



Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Caracterización genética y molecular
de los genes *RE* e *ICU2*
de *Arabidopsis thaliana***

Rebeca González Bayón

Elche, 2007

**Caracterización genética y molecular
de los genes *RE* e *ICU2*
de *Arabidopsis thaliana***



Trabajo realizado por la Licenciada Rebeca González Bayón, en la División de Genética del Departamento de Biología Aplicada y el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche, para optar al grado de Doctor.

Elche, 2 de julio de 2007

JOSÉ LUIS MICOL MOLINA, Catedrático de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

MARÍA ROSA PONCE MOLET, Profesora Titular de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por la Licenciada Rebeca González Bayón para optar al grado de Doctor. Las investigaciones reflejadas en esta Tesis se han desarrollado íntegramente en la División de Genética del Departamento de Biología Aplicada y el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

José Luis Micol Molina

María Rosa Ponce Molet

Elche, 2 de julio de 2007

A quien corresponda:

José Luis Micol Molina, Catedrático de Genética y Director del Departamento de Biología Aplicada,

HACE CONSTAR

que da su conformidad a la lectura de la Tesis Doctoral presentada por Doña **Rebeca González Bayón**, titulada “**Caracterización genética y molecular de los genes *RE* e *ICU2* de *Arabidopsis thaliana*”**, que se ha desarrollado dentro del Programa de Doctorado de Bioingeniería de este Departamento, bajo mi dirección y la de la Prof.^a Dra. Doña María Rosa Ponce Molet.

Lo que firmo en Elche, a instancias de la interesada y a los efectos oportunos, a dos de julio de dos mil siete.

José Luis Micol Molina
Catedrático de Genética
Director del Departamento de Biología Aplicada



A mi niña
A mi familia

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS	III
I.- PREFACIO	1
II.- RESUMEN Y CONCLUSIONES	2
III.- INTRODUCCIÓN	4
III.1.- Consideraciones sobre el desarrollo vegetal	4
III.2.- <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo del desarrollo vegetal	4
III.3.- Morfología e histología foliar	6
III.4.- Análisis de los mutantes reticulados en <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
III.5.- La memoria celular mediada por la cromatina	11
III.6.- Antecedentes y objetivos de esta Tesis	14
IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
IV.1.- Análisis genético y molecular de los genes <i>VEN</i>	15
IV.1.1.- Caracterización preliminar de los mutantes <i>ven</i>	15
IV.1.2.- Análisis genético y molecular del gen <i>RE (VEN2)</i>	15
IV.1.2.1.- Identificación de los mutantes <i>re</i>	15
IV.1.2.2.- Fenotipo de los mutantes <i>re</i>	17
IV.1.2.2.1.- Rasgos morfológicos	17
IV.1.2.2.2.- Histología foliar	17
IV.1.2.2.3.- Patrón de venación foliar	17
IV.1.2.2.4.- Ultraestructura de los cloroplastos	18
IV.1.2.3.- Clonación posicional y caracterización estructural del gen <i>RE</i>	18
IV.1.2.3.1.- Identificación de <i>RE</i>	18
IV.1.2.3.2.- Obtención de alelos insercionales <i>re</i>	19
IV.1.2.3.3.- La familia <i>RE</i>	20
IV.1.2.4.- Análisis de la expresión de los genes <i>RE</i> y <i>RE2</i>	21
IV.1.2.5.- Análisis de las interacciones genéticas de <i>RE</i>	23
IV.1.2.6.- Consideraciones sobre la función de <i>RE</i>	24
IV.1.3.- Clonación posicional de los genes <i>VEN1</i> , <i>VEN3</i> , <i>VEN4</i> , <i>VEN5</i> y <i>VEN6</i>	26
IV.1.3.1.- Cartografía de alta resolución de <i>VEN1</i>	26
IV.1.3.2.- Cartografía de alta resolución de <i>VEN3</i>	26
IV.1.3.3.- Clonación posicional y caracterización de <i>VEN4</i>	27
IV.1.3.3.1.- Cartografía de alta resolución de <i>VEN4</i>	27
IV.1.3.3.2.- Identificación y caracterización estructural de <i>VEN4</i>	27
IV.1.3.4.- Clonación posicional y caracterización de <i>VEN5</i>	29
IV.1.3.4.1.- Cartografía de alta resolución de <i>VEN5</i>	29
IV.1.3.4.2.- Identificación y caracterización estructural de <i>VEN5</i>	29
IV.1.3.5.- Cartografía de alta resolución de <i>VEN6</i>	30

IV.2.- Análisis genético y molecular del gen <i>ICU2</i>	31
IV.2.1.- Caracterización preliminar del mutante <i>icu2-1</i>	31
IV.2.2.- Fenotipo morfológico del mutante <i>icu2-1</i>	32
IV.2.3.- Clonación posicional y caracterización estructural de <i>ICU2</i>	32
IV.2.3.1.- Cartografía de alta resolución e identificación de <i>ICU2</i>	32
IV.2.3.2.- Obtención y caracterización de alelos <i>icu2</i> insercionales	33
IV.2.4.- Análisis de la expresión de <i>ICU2</i>	34
IV.2.5.- Análisis de las interacciones genéticas de <i>ICU2</i>	35
IV.2.5.1.- Interacciones con <i>AG</i> y <i>FT</i>	35
IV.2.5.2.- Interacciones con <i>CLF</i> , <i>TFL2</i> , <i>FAS1</i> y <i>FAS2</i>	35
IV.2.6.- Análisis de la desregulación génica en el mutante <i>icu2-1</i>	36
IV.2.7.- Estudio de la metilación del gen <i>AG</i> en el mutante <i>icu2-1</i>	37
IV.2.8.- Análisis de la expresión del gen <i>AG</i> y la distribución subcelular de la proteína TFL2 en el mutante <i>icu2-1</i>	37
IV.2.9.- Consideraciones sobre la función de <i>ICU2</i>	37
V.- BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXO I: PUBLICACIONES	45
ANEXO II: COMUNICACIONES A CONGRESOS	115
AGRADECIMIENTOS	134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Estructura y ultraestructura de las hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
Figura 2.- Fenotipo de algunos mutantes variegados o reticulados de <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
Figura 3.- Representación esquemática de los complejos PRC2	11
Figura 4.- El sistema Su(var)3-9 y Su(var)2-5	13
Figura 5.- El fenotipo Venosa	15
Figura 6.- Ultraestructura de los cloroplastos de los mutantes <i>re</i>	18
Figura 7.- Mapa físico de <i>Arabidopsis thaliana</i> con indicación de las posiciones absolutas de los marcadores moleculares y las relativas de los genes estudiados en este trabajo	19
Figura 8.- Células del mesófilo en empalizada del mutante <i>re2-1</i>	21
Figura 9.- Análisis de la expresión del gen <i>RE2</i>	22
Figura 10.- Sinergia fenotípica en las plantas <i>re-3/re-3;RE2/re2-1</i>	23
Figura 11.- Clonación posicional del gen <i>VEN4</i>	28
Figura 12.- Estructura del gen <i>VEN4</i> y naturaleza molecular de sus alelos mutantes.....	28
Figura 13.- Clonación posicional del gen <i>VEN5</i>	29
Figura 14.- Estructura del gen <i>VEN5</i> y naturaleza molecular de sus alelos mutantes.....	30
Figura 15.- Clonación posicional del gen <i>VEN6</i>	31
Figura 16.- Algunos rasgos fenotípicos del mutante <i>icu2-1</i>	32
Figura 17.- Hipótesis sobre la relación entre ICU2 y el marcaje epigenético.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Algunas características de los mutantes <i>venosa</i> estudiados en este trabajo	16
---	----



I.- PREFACIO

I.- PREFACIO

Este documento se ha elaborado siguiendo la normativa de la Universidad Miguel Hernández de Elche para la “Presentación de Tesis Doctorales con un conjunto de publicaciones”, y se ha dividido en las partes siguientes:

- 1.- Un apartado de *Resumen y conclusiones*.
- 2.- Una *Introducción*, en la que se presenta el tema de la Tesis, el organismo experimental elegido y los antecedentes del trabajo realizado, y se definen los objetivos perseguidos.
- 3.- Un apartado de *Resultados y discusión*.
- 4.- Un *Anexo I*, que contiene un artículo publicado y un manuscrito pendiente de aceptación en el momento del depósito de la Tesis, que son los siguientes:

González-Bayón, R., Kinsman, E.A., Quesada, V., Vera, A., Robles, P., Ponce, M.R., Pyke, K.A., y Micol, J.L. (2006). Mutations in the *RETICULATA* gene dramatically alter internal architecture but have little effect on overall organ shape in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**, 3019-3031 (Índice de impacto: 3,630).

Barrero, J.M., González-Bayón, R., del Pozo, J.C., Ponce, M.R., y Micol, J.L. *INCURVATA2* encodes the catalytic subunit of DNA polymerase α and interacts with genes involved in chromatin-mediated cellular memory in *Arabidopsis thaliana*. Pendiente de aceptación en *Plant Cell* (Índice de impacto: 9,868).

- 5.- Un *Anexo II*, que incorpora 8 comunicaciones a congresos nacionales y 1 internacional, relacionadas con los análisis del gen *RE* en los que he participado, 3 comunicaciones a congresos nacionales relacionadas con los análisis referentes al gen *ICU2*, y otras 5 comunicaciones a congresos nacionales, relacionadas con otros trabajos que he realizado durante el disfrute de mi beca predoctoral, que se recogerán en el futuro en manuscritos aún por redactar.

Este documento no incluye un apartado de *Materiales y métodos*, puesto que se describen en las publicaciones del *Anexo I*. Del mismo modo, en el apartado de *Bibliografía* se citan sólo aquellas referencias que no están recogidas en el artículo y el manuscrito.

A lo largo de esta Tesis hemos colaborado con los grupos de Kevin A. Pyke (University of Nottingham, Leicestershire, Reino Unido), Antonio Vera (Universidad Miguel Hernández, Campus de San Juan), y Juan Carlos del Pozo (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid).



II.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

II.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Con el objetivo de contribuir a la disección genética de la ontogenia foliar, hemos obtenido y estudiado varias estirpes mutantes de *Arabidopsis thaliana* que presentan alteraciones en la morfología de sus hojas vegetativas, a las que hemos denominado *venosa* (*ven*) e *incurvata2* (*icu2*). Las razones de nuestro interés inicial por estos mutantes fueron las siguientes: Las hojas vegetativas de los mutantes *ven* presentan una red vascular intensamente verde, que destaca sobre un limbo pálido, lo que sugiere que sufren alteraciones en la biogénesis de los cloroplastos, la diferenciación del mesófilo, o ambas; El margen de las hojas vegetativas del mutante *icu2-1* está ligeramente recurvado hacia el haz y en su epidermis se observan grupos de células de tamaño reducido, lo que podría deberse a perturbaciones en la especificación de la dorsoventralidad o en los mecanismos de coordinación del crecimiento de los tejidos dorsales y ventrales de este órgano.

En esta Tesis Doctoral hemos caracterizado seis alelos recesivos del gen *RETICULATA* (*RE*; *VEN2*) y demostrado que su fenotipo foliar reticulado se debe a una gran reducción en la densidad de las células del mesófilo intervenal. Las hojas de las plantas *re/re* presentan una ligera disminución en tamaño y una forma casi normal, a pesar de que les faltan numerosas células del mesófilo, que son sustituidas por espacios aéreos intercelulares, lo que sugiere que el correcto desarrollo de los tejidos internos incide poco en la forma final del órgano, que parece depender en mayor medida de la epidermis. También apoya esta hipótesis la observación de que las células de la epidermis foliar de los mutantes *re* son aparentemente normales en tamaño y morfología.

Hemos clonado posicionalmente el gen *RE* y caracterizado molecularmente sus alelos, varios de los cuales parecen nulos. *RE* es *LCD1*, que había sido identificado por otros autores en base a la sensibilidad al ozono y a *Pseudomonas syringae* causada por *lcd1-1*, su único alelo conocido previamente (Barth y Conklin, 2003), y codifica una proteína de función desconocida y expresión ubicua. Nuestros resultados indican que los alelos *re* hipomorfos o nulos perturban específicamente la división de las células del mesófilo en estadios tempranos de la organogénesis foliar. Hemos demostrado además que la reticulación foliar es un rasgo externo útil como criterio selectivo para el aislamiento de mutantes con anomalías en la arquitectura interna de la hoja.

Hemos estudiado las interacciones genéticas entre *RE* y su parólogo más cercano, al que hemos denominado *RE2*, cuyo alelo nulo *re2-1* no tiene manifestación fenotípica. El análisis de la progenie de varios cruzamientos *re/re* × *re2-1/re2-1* indica que

los genotipos *re/re;re2-1/re2-1* y *RE/re;re2-1/re2-1* son letales, mientras que *re/re;RE2/re2-1* causa sinergia fenotípica, lo que sugiere que *RE* y *RE2* son redundantes y necesarios no sólo para la organogénesis foliar sino también para el desarrollo reproductivo y embrionario. La obtención del doble mutante *cue1-5/cue1-5;re-3/re-3* nos ha permitido establecer que *cue1-5* es epistático sobre *re-3*, lo que indica que *RE* participa en la ruta del shikimato.

Hemos clonado posicionalmente otros dos genes cuya insuficiencia de función provoca un fenotipo reticulado, comprobando que *VEN4* codifica una fosfohidrolasa y *VEN5*, otro parálogo de *RE*, una proteína de la envuelta del cloroplasto, ambas de función desconocida. Estamos intentando determinar la naturaleza molecular de otros tres genes *VEN* (*VEN1*, *VEN3* y *VEN6*) mediante un abordaje posicional similar al que nos ha permitido identificar *RE*, *VEN4* y *VEN5*.

Además de su fenotipo foliar, el mutante *icu2-1* muestra floración temprana y transformaciones homeóticas parciales entre órganos florales, similares a las causadas por la insuficiencia de función del gen de identidad de órgano floral *AP2*, que a su vez causa la desrepresión ectópica de *AG*. Hemos comprobado mediante RT-PCR cuantitativa que en las hojas del mutante *icu2-1* se expresan ectópicamente, entre otros, los genes *AG*, *AP1*, *AP3*, *PI*, *SEP3*, *CAL*, *FUL* y *FT*, todos los cuales codifican factores de transcripción. La desrepresión de *AG* causa el fenotipo foliar del mutante *icu2-1*, y la de *FT* su floración temprana, ya que las mutaciones de insuficiencia de función *ag-1* y *ft-1*, respectivamente, suprimen dichos rasgos.

Hemos clonado posicionalmente el gen *ICU2*, que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa α . El alelo *icu2-1* es hipomorfo y probablemente modifica la estructura tridimensional de la proteína *ICU2*, pero no parece reducir su actividad polimerasa. Los alelos insercionales y aparentemente nulos *icu2-2* e *icu2-3* causan letalidad gamética y embrionaria, tal como cabe esperar del papel esencial de la ADN polimerasa α en la replicación.

La obtención de dobles mutantes nos ha permitido establecer que las mutaciones *clf*, *tfl2* y *emf2* interaccionan sinérgicamente con *icu2-1*. Este análisis de interacciones sugiere la existencia en *Arabidopsis thaliana* de un mecanismo de silenciamiento génico mediado por la cromatina similar al que se ha descrito para algunas levaduras y animales, en el que las marcas epigenéticas y el ADN se replican simultáneamente. Proponemos que la polimerasa *ICU2* participa en la unión de *TFL2* a las histonas, contribuyendo así al marcaje epigenético de la cromatina de manera casi simultánea a la replicación.



III.- INTRODUCCIÓN

III.- INTRODUCCIÓN

III.1.- Consideraciones sobre el desarrollo vegetal

Uno de los fenómenos biológicos que mayor interés despierta en nuestros días es el desarrollo, denominación genérica que se aplica al conjunto de los procesos que convierten a un cigoto en un individuo adulto. En el caso de las plantas, el estudio de su desarrollo es valioso no sólo por su contribución al conocimiento de los procesos que son específicos del reino vegetal y lo distinguen del animal, sino también por sus eventuales aplicaciones prácticas a la mejora de las especies cultivadas (Meyerowitz y Pruitt, 1985; Meyerowitz, 2002; Somerville y Koornneef, 2002; Walbot y Evans, 2003).

Las células animales y las vegetales han evolucionado a partir del mismo conjunto inicial de genes, presente en su último ancestro común, un eucariota unicelular. Sin embargo, el desarrollo vegetal difiere del animal en numerosos aspectos, como consecuencia de más de 1500 millones de años de evolución divergente (Hedges *et al.*, 2004). Debe tenerse en cuenta que las plantas son productores primarios, capaces de elaborar su propia materia orgánica a partir de sustancias inorgánicas merced a la energía solar, característica que les confiere un papel central en nuestra biosfera. Dado que presentan cloroplastos y son organismos fotosintéticos y autótrofos, su plan corporal es necesariamente distinto y más simple que el de los animales (Alberts *et al.*, 1994). La organogénesis animal sucede durante la embriogénesis y la metamorfosis, mientras que la de las plantas es fundamentalmente postembrionaria y depende de los meristemas del tallo y la raíz. Los meristemas, grupos de células que se establecen durante la embriogénesis y permanecen indiferenciados durante todo el ciclo de vida de la planta (Sachs, 1991; Howell, 1998), son los determinantes de la gran plasticidad del desarrollo vegetal, que está muy influido por factores ambientales como la luz o la temperatura. Cabe destacar por último que la principal diferencia estructural entre las células animales y las vegetales es la presencia, en estas últimas, de una pared celulósica que impide las migraciones celulares durante el desarrollo.

III.2.- *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo del desarrollo vegetal

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. es una planta vascular, una angiosperma que pertenece a la clase de las Dicotiledóneas, a la subclase de las Dilénidas, al orden de las Caprales y a la familia de las Brassicáceas o Crucíferas. Friedrich Laibach (1885-1967) propuso en 1943 su adopción como sistema modelo para estudiar los procesos genéticos que controlan el desarrollo vegetal, pero su utilización no se incrementó

significativamente hasta la década de los ochenta (Meyerowitz, 2001). *Arabidopsis thaliana* reúne una serie de características que la han convertido en el objeto de estudio por excelencia de la mayoría de los laboratorios dedicados a la Biología experimental de las plantas (Meyerowitz, 1987). Alcanza unos 30 cm de altura, lo que permite siembras de hasta 10.000 plantas/m². Su ciclo de vida es corto, completándose en unas 6 semanas cuando es cultivada a 25°C bajo iluminación continua. Es una especie muy prolífica, capaz de producir hasta 10.000 semillas por planta, siendo relativamente sencilla la realización de cruzamientos (Meyerowitz, 1987). El mantenimiento de estirpes no reviste dificultad alguna, ya que la planta es autógama, autofecundándose sin necesidad de la intervención humana, y sus semillas pueden permanecer viables durante varios años a temperatura ambiente (Gómez-Campo, 1976). Su aceptación como sistema modelo ha supuesto cambios conceptuales y metodológicos en la Biología molecular de las plantas, disciplina en la que se han aunado la Fisiología vegetal y la Genética molecular (Meyerowitz, 2001).

A pesar de las pequeñas dimensiones de su genoma haploide (unas 135 Mb), *Arabidopsis thaliana* presenta las características típicas de otras angiospermas en lo referente a su morfología, anatomía, crecimiento, desarrollo y respuestas al ambiente. Los resultados de la investigación en *Arabidopsis thaliana* son, por consiguiente, potencialmente extrapolables a otras especies vegetales (Meyerowitz, 1994). Sin embargo, la razón principal por la que *Arabidopsis thaliana* se ha convertido en la planta modelo por excelencia es su genética. Los procedimientos de mutagénesis clásica, aplicados anteriormente a la genética de otros organismos modelo, han demostrado su eficacia en *Arabidopsis thaliana* para la disección de problemas biológicos de naturaleza muy diversa, como la inducción floral (Aukerman y Amasino, 1996), la percepción de la luz (Koornneef *et al.*, 1983) y los mecanismos de acción de las hormonas (McCourt, 1999), entre otros. Su idoneidad para experimentos de genética clásica también fue avalada por su aptitud para la mutagénesis de saturación (Somerville y Ogren, 1979; 1982; Franzmann *et al.*, 1995; Berná *et al.*, 1999; Meyerowitz, 2001). Existen además varios métodos de transformación por infección con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, gracias a los cuales se han obtenido colecciones de mutantes señalizados que han permitido identificar y caracterizar muchos genes (Azpiroz-Leehan y Feldmann, 1997). A finales del año 2000, un consorcio internacional (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) completó la secuenciación de su genoma nuclear, en el que se han identificado 27.873 presuntos genes y 3.889 pseudogenes, y confirmado su pobreza en

ADN repetitivo (TAIR; The *Arabidopsis* Information Resource; García-Hernández *et al.*, 2002).

