SNRK2-7
AT5G50950	FUM2	AT4G40010	SRK2F
AT5G11150	ATVAMP713	AT4G37530	
AT3G44110	ATJ		ATGSL1
	ATJ3		GLN2
AT3G08720	ATPK19	AT5G35630	GS2
	ATPK2	AT5G19320	RANGAP2
	ATS6K2	AT5G10860	CBSX3
AT4G01070	GT72B1	AT1G53165	ATMAPK ALPHA1
	UGT72B1	AT1G53240	mMDH1
AT5G56030	AtHsp90.2	AT1G74840	
	ERD8		ATMYB7
	HSF81-2	AT2G16720	ATY49
	HSP90.2		ACO2
AT1G65930	cICDH	AT1G62380	ATACO2
AT1G10940	ASK1		ATRH25
	SNRK2-4	AT5G08620	STRS2
	SRK2A	AT5G39730	
AT2G13560	NAD-ME1		RGA
AT1G70000		AT2G01570	RGA1
AT4G23650	AtCDPK8	AT1G73230	
	CPK3	AT3G09200	
AT5G13850	NACA3	AT5G63320	NFX1
AT3G04120	GAPC		BGLU34
	GAPC-1	AT1G47600	TGG4
	GAPC1	AT5G18170	GDH1
AT4G12480	EARL1	AT1G50010	TUA2

Anexo: Tabla 2: Relación de genes regulados por APA en el mutante *fip1-1* con respecto al fondo genético control que pertenecen a la categoría funcional Respuesta a Estrés Salino (GO:0009651).

AGI	gene_alias
AT5G01810	ATPK10
	CIPK15
	PKS3
	SIP2
	SNRK3.1
AT2G26300	ATGPA1
	GP ALPHA 1
AT2G38310	PYL4
	RCAR10
AT2G22430	ATHB6
AT4G17870	PYR1
	RCAR11
AT4G23650	AtCDPK6
	CPK3
AT4G21670	ATCPL1
	FRY2
	RCF2
	SHI4
AT5G63470	NF-YC4
AT1G64060	ATRBOH F
	ATRBOHF
	RBOHAP108
AT2G30020	
AT1G74560	NRP1

Anexo: Tabla 3: Relación de genes regulados por APA en el mutante *fip1-1* con respecto al fondo genético control que pertenecen a la categoría funcional Señalización por ABA (GO: 0009738).

### 3. Poliadenilación alternativa: Genes regulados por APA en respuesta a estrés salino

AGI	alias
AT3G16640	TCTP
AT5G59030	COPT1
AT3G53480	ABCG37
	ATFDR9
	RS1
AT5G20520	WAV2
AT1G55020	ATLOX1
AT1G06230	GTE4
AT5G58710	ROC7
AT5G47990	CYP705A.5
	THAD
	THAD1
AT2G37250	ADK
	ATPADK1
AT3G02280	ASA 1
	BIG
	CRM1
	DOC1
	LPR1
	TIR3
	UMB1
AT5G17890	AtLHP1
	TFL2
AT1G30000	MNS3

Anexo: Tabla 4: Relación de genes regulados por APA en respuesta a estrés salino que pertenecen a la categoría funcional Desarrollo Radicular (GO: 0048364).

AGI	alias		AGI	alias		AGI	alias
AT1G16850			AT4G23650	AtCDPK6		AT1G62380	ACO2
AT5G50950	FUM2			CPK3			ATACO2
AT5G11150	ATVAMP713		AT5G13850	NACA3		AT5G08620	ATRH25
AT3G44110	ATJ			GAPC			STRS2
	ATJ3		AT3G04120	GAPC-1		AT5G39730	
	ATPK19			GAPC1		AT2G01570	RGA
AT3G08720	ATPK2		AT4G40010	SNRK2-7		AT1G73230	
	ATS6K2			SRK2F		AT3G09200	
AT4G01070	GT72B1		AT4G37530			AT5G63320	NPX1
	UGT72B1			ATGSL1		AT1G47600	BGLU34
	AtHsp90.2		AT5G35630	GLN2			TGG4
AT5G56030	ERD8			GS2		AT5G18170	GDH1
	HSP81-2		AT5G19320	RANGAP2		AT1G59960	
	HSP90.2		AT5G10860	CBSX3		AT1G50010	TUA2
AT1G65930	ciCDH		AT1G53165	ATMAP4K ALPHA1		AT4G12480	EARL1
	ASK1		AT1G53240	mMDH1			
AT1G10940	SNRK2-4		AT1G74840				
	SRK2A			ATMYB7			
AT2G13560	NAD-ME1		AT2G16720	ATY49			

Anexo: Tabla 5: Relación de genes regulados por APA en respuesta a estrés salino que pertenecen a la categoría funcional Respuesta a Estrés Salino (GO:0009651).