III.3.- Morfología e histología foliar

Las hojas son los órganos fotosintéticos más importantes de las plantas y suponen el mayor aporte de biomasa de muchas herbáceas, constituyendo el motivo del interés económico de numerosas especies cultivadas. Por otro lado, los órganos florales (los sépalos, pétalos, estambres y muy probablemente también los carpelos) son hojas modificadas, lo que también justifica la importancia del estudio de la morfogénesis foliar (Meyerowitz *et al.*, 1989; Tsukaya, 2006).

Las hojas son órganos laminares, compuestos por varias capas de células. Se polarizan a lo largo de tres ejes que se establecen en los estadios tempranos de su organogénesis: el mediolateral, que divide la hoja en toda su longitud en dos partes simétricas, desde la vena primaria hasta el margen foliar; el proximodistal, que define las partes más cercanas y más alejadas del tallo; y el dorsoventral, que determina la existencia de una cara adaxial, el haz, y una abaxial, el envés (Byrne *et al.*, 2001) (Figura 1A).

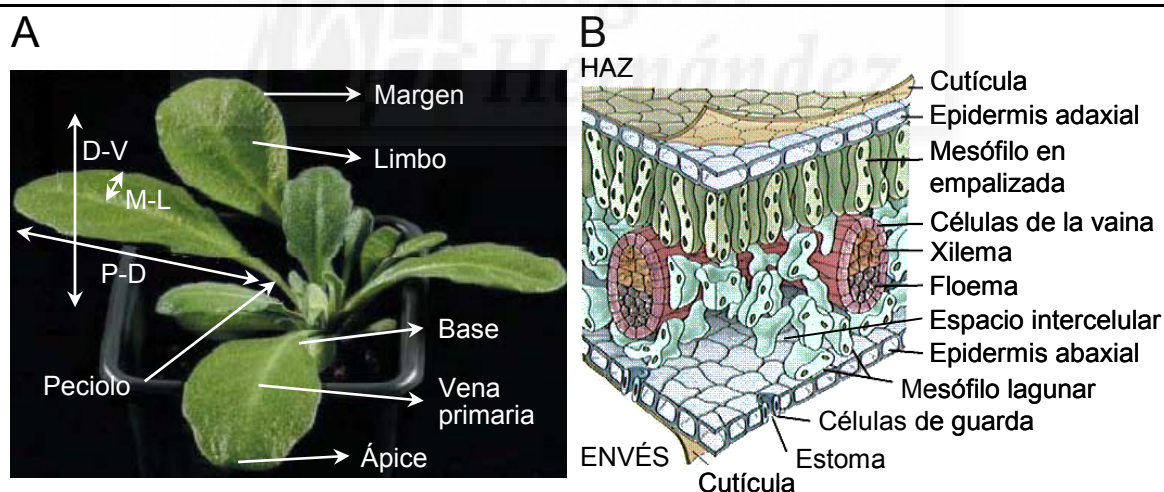


Figura 1.- Estructura y ultraestructura de las hojas de *Arabidopsis thaliana*. (A) Roseta de una estirpe silvestre, con indicación de las partes de la hoja y sus ejes de polaridad (D-V: Dorsoventral; P-D: Proximodistal; M-L: Mediolateral). (B) Representación esquemática de la ultraestructura foliar. Las figuras se han tomado de (A) Piazza *et al.* (2005), y (B) Purves *et al.* (1998), con algunas modificaciones.

Arabidopsis thaliana presenta dos tipos de hojas: las de la roseta basal o vegetativas, y las caulinares, que aparecen en los nudos basales de cada rama de la

inflorescencia. Las hojas vegetativas presentan dos dominios, uno distal, el limbo, y otro proximal, el peciolo (Figura 1A), a diferencia de las caulinares, que no poseen peciolo y se asientan directamente sobre el tallo.

El limbo se estructura internamente en varias capas celulares: la epidermis adaxial, la abaxial y los tejidos internos (Figura 1B). La epidermis separa a la planta de su entorno, del que la protege, regulando el intercambio de sustancias con el exterior (Becraft, 1999). En las hojas de *Arabidopsis thaliana*, la epidermis incluye una única capa de células pavimentosas, cuya forma es irregular, excepto en el peciolo, en el margen foliar y sobre la vena primaria, en donde son alargadas y estrechas. La superficie de la epidermis adaxial es relativamente lisa, mientras que la abaxial es rugosa y presenta células de menor tamaño (Byrne, 2006). Entre las células pavimentosas se intercalan además otros dos tipos celulares morfológicamente distintos, los tricomas y las células de guarda de los estomas. Los tricomas son apéndices epidérmicos unicelulares que aparecen en las hojas, sépalos y tallos, y que probablemente actúan como elementos protectores contra los insectos o reflectores del exceso de luz incidente (Johnson, 1975; Mauricio y Rausher, 1997).

La epidermis envuelve a unas cinco capas de tejido interno, denominado mesófilo. El mesófilo en empalizada se encuentra yuxtapuesta a la epidermis adaxial, y está constituido por una o dos capas de células alargadas y densamente empaquetadas. Entre esta capa y la epidermis ventral existen otras cuatro de mesófilo esponjoso o lagunar, formado por células más pequeñas, de tamaños irregulares y separadas por amplios espacios intercelulares (Figura 1B). El sistema vascular de *Arabidopsis thaliana*, como el de otras plantas, está formado por dos tipos de tejidos: el xilema, que transporta agua y solutos, y el floema, que conduce los hidratos de carbono (Turner y Sieburth, 2002). Estos haces vasculares transcurren a través del mesófilo esponjoso (Figura 1B), en el que el xilema ocupa la parte adaxial y el floema la abaxial.

El patrón de venación de *Arabidopsis thaliana* es broquidódromo (según la clasificación de Hickey, 1979) y está formado por una vena primaria central de la que surgen las secundarias formando bucles. Las areolas (regiones intervascuales del limbo) de *Arabidopsis thaliana* son irregulares en su forma, tamaño y orientación. El patrón de venación de las hojas del ecotipo Landsberg *erecta* (Ler) ha sido descrito en detalle (Candela *et al.*, 1999; Alonso-Peral *et al.*, 2006), así como la distribución de los hidatodos, estructuras ubicadas cerca del margen foliar, que están asociadas a los conductos vasculares, a través de las que sucede la gutación o secreción de agua líquida.

III.4.- Análisis de los mutantes reticulados en *Arabidopsis thaliana*

La organogénesis foliar es un proceso complejo en el que coexisten la división y la proliferación celular, que contribuyen a la forma final del órgano y se simultanean durante su desarrollo (Tsukaya, 2006). Aunque la arquitectura interna de las hojas vegetativas de *Arabidopsis thaliana* ha sido caracterizada detalladamente a nivel tisular (Pyke *et al.*, 1991), se sabe muy poco acerca de los mecanismos genéticos que controlan su desarrollo (Micol y Hake, 2003; Tsukaya, 2003; Champagne y Sinha, 2004; Engstrom *et al.*, 2004; Hay *et al.*, 2004; Kessler y Sinha, 2004; Byrne, 2005; Tsukaya, 2006). Se conocen muchos mutantes cuyas hojas presentan una morfología alterada, tanto en *Arabidopsis thaliana* como en otras especies vegetales (Berná *et al.*, 1999; Serrano-Cartagena *et al.*, 1999; Byrne *et al.*, 2001; Kurata *et al.*, 2005; Horiguchi *et al.*, 2006; Tsukaya, 2006). La mayoría de ellos son pleiotrópicos, lo que indica que no son muchos los genes cuyas mutaciones alteran exclusivamente la morfología foliar (González-Bayón *et al.*, 2006).

El estudio del desarrollo foliar incluye el de la biogénesis de los cloroplastos, orgánulos cuya capacidad fotosintética les hace esenciales para el crecimiento fotoautotrófico de las plantas (Bauer *et al.*, 2000). El interés por la biogénesis de los cloroplastos y las interacciones genéticas entre estos orgánulos y el núcleo ha llevado a numerosos autores a estudiar mutantes morfológicos que muestren algún rasgo externo fácilmente observable, como la variegación y la reticulación (Figura 2), que evidencie una alteración de la estructura interna del órgano (Kinsman y Pyke, 1998; Berná *et al.*, 1999; González-Bayón *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007).

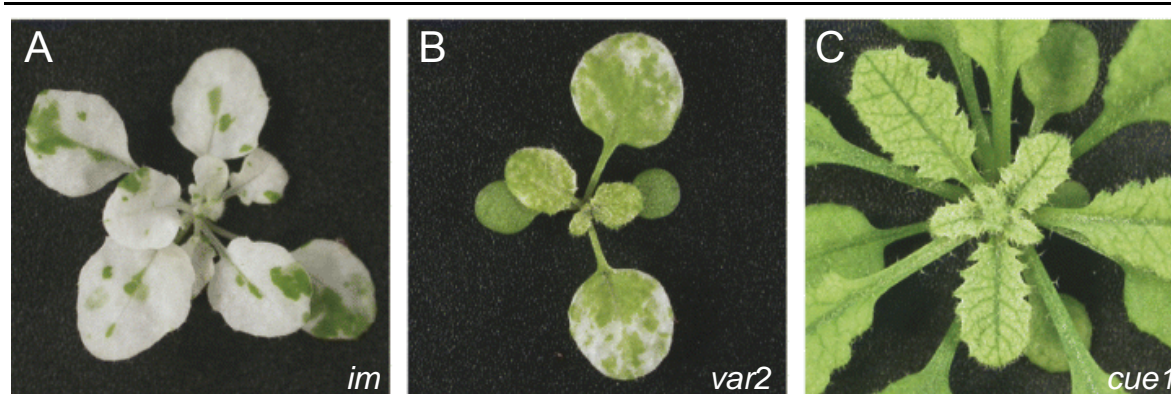


Figura 2.- Fenotipo de algunos mutantes variegados o reticulados de *Arabidopsis thaliana*. Las imágenes corresponden a los mutantes variegados (A) *immutans* (*im*) y (B) *variegated2* (*var2*), y el mutante reticulado (C) *chlorophyll a/b binding protein underexpressed1* (*cue1*). Tomado de Yu *et al.* (2007).

Los mutantes variegados presentan sectores de diferente coloración en sus tejidos vegetativos, siendo verdes y blancos o amarillos los más comunes (Yu *et al.*, 2007). Los mutantes reticulados presentan la red vascular y el limbo pigmentados diferencialmente.

En los mutantes variegados, las células del mesófilo de los sectores verdes contienen cloroplastos de apariencia normal. Por el contrario, las de los sectores despigmentados presentan cloroplastos anormales, que carecen de pigmentos fotosintéticos (Aluru *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007). En muchos casos descritos estos sectores pigmentados diferencialmente manifiestan mosaicismo y difieren en su genotipo, y las mutaciones responsables afectan tanto a genes nucleares como mitocondriales o cloroplásticos.

El fenotipo de *immutans* (*im*; Figura 2A), uno de los primeros mutantes variegados descritos en *Arabidopsis thaliana* (Rédei 1963; Röbbelen 1968), se debe a la pérdida de función de un gen nuclear cuyo producto es una proteína cloroplástica (Carol *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999). En los sectores verdes de las hojas del mutante *im* las células epidérmicas y las del mesófilo presentan un tamaño mayor que las del tipo silvestre, lo que provoca un engrosamiento local. Sin embargo, el grosor de los sectores blancos es normal a pesar de que las células del mesófilo en empalizada no se expanden correctamente (Aluru *et al.*, 2001; 2006; Yu *et al.*, 2007). El gen *IM* codifica una oxidasa alternativa similar a la que se localiza en la membrana mitocondrial interna, que presuntamente contribuye a la desaturación del fitoeno, el precursor de los carotenoides en las plantas (Aluru y Rodermel, 2004; Aluru *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007).

Las mutaciones *yellow variegated1* y *2* (*var1* y *var2*; Figura 2B), son alelos de dos genes nucleares que codifican distintas subunidades del complejo cloroplástico FtsH (FtsH5 y FtsH2, respectivamente). Este complejo presenta actividad proteasa dependiente de ATP y participa en la degradación de diversas proteínas cloroplásticas (Martínez-Zapater, 1993; Chen *et al.*, 2000; Takechi *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2002; Sakamoto, 2006). Se ha propuesto recientemente que el balance entre la síntesis y la degradación proteica es uno de los factores determinantes del fenotipo variegado de estos mutantes (Miura *et al.*, 2007). Por otro lado, el mutante *var3* presenta sectores blancos en los que las células del mesófilo en empalizada no se expanden correctamente y cuyos cloroplastos son rudimentarios. *VAR3* codifica una proteína que contiene un péptido de tránsito al cloroplasto y parece estar implicada en la biosíntesis de carotenoides (Næsted *et al.*, 2004).

Son también ejemplos de mutantes variegados *pale cress* (*pac*; Reiter *et al.*, 1994;

Grevelding *et al.*, 1996), *differentiation and greening-like1* (*DAG-like1*; *dal1*; Babiychuk *et al.*, 1997; Bisanz *et al.*, 2003), *cloroplastos alterados1* (*cla1*; Mandel *et al.*, 1996), *thylakoid formation1* (*thf1*; Wang *et al.*, 2004), *atease2 deficient* (*atd2*; van der Graaff, 1997; León *et al.*, 1998), y *phosphatidylglycerolphosphate synthetase1* (*pgp1*; Hagio *et al.*, 2002) de *Arabidopsis thaliana*, al igual que *differentiation and greening* (*dag*) de *Antirrhinum majus* (Sommer *et al.*, 1985; Chatterjee *et al.*, 1996) y *defective chloroplast and leaves-mutable* (*dcl*; Keddie *et al.*, 1996) de *Lycopersicon esculentum*, todos ellos con mutaciones en genes nucleares que codifican proteínas cloroplásticas. La mutación *chloroplast mutator* (*chm*; Rédei, 1973; Martínez-Zapater *et al.*, 1992; Abdelnoor *et al.*, 2003) radica en un gen nuclear que codifica una proteína mitocondrial.

Se han descrito con diferentes grados de detalle varios mutantes de *Arabidopsis thaliana* con fenotipo foliar reticulado, entre los que se incluyen *re-1* (*reticulata*; Rédei e Hirono, 1964), *cue1* (*chlorophyll a/b binding protein underexpressed1*; Li *et al.*, 1995; Figura 2C) y *dov1* (*differential development of vascular associated cells1*; Kinsman y Pyke, 1998). En todos estos mutantes las células circundantes a los conductos vasculares, fundamentalmente la vena primaria y las secundarias, están pigmentadas de verde mucho más intensamente que los tejidos intervenales (Figura 2C). En las hojas de *cue1*, la densidad celular en el mesófilo en empalizada es inferior a la silvestre y las células, a pesar de tener un tamaño normal, presentan unos cloroplastos más pequeños que los silvestres (Streatfield *et al.*, 1999). No obstante, las células que rodean a los haces vasculares presentan una densidad superior a la silvestre y tanto su apariencia como la de sus cloroplastos es normal (Streatfield *et al.*, 1999).

Las células del mesófilo del mutante *dov1* son normales en tamaño y número, pero sus cloroplastos son pálidos y de apariencia desorganizada. Sin embargo, tanto las células que circundan a los haces vasculares como sus cloroplastos son normales (Kinsman y Pyke, 1998). Aunque se desconoce la naturaleza molecular del gen *DOV1*, se sabe que el producto de *CUE1* es un translocador de fosfoenolpiruvato/fosfato (PPT), que se ubica en la membrana interna de los cloroplastos (Fischer *et al.*, 1997; Streatfield *et al.*, 1999). *CUE1* incorpora fosfoenolpiruvato a los cloroplastos, que es utilizado como sustrato principal en la ruta del shikimato, que da lugar a los aminoácidos aromáticos y una gran variedad de metabolitos secundarios (Voll *et al.*, 2003). El mutante *cue1* manifiesta alteraciones únicamente en las células del mesófilo y en sus cloroplastos, lo que sugiere que la actividad de la PPT es específica de estas células.

El hecho de que la mayoría de los mutantes reticulados y variegados posean una morfología foliar alterada, además de unos cloroplastos anormales, sugiere que el

desarrollo normal del mesófilo foliar está íntimamente ligado al de estos orgánulos (Chatterjee *et al.*, 1996; Keddie *et al.*, 1996, Raynaud *et al.*, 2005; Hricová *et al.*, 2006), y apoya la hipótesis de que a la morfogénesis de la hoja contribuye una señal transmitida desde el cloroplasto al núcleo (Pyke *et al.*, 2000; Rodermel, 2001; Hricová *et al.*, 2006).

III.5.- La memoria celular mediada por la cromatina

Durante el desarrollo de los organismos pluricelulares, las células se diferencian en respuesta a determinados estímulos transitorios. Una vez que dichos estímulos han desaparecido, los mecanismos de memoria celular son los responsables de que las células mantengan sus decisiones acerca de su destino durante rondas sucesivas de divisiones mitóticas (Ringrose y Paro, 2004; Schubert *et al.*, 2005).

Los genes de los grupos Polycomb (Pc-G) y trithorax (trx-G) se requieren para mantener los patrones de expresión génica definidos en etapas tempranas del desarrollo (Ringrose y Paro, 2004). Fueron inicialmente descritos en *Drosophila melanogaster* por sus funciones antagónicas en la regulación de la expresión de algunos genes homeóticos. Las proteínas del Pc-G inducen la heterocromatinización, haciendo que la cromatina resulte inaccesible a los factores de transcripción. Por su parte, las del trx-G actúan como activadores de la transcripción (Pirrotta, 1998; Francis y Kingston, 2001; Orlando, 2003). Se ha demostrado recientemente que muchas proteínas Pc-G y trx-G presentan actividad metiltransferasa de histonas, lo que sugiere que la metilación de las histonas está implicada en el mantenimiento de la memoria celular (Cao y Zhang, 2004; Makarevich *et al.*, 2006). Las proteínas del Pc-G forman parte de al menos dos complejos distintos, denominados Polycomb Repressive Complex 1 y 2 (PRC1 y PRC2; Figura 3).

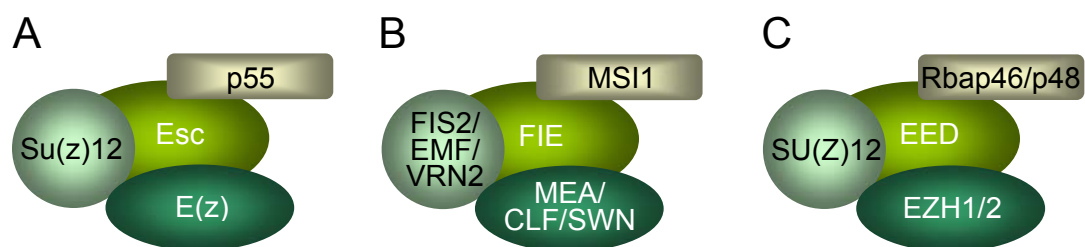


Figura 3.- Representación esquemática de los complejos PRC2 de (A) *Drosophila melanogaster*, (B) *Arabidopsis thaliana*, y (C) *Homo sapiens*. Las proteínas homólogas se han coloreado del mismo modo. Tomado de Guitton y Berger (2005), con pequeñas modificaciones.

El complejo PRC2 de *Drosophila melanogaster* contiene cuatro proteínas principales, Extra sex combs (Esc), Enhancer of zeste [E(z)], Suppressor of zeste 12

[Su(z)12] y Nucleosome-remodeling factor 55 (Nurf-55; p55) (revisado en Cao y Zhang, 2004; Pasini *et al.*, 2004). Todos los complejos PRC2 presentan actividad metiltransferasa de histonas, asociada a la proteína E(z), y metilan específicamente las lisinas 9 y 27 del extremo amino de la histona H3 (Cao *et al.*, 2002; Czermin *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2002).

Las proteínas del complejo PRC2 están muy conservadas, conociéndose ortólogas tanto en los mamíferos como en las plantas (Guitton y Berger, 2005). En el genoma de *Arabidopsis thaliana* existen genes homólogos de E(z), Esc, Su(z)12 y p55, pero no de los de otras proteínas del Pc-G (Ringrose y Paro, 2004). *Arabidopsis thaliana* cuenta con tres proteínas homólogas de E(z) del PRC2 de *Drosophila melanogaster* [MEDEA (MEA; Grossniklaus *et al.*, 1998; Kiyosue *et al.*, 1999), CURLY LEAF (CLF; Goodrich *et al.*, 1997) y SWINGER (SWN; Chanvivattana *et al.*, 2004)], tres de Su(z)12 [FERTILIZATION INDEPENDENT SEED2 (FIS2; Luo *et al.*, 1999), VERNALIZATION2 (VRN2; Gendall *et al.*, 2001) y EMBRYONIC FLOWER2 (EMF2; Yoshida *et al.*, 2001; Guitton y Berger, 2005)], uno de Esc [FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE; Ohad *et al.*, 1999)], y cinco de p55 [MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1-5 (MSI1-5; Hennig *et al.*, 2005)] (Figura 3). Estas proteínas se combinan de varios modos, dando lugar a distintos complejos que regulan diferentes etapas del desarrollo vegetal (Makarevich *et al.*, 2006). Mientras que MEA regula la expresión de *PHERES1*, que codifica un factor de transcripción implicado en el desarrollo de los gametofitos y las semillas (*PHE1*; Köhler *et al.*, 2003; 2005; Makarevich *et al.*, 2006), CLF controla el desarrollo floral y foliar actuando sobre *AGAMOUS (AG)* y *APETALA3 (AP3)*, que son sus dianas directas (Goodrich *et al.*, 1997; Schubert *et al.*, 2006). Los mutantes de *Arabidopsis thaliana* portadores de alelos de insuficiencia de función en los genes *CLF* y *EMF2* son pleiotrópicos y presentan las hojas recurvadas hacia el haz, floración temprana y desrepresión ectópica de algunos genes, muchos de los cuales codifican factores de transcripción (Reyes, 2006).

Otro sistema de silenciamiento génico transcripcional es el compuesto por las proteínas Suppressor of variegation 3-9 [Su(var)3-9] y Suppressor of variegation 2-5 [Su(var)2-5] de *Drosophila melanogaster* (Bannister *et al.*, 2001). Al igual que sus ortólogos en los mamíferos y *Schizosaccharomyces pombe* (Lachner *et al.*, 2001), los genes de la familia *Su(var)3-9* codifican metiltransferasas de histonas responsables de la metilación específica de la lisina 9 de la histona H3, y el producto de *Su(var)2-5* es la proteína HP1 (Heterochromatin protein 1). En *Schizosaccharomyces pombe* el ortólogo de *Su(var)3-9* es *Clr4* y el de *HP1* es *Swi6* (Rea *et al.*, 2000; Bannister *et al.*, 2001;

Lachner *et al.*, 2001) (Figura 4). El ortólogo de *HP1* en *Arabidopsis thaliana* es *TERMINAL FLOWER 2* [*TFL2*; *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1* (*LHP1*); Larsson *et al.*, 1998; Gaudin *et al.*, 2001], que reprime genes implicados en procesos como la transición y la identidad floral, la meiosis y la maduración de las semillas (Nakahigashi *et al.*, 2005). La metilación de la lisina 9 de la histona H3 por Su(var)3-9, induce la incorporación de HP1 a las histonas metiladas, que a su vez atrae a proteínas del Pc-G (Fransz y Jong, 2002; Craig, 2004), manteniéndose así el silenciamiento epigenético (Grewal y Elgin, 2002) (Figura 4).

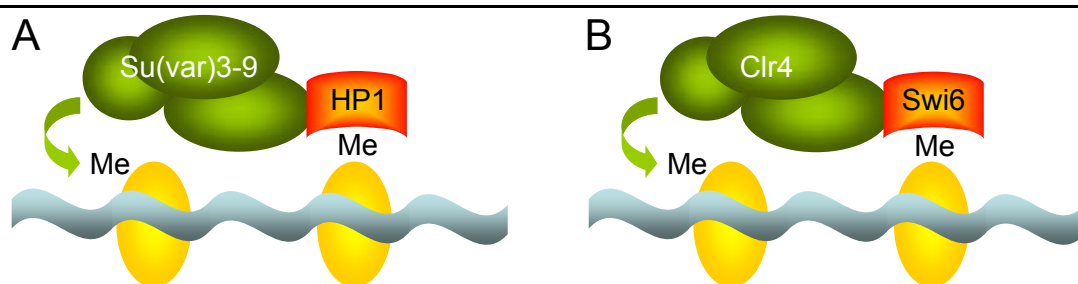


Figura 4.- El sistema Su(var)3-9 y Su(var)2-5 en (A) *Drosophila melanogaster* y (B) *Schizosaccharomyces pombe*. Las proteínas homólogas se han dibujado del mismo color.

Durante la mitosis, todos los complejos implicados en el silenciamiento génico transcripcional deben desensamblarse para permitir la replicación del ADN, lo que exige la coordinación de la replicación con el ensamblaje de la cromatina, en la que, al menos en *Schizosaccharomyces pombe*, participa la maquinaria de replicación del ADN (Ahmed *et al.*, 2001; Nakayama *et al.*, 2001). El complejo CAF-1 (Chromatin assembly factor-1) constituye otro elemento clave de este proceso, ya que parece estar implicado en el ensamblaje *de novo* de los nucleosomas durante la replicación (Verreault, 2000; Krude y Keller 2001; Mello y Almouzni 2001; Ono *et al.*, 2006). CAF-1 es un complejo heterotrimérico compuesto por CAC1, CAC2 y CAC3 en las levaduras, p150, p60 y p48 en los mamíferos, y FAS1, FAS2 y MSI1 en las plantas (Loyola y Almouzni, 2004). La insuficiencia de función de CAF-1 causa la desrepresión ectópica de genes que están silenciados en el tipo silvestre (Schönrock *et al.*, 2006). El complejo CAF-1 de los mamíferos se localiza en la heterocromatina durante la replicación de ésta y su subunidad p150 interacciona específicamente con HP1 (Murzina *et al.* 1999; Quivy *et al.* 2004). Esto sugiere la implicación de CAF-1 en la incorporación de HP1 a las regiones heterocromáticas durante la replicación (Quivy *et al.* 2004). En *Arabidopsis thaliana* CAF-1 es necesario para la compactación de la cromatina (Schönrock *et al.*, 2006) y para

el mantenimiento del silenciamiento epigenético (Ono *et al.*, 2006). Los mutantes de *Arabidopsis thaliana* portadores de alelos de insuficiencia de función en los genes *FAS1* y *FAS2* desarrollan tallos fasciados y manifiestan una reducción en el crecimiento de la raíz y desorganización de los meristemas (Leyser y Furner 1992; Kaya *et al.* 2001). *FAS1* y *FAS2* participan en el mantenimiento de la identidad del meristemo apical del tallo a través de *WUSCHEL* (*WUS*) (Fransz y Jong, 2002).

III.6.- Antecedentes y objetivos de esta Tesis

Las hojas son órganos esenciales en las plantas. A través de ellas se cumple uno de los papeles vitales de las especies vegetales, su contribución a la regulación de las cantidades de oxígeno y dióxido de carbono en nuestra atmósfera. El interés económico de algunas plantas cultivadas se deriva de la utilización industrial o alimentaria de sus hojas. A pesar de lo anterior, se dispone de muy poca información acerca de los procesos genéticos que subyacen en el crecimiento y la morfogénesis de las hojas. La comprensión de los mecanismos que controlan la determinación del número de hojas en una planta, así como la forma, tamaño y estructura interna de cada una de ellas, permitirá la manipulación genética de especies vegetales para ayudar a satisfacer mejor las necesidades de la humanidad y del planeta en su conjunto.

El objetivo de mi Tesis Doctoral era llevar a cabo el análisis genético y molecular de varios mutantes de *Arabidopsis thaliana*, cuyo fenotipo les hacía candidatos a estar afectados en genes implicados en el control del desarrollo foliar. El material de partida fue una colección de varios cientos de mutantes de *Arabidopsis thaliana*, que habían sido aislados en el laboratorio de J.L. Micol (Berná *et al.*, 1999; Serrano-Cartagena *et al.*, 1999; Robles Ramos, 2000). Estos mutantes fueron clasificados en 22 clases fenotípicas y se comprobó que pertenecían a 149 grupos de complementación. Hemos llevado a cabo en esta Tesis la clonación posicional y caracterización de dos de estos grupos de complementación, *RETICULATA* (*RE*) e *INCURVATA2* (*ICU2*). Hemos comprobado que *RE* está implicado en la proliferación del mesófilo, mientras que *ICU2* participa en la memoria celular mediada por la cromatina.



IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1.- Análisis genético y molecular de los genes *VEN*

IV.1.1.- Caracterización preliminar de los mutantes *ven*

Con anterioridad al comienzo de esta Tesis, se identificaron en el laboratorio de J.L. Micol 14 estirpes mutantes a las que se denominó *venosa* (*ven*). Su rasgo más característico es la reticulación de sus hojas, cuya red vascular es intensamente verde y destaca sobre un limbo más pálido (Figura 5). Los mutantes *ven* pertenecen a seis grupos de complementación (*VEN1* a *VEN6*). Hemos estudiado un alelo recesivo *ven1* y otro *ven4*, cuatro recesivos *ven2*, dos semidominantes y dos recesivos *ven3*, tres recesivos *ven5* y uno semidominante *ven6* (Berná *et al.*, 1999; Tabla 1, en la página 16).

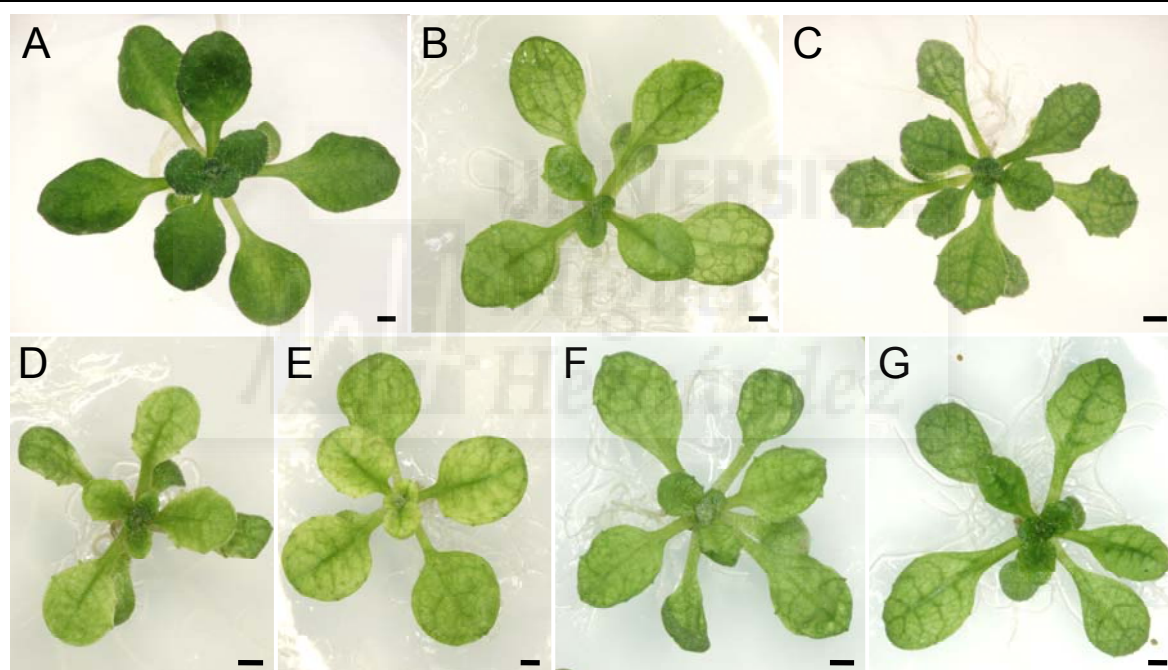


Figura 5.- El fenotipo Venoso. (A) Rosetas de la estirpe silvestre Landsberg *erecta* (*Ler*) y de los mutantes *ven1/ven1* (B), *ven2-2/ven2-2* (C), *ven3-4/ven3-4* (D), *ven4/ven4* (E), *ven5-2/ven5-2* (F), y *ven6/ven6* (G). Las fotografías se tomaron 18 días después de la siembra. Las barras de escala representan 1 mm.

IV.1.2.- Análisis genético y molecular del gen *RE* (*VEN2*)

IV.1.2.1.- Identificación de los mutantes *re*

Un mutante reticulado muy similar a los *ven* es *reticulata-1* (*re-1*), que fue utilizado durante décadas como marcador genético clásico (Rédei e Hirono, 1964), aunque nunca ha sido caracterizado en detalle. El cruzamiento de plantas *re-1/re-1* con otros mutantes

reticulados de dominio público reveló la existencia de un segundo alelo del gen *RE*, al que hemos denominado *re-2* (Tabla 1, en esta página; Tabla 1, en la página 46). El análisis de complementación de los mutantes *re-1* y *ven2-1* indicó su alelismo (Robles Ramos, 1999), razón por la que pasamos a denominar *re-3*, *re-4* y *re-5*, respectivamente, a las mutaciones *ven2-1*, *ven2-2* y *ven2-3* (Tabla 1, en esta página; Tabla 1, en la página 46). Una vez conocida la naturaleza molecular del gen *RE* (véase el apartado IV.1.2.3.1, en la página 18), se identificaron dos alelos recesivos adicionales, de los que eran portadoras las líneas de inserción de ADN-T de dominio público N584529 y N537745, que fueron denominados *re-6* y *re-7*, respectivamente. Hemos caracterizado este último sólo a nivel preliminar.

Tabla 1.- Algunas características de los mutantes *venosa* estudiados en este trabajo

Gen	Alelo	Ancastro silvestre	Mutágeno
VEN1	<i>ven1</i>	<i>Ler</i>	EMS
VEN2 (<i>RE</i>)	<i>re-1</i> (N129)	Desconocido	Desconocido
	<i>re-2</i> (N734)	En-2	EMS
	<i>ven2-1a</i> (<i>re-3a</i>)	<i>Ler</i>	EMS
	<i>ven2-1b</i> (<i>re-3b</i>)	<i>Ler</i>	EMS
	<i>ven2-2</i> (<i>re-4</i>)	<i>Ler</i>	EMS
	<i>ven2-3</i> (<i>re-5</i>)	Ws-2	ADN-T
VEN3	<i>ven3-1</i>	<i>Ler</i>	EMS
	<i>ven3-2</i>	<i>Ler</i>	EMS
	<i>ven3-3</i>	<i>Ler</i>	EMS
	<i>ven3-4</i>	<i>Ler</i>	EMS
VEN4	<i>ven4</i>	<i>Ler</i>	EMS
VEN5	<i>ven5-1a</i>	<i>Ler</i>	EMS
	<i>ven5-1b</i>	<i>Ler</i>	EMS
	<i>ven5-1c</i>	<i>Ler</i>	EMS
	<i>ven5-2</i>	<i>Ler</i>	EMS
VEN6	<i>ven6</i>	<i>Ler</i>	EMS

El fondo genético de *re-3* y *re-4* es *Ler*, mientras que el de *re-5* es Ws-2, y el de *re-6* y *re-7* es Col-0. Según el NASC, los fondos genéticos de *re-1* y *re-2* son Col-0 y En-2, respectivamente. El análisis del ligamiento a microsatélites polimórficos (Ponce *et al.*, 1999) nos ha permitido confirmar el fondo genético de *re-2*. Por el contrario, de los 22 microsatélites que hemos genotipado en *re-1*, 11 resultaron homocigóticos para el alelo de Col-0, 5 para el de *Ler*, y 4 para alelos inequívocamente distintos de los anteriores.

Estos últimos tampoco se correspondían con ninguno de los 27 ecotipos genotipados con anterioridad en el laboratorio de J.L. Micol (Quesada *et al.*, 2002; Pérez-Pérez *et al.*, 2002).

IV.1.2.2.- Fenotipo de los mutantes *re*

IV.1.2.2.1.- Rasgos morfológicos

La mayor singularidad de los mutantes *re* es que no son pleiotrópicos, a diferencia de la mayoría de los que presentan alteraciones en la morfología de la hoja en *Arabidopsis thaliana*. Su única característica fenotípica anormal apreciable a simple vista es la venación de sus hojas y cotiledones, que está intensamente pigmentada de verde y destaca sobre un limbo más pálido (Figura 1, en la página 47), rasgo que se atenúa a medida que avanza el desarrollo vegetativo. La forma de la hoja de estos mutantes es similar a la de sus ancestros silvestres, y su tamaño es ligeramente reducido (Figura 1, en la página 47). Las hojas caulinares de los mutantes *re* también están reticuladas. El resto de sus órganos, sin embargo, presenta una apariencia normal.

IV.1.2.2.2.- Histología foliar

Mediante microscopía electrónica de barrido hemos comprobado que la venación de las hojas de las plantas *re/re* es protuberante, lo que sugiere la existencia de cambios en la arquitectura interna de la hoja (Figura 4A,B, en la página 49). Por este motivo hemos estudiado la anatomía interna de hojas del primer (Figura 4C-K, en la página 49) y tercer nudo de los mutantes *re* mediante microscopía confocal, comprobando que la densidad celular de su mesófilo en empalizada es inferior a la silvestre. Hemos obtenido también micrografías electrónicas de barrido de la epidermis foliar de los mutantes *re* y de sus ancestros silvestres, comprobando que sus células epidérmicas son normales tanto en tamaño como en morfología (Figura S1, en la página 59).

IV.1.2.2.3.- Patrón de venación foliar

Hemos visualizado el tejido vascular de las hojas del primer y tercer nudo en los mutantes *re* mediante tratamiento con hidrato de cloral (según el método descrito en Candela *et al.*, 1999). La densidad de la venación foliar de la primera y la tercera hoja de estos mutantes es inferior a la silvestre (Figura 3, en la página 48), lo que sugiere que una reducción en la proliferación celular del mesófilo durante el desarrollo temprano de la hoja dificulta la incorporación de las células al destino vascular.

IV.1.2.2.4.- Ultraestructura de los cloroplastos

Hemos visualizado mediante microscopía electrónica de transmisión los cloroplastos de las regiones intervenales de las hojas de las plantas *re/re* (Figura 6), comprobando que su tamaño es ligeramente menor que en sus ancestros silvestres. Sin embargo, tanto su morfología como la cantidad de gránulos de almidón que contienen son aparentemente normales.

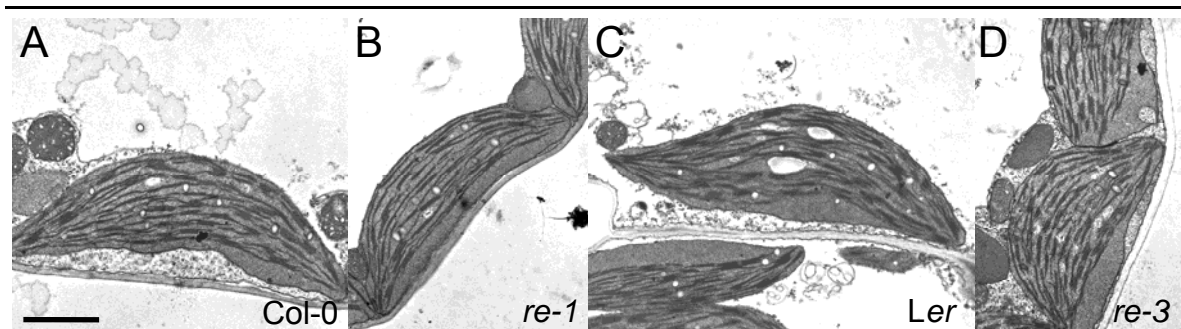


Figura 6.- Ultraestructura de los cloroplastos de los mutantes *re*. Micrografías electrónicas de transmisión de la región intervenal de la tercera hoja de los mutantes *re-1* y *re-3* (B y D) y sus correspondientes ancestros silvestres (A y C), recolectadas 21 días después de la siembra. La barra de escala indica 1,68 μ m.

IV.1.2.3.- Clonación posicional y caracterización estructural del gen *RE*

IV.1.2.3.1.- Identificación de *RE*

La cartografía de baja resolución de los mutantes *ven2* llevada a cabo en una Tesis previa (Robles Ramos, 1999) estableció su ligamiento absoluto al marcador *nga168* del cromosoma 2 (Robles y Micol, 2001), posición muy similar a la descrita para *re-1*. La semejanza entre los fenotipos y la proximidad de las posiciones de mapa de *ven2* y *re-1* nos indujo a realizar un análisis de complementación (Robles Ramos, 1999), que demostró su alelismo. Hemos confirmado y ampliado los resultados de cartografía previos, mediante el estudio de 36 individuos de fenotipo recesivo de la F_2 de un cruzamiento *re-3/re-3* x *Col-0*, que fueron genotipados para los marcadores *nga1145*, *nga1126*, *nga361*, *nga168* y *AthBIO2*, del cromosoma 2. De este análisis se desprende que *RE* se sitúa entre los microsatélites *nga361* y *nga168* (Figura 7, en la página 19).

Entre los genes de este intervalo candidato se encuentra *LCD1* (*LOW CELL DENSITY1*; At2g37860), cuyo único alelo mutante descrito previamente, *lcd1-1*, presenta un fenotipo reticulado (Barth y Conklin, 2003). Por ello, se secuenció la región codificante de At2g37860 en los mutantes *re* y sus ancestros silvestres correspondientes, encontrando mutaciones en todos los alelos. Mientras que *re-1* es portador de una

deleción de al menos 11 genes, *re-2* codifica una proteína truncada que ha perdido 189 aminoácidos. Sin embargo, *re-5* padece una reorganización cromosómica en la región promotora del gen *RE*, en la que parte del gen *At2g41790* se ha fusionado al nucleótido -45 de *RE*. Hemos caracterizado además dos alelos hipomorfos, *re-3* y *re-4* (Tabla 1, en la página 46; Figura 7, en la página 50; Figura S2A, en la página 60).