#### 4. Poliadenilación alternativa: Genes regulados por APA en respuesta a estrés salino en el fondo genético *fip1-1*

AGI	alias	AGI	alias	AGI	alias	AGI	alias	
AT5G44810	MAP18 FCAP2	AT2G17840	ERD7	AT2G26430	ATRCY1 MDS12	AT1G74840		
AT5G52860		AT4G34110	ATPAB2 FABP2	AT1G51470	BGLU35 TGG5	AT3G51780	ATBAG4	
AT1G89270	AtRPK1	AT1G05850	ATCTL1	AT1G02920	ATGST11	AT4G01280		
AT2G38460	FBA6		ELP		ATGSTF7	AT1G82380	ACO2 ATA CO2	
AT1G27320	AHK3		ELP1		ATGSTF8	AT2G28650	AKT1 ATAKT1	
AT4G30960	ATCIRK6		ERH2		AT3G52300	ATRQ	AT4G24190	AtHsp90-7 HSP90.7 SHD
	SIP3		HOT2	AT5G63850	SNRK2-5 SRK2H			
	SNRK3.14 SOS3		POM1	AT4G34000	ABF3 AtABF3 DPBF5	AT1G10170		ATNFXL1
AT4G01070	GT72B1 UGT72B1	AT5G56030	AT5G63850		AT4G34000	AT1G28420	HB-1 RLT1	
AT2G47510	FUM1	AtHsp90.2 ERD8 HSP81-2 HSP90.2	AT5G35630		AT4G35830	AT1G18170	GDH1	
AT4G14960	TUA6	AT5G47030		AT5G35630	GLN2 GS2	AT5G62690	TUB2	
AT3G03780	ATMS2	AT1G65930	clCDH		AT4G35830	ACO1	AT1G59960	
AT5G37370	ATSRL1	AT3G60750	AtTKL1	AT4G02520	ATGSTF2 ATRM24 ATRM24.1 GST2	AT4G24800	ECIP1	
AT1G62480		AT2G21660	ATGRP7 CCR2 GR-RBP7		AT3G02360		AT1G64190	
AT1G04410	c-NAD-MDH1		AT1G77180		SKIP	AT5G10860	CB SX3	
AT5G08590	ASK2 SNRK2-1 SRK2G	AT1G17520		AT1G78080	AtWIND1 RAF2.4			
AT4G23670		AT4G11600	ATGPX8 LSC803 FHGPX	AT1G45249	ABF2 AREB1 AtABF2			
AT5G04590	SIR		AT2G33540		ATCPL3			
AT4G09320	ATNDK1 NDRK1	AT1G21750	ATPDI5 ATPDIL1-1					
AT5G67300	ATMYB44 ATMYBR1	AT5G01410	RSR4					
AT5G04280	AtRZ-1c							
AT2G05710	ACO3							

Anexo: Tabla 6: Relación de genes regulados por APA en el mutante *fip1-1* como respuesta a estrés salino que pertenecen a la categoría funcional Respuesta a Estrés Salino (GO:0009651).

AGI	alias	AGI	alias	AGI	alias	AGI	alias
AT5G44610	MAP18	AT5G87300	ATMYB44	AT2G17290	ATCDK3	AT5G62000	ARF1-BP
	PCAF2		ATMYBR1		ATCPK6		ARF2
AT5G52660		AT3G47620	AtTCP14	AT2G25070			HSS
AT5G37770	CML24	AT2G05710	ACO3	AT3G20310	A TERF-7		AT1G74840
	TCH2	AT5G57050	ABI2		ATERF7		
AT1G89270	AtRRK1		AT1G77180	AtABI2	AT1G03080	SPI	AT3G12560
AT3G80240	CUM2	AT1G55020		SKJP	AT1G49720	ABF1	AT3G19580
	EIF4G	AT3G57870	ATLOX1	AtABF1		AT3G19580	
AT2G18960	AHA1		AHUS5	AT3G50970	LT30	AT5G20850	COPT5
	OST2		ATSCE1		XERO2	AT2G30470	HSI2
	PMA		EMB1637	AT3G53420	AtPP2.1		VAL1
AT1G78180	ERD14	SCE1A	RFP2A		AT4G01280		
AT1G73980		AT2G33540	ATCFL3	AT1G56280	ATDH9	AT4G27410	ANAC072
AT1G20440	AtCOR47	AT1G20450	ERD10	AT4G34000	ABF3	AT4G26080	RD26
	RD17		LT29		AtABF3		ABI1
AT1G32640	ATMYC2		LT45	AT2G05520	DPBF5	AtABI1	
	JAI1	ATGRP-3	AT5G20910		AP2	AT1G13740	AFF2
	JN1	ATGRP3	AT1G63840		AT1G18100	E12A11	
	RD22BP1	ATDB	AT1G45249	ABF2		MFT	
	ZBF1	RAB18		AREB1	AT5G08080	ATSYF132	

Anexo: Tabla 7: Relación de genes regulados por APA en el mutante *fip1-1* como respuesta a estrés salino que pertenecen a la categoría funcional Señalización por ABA (GO: 0009738).



Es peligroso, Frodo, cruzar tu puerta.

Pones tu pie en el camino, y si no cuidas tus pasos, nunca sabes a dónde te pueden llevar...