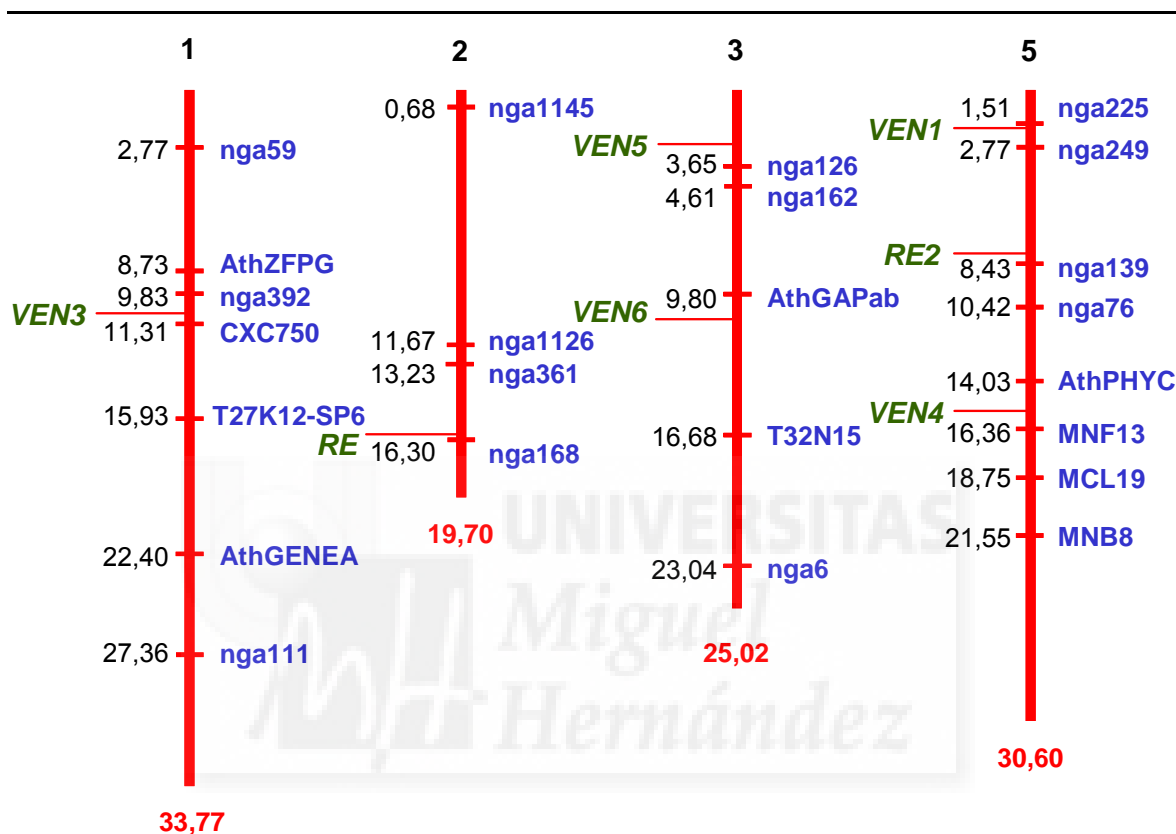


Figura 7.- Mapa físico de *Arabidopsis thaliana* con indicación de las posiciones absolutas de los marcadores moleculares y las relativas de los genes estudiados en este trabajo. Los valores numéricos indican Mb.

IV.1.2.3.2.- Obtención de alelos insercionales *re*

Hemos realizado una búsqueda en la colección de líneas de inserción de ADN-T del Instituto SALK (<http://signal.salk.edu/>), encontrando dos presuntamente portadoras de alelos nulos del gen *RE*. Hemos confirmado mediante análisis de complementación el alelismo de *re-1* y la mutación de la que es portadora N584529, por lo que la hemos red denominado *re-6*. El alelo *re-6* es probablemente nulo, ya que el ADN-T está insertado en su primer exón (Tabla 1, en la página 46). La estirpe N537745 también manifiesta el fenotipo Reticulata, y es presuntamente portadora de una inserción de ADN-T en el último exón de *At2g37860*, aspecto que no hemos confirmado.

IV.1.2.3.3.- La familia RE

El gen *RE* codifica una proteína de 432 aminoácidos y 46,6 kDa, localizada en el cloroplasto (Dunkley *et al.*, 2006). Se conoce además la existencia de dos formas de ARN mensajero procedentes del procesamiento alternativo de este gen, At2g37860.1 y At2g37860.2, uno de los cuales incorpora 96 nucleótidos más que el otro (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=818362) y produce una proteína de 347 aminoácidos. Estos 96 nucleótidos diferenciales podrían corresponder al procesamiento alternativo del sexto intrón del gen, que se encuentra presente en At2g37860.1, pero no en At2g37860.2. El primero de estos dos transcritos se traduce a una proteína de menor longitud debido a la presencia en dicho intrón de un codón de terminación (Barth y Conklin, 2003).

Por otro lado, los análisis *in silico* de la proteína RE revelan la presencia de un presunto péptido señal de tránsito al cloroplasto, que incluye los 47 aminoácidos aminoterminales, y de dos posibles regiones transmembrana (http://crombec.botanik.uni-koeln.de/seq_view.ep?orgm=0&search=at2g37860) (Figura S2A, en la página 60). En *Arabidopsis thaliana* la proteína RE pertenece a una familia génica constituida por cinco miembros, At5g12470, At3g08630, At3g08640, At5g22790 y *RE* (<http://www.cbs.umn.edu/arabidopsis/>), cuatro de los cuales están muy emparentados dos a dos. El primer par de parálogos es el formado por los genes *RE* y At5g22790, cuyos productos proteicos presentan una identidad del 71,0% (Figura S2A, en la página 60). Estas observaciones nos han llevado a denominar *RETICULATA2 (RE2)* al gen At5g22790, que se encuentra en el cromosoma 5 (Figura 7). Sus dominios más conservados son una región rica en glicina en el extremo amino y los dos presuntos dominios transmembrana. Ambas proteínas poseen un péptido señal de tránsito al cloroplasto (http://crombec.botanik.uni-koeln.de/seq_view.ep?search=at5g22790) (Figura S2A, en la página 60). La segunda pareja la constituyen At3g08630 y At3g08640, cuyos productos proteicos presentan una identidad del 83,0% (http://crombec.botanik.uni-koeln.de/seq_view.ep?orgm=0&search=At3g08630).

Para averiguar si *RE2* desempeña alguna función en el desarrollo de la hoja, hemos realizado una búsqueda de líneas portadoras de inserciones de ADN-T en este gen, encontrando sólo una, N573984. Hemos confirmado que es portadora de una inserción de ADN-T en el primer exón del *RE2*, lo que sugiere su carácter nulo. Sin embargo, ninguna de las plantas *re2-1/re2-1* ha manifestado rasgo fenotípico mutante alguno, tras sucesivas generaciones, siendo indistinguibles de su ancestro silvestre, tanto a nivel de morfología externa como de histología foliar (Figura 8, en la página 21).

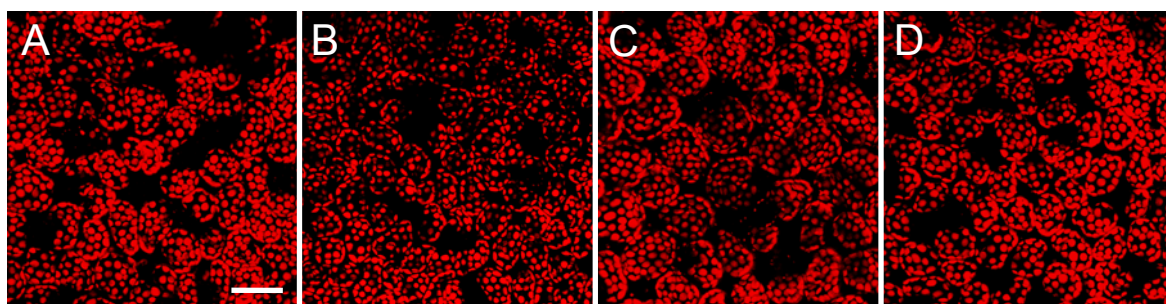


Figura 8.- Células del mesófilo en empalizada del mutante *re2-1*. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal, aprovechando la autofluorescencia de los cloroplastos. Las fotografías corresponden a los tejidos intervenales de hojas vegetativas del primer (A y B) y tercer (C y D) nudo de la estirpe silvestre Col-0 (A y C) y *re2-1/re2-1* (B y D). Las fotografías fueron tomadas 21 días después de la siembra. La barra de escala indica 50 μ m.

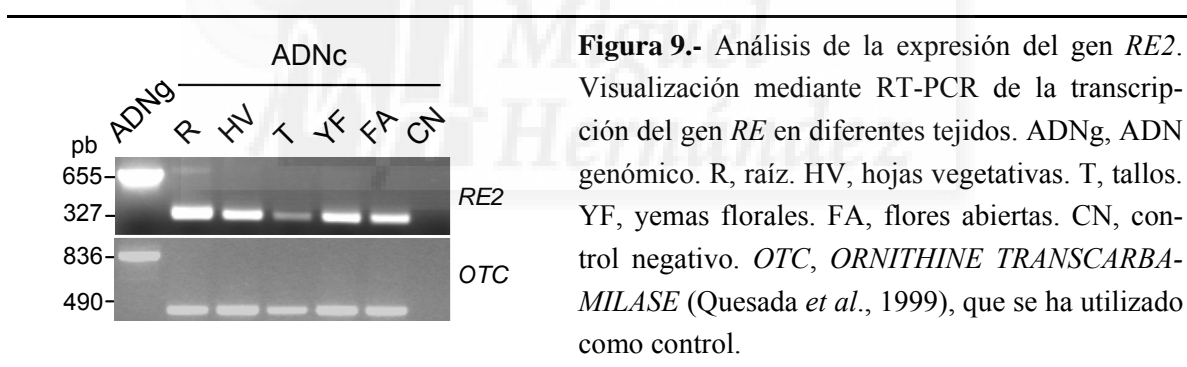
La proteína RE sólo tiene homólogos en otras especies vegetales, como *Oryza sativa* y *Euphorbia esula*, lo que sugiere que es específica de las plantas. La mayor semejanza se observa en el extremo carboxilo, mientras que el amino es muy rico en residuos de glicina en todas ellas excepto en la del arroz (CAE05717; Figura S2A, en la página 60). Aunque hemos llevado a cabo los análisis filogenéticos habituales con la secuencia de los genes *RE* y sus productos proteicos correspondientes, no ha sido posible proponer una función en base a su homología con otros previamente descritos en otras especies.

IV.1.2.4.- Análisis de la expresión de los genes *RE* y *RE2*

Hemos analizado mediante RT-PCR semicuantitativa el patrón de expresión espacial de los genes *RE* y *RE2*, comprobando que ambos se expresan en todos los tejidos y órganos estudiados (Figura 9, en la página 22; Figura S2C, en la página 60). Todos los intentos de detectar el transcrito At2g37860.1 (véase el apartado IV.1.2.3.3, en la página 20) han sido fallidos, lo que sugiere que se produce en estadios distintos a los estudiados en este trabajo, se encuentra restringido a un pequeño número de células durante el desarrollo, es inestable o se trata de un artefacto.

Hemos analizado la expresión del gen *RE* mediante RT-PCR semicuantitativa a partir del ARN extraído de terceras hojas de los mutantes *re* y sus ancestros silvestres. Hemos comprobado que *RE* se transcribe en las plantas *re/re* y en sus ancestros silvestres, excepto en el caso de *re-1* (Figura S2B, en la página 60). Tal como era de esperar, hemos detectado la presencia de los transcritos de los alelos mutantes *re-2*, *re-3* y *re-4*, que presentan mutaciones puntuales (Figura S2B, en la página 60), y su ausencia

en *re-1*, como consecuencia de la delección que elimina el gen *RE*. Sin embargo, nos ha sorprendido la detección de transcritos en los mutantes *re-5* y *re-6*. El alelo mutante *re-5* presenta una reorganización de su región promotora y *re-6* es una línea de inserción de ADN-T, lo que sugiere que no deben transcribirse. Para descartar una eventual amplificación inespecífica, los productos de PCR fueron secuenciados, comprobándose que eran genuinos. Por ello, decidimos amplificar la unidad de transcripción completa, utilizando diferentes parejas de oligonucleótidos, lo que nos permitió determinar que el transcrito del ARN del mutante *re-6* ha perdido gran parte de su región 5'. El transcrito *re-5* parece ser idéntico al silvestre, dado que probablemente se transcribe bajo el control del promotor del gen At2g41790 (véase el apartado IV.1.2.3.1, en la página 18). De nuestros resultados se deduce que los alelos *re-3* y *re-4* son hipomorfos, ya que sus mutaciones provocan un cambio de aminoácido en un dominio muy conservado de la proteína, que no tiene efecto en la transcripción del gen *RE*. Los alelos *re-2* y *re-6* se traducen a proteínas truncadas en sus extremos carboxilo y amino, respectivamente, por lo que muy probablemente sean nulos. Estos resultados demuestran además que *re-1* es un alelo nulo.



Hemos obtenido una línea portadora del transgén P_{RE} -*GUS*, en la que la expresión del gen de la β -glucuronidasa (*GUS*; Jefferson *et al.*, 1987), está controlada por el promotor de *RE* en plantas del ecotipo Col-0. La tinción de las plantas transgénicas reveló que *RE* se expresa en los conductos vasculares de los primordios foliares en desarrollo, las estípulas, los hidatodos, los estambres, el ápice radicular y la zona de escisión del funículo ovárico (Figura 8, en la página 52). Este patrón de detección de la actividad *GUS* es consistente con los resultados de expresión obtenidos mediante RT-PCR semicuantitativa para el gen *RE* (Figura S2C, en la página 60). La ausencia de tinción en estadios más avanzados del desarrollo se correlaciona con la desaparición

paulatina de la reticulación, que se observa en los mutantes *re* en las etapas finales del desarrollo vegetativo.

IV.1.2.5.- Análisis de las interacciones genéticas de *RE*

Hemos obtenido varios dobles mutantes con el fin de identificar eventuales interacciones entre las mutaciones *re* y otras que también causan un fenotipo reticulado. Hemos cruzado *re-3* por *cue1-5* y *dov1*, dos de los mutantes reticulados mejor descritos en *Arabidopsis thaliana* (véase el apartado III.4, en la página 8). El fenotipo morfológico del doble mutante *re-3/re-3;cue1-5/cue1-5* fue indistinguible del de su parental *cue1-5/cue1-5* (Figura 9, en la página 52), lo que indica que *cue1-5* es epistático sobre *re-3* y sugiere que los genes *RE* y *CUE1* están implicados en el mismo proceso de desarrollo.

Las células del mesófilo del mutante *dov1* son normales, mientras que la morfología de sus cloroplastos está fuertemente alterada. Tal como cabía esperar de la observación de los fenotipos parentales, el del doble mutante *dov1/dov1;re-3/re-3* fue meramente aditivo (Figura 9, en la página 52), lo que sugiere que *RE* y *DOV1* actúan de manera independiente.



Figura 10.- Sinergia fenotípica en las plantas *re-3/re-3;RE2/re2-1*. (A) Roseta de 18 días. (B-C) Flores, (D) inflorescencia, y (E) silicua de una planta de 34 días. Las barras de escala indican 1 mm.

Por otro lado, hemos cruzado los mutantes *re-1*, *re-3* y *re-6* por *re2-1*, portador de una inserción de ADN-T en el gen At5g22790, parálogo de *RE* (véase el apartado IV.1.2.3.3, en la página 20). El análisis de la progenie de varios cruzamientos *re/re* × *re2-1/re2-1* indica que los genotipos *re/re;re2-1/re2-1* y *RE/re;re2-1/re2-1* son letales, y que las plantas *re/re;RE2/re2-1* aparecen en una proporción muy inferior (1/100) a la esperada (2/13). Estas últimas desarrollan una roseta mucho menor que la silvestre, cuyas hojas son reticuladas y presentan alteraciones en las flores y las silicuas

(Figura 10). Este fenotipo sinérgico y la letalidad del doble mutante sugieren que *RE* y *RE2* son redundantes y necesarios para la organogénesis foliar y el desarrollo reproductivo y embrionario.

IV.1.2.6.- Consideraciones sobre la función de *RE*

Aunque son numerosos los estudios del papel que desempeñan la expansión y la división celular en la morfogénesis foliar (Poethig, 1997), se desconoce la contribución relativa de la epidermis y del mesófilo a la forma final de este órgano (Dale, 1988).

Las hojas de las plantas *re/re* presentan una forma casi normal, a pesar de presentar una gran disminución en la densidad celular de su mesófilo, lo que sugiere que el correcto desarrollo de los tejidos internos incide en la determinación del grosor de la hoja, pero muy poco en la forma de ésta, que parece depender en mayor medida de la epidermis. Como consecuencia de la reducción en grosor de los tejidos intervenales, la red vascular de los mutantes *re* es protuberante. Sin embargo, las células pavimentosas de las plantas *re/re* son indistinguibles de las del tipo silvestre, lo que también apoya la hipótesis de que la epidermis juega un papel fundamental en el control de la forma de la hoja en *Arabidopsis thaliana*. La propuesta de que la epidermis controla la expansión y la forma final de las hojas fue formulada por primera vez por Avery en 1933 y está basada en sus estudios sobre el desarrollo en *Nicotiana tabacum*. Hemos observado además que las hojas de los mutantes *re* presentan una ligera disminución en tamaño, por lo que el gen *RE* también podría estar implicado en la expansión foliar.

Nuestra caracterización del fenotipo foliar de los mutantes *re* apoya la hipótesis de que la forma de la hoja no solo está controlada a nivel celular sino también a nivel de tejido u órgano, tal como se deduce de los estudios realizados con el mutante *tangled1* (*tan1*) de *Zea mays*. Aunque las hojas de las plantas homocigóticas para la mutación *tan1* del maíz son pequeñas y crecen lentamente, su forma es normal. Esta mutación altera la orientación de las divisiones celulares, sin modificar la forma final de las hojas (Smith *et al.*, 1996). El producto de *TAN1* es una proteína que se une a los microtúbulos (Smith *et al.*, 2001), que está implicada en el control espacial de la división celular y contribuye a orientar correctamente las fibras del citoesqueleto durante la citocinesis (Cleary y Smith, 1998; Smith *et al.*, 2001).

Debe existir un mecanismo de compensación que controle la morfología final de la hoja, hipótesis que podría explicar el fenotipo foliar de los mutantes *re*, en los que la reducción del número de células del mesófilo no parece afectar sustancialmente la forma del órgano. La hipótesis de la compensación también se ha empleado para explicar el

fenotipo del mutante *angustifolia3 (an3)* de *Arabidopsis thaliana* (Tsukaya, 2002a; 2002b; 2003; 2005; 2006; Beemster *et al.*, 2003; Horiguchi *et al.*, 2005; 2006a), cuyas hojas contienen un menor número de células, pero de un tamaño mayor que las del tipo silvestre. El gen *AN3*, también conocido como *GIF1 (GRF-INTERACTING FACTOR1)*; Kim y Kende, 2004), promueve la proliferación celular en los primordios foliares.

La epidermis es el tejido que recubre la hoja en toda su longitud, por lo que es posible que contenga información predeterminada acerca de la forma final del órgano, que puede ser modulada variando el área de los componentes del mesófilo subyacente. El análisis de quimeras en las que algunos sectores de células del maíz son portadoras de la mutación *Kn1 (Knotted1)*; Freeling y Hake, 1985) sugiere que el mesófilo regula la actividad de la epidermis adyacente. En los pétalos de *Arabidopsis thaliana* la epidermis constituye el tejido principal, mientras que el mesófilo es rudimentario (Pyke y Page, 1998), lo que sugiere que la expansión y la forma definitiva de este órgano son controladas principalmente por la epidermis.

Nuestros resultados sugieren que el desarrollo del mesófilo participa en el control del grosor de la hoja de *Arabidopsis thaliana*. A pesar de la reducción en el número de células del mesófilo intervenal de las hojas de los mutantes *re*, el mesófilo en empalizada y el lagunar mantienen su posición y morfología específicas.

La clonación posicional del gen *RE* ha revelado que es *LCD1 (LOW CELL DENSITY1)*, previamente identificado por la sensibilidad al ozono y a *Pseudomonas syringae* causada por su único alelo descrito, *lcd1-1* (Barth y Conklin, 2003). La mutación *lcd1-1* no tiene efectos sobre el aparato fotosintético de la hoja, y el rasgo fenotípico en base al cual fue identificado parece ser un efecto secundario de la reducción que sufre en el número de células del mesófilo (Barth y Conklin, 2003). Esto es congruente con nuestra observación de que el fenotipo reticulado se debe principalmente a alteraciones en las células del mesófilo y no en sus cloroplastos.

Hemos encontrado además niveles similares del ARNm de los genes *RE* y *RE2* en diferentes órganos de *Arabidopsis thaliana*, lo que sugiere que su actividad no está restringida espacialmente. Por lo tanto, *RE* y *RE2* podrían estar desempeñando funciones redundantes y esenciales para el desarrollo foliar y reproductivo, tal y como se deduce además de sus interacciones genéticas. En este caso, su redundancia con otros genes explicaría la ausencia de pleiotropía. Por otro lado, la epistasia de *cue1-5* sobre *re-3* sugiere la implicación de *RE* en la ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos o ruta del shikimato.

IV.1.3.- Clonación posicional de los genes *VEN1*, *VEN3*, *VEN4*, *VEN5* y *VEN6*

IV.1.3.1.- Cartografía de alta resolución de *VEN1*

El análisis de ligamiento a microsatélites polimórficos, que se llevó a cabo según el método de Ponce *et al.* (1999) en una Tesis previa (Robles Ramos, 1999), permitió cartografiar a baja resolución el gen *VEN1*, determinándose que se encontraba a una distancia de $7,96 \pm 4,49$ cM del marcador AthCTR1, en el cromosoma 5, mediante el genotipado de 19 individuos de la F₂ de un cruzamiento *ven1/ven1* × Col-0. Hemos estudiado otros 67 individuos de dicha población cartográfica, que fueron genotipados para los marcadores AthCTR1, nga225, MHFD, nga249, nga72 y nga151. De tal análisis de ligamiento se concluyó que el gen *VEN1* se ubica entre los microsatélites nga249 y nga225, a $0,76 \pm 0,75$ cM de este último (Figura 7, en la página 19). Para delimitar con más precisión el intervalo candidato a contener el gen *VEN1*, se obtuvo una nueva población cartográfica F₂ a partir de un cruzamiento *ven1/ven1* × Col-0. El genotipado de 240 plantas de esta última población cartográfica para los marcadores nga225, MJJ3, MHFD, CER456516 y nga249 permitió delimitar un nuevo intervalo flanqueado por nga225 y MHFD, en el que *VEN1* se sitúa a $0,21 \pm 0,21$ cM de MHFD y completamente ligado a MJJ3. Uno de los genes presentes en el intervalo candidato es At5g05820, cuyo producto es un translocador de fosfoenolpiruvato/fosfato muy parecido a CUE1 (véase el apartado III.4, en la página 8). Dado que el mutante *cue1* presenta un fenotipo reticulado muy similar al de *ven1*, hemos secuenciado At5g05820 en este mutante, pero no hemos encontrado ninguna mutación en su región codificante.

IV.1.3.2.- Cartografía de alta resolución de *VEN3*

El abordaje posicional seguido para la clonación del gen *VEN3* se inició con su cartografía de baja resolución, que permitió asignarlo al cromosoma 1, entre los marcadores AthZFPG y T27K12-SP6 (Robles y Micol, 2001). Hemos genotipado otros 66 individuos *ven3-2/ven3-2* de la F₂ de un cruzamiento *ven3-2/ven3-2* × Col-0, para los marcadores del cromosoma 1 AthACS, AthZFPG, nga392, SNP9916, SO932, CXC750, T27K12-SP6, SNP375 y AthGENEA. Hemos concluido que el gen *VEN3* se ubica entre los microsatélites nga392 y CXC750, a $0,83 \pm 0,83$ cM de este último (Figura 7, en la página 19). En este intervalo candidato se encuentra el gen At1g31020, que codifica una tiorredoxina. Las tiorredoxinas controlan varios procesos de desarrollo gracias a su capacidad de reducir los puentes disulfuro de determinadas enzimas (Motohashi *et al.*, 2001). Sus dianas participan en procesos celulares fundamentales, como el ciclo de Calvin, la fotosíntesis, la defensa contra el estrés oxidativo y la síntesis de aminoácidos,

entre otros (Marchand *et al.*, 2004). Muchos de estos procesos tienen lugar en los orgánulos, fundamentalmente el cloroplasto, razón por la que hemos secuenciado At1g31020 en los mutantes *ven3*, no encontrando ninguna mutación en su región codificante. No obstante, las secuencias obtenidas nos han permitido identificar un nuevo polimorfismo intraespecífico entre *Ler* y *Col-0*, que nos servirán para la futura clonación posicional de *VEN3*.

IV.1.3.3.- Clonación posicional y caracterización de *VEN4*

IV.1.3.3.1.- Cartografía de alta resolución de *VEN4*

La cartografía de baja resolución previa a esta tesis situó *VEN4* en el cromosoma 5, a $2,78 \pm 2,74$ cM de AthPHYC (Figura 7, en la página 19) (Robles y Micol, 2001). Hemos genotipado 72 individuos adicionales para los marcadores AthPHYC, SO191, MNF13, MCL19 y MBK5, concluyendo que *VEN4* radica en el intervalo flanqueado por SO191 y MCL19 (Figura 11, en la página 28). Hemos desarrollado cuatro nuevos marcadores moleculares en dicha región, que hemos empleado para establecer que *VEN4* se encuentra entre MKM21 y MHK7. Finalmente, el genotipado con otros 5 nuevos marcadores de 300 individuos de una población cartográfica recién obtenida ha revelado que *VEN4* radica en un cóntigo formado por dos clones BAC solapantes, un segmento de unas 100 kb flanqueado por los marcadores MSN9 y MPO12 y que contiene 25 genes (Figura 11, en la página 28).

IV.1.3.3.2.- Identificación y caracterización estructural de *VEN4*

Para establecer cuál de los 25 genes candidatos mencionados en el apartado anterior era *VEN4*, iniciamos una búsqueda de alelos de inserción de ADN-T disponibles en las colecciones de dominio público. Analizamos 33 líneas, de las que sólo cuatro (N506086, N531416, N577401 y N631986) presentaron un fenotipo similar al de las plantas *ven4/ven4*, todas ellas presuntamente portadoras de inserciones de ADN-T en el gen At5g40270 (Figura 12, en la página 28).

Para determinar si el gen At5g40270 es *VEN4*, se obtuvo su secuencia tanto en el mutante *ven4* como en *Ler*, su ancestro silvestre. El alelo *ven4* presenta una transición G→A en la posición 745 de la unidad de transcripción (contando a partir del codón de iniciación) (Figura 12, en la página 28), que transforma un residuo de ácido glutámico en lisina en la posición 249 de la proteína, por lo que pasamos a denominar *VEN4* a At5g40270 y *ven4-1* al alelo portador de esta mutación puntual.

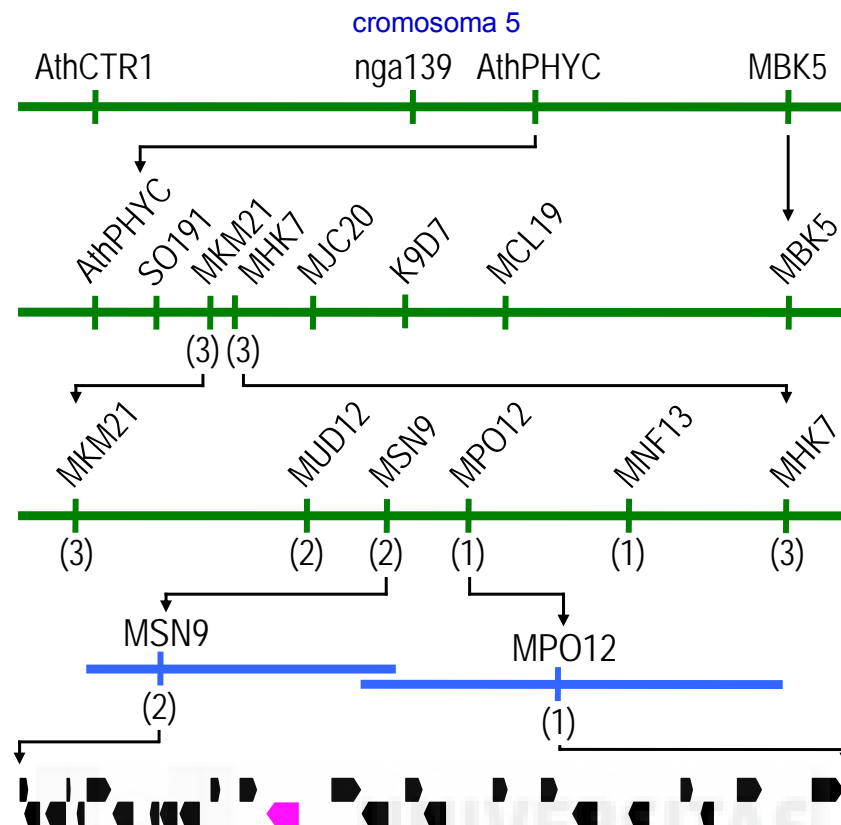


Figura 11.- Clonación posicional del gen *VEN4*. Se representa en la parte superior el intervalo definido mediante cartografía de baja resolución. En la parte inferior se destaca la región candidata a contener *VEN4*, con indicación de sus presuntas unidades de transcripción. Se destaca en rosa la unidad de transcripción de *VEN4*. Se indican los marcadores empleados y, entre paréntesis, el número de individuos recombinantes informativos encontrados para cada uno de ellos.

El gen At5g40270 incluye 19 exones y 18 intrones (Figura 12). Su ADNc (AF389282) tiene una longitud de 1727 pb, lo que incluye una región 5' no traducida de 126 pb, una pauta de lectura abierta de 1422 pb y una región 3' no traducida de 179 pb. La proteína *VEN4* tiene 473 aminoácidos y un peso molecular de 55 kDa, y codifica una presunta fosfohidrolasa de función desconocida.

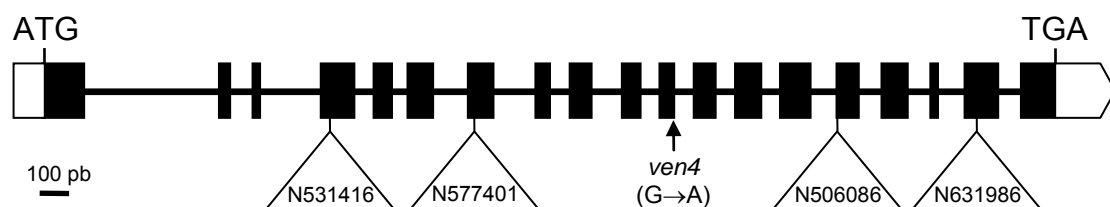


Figura 12.- Estructura del gen *VEN4* y naturaleza molecular de sus alelos mutantes. Los exones e intrones están representados por rectángulos y líneas continuas, respectivamente. Se indican en blanco las regiones 5' y 3' no traducidas.

IV.1.3.4.- Clonación posicional y caracterización de *VEN5*

IV.1.3.4.1.- Cartografía de alta resolución de *VEN5*

Los resultados previamente obtenidos en nuestro laboratorio indicaban que *VEN5* está ligado al marcador nga361 del cromosoma 2 (Robles y Micol, 2001). En este trabajo hemos obtenido una nueva población cartográfica a partir de un cruzamiento *ven5-1/ven5-1* × Col-0. El análisis del ligamiento a microsatélites polimórficos (Ponce *et al.*, 1999) de 44 plantas de dicha población nos ha permitido cartografiar a baja resolución nuevamente el gen *VEN5*, concluyéndose que se encuentra a $2,63 \pm 1,84$ cM del marcador nga126, del cromosoma 3 (Figura 7, en la página 19), y no observándose ligamiento a ningún marcador del cromosoma 2. Hemos iniciado la cartografía de alta resolución con el genotipado de los 44 individuos anteriores para otros 3 marcadores, que nos ha permitido establecer que *VEN5* radica en un intervalo flanqueado por los marcadores GAPC y nga126. A continuación se genotiparon los recombinantes informativos y 126 nuevos individuos para cuatro nuevos marcadores, estableciéndose un intervalo candidato flanqueado por F21O3 y MZB10 (Figura 13).

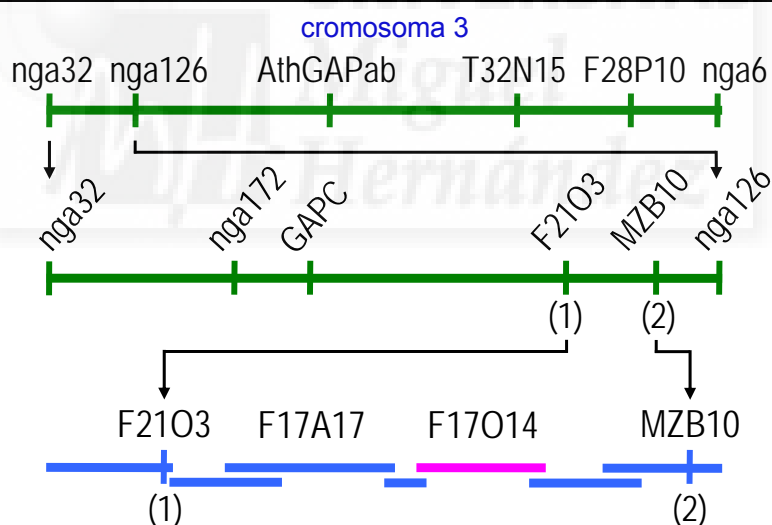


Figura 13.- Clonación posicional del gen *VEN5*. Se siguen las pautas definidas para la Figura 11, en la página 28. Se indica en rosa el clon BAC que contiene a *VEN5*.

IV.1.3.4.2.- Identificación y caracterización estructural de *VEN5*

Entre los genes del intervalo candidato mencionado en el apartado anterior se encuentran At3g08630 y At3g08640, dos genes contiguos pertenecientes a la misma familia que *RE*, que están contenidos en el BAC F17O14 (Figura 13). La secuenciación de ambos genes en los alelos mutantes de *VEN5* y en su ancestro silvestre correspondiente ha revelado que son portadores de mutaciones puntuales en At3g08640.

Los alelos *ven5-1b* y *ven5-1c* presentan una transición G→A en la posición 386 de su unidad de transcripción (numerando a partir del ATG) (Figura 14, en la página 30), que transforma un residuo de glicina en ácido glutámico en la posición 129 de la proteína. Sin embargo, el alelo *ven5-1a* es portador de una transición G→A en la posición 682 de la unidad de transcripción (Figura 14), que sustituye una glicina por una serina en la posición 228. Hemos pasado a llamar *ven5-3* al alelo mutante *ven5-1a*, ya que ha resultado ser portador de una mutación diferente, a pesar de haber sido seleccionado a partir del mismo grupo parental (Berná *et al.*, 1999; Serrano-Cartagena *et al.*, 1999; Robles Ramos, 2000). El mutante *ven5-2* presenta una transición G→A en la posición 785 (Figura 14), que elimina el triptófano situado en la posición 262 e incorpora un codón de terminación prematuro, dando lugar a una proteína truncada, que ha perdido 76 aminoácidos de su dominio carboxiterminal.

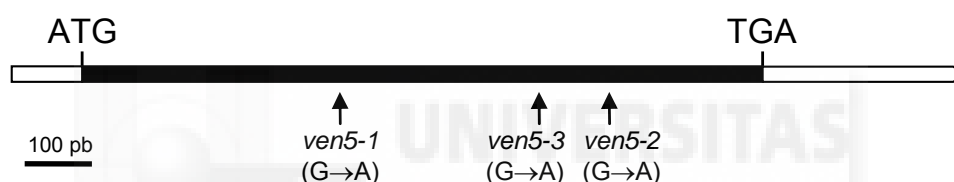


Figura 14.- Estructura del gen *VEN5* y naturaleza molecular de sus alelos mutantes. Se indican en blanco las regiones 5' y 3' no traducidas.

La unidad de transcripción del gen At3g08640 carece de intrones (Figura 14). Su ADNc (NM_111698) tiene una longitud de 1429 pb, e incluye una región 5' no traducida de 112 pb, una pauta de lectura abierta de 1014 pb y una cola 3' no traducida de 303 pb. La proteína VEN5 tiene 337 aminoácidos y 35 kDa, y se ubica presuntamente en la envuelta del cloroplasto, desconociéndose su función.

IV.1.3.5.- Cartografía de alta resolución de *VEN6*

El gen *VEN6* radica en el cromosoma 3 a $0,00 \pm 0,16$ cM de AthGAPab, según la cartografía de baja resolución realizada con anterioridad en el laboratorio de J.L. Micol (Robles y Micol, 2001). Hemos genotipado 32 nuevos individuos de la F₂ de un cruzamiento *ven6/ven6* × Col-0 para los marcadores AthCHIB, nga162, NW123.1, AthGAPab y T32N15, lo que nos ha permitido definir un intervalo candidato flanqueado por AthGAPab y T32N15 (Figura 15, en la página 31; Figura 7, en la página 19). El desarrollo de tres nuevos marcadores y su análisis en los individuos informativos nos ha permitido establecer que MDJ14 y K17E12 flanquean a *VEN6* (Figura 15). En el intervalo

candidato se encuentra el gen At3g26900, que codifica una proteína quinasa que participa en la ruta del shikimato, al igual que *CUE1*. Este gen candidato fue secuenciado sin que encontráramos ninguna mutación, aunque sí polimorfismos que serán empleados para completar la cartografía de alta resolución.

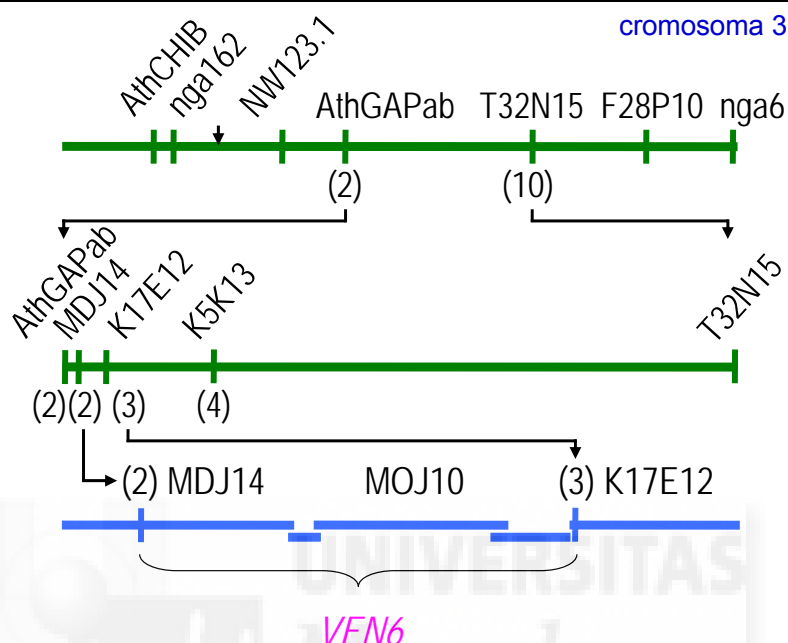


Figura 15.- Clonación posicional del gen *VEN6*. Se siguen las pautas definidas para la Figura 11, en la página 28.

IV.2.- Análisis genético y molecular del gen *ICU2*

IV.2.1.- Caracterización preliminar del mutante *icu2-1*

En una Tesis anterior a ésta (Serrano Cartagena, 1998) se inició la caracterización genética de 152 mutantes que manifestaban alteraciones en la morfología de sus hojas vegetativas (Serrano-Cartagena *et al.*, 2000), pertenecientes a la colección del AIS (*Arabidopsis* Information Service; está depositada en el Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre). Trece de estos mutantes presentaban el margen foliar recurvado hacia el haz, fenotipo al que se denominó Incurvata (*Icu*; Berná *et al.*, 1999). Su análisis de complementación demostró que correspondían a 5 genes (*ICU1* a *ICU5*; Serrano-Cartagena *et al.*, 2000). El grupo de complementación que hemos estudiado en este trabajo, *ICU2*, estaba representado por una única línea, N329 (*icu2-1*), aislada por Röbbelen entre 1964 y 1969. Sus hojas vegetativas están débilmente recurvadas hacia el haz y son ligeramente asimétricas y más pequeñas que las de En-2, su ancestro silvestre (Figura 16, en esta página; Figura 1A, B, en la página 88). Mediante microscopía electrónica de barrido se comprobó que la superficie adaxial de las hojas vegetativas del

mutante *icu2-1* es irregular, presentando parches de células epidérmicas más pequeñas que las circundantes (Serrano-Cartagena *et al.*, 2000; Figura 1C, D, en la página 88). Estos rasgos nos hicieron pensar que *icu2-1* podía sufrir alguna alteración en la especificación o el mantenimiento de la dorsoventralidad foliar.

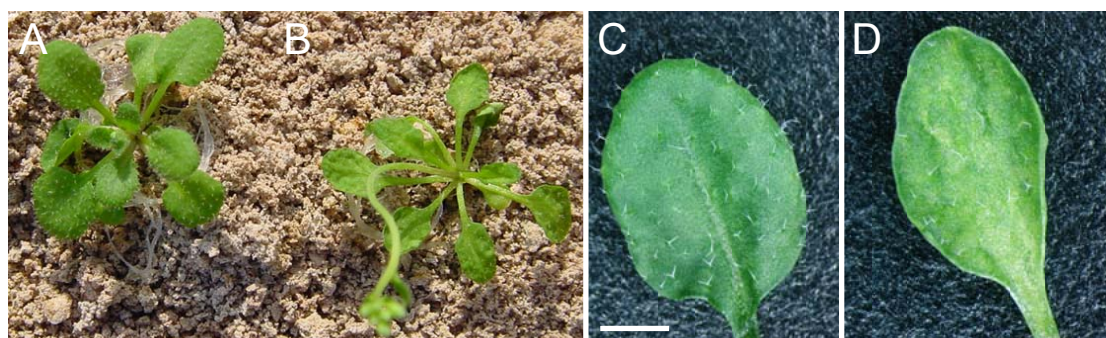


Figura 16.- Algunos rasgos fenotípicos del mutante *icu2-1*. Rosetas de (A) *En-2* e (B) *icu2-1*. Detalle de una hoja del tercer nudo de (C) *En-2* y (D) *icu2-1*. Las plantas tienen una edad de 30 días y la barra de escala representa 2 mm.

IV.2.2.- Fenotipo morfológico del mutante *icu2-1*

El fenotipo del mutante *icu2-1* es pleiotrópico: Muestra fertilidad reducida y un pedicelo más delgado que el silvestre (Serrano-Cartagena *et al.*, 2000); manifiesta floración temprana, ya que florece $24,43 \pm 2,10$ días tras la siembra, mientras que *En-2* lo hace a los $37,80 \pm 2,90$; produce menos hojas vegetativas ($9,36 \pm 0,81$) que el tipo silvestre ($12,40 \pm 0,52$); y sus flores sufren transformaciones homeóticas de sépalos en carpelos y de pétalos en estambres, similares a las causadas por las mutaciones *apetala2* (*ap2*; Figura 1E, en la página 88). En los mutantes portadores de alelos *ap2* hipomorfos o nulos el gen *AGAMOUS* (*AG*) se expresa ectópicamente en el primer y segundo verticilo floral (Bowman *et al.*, 1989). El número de tallos secundarios del mutante *icu2-1* es superior al del tipo silvestre, lo que sugiere una reducción de la dominancia apical.

IV.2.3.- Clonación posicional y caracterización estructural de *ICU2*

IV.2.3.1.- Cartografía de alta resolución e identificación de *ICU2*

La cartografía de baja resolución del mutante *icu2-1* llevada a cabo en una Tesis previa (Robles Ramos, 1999) indicó que se encuentra a $8,62 \pm 3,18$ cM del marcador MBK5 del cromosoma 5 (Serrano-Cartagena *et al.*, 2000; Robles y Micol, 2001). El genotipado de otros 1000 individuos *icu2-1/icu2-1* de la F_2 de un cruzamiento *icu2-1/icu2-1* \times *Ler*, para 10 nuevos marcadores del cromosoma 5 nos permitió definir un intervalo

candidato flanqueado por K8A10 y K3G17, un cóntigo formado por tres clones BAC parcialmente solapantes (Figura 2A, en la página 89). Finalmente, el genotipado de los recombinantes informativos para otros siete nuevos marcadores nos ha permitido establecer que *ICU2* radica en una región candidata de 50 kb, que contiene 15 genes (Figura 2A, en la página 89). La secuenciación de las unidades de transcripción de dichos genes ha revelado que el alelo *icu2-1* es portador de una transición C→T en la posición 6.762 (contando a partir del ATG) del gen At5g67100 (Figura 2A, en la página 89), que transforma una arginina en cisteína en la posición 1273 de la proteína (Figura 2B, en la página 89).

Hemos confirmado que At5g67100 es *ICU2* transfiriendo un transgén portador del alelo silvestre de At5g67100 a plantas *icu2-1/icu2-1*. En la progenie F₁ de la autofecundación de las plantas sometidas a agroinfiltración aparecieron nueve transformantes con fenotipo silvestre (Figura 3A, en la página 91).

IV.2.3.2.- Obtención y caracterización de alelos *icu2* insercionales

Hemos realizado una búsqueda de alelos insercionales, disponibles en las colecciones de dominio público, y hemos encontrado dos líneas presuntamente portadoras de alelos nulos del gen *ICU2*, GK-731A12 y N175161, a los que hemos denominado *icu2-2* e *icu2-3*, respectivamente. La primera de ellas es portadora de una inserción de ADN-T y la segunda de un elemento Ds.

Los heterocigotos *ICU2/icu2-2* e *ICU2/icu2-3* son indistinguibles de su parental silvestre *ICU2/ICU2* y no hemos encontrado homocigotos mutantes en la progenie de su autofecundación, lo que indica que los genotipos *icu2-2/icu2-2* e *icu2-3/icu2-3* son letales. El análisis de la progenie de los cruzamientos *icu2-1/icu2-1* × *ICU2/icu2-2* e *icu2-1/icu2-1* × *ICU2/icu2-3* y sus recíprocos indica que los genotipos *icu2-1/icu2-2* e *icu2-2/icu2-3* también son letales, mientras que las plantas *icu2-1/icu2-3* son viables e indistinguibles de las *icu2-1/icu2-1* (Tabla 1, en la página 99; Figura 3B, en la página 91).

Hemos analizado silicuas de las plantas *ICU2/icu2-2* y hemos observado que la mitad de su contenido parece corresponder a óvulos sin fecundar o abortivos, siendo la otra mitad semillas normales (Figura 3C-E, en la página 91), de las que sólo el 15% son portadoras del alelo *icu2-2* (Tabla 1, en la página 99). A su vez, las silicuas de los cruzamientos recíprocos *ICU2/ICU2* × *ICU2/icu2-2* contienen tanto óvulos sin fecundar o abortivos como semillas normales, y su segregación sugiere que la mayoría de los gametos femeninos *icu2-2* no son viables y que muchos de los *ICU2* producen embriones letales tras su fertilización con polen *icu2-2* (Tabla 1, en la página 99). El alelo mutante

icu2-3 también causa letalidad gamética con penetrancia incompleta, ya que las segregaciones observadas tras el análisis de las silicuas de las plantas *ICU2/icu2-3* y de las derivadas del cruzamiento *ICU2/ICU2* × *ICU2/icu2-3* y su recíproco son similares a las obtenidas para *icu2-2* (Tabla 1, en la página 99). No obstante, la proporción de plantas *ICU2/icu2-3* fue superior a la de las *ICU2/icu2-2*, lo que sugiere que la insuficiencia de función de *icu2-2* es más extrema que la de *icu2-3*, conclusión que también se desprende del análisis de los cruzamientos *icu2-1/icu2-1* × *ICU2/icu2-2* e *icu2-1/icu2-1* × *ICU2/icu2-3*, y sus recíprocos.

El gen At5g67100 codifica la subunidad catalítica de la polimerasa α de ADN, una de las cuatro subunidades que conforman la holoenzima. Su región codificante está formada por 30 exones y 29 intrones y codifica una proteína de 1492 aminoácidos y 167 kDa, que es de copia única en el genoma de *Arabidopsis thaliana*. La polimerasa α desempeña un papel fundamental en el ciclo celular, en el que se requiere para la iniciación de la replicación. Se ha demostrado que la regulación de la transcripción del gen de la polimerasa α de ADN en células humanas y en *Drosophila melanogaster* y *Schizosaccharomyces pombe* depende del ciclo celular (Wahl *et al.*, 1998; Hirose *et al.*, 1991; Bouvier *et al.*, 1992). En el reino vegetal, se sabe que en *Oryza sativa* y *Zea mays* la mayor actividad de esta enzima se detecta inmediatamente antes de la entrada en la fase S de la mitosis (Yokoi *et al.*, 1997; Gómez Roig y Vázquez-Ramos, 2003).

El alelo hipomorfo *icu2-1* es portador de una mutación que probablemente modifica la estructura tridimensional de la proteína ICU2 sin dañar su dominio catalítico (Figura 2B-D, en la página 89). Los alelos *icu2-2* e *icu2-3* causan letalidad embrionaria, probablemente como consecuencia de su insuficiente o nula actividad polimerasa (Figura 2B, en la página 89).

IV.2.4.- Análisis de la expresión de ICU2

Hemos analizado mediante RT-PCR cuantitativa el patrón de expresión espacial de *ICU2*, comprobando que la región que corresponde al meristemo apical del tallo es la de mayor actividad. Aunque en menor medida, también se detectaron transcritos *ICU2* en las yemas florales, las flores y las silicuas. Hemos comprobado además que la mutación *icu2-1* no modifica la actividad transcripcional del gen *ICU2* (Figura 6A, B, en la página 95).

IV.2.5.- Análisis de las interacciones genéticas de *ICU2*

IV.2.5.1.- Interacciones con *AG* y *FT*

Varios de los rasgos morfológicos del fenotipo del mutante *icu2-1* son similares a los que muestran los mutantes *tfl2* (Larsson *et al.*, 1998; Gaudin *et al.*, 2001) y *clf* (Goodrich *et al.*, 1997; véase el apartado III.5, en la página 11), tales como la curvatura de la hoja y la floración temprana, entre otros (Figura 4A-D, en la página 93). Hemos cruzado los mutantes *icu2-1* y *clf2-2* por *ft-1*, comprobando que los dobles mutantes *icu2-1 ft-1* (Figura 3F, G, en la página 91) y *clf2-2 ft-1* presentan el mismo fenotipo foliar que sus parentales *icu2-1* y *clf2-2*, respectivamente, y floración tardía (Figura 3F, en la página 91), lo que indica que la desrepresión del gen *FT* es la causa de la floración temprana de estos dos últimos. En una Tesis previa (Serrano Cartagena, 1998) se demostró que la expresión ectópica en las hojas del gen de identidad de órgano floral *AG* era la causante del fenotipo foliar de los mutantes *icu2-1* (Figura 3H, en la página 91) y *clf-18*.

IV.2.5.2.- Interacciones con *CLF*, *TFL2*, *FAS1* y *FAS2*

El parecido entre los fenotipos de los mutantes *icu2-1*, *clf* y *tfl2* sugiere que los genes *ICU2*, *CLF* y *TFL2* están implicados en un mismo proceso. El fenotipo morfológico de los dobles mutantes *icu2-1 clf2-2*, *icu2-1 tfl2-2* y *clf2-2 tfl2-2* fue sinérgico (Figura 4A-G, en la página 93), lo que apoya la hipótesis de su posible relación funcional.

Los mutantes *emf2*, portadores de alelos del gen *EMF2*, uno de los homólogos de *Su(z)12* en *Arabidopsis thaliana*, también comparten algunos rasgos fenotípicos con *icu2-1* (véase el apartado III.5, en la página 11). El mutante *emf2-5* presenta en forma extrema los rasgos morfológicos que caracterizan a *icu2-1*, y su fenotipo es muy similar al que exhiben los dobles mutantes *icu2-1 clf2-2*, *icu2-1 tfl2-2* y *clf2-2 tfl2-2*. El fenotipo del doble mutante *icu2-1 emf2-5* fue indistinguible del de su parental *emf2-5* (Figura 4, en la página 93). Esto indica que la mutación *emf2-5* es epistática sobre *icu2-1*, y sugiere que los genes *ICU2* y *EMF2* están implicados en el mismo proceso de desarrollo. Se ha demostrado previamente la epistasia de *emf2-3* sobre las mutaciones *clf* nulas o muy hipomorfas (Chanvivattana *et al.*, 2004), lo que refuerza la hipótesis de la posible relación funcional entre *ICU2*, *CLF2*, *TFL2* y *EMF2*.

Dado que los genes *CLF2*, *TFL2* y *EMF2* están implicados en la memoria celular mediada por la cromatina, hemos obtenido dobles mutantes entre *icu2-1* y los mutantes viables de pérdida de función del complejo CAF-1, cuya disrupción también causa la expresión ectópica de numerosos genes que en el tipo silvestre se encuentran

silenciados (véase el apartado III.5, en la página 11). Se sabe además que HP1, la homóloga de TFL2 en los mamíferos (véase el apartado III.5, en la página 11), interacciona con la subunidad p150 del complejo CAF-1 (véase el apartado III.5, en la página 11).

El rasgo fenotípico más característico de los mutantes *fas1* y *fas2* de *Arabidopsis thaliana* es la fasciación de sus tallos. El doble mutante *fas1-1 icu2-1* exhibió un fenotipo sinérgico, similar al de los dobles mutantes *icu2-1 clf2-2* e *icu2-1 tfl2-2* (Figura 4, en la página 93; Figura 5, en la página 92). Sin embargo, el análisis de la progenie del cruzamiento *fas2-1/fas2-1* × *icu2-1/icu2-1* reveló que el genotipo *fas2-1/fas2-1; icu2-1/icu2-1* es letal, y que las plantas *FAS2/fas2-1;icu2-1/icu2-1* y *fas2-1/fas2-1; ICU2/icu2-1* aparecen en una proporción (1/100) inferior a la esperada (1/15). Estos resultados sugieren alguna relación funcional entre *ICU2* y los genes *FAS*.

IV.2.6.- Análisis de la desregulación génica en el mutante *icu2-1*

Hemos comprobado cuantitativamente que tanto en las hojas como en las rosetas del mutante *icu2-1* se expresan ectópicamente, entre otros, los genes *AG*, *AP1*, *AP3*, *PI*, *SEP3*, *CAL*, *FUL*, *SOC1* y *FT* (véase Barrero *et al.*, 2007, en el Anexo I, en la página 72). Por su parte, los genes *WUS* y *LFY* sólo se sobreexpresan en las rosetas del mutante (Figura 6C-D, en la página 95). No hemos encontrado diferencias en los niveles de expresión de estos genes entre el mutante *icu2-1* y los dobles mutantes *icu2-1 ag-1*, *icu2-1 ap1-1*, *icu2-1 ap3-4* e *icu2-1 pi-1* (Figura 6E, en la página 95), lo que indica que la desrepresión de *AG*, *AP1*, *AP3* y *PI* no es la causa de la de los demás.

Del mismo modo, hemos cuantificado la expresión de los genes *AG*, *FT*, *SEP3* y *WUS* en los mutantes *icu2-1*, *clf2-2*, *tfl2-2* y *emf2-5* y en todas sus combinaciones dobles mutantes, comprobando que todos ellos se encuentran sobreexpresados (Figura 6E, en la página 95). Los niveles de desrepresión de *FT* y *AG* son muy altos en los mutantes *icu2-1*, *clf2-2* y *tfl2-2*, y mucho mayores en sus combinaciones dobles mutantes, así como en el mutante simple *emf2-5* (Figura 6E, en la página 95), lo que se correlaciona con la severidad de sus fenotipos morfológicos. Los niveles más altos de expresión del gen *WUS* fueron detectados en el mutante *icu2-1* y en los dobles mutantes *icu2-1 clf2-2* e *icu2-1 tfl2-2* (Figura 6E, en la página 95), lo que sugiere que *ICU2* participa en la represión de *WUS*.

IV.2.7.- Estudio de la metilación del gen *AG* en el mutante *icu2-1*

Los resultados del análisis de interacciones genéticas entre *ICU2*, *CLF* y *TFL2*, y la desrepresión de numerosos genes que hemos constatado en el mutante *icu2-1* son indicios de que el gen *ICU2* puede participar en la memoria celular mediada por la cromatina. Dado que el estado de actividad de muchos genes, como por ejemplo *AG* y *STM*, se correlaciona con patrones específicos de metilación de las histonas (Schubert *et al.*, 2006), hemos estudiado mediante inmunoprecipitación de la cromatina las regiones reguladoras del gen *AG* en el mutante *icu2-1*. Nuestros resultados indican que las plantas *icu2-1/icu2-1* presentan una ligera reducción de los niveles de dimetilación de la lisina 9 de la histona H3, así como un aumento de la acetilación generalizada de esa misma histona (Figura 7, en la página 96).

IV.2.8.- Análisis de la expresión del gen *AG* y la distribución subcelular de la proteína *TFL2* en el mutante *icu2-1*

Hemos visualizado el patrón de expresión de *AG* mediante una construcción *pAG-l::GUS*, encontrando parches de actividad *GUS* en las hojas del mutante *icu2-1*, que no se observan en las del tipo silvestre (Figura 9A-D, en la página 98). Esto sugiere que la expresión ectópica del gen *AG* en las hojas vegetativas de *icu2-1* no es generalizada, sino que se restringe a determinados grupos de células.

Empleando una construcción *TFL2-GFP* hemos comprobado además que la mutación *icu2-1* altera la distribución subcelular de la proteína *TFL2*, que es muy regular y exclusivamente nuclear en los tejidos silvestres, e irregular en los mutantes, en los que parece ser tanto nuclear como citoplasmica en determinados grupos de células (Figura 9E-H, en la página 98), lo que indica que la localización subcelular de *TFL2* depende de *ICU2*.

IV.2.9.- Consideraciones sobre la función de *ICU2*

Son varios los estudios en los que se relaciona la memoria celular mediada por la cromatina con la replicación (Vermaak *et al.*, 2003; McNairn y Gilbert, 2003; Craig, 2004). Uno de los sistemas de silenciamiento génico transcripcional mejor conocido es el protagonizado por *Su(var)3-9* y *Su(var)2-5* de *Drosophila melanogaster* (Bannister *et al.*, 2001). La familia génica *Su(var)3-9* codifica metiltransferasas de histonas responsables de la metilación específica de la lisina 9 de la histona H3, y el producto de *Su(var)2-5* es la proteína HP1. La proteína *TFL2* de *Arabidopsis thaliana* es homóloga de la Swi6 de levadura y de la HP1 de *Drosophila melanogaster*, que participan en la

heterocromatinización y se unen a las histonas metiladas. Se ha comprobado en *Schizosaccharomyces pombe* y *Drosophila melanogaster* que las metilasas de histonas Clr4 y Su(var)3-9 se unen a Swi6 o HP1, respectivamente (Moazed, 2001). Aunque se han descrito 9 proteínas homólogas de Su(var)3-9 en *Arabidopsis thaliana*, ninguna de ellas presenta el cromodominio SET responsable de la actividad metiltransferasa de histonas característica de esta familia (Malagnac *et al.*, 2002). Por otro lado, se sabe que la polimerasa α de ADN de *Schizosaccharomyces pombe* (Swi7) se une a Swi6 (Nakayama *et al.*, 2001). Todas estas proteínas parecen estar implicadas en la condensación de la cromatina, en el silenciamiento génico mediado por la cromatina y en la memoria celular. El resultado final de estas interacciones es la condensación de la cromatina y la represión local de determinados genes.

La proteína ICU2, además de los dominios típicos presentes en la subunidades catalíticas de las polimerasas α de ADN, posee un dominio de interacción proteína-proteína denominado MIR (MOD1-interacting region). En *Drosophila melanogaster*, este dominio está presente en todas las proteínas que interactúan con HP1 (Murcina *et al.*, 1999; Smothers y Henikoff, 2000) y la polimerasa Swi7 de *Schizosaccharomyces pombe* también lo requiere para su interacción con Swi6. El alelo mutante *icu2-1* es portador de una mutación hipomorfa que probablemente modifica la estructura tridimensional de la proteína ICU2, quedando el dominio MIR inaccesible a TFL2 (Figura 2C, D, en la página 89). Estas observaciones son congruentes con los resultados obtenidos en el análisis de las interacciones genéticas entre *icu2-1* y *tfl2-2*, cuyo doble mutante exhibe un fenotipo más extremo que el de ambos mutantes individuales.

El análisis de las interacciones entre los genes *ICU2*, *CLF* y *TFL2*, llevado a cabo en este trabajo, sugiere la existencia en *Arabidopsis thaliana* de un mecanismo de silenciamiento génico mediado por la cromatina similar al que se ha descrito para algunas levaduras y animales. Proponemos un modelo en el que la polimerasa α de ADN (ICU2), a la vez que replica el ADN es necesaria para que TFL2 se una a las histonas. ICU2 participaría así en el marcaje epigenético de la cromatina de manera casi simultánea a la replicación. A continuación, TFL2 formaría complejos con proteínas con actividad metiltransferasa, que metilarían a otras histonas, a las que a su vez se uniría TFL2 (Figura 17). Suponemos que la polimerasa ICU2 pierde o reduce su capacidad de interacción con TFL2 en el mutante *icu2-1*, de manera que el marcaje mediado por la polimerasa se ve dificultado, lo que a su vez perjudica el empaquetamiento de la cromatina. Como consecuencia, no se reprimen genes que están inactivados en el tipo silvestre.

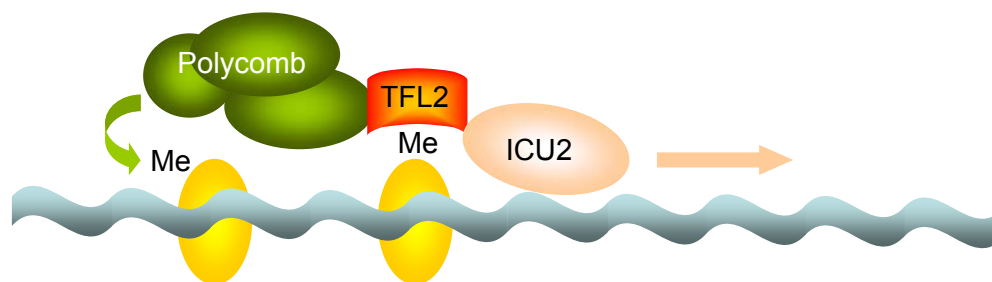


Figura 17.- Hipótesis sobre la relación entre ICU2 y el marcaje epigenético. La polimerasa ICU2 es necesaria para que TFL2 se una a las histonas, participando así en la memoria celular mediada por la cromatina.



V.- BIBLIOGRAFÍA

V.- BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnoor, R.V., Yule, R., Elo, A., Christensen, A.C., Meyer-Gauen, G., y Mackenzie, S.A. (2003). Substoichiometric shifting in the plant mitochondrial genome is influenced by a gene homologous to muts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 5968–5973.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J.D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. Tercera edición. Garland Publishing.
- Alonso-Peral, M.M., Candela, H., del Pozo, J.C., Martínez-Laborda, A., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (2006). The *HVE/CAND1* gene is required for the early patterning of leaf venation in *Arabidopsis*. *Development* **133**, 3755–3766.
- Aluru, M., Bae, H., Wu, D., y Rodermel, S. (2001). The *Arabidopsis immutans* mutation affects plastid differentiation and the morphogenesis of white and green sectors in variegated plants. *Plant Physiol.* **127**, 67–77.
- Aluru, M.R., y Rodermel, S.R. (2004). Control of chloroplast redox by the IMMUTANS terminal oxidase. *Physiol. Plant.* **120**, 4–11.
- Aluru, M., Yu, F., Fu, A., y Rodermel, S. (2006). *Arabidopsis* variegation mutants: new insights into chloroplast biogenesis. *J. Exp. Bot.* **57**, 1871–1881.
- Aukerman, M.J., y Amasino, R.A. (1998). Floral induction and florigen. *Cell* **93**, 491–494.
- Azpiroz-Leehan, R., y Feldmann, K.A. (1997). T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends Genet.* **13**, 152–156.
- Bauer, J., Chen, K., Hiltbunner, A., Wehrli, E., Eugster, M., Schnell, D., y Kessler, F. (2000). The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* **403**, 203–207.
- Becraft, P.W. (1999). Development of the leaf epidermis. *Curr. Top. Dev. Biol.* **45**, 1–40.
- Beemster, G.T.S., Fiorani, F. y Inzé, D. (2003). Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends Plant Sci.* **8**, 154–158.
- Bisanz, C., Begot, L., Carol, P., Perez, P., Bligny, M., Pesey, H., Gallois, J.L., Lerbs-Mache, S., y Mache, R. (2003). The *Arabidopsis* nuclear *DAL* gene encodes a chloroplast protein which is required for the maturation of the plastid ribosomal RNAs and is essential for chloroplast differentiation. *Plant Mol. Biol.* **51**, 651–663.
- Byrne, M.E., Timmermans, M., Kidner, C., y Martienssen, R.A. (2001). Development of leaf shape. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 38–43.
- Byrne, M.E. (2006). Shoot meristem function and leaf polarity: the role of class III HD-ZIP genes. *PloS Genet.* **2**, e89.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S., y Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**, 1039–1043.
- Cao, R., y Zhang, Y. (2004). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**, 115–164.
- Champagne, C., y Sinha, N.R. (2004). Compound leaves: equal to the sum of their parts? *Development* **131**, 4401–4412.
- Chen, M., Choi, Y., Voytas, D.F., y Rodermel, S.R. (2000). Mutations in the *Arabidopsis VAR2* locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease. *Plant J.* **22**, 303–313.
- Cleary, A.L., y Smith, L.G. (1998). The *Tangled1* gene is required for spatial control of cytoskeletal arrays associated with cell division during maize leaf development. *Plant Cell* **10**, 1875–1888.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A., y Pirrotta, V. (2002). *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* **111**, 185–196.

- Dunkley, T.P.J., Hester, S., Shadforth, I.P., Runions, J., Weimar, T., Hanton, S.L., Griffin, J.L., Bessant, C., Brandizzi, F., Hawes, C., Watson, R.B., Dupree, P., y Lilley, K.S. (2006). Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 6518–6523.
- Engstrom, E.M., Izhaki, A., y Bowman, J.L. (2004). Promoter bashing, microRNAs, and Knox genes. New insights, regulators, and targets-of-regulation in the establishment of lateral organ polarity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **135**, 685–694.
- Fischer, K., Kammerer, B., Gutensohn, M., Arbinger, B., Weber, A., Häusler, R.E., y Flüggé, U.I. (1997). A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter. *Plant Cell* **9**, 453–462.
- Franzmann, L.H., Yoon, E.S., y Meinke, D.W. (1995). Saturating the genetic map of *Arabidopsis thaliana* with embryonic mutations. *Plant J.* **7**, 341–350.
- Freeling, M., y Hake, S. (1985). Developmental genetics of mutants that specify knotted leaves in maize. *Genetics* **111**, 617–634.
- García-Hernández, M., Berardini, T.Z., Chen, G., Crist, D., Doyle, A., Huala, E., Knee, E., Lambrecht, M., Miller, N., Mueller, L.A., Mundodi, S., Reiser, L., Rhee, S.Y., Scholl, R., Tacklind, J., Weems, D.C., Wu, Y., Xu, I., Yoo, D., Yoon, J., y Zhang, P. (2002). TAIR: a resource for integrated *Arabidopsis* data. *Funct. Integr. Genomics* **2**, 239–253.
- Gómez-Campo, C. (1976). Conservation techniques of crucifer seed banks. *Arabid. Inf. Serv.* **13**, 18–21.
- van der Graaff, E. (1997). Developmental mutants of *Arabidopsis thaliana* obtained after T-DNA transformation. PhD thesis. Leiden University, Leiden, the Netherlands.
- Grossniklaus, U., Vielle-Calzada, J.-P., Hoepfner, M.A., y Gagliano, W.B. (1998). Maternal control of embryogenesis by *MEDEA*, a polycomb-group gene in *Arabidopsis*. *Science* **280**, 446–450.
- Guitton, A.E., y Berger, F. (2005). Control of reproduction by Polycomb group complexes in animals and plants. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 707–716.
- Hagio, M., Sakurai, I., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., y Wada, H. (2002). Phosphatidylglycerol is essential for the development of thylakoid membranes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1456–1464.
- Hay, A., Craft, J., y Tsiantis, M. (2004). Plant hormones and homeoboxes: bridging the gap? *BioEssays* **26**, 395–404.
- Hedges, S.B., Blair, J.E., Venturi, M.L., y Shoe, J.L. (2004). A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evol. Biol.* **4**, 2.
- Hennig, L., Bouveret, R., y Gruissem, W. (2005). MSI1-like proteins: an escort service for chromatin assembly and remodeling complexes. *Trends Cell Biol.* **15**, 295–302.
- Hickey, L.J. (1979). A revised classification of the architecture of dicotyledonous leaves. En *Anatomy of the dicotyledons*, 2nd edn, pp. 25–39. Metcalfe, C.R., y Chalk, L. (eds.). Clarendon Press.
- Horiguchi, G., Ferjani, A., Fujikura, U., y Tsukaya, H. (2006). Coordination of cell proliferation and cell expansion in the control of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* **119**, 37–42.
- Howell, S.H. (1998). *Molecular Genetics of plant development*. Cambridge.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., y Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901–3907.
- Johnson, H.B. (1975). Plant Pubescence: An ecological perspective. *Bot. Rev.* **41**, 233–258.
- Kessler, S., y Sinha, N. (2004). Shaping up: The genetic control of leaf shape. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 65–72.
- Kim, J.H., y Kende, H. (2004). A transcriptional coactivator, AtGIF1, is involved in regulating leaf growth and morphology in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 13374–13379.

- Kiyosue, T., Ohad, N., Yadegari, R., Hannon, M., Dinneny, J., Wells, D., Katz, A., Margossian, L., Harada, J., Goldberg, R.B., y Fischer, R.L. (1999). Control of fertilization-independent endosperm development by the *MEDEA* polycomb gene in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4186–4191.
- Köhler, C., Hennig, L., Spillane, C., Pien, S., Gruissem, W., y Grossniklaus, U. (2003). The Polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene *PHERES1*. *Genes Dev.* **17**, 1540–1553.
- Köhler, C., Page, D.R., Gagliardini, V., y Grossniklaus, U. (2005). The *Arabidopsis thaliana* MEDEA Polycomb group protein controls expression of *PHERES1* by parental imprinting. *Nat. Genet.* **37**, 28–30.
- Koornneef, M., van Eden, J., Hanhart, C.J., Stam, P., Braaksma, F.J., y Feenstra, W.J. (1983). Linkage map of *Arabidopsis thaliana*. *J. Hered.* **74**, 265–272.
- Krude, T., y Keller, C. (2001). Chromatin assembly during S phase: contributions from histone deposition, DNA replication and the cell division cycle. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 665–672.
- Kurata, N., Miyoshi, K., Nonomura, K., Yamazaki, Y., e Ito, Y. (2005). Rice mutants and genes related to organ development, morphogenesis and physiological traits. *Plant Cell Physiol.* **46**, 48–62.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., y Reinberg, D. (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.* **16**, 2893–2905.
- Laibach, F. (1943). *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. als Objekt für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen. *Bot. Arch.* **44**, 439–455.
- León, P., Arroyo, A., y Mackenzie, S. (1998). Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 453–480.
- Loyola, A., y Almouzni, G. (2004). Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim. Biophys. Acta* **1677**, 3–11.
- Luo, M., Bilodeau, P., Koltunow, A., Dennis, E.S., Peacock, W.J., y Chaudhury, A.M. (1999). Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 296–301.
- Makarevich, G., Leroy, O., Akinci, U., Schubert, D., Clarenz, O., Goodrich, J., Grossniklaus, U., y Köhler, C. (2006). Different Polycomb group complexes regulate common target genes in *Arabidopsis*. *EMBO Rep.* **7**, 947–952.
- Malagnac, F., Bartee, L., y Bender, J. (2002). An *Arabidopsis* SET domain protein required for maintenance but not establishment of DNA methylation. *EMBO J.* **21**, 6842–6852.
- Mandel, M.A., Feldmann, K.A., Herrera-Estrella, L., Rocha-Sosa, M., y León P. (1996). *CLAI*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.* **9**, 649–658.
- Marchand, C., Le Marechal, P., Meyer, Y., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E., y Decottignies, P. (2004). New targets of *Arabidopsis* thioredoxins revealed by proteomic analysis. *Proteomics* **4**, 2696–2706.
- Martínez-Zapater, J.M., Gil, P., Capel J., y Somerville, C.R. (1992). Mutations at the *Arabidopsis* *CHM* locus promote rearrangements of the mitochondrial genome. *Plant Cell* **4**, 889–899.
- Martínez-Zapater, J.M. (1993). Genetic analysis of variegated mutants in *Arabidopsis*. *J. Hered.* **84**, 138–140.
- Mauricio, R., y Rausher, M.D. (1997). Experimental manipulation of putative selective agents provides evidence for the role of natural enemies in the evolution of plant defense. *Evolution* **51**, 1435–1444.
- McCourt, P. (1999). Genetic analysis of hormone signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 219–243.

- Mello, J.A., y Almouzni, G. (2001). The ins and outs of nucleosome assembly. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 136–141.
- Meyerowitz, E.M., y Pruitt, R.E. (1985). *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. *Science* **229**, 1214–1218.
- Meyerowitz, E.M. (1987). *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Genet.* **21**, 93–111.
- Meyerowitz, E.M., Smyth, D.R., y Bowman, J.L. (1989). Abnormal flowers and pattern formation in floral development. *Development* **106**, 209–217.
- Meyerowitz, E.M. (1994). Structure and organization of the *Arabidopsis thaliana* nuclear genome. En *Arabidopsis*, pp. 21–36. Meyerowitz, E.M., y Somerville, C.R. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Meyerowitz, E.M. (2001). Prehistory and history of *Arabidopsis* research. *Plant Physiol.* **125**, 15–19.
- Meyerowitz, E.M. (2002). Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science* **295**, 1482–1485.
- Micol, J.L., y Hake, S. (2003). The development of plant leaves. *Plant Physiol.* **131**, 389–394.
- Miura, E., Kato, Y., Matsushima, R., Albrecht, V., Laalami S., y Sakamoto, W. (2007). The balance between protein synthesis and degradation in chloroplasts determines leaf variegation in *Arabidopsis yellow variegated*. *Plant Cell* **19**, 1313–1328.
- Moazed, D. (2001). Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol. Cell* **8**, 489–498.
- Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M.T., y Hisabori, T. (2001). Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11224–11229.
- Müller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E.L., O'Connor, M.B., Kingston, R.E., y Simon, J.A. (2002). Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell* **111**, 197–208.
- Næsted, H., Holm, A., Jenkins, T., Nielsen, H.B., Harris, C.A., Beale, M.H., Andersen, M., Mant, A., Scheller, H., Camara, B., Mattsson, O., y Mundy, J. (2004). *Arabidopsis VARIEGATED 3* encodes a chloroplast-targeted, zinc-finger protein required for chloroplast and palisade cell development. *J. Cell Sci.* **117**, 4807–4818.
- Ohad, N., Yadegari, R., Margossian, L., Hannon, M., Michaeli, D., Harada, J.J., Goldberg, R.B., y Fischer, R.L. (1999). Mutations in *FIE*, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *Plant Cell* **11**, 407–415.
- Ono, T., Kaya, H., Takeda, S., Abe, M., Ogawa, Y., Kato, M., Kakutani, T., Scheid, O.M., Araki, T., y Shibahara, K. (2006). Chromatin assembly factor 1 ensures the stable maintenance of silent chromatin states in *Arabidopsis*. *Genes Cells* **11**, 153–162.
- Orlando, V. (2003). Polycomb, epigenomes, and control of cell identity. *Cell* **112**, 599–606.
- Pasini, D., Bracken, A.P., Jensen, M.R., Denchi, E.L., y Helin, K. (2004). Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J.* **23**, 4061–4071.
- Pérez Pérez, J.M. (2003). Caracterización genética y molecular de los mutantes *ultracurvata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Piazza, P., Jasinski, S., y Tsiantis, M. (2005). Evolution of leaf developmental mechanisms. *New Phytol.* **167**, 693–710.
- Pirrotta, V. (1998). Polycomb the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing. *Cell* **93**, 333–336.
- Purves, W.K., Orians, G.H., Heller, H.C., y Sadava, D. (1998). *Life: The Science of Biology*, 5th Edition. Sinauer Associates.
- Raynaud, C., Perennes, C., Reuzeau, C., Catrice, O., Brown, S., y Bergounioux, C. (2005). Cell and plastid division are coordinated through the prereplication factor AtCDT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 8216–8221.

- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., y Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593–599.
- Rédei, G.P. (1963). Somatic instability caused by a cysteine-sensitive gene in *Arabidopsis*. *Science* **139**, 767–769.
- Rédei, G.P. (1973). Extra-chromosomal mutability determined by a nuclear gene locus in *Arabidopsis*. *Mut. Res.* **18**, 149–162.
- Ringrose, L., y Paro, R. (2004). Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 413–443.
- Röbbelen, G. (1968). Genbedingte Rotlicht-Empfindlichkeit der Chloroplastendifferenzierung bei *Arabidopsis*. *Planta* **80**, 237–254.
- Robles Ramos, P. (1999). Análisis genético de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología de la hoja. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Rodermel, S.R. (2001). Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends Plant Sci.* **6**, 471–478.
- Sachs, T. (1991). *Pattern Formation in Plant Tissues*. Cambridge University Press.
- Sakamoto, W. (2006). Protein degradation machineries in plastids. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 559–621.
- Serrano Cartagena, J. (1998). Disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*: Estudio de ecotipos y estirpes mutantes de la colección del *Arabidopsis* Information Service. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Smith, L.G., Gerttula, S.M., Han, S., y Levy, J. (2001). *Tangled1*: a microtubule binding protein required for the spatial control of cytokinesis in maize. *J. Cell Biol.* **152**, 231–236.
- Somerville, C., y Koornneef, M. (2002). A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 883–889.
- Somerville, C.R., y Ogren, W.L. (1979). A phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Nature* **280**, 833–836.
- Somerville, C.R., y Ogren, W.L. (1982). Isolation of photorespiratory mutants in *Arabidopsis thaliana*. En *Methods in Chloroplast Molecular Biology*, pp. 129–138. Edelman, M., Hallik, R.B., y Chua, N.H. (eds.). Elsevier.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796–815.
- Tsukaya, H. (2002). Interpretation of mutants in leaf morphology: genetic evidence for a compensatory system in leaf morphogenesis that provides a new link between cell and organismal theories. *Int. Rev. Cytol.* **217**, 1–39.
- Tsukaya, H. (2006). Mechanism of leaf-shape determination. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 477–496.
- Turner, S., y Sieburth, L.E. (2002). Vascular patterning. En *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists.
- Verreault, A. (2000). *De novo* nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev.* **14**, 1430–1438.
- Voll, L., Hausler, R.E., Hecker, R., Weber, A., Weissenböck, G., Fiene, G., Waffenschmidt, S., y Flugge, U.I. (2003). The phenotype of the *Arabidopsis cue1* mutant is not simply caused by a general restriction of the shikimate pathway. *Plant J.* **36**, 301–317.
- Walbot, V., y Evans, M.M. (2003). Unique features of the plant life cycle and their consequences. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 369–379.
- Wang, Q., Sullivan, R.W., Kight, A., Henry, R.L., Huang, J., Jones, A.M., y Korth, K.L. (2004). Deletion of the chloroplast-localized *Thylakoid Formation1* gene product in *Arabidopsis* leads to deficient thylakoid formation and variegated leaves. *Plant Physiol.* **136**, 3594–3604.
- Yu, F., Fu, A., Aluru, M., Park, S., Xu, Y., Liu, H., Liu, X., Foudree, A., Nambogga, M., y Rodermel, S. (2007). Variegation mutants and mechanisms of chloroplast biogenesis. *Plant Cell Environ.* **30**, 350–365.



ANEXO I: PUBLICACIONES

































INCURVATA2* encodes the catalytic subunit of DNA polymerase α and interacts with genes involved in chromatin-mediated cellular memory in *Arabidopsis thaliana

**José María Barrero^{a,1}, Rebeca González-Bayón^a, Juan Carlos del Pozo^b,
María Rosa Ponce^a and José Luis Micol^{a,2}**

^aDivisión de Genética and Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante, Spain

^bInstituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Departamento de Biotecnología, Carretera de la Coruña Km. 7, 28040 Madrid, Spain

¹Current address: CSIRO Plant Industry, GPO Box 1600, ACT 2601 Canberra, Australia

²To whom correspondence should be addressed. E-mail: jlmicol@umh.es; telephone: 34 96 665 85 04; fax: 34 96 665 85 11.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: J.L. Micol.

Running title: Characterization of the *ICU2 Arabidopsis* gene

Key words: *Arabidopsis*, DNA polymerase, cellular memory, epigenetic inheritance, plant development.

Word count: 12960 (abstract: 287; main body of text: 8991; tables: 505; references: 3177)

Character count: 74445

Figures: 9 (7 in color)

Tables: 2

ABSTRACT

Once initiated, cell type-specific gene expression patterns have to be maintained during the development of multicellular organisms by the stable inheritance of transcriptional states through mitosis, which requires the action of multiprotein complexes that remodel chromatin structure. Genetic and molecular interactions between chromatin remodeling factors and components of the DNA replication machinery have been identified in *Schizosaccharomyces pombe*, indicating that some epigenetic marks are replicated simultaneously to DNA with the participation of the DNA replication complexes. This model of epigenetic inheritance might be extended to the Plant Kingdom, as we report here after the positional cloning and characterization of the *INCURVATA2* (*ICU2*) gene, which encodes the catalytic subunit of the DNA polymerase α of *Arabidopsis thaliana*. The strong *icu2-2* and *icu2-3* insertional alleles caused fully penetrant zygotic lethality when homozygous and incompletely penetrant gametophytic lethality, probably because of loss of DNA polymerase activity. The weak *icu2-1* allele carried a point mutation and caused early flowering, leaf incurvature and homeotic transformations of sepals into carpels and of petals into stamens. We obtained double mutants and deduced from their synergistic phenotypes that *ICU2* interacts with *TERMINAL FLOWER 2*, the ortholog of *HETEROCHROMATIN PROTEIN 1* of animals and yeasts, and with the Polycomb-Group (PcG) gene *CURLY LEAF*. Another PcG gene, *EMBRYONIC FLOWER 2*, was found to be epistatic to *ICU2*. Quantitative RT-PCR analyses indicated that a number of regulatory genes were derepressed in the *icu2-1* mutant, including flowering time, flower meristem and flower organ identity genes. Derepression of two of them, *AGAMOUS* and *FLOWERING LOCUS T*, largely contributed to the leaf incurvature and early flowering, respectively, displayed by the *icu2-1* mutant. Pull-down analysis demonstrated ICU2-TFL2 protein-protein interaction, which is impaired by the amino acid substitution caused by the *icu2-1* mutation.

INTRODUCTION

Cells decide their fates early in the development of multicellular organisms, and their decisions must be maintained through cell divisions that lead to the adult body. Such maintenance requires the stable inheritance of gene expression states and behaves as a cellular memory which allows the determined cells to retain their developmental identity through successive mitotic cycles (Schubert *et al.*, 2005). Loss of such cellular memory causes diverse developmental aberrations and diseases, including cancer (Rountree *et al.*, 2001; Gil *et al.*, 2005).

Certain small RNAs are involved in initiating the heterochromatinization of specific chromosome regions (Grewal and Moazed, 2003; Zilberman *et al.*, 2003; Craig, 2004; Lippman and Martienssen, 2004; Mathieu and Bender, 2004). After initiation, protein complexes are recruited that introduce epigenetic marks in histones. Methylation of H3K9 (the Lysine 9 residue of the N-terminal tail of the H3 histone) is the most widely studied of these epigenetic marks, and seems to be an essential element in the heterochromatinization process (Soppe *et al.*, 2002; Elgin and Grewal, 2003; Craig, 2004). Methylated H3K9 is recognized by the Heterochromatin protein 1 (HP1) of *Drosophila melanogaster* (Bannister *et al.*, 2001) and its orthologs, Switching 6 (Swi6) of *Schizosaccharomyces pombe* and the human HP1 (Lachner *et al.*, 2001). After its binding to methylated histones, HP1 mediates the recruitment of other proteins to assemble multiprotein complexes with histone methyltransferase activity (Fransz and Jong, 2002; Craig, 2004), which repress gene expression through the formation of higher order chromatin structures (Grewal and Elgin, 2002). During S phase, these structures need to be removed to allow DNA replication, and then quickly reassembled to maintain the gene expression states.

The Polycomb group (PcG) of repressors includes crucial components of cellular memory mechanisms that rely on the inheritance of modifications in specific histone tails. They were first discovered in *Drosophila melanogaster* and found to be responsible for the

maintenance of early determined transcription patterns throughout the life cycle of the fly. Loss-of-function mutations in PcG genes result in ectopic expression of homeotic genes (Paro *et al.*, 1998; Francis and Kingston, 2001; Cunliffe, 2003). PcG genes encode components of multiprotein complexes that catalyze methylation of the N-terminal tail of the H3 and H4 histones (Peterson and Laniel, 2004).

Chromatin-mediated gene repression systems exist in plants (He and Amasino, 2005), where a *HP1* homolog and several PcG genes have been described. The only protein of *Arabidopsis thaliana* with overall sequence similarity to HP1 is TERMINAL FLOWER 2 (TFL2; also known as LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 [LHP1]; Larsson *et al.*, 1998; Gaudin *et al.*, 2001; Turck *et al.*, 2007). TFL2 acts as a repressor of genes involved in flowering time, floral organ identity, meiosis and seed maturation (Nakahigashi *et al.*, 2005). TFL2 is a euchromatic protein that mainly associates with regions evenly distributed along euchromatin, each covering one or two genes marked by the methylated H3K27 repressive mark (Turck *et al.*, 2007).

The PcG genes identified in *Arabidopsis thaliana* include, among others, *CURLY LEAF* (*CLF*; Goodrich *et al.*, 1997), which represses the floral organ identity gene *AGAMOUS* (*AG*; Yanofsky *et al.*, 1990) throughout plant development, *VERNALIZATION 2* (*VRN2*; Gendall *et al.*, 2001), which is required for the maintenance of the repression of *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*; Bastow *et al.*, 2004) in response to vernalization, and *EMBRYONIC FLOWER 2* (*EMF2*; Yoshida *et al.*, 2001), which is required to maintain vegetative development and represses flower development (Moon *et al.*, 2003). It has been proposed that different PcG complexes exist in plants, which would include common components, such as *EMF2*, and specific components, such as *CLF* and *VRN2* (Otte and Kwaks, 2003; Reyes and Grossniklaus, 2003; Chanvivattana *et al.*, 2004). Loss-of-function alleles of the *CLF* and *EMF2* PcG genes share a pleiotropic phenotype that include leaf curling, early flowering, and the misexpression of many genes, some of which encode transcription factors (reviewed in Reyes, 2006). The same phenotypic traits are caused by mutations in genes that encode putative chromatin remodeling factors, such as

TFL2, *EARLY BOLTING IN SHORT DAYS (EBS)*; Piñeiro *et al.*, 2003) and *SPLAYED (SYD)*; Wagner and Meyerowitz, 2002), and by the silencing of *BRAHMA* (Farrona *et al.*, 2004).

We have already studied at a preliminary level the *incurvata2-1 (icu2-1)* mutant, which displayed mildly incurved leaves and early flowering. It was identified in a study of 152 *Arabidopsis thaliana* mutants with abnormally shaped leaves, which belong to the *Arabidopsis* Information Service (AIS) Form Mutants collection, 13 of which had been isolated by G. Röbbelen and displayed curled, involute leaves, a phenotype that we named *Incurvata* (Serrano-Cartagena *et al.*, 1999). We found the *icu* mutations to belong to five complementation groups, one of which, *ICU2*, was represented by a single recessive allele, *icu2-1*, which caused the ectopic derepression of several floral organ identity genes in the leaves. In addition, the *icu2-1 clf* double mutants displayed a synergistic phenotype. Taken together, our results suggested a functional relationship between the *ICU2* gene and PcG-mediated gene repression (Serrano-Cartagena *et al.*, 2000).

Here, we report the positional cloning of the *ICU2* gene, which was found to encode the catalytic subunit of DNA polymerase α , and the isolation of lethal *icu2* alleles. The morphological and molecular phenotypes caused by the *icu2* mutations, the molecular nature of the *icu2-1* allele and its genetic interactions with mutations in *TFL2* and several PcG genes suggest a role for the replication machinery in epigenetic inheritance and plant chromatin packaging. Our results suggest the existence in plants of a cellular memory mechanism that involves DNA polymerase α , as proposed by previous authors for the fission yeast (Nakayama *et al.*, 2000; 2001; Ahmed *et al.*, 2001; Vermaak *et al.*, 2003).

RESULTS

The recessive *icu2-1* mutation causes leaf incurvature, early flowering and homeotic flower transformations

The phenotype of the *icu2-1* mutant is pleiotropic. Its vegetative leaves were of slightly reduced size and displayed some bilateral asymmetry and a variable degree of incurvature (Figure 1A, B). The surface of these leaves was uneven, which correlated with the presence of patches of small epidermal cells (Figure 1C, D). The *icu2-1* mutant showed reduced apical dominance, developing an increased number of secondary stems, and its flowers displayed partial homeotic transformations of sepals into carpels and of petals into stamens (Figure 1E). These flower aberrations are similar to those shown by mutants carrying loss-of-function *apetala2* alleles, which derepress *AG* in the first and second floral whorls (Bowman *et al.*, 1989). The *icu2-1* mutant was early flowering, bolting 24.43 ± 2.10 days after sowing (the wild-type En-2 bolted 37.80 ± 2.90 days after sowing) and produced less vegetative leaves (9.36 ± 0.81) than En-2 (12.40 ± 0.52).

The *ICU2* gene encodes the catalytic subunit of DNA polymerase α

We previously mapped the *icu2-1* mutation at a low-resolution level to the lower arm of chromosome 5, linked to the *nga129* and *MBK5* microsatellites (Serrano-Cartagena *et al.*, 2000). Further linkage analyses allowed us to define a 50-kb candidate region (Figure 2A), which encompassed 15 annotated genes. All the putative transcription units within the candidate region were sequenced in *icu2-1/icu2-1* and En-2 plants. A missense mutation was found in the *At5g67100* gene (Figure 2A, B) which encodes the catalytic subunit of the DNA polymerase α of *Arabidopsis thaliana*.

To confirm that loss of function of the *At5g67100* gene causes the mutant phenotype of *icu2-1/icu2-1* plants, a transgene-mediated complementation experiment was performed. A wild-type (En-2) genomic fragment of 9467 bp encompassing the entire

region between the genes At5g67090 and At5g67110 was cloned into the pGreenII0179 vector. The resulting construct was named *pG-ICU2* and transferred into *icu2-1/icu2-1* plants (see Methods). Nine transformant lines were obtained, all of which displayed wild-type morphology (Figure 3A).

At5g67100 is a large, single-copy gene that contains 30 exons, coding for a 1492-amino acid protein (Figure 2B). The *icu2-1* mutation consisted of a C→T transition in the 24th exon of At5g67100, in nucleotide position 6762 of the transcription unit (numbering from the initiation codon), which substituted Arginine by Cysteine in amino acid position 1273 (Figure 2B), a residue that is outside the predicted polymerase catalytic domains of the enzyme (see the II, III and V domains in Figure 2B; Wong *et al.*, 1998) and other conserved regions. The promoter of this gene includes the E2F binding site motif (TTTCCCGC), which is characteristic of cell-cycle-regulated genes (Fry and Farnham, 1999; Chaboute *et al.*, 2000).

Proteins interacting with HP1 in *Drosophila melanogaster* share the PXVXL consensus sequence, named MIR domain (MOD1-interacting region; Murzina *et al.*, 1999; Smothers and Henikoff, 2000). A similar pentameric sequence (PFVQV) is present in Swi7, the DNA polymerase α of *Schizosaccharomyces pombe*, and is required for its binding to the HP1 homolog Swi6 (Nakayama *et al.*, 2001). This sequence is also shared by other DNA polymerase α proteins, including ICU2 (PHVQV; Figure 2B) and those of *Drosophila melanogaster* (PHVQV) and mammals (PHVHV). A computer-based prediction of protein structure suggested that the amino acid change caused by the *icu2-1* mutation (Figure 2C, D), would reduce or abolish access of some proteins to the MIR domain of ICU2.

The *icu2-2* and *icu2-3* recessive alleles cause early lethality

A search for insertional alleles of *ICU2* in public collections allowed us to find the GK-731A12 line in the GABI-Kat database (Li *et al.*, 2003; Rosso *et al.*, 2003), which was

confirmed as carrying a T-DNA (Sul^R) insertion in position 1075 bp (numbering from the initiation codon), in the first exon of the *ICU2* gene, and named *icu2-2* (Figure 2A, B). An enhancer trap line (N175161) that had been generated by J. Clarke and M. Bevan was confirmed as carrying a *Ds* (Kan^R) transposable element in the first exon of the *ICU2* gene and named *icu2-3* (Figure 2A, B). We tested by RT-PCR the presence of *icu2-2* and *icu2-3* transcripts, only the latter being detected and found to be a chimeric molecule containing segments of the T-DNA insert and the downstream *ICU2* sequences (data not shown).

The *ICU2/icu2-2* and *ICU2/icu2-3* heterozygotes were phenotypically wild-type. No homozygous mutants were found in their progeny, which suggested recessive lethality. We did not find *icu2-1/icu2-2* or *icu2-2/icu2-3* heterozygous plants in the progeny of *icu2-1/icu2-1* x *ICU2/icu2-2* or *ICU2/icu2-2* x *ICU2/icu2-3* crosses, respectively. On the contrary, the *icu2-1/icu2-3* heterozygotes were viable and displayed a morphological phenotype indistinguishable from that of the *icu2-1/icu2-1* homozygotes (Figure 3B). Moreover, the *icu2-2* allele was not transmitted to the viable progeny of reciprocal *icu2-1/icu2-1* x *ICU2/icu2-2* crosses (Table 1).

When developing siliques were dissected in selfed *ICU2/icu2-2* plants, half of the seeds were found to be abnormal, small and white and seemed to be aborted or unfertilized ovules without any visible embryonic structure (Figure 3C-E), whereas all the remaining seeds were morphologically normal, and only 15% of which carried the *icu2-2* allele (Table 1). The siliques of *ICU2/ICU2* x *ICU2/icu2-2* reciprocal crosses displayed aborted or unfertilized ovules and mature seeds, some of which gave morphologically wild-type *ICU2/icu2-2* plants. Our results indicate that most of the female *icu2-2* gametes are not viable, and that some wild-type ovules yield lethal zygotes after fertilization by *icu2-2* pollen.

The *icu2-3* allele also caused gametic lethality with incomplete penetrance, although weaker than that of *icu2-2*. This conclusion was reached from analyses of the progeny of selfed *ICU2/icu2-3* plants, and those of *ICU2/ICU2* x *ICU2/icu2-3* reciprocal

crosses. The corresponding siliques displayed a higher proportion of normal seeds, together with aborted or unfertilized ovules as well as brown and shrivelled seeds that seemed to have arrested their development in a later stage of maturation. The proportion of *ICU2/icu2-3* plants was in all cases higher than that of *ICU2/icu2-2*, further indicating that the deleterious effects of *icu2-2* are stronger than those of *icu2-3*. Similar conclusions were reached from the analysis of reciprocal *icu2-1/icu2-1* x *ICU2/icu2-2* and *icu2-1/icu2-1* x *ICU2/icu2-3* crosses. Although gametogenesis seemed to be affected also by the weak *icu2-1* allele, the aborted or unfertilized ovules found in the siliques of non-manipulated, naturally selfed *icu2-1/icu2-1* plants, were absent from *icu2-1/icu2-1* siliques pollinated by hand with *icu2-1* pollen. This suggests that the early lethality observed in *icu2-1/icu2-1* plants is due to insufficient pollen quantity rather than poor pollen quality. Taken together, these results indicate that the *icu2-2* and *icu2-3* alleles, but not *icu2-1*, affect both ovule and pollen formation.

The phenotype of the *icu2-1* mutant is largely due to the derepression of *AG* and *FT*

Given that the early flowering phenotype of the *tfl2* mutants is suppressed (Kotake *et al.*, 2003) by mutations at the flowering promoter gene *FT* (*FLOWERING LOCUS T*; Kobayashi *et al.*, 1999), and due to the resemblance between the phenotypes of *tfl2-2*, *icu2-1* and *clf-2*, we crossed the *ft-1* mutant to either *icu2-1* or *clf-2*. Given that the double mutants displayed the leaf morphology of their *icu2-1* or *clf-2* parentals and late flowering, such as that of *ft-1* (Figure 3F, G), we concluded that the early flowering of *icu2-1* requires FT. We already found that the severe loss-of-function *ag-1* mutation (Chen and Meyerowitz, 1999) suppressed the mutant phenotype of *icu2-1/icu2-1* leaves (Figure 3H), where not only *AG*, but also *APETALA1* (*AP1*; Mandel *et al.*, 1992), *AP3* (Jack *et al.*, 1992), and *PISTILLATA* (*PI*; Bowman *et al.*, 1989) were ectopically derepressed (Serrano-Cartagena *et al.*, 2000). We obtained in this work double mutant combinations of *icu2-1* with the strong loss-of-function *ap1-1* (Bowman *et al.*, 1993), *ap3-4* (Jack *et al.*, 1992; Irish and Yamamoto, 1995) and *pi-1* (Bowman *et al.*, 1991) mutations, and found that both leaf

morphology and flowering time of all the double mutants were similar to those of the *icu2-1* single mutant (data not shown). These results indicate that both *AG* and *FT* are epistatic to *ICU2* and that their derepressions (see below) cause leaf incurvature and early flowering, respectively, in the *icu2-1* mutant; the results also show that *FT* is repressed not only by *TFL2* but also by *CLF* and *ICU2*.

ICU2* genetically interacts with *CLF*, *TFL2*, *EMF2*, *FAS1* and *FAS2

Ectopic expression of *AG* and other MADS-box genes is known to be caused by loss-of-function of *TFL2*, *CLF* or *EMF2*, among others (reviewed in Schubert *et al.*, 2005). The mutants affected in these genes share several phenotypic traits with *icu2-1*, including leaf curvature and early flowering. Therefore, we decided to analyze the genetic interactions between *icu2*, *tfl2*, *clf* and *emf2*. We obtained double mutants involving *icu2-1* (Figure 4B) and the null *clf-2* (Goodrich *et al.*, 1997) and *tfl2-2* (Kotake *et al.*, 2003) mutations (Figure 4C, D). The phenotypes of the *icu2-1 clf-2*, *icu2-1 tfl2-2* and *clf-2 tfl2-2* double mutants (Figure 4E-G) were very similar and much more severe than those of either parental, displaying strongly incurved and narrow leaves, arranged in an extremely small rosette. These synergistic genetic interactions suggested that the *ICU2*, *CLF* and *TFL2* genes are functionally related.

The *emf2-5* mutant carries a weak, hypomorphic allele of the *EMF2* gene (Yang *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997), is extremely early flowering and develops a tiny rosette composed of small, narrow and involute leaves (Yoshida *et al.*, 2001; Figure 4H). Its phenotype is similar to those of the *icu2-1 clf-2*, *icu2-1 tfl2-2* and *clf-2 tfl2-2* double mutants. We found *emf2-5* to be epistatic to *icu2-1*, as deduced from a comparison of the *icu2-1/icu2-1;emf2-5/emf2-5* plants (Figure 4I) with their *ICU2/-;emf2-5/emf2-5* siblings, which were phenotypically indistinguishable in the F₂ progeny (427 plants) of an *emf2-5/emf2-5* x *icu2-1/icu2-1* cross. Taken together with the previously described epistasis of *emf2* to *clf* (Chanvivattana *et al.*, 2004), our results suggested a functional relationship between *ICU2*, *CLF*, *TFL2* and *EMF2* genes.

We also crossed the *icu2-1* mutant to viable mutants defective in CAF-1 (Chromatin Assembling Factor-1) function, which is required for histone deposition in *Arabidopsis thaliana* (Schönrock *et al.*, 2006). CAF-1 is a heterotrimeric complex including the CAC1, CAC2 and CAC3 proteins in yeast, p150, p60 and p48 in mammals, and FAS1, FAS2 and MSI1 in plants, loss of function of which results in transcription of some silenced genes. Mammalian CAF-1 is necessary for coupling chromatin assembly with DNA replication (Hoek and Stillman, 2003) and its p150 subunit is known to interact with HP1 (Murzina *et al.*, 1999; Quivy *et al.*, 2004). The *fas1* and *fas2* mutants of *Arabidopsis thaliana* are characterized by fasciated and flat stems, disrupted phyllotaxy, altered floral organ structure and number, leaf serration and inhibition of root elongation (Leyser and Furner, 1992; Fig. 5B, E). We crossed *icu2-1* to the *fas* mutants, and found that the *icu2-1 fas1-1* double mutant displayed a synergistic phenotype consisting in small, narrow and involute leaves (Figure 5C, D, F), similar to those of the *icu2-1 clf-2* and *icu2-1 tfl2-2* double mutants obtained in this work. In addition, the *icu2-1 fas1-1* floral organs had much more severe alterations than those of either parental (Figure 5F), displaying disrupted phyllotaxy and strongly curly siliques, which only contained aborted or unfertilized ovules. In addition, we performed an *icu2-1/icu2-1* x *fas2-1/fas2-1* cross, finding in its F₂ progeny no *icu2-1/icu2-1;fas2-1/fas2-1* plants, as well as a reduced frequency of the *icu2-1/icu2-1;FAS2/fas2-1* and *ICU2/icu2-1;fas2-1/fas2-1* genotypes (expected: 2/15 each; observed: 1/100 each), which were phenotypically indistinguishable to their *icu2-1/icu2-1;FAS2/FAS2* and *ICU2/ICU2;fas2-1/fas2-1* siblings, respectively.

A number of genes encoding transcription factors are upregulated in the *icu2-1* mutant

When *ICU2* transcript levels were analysed in assorted tissues of the wild-type En-2 by means of quantitative reverse-transcriptase PCR (QRT-PCR; Figure 6A), we found about 10-fold more expression in shoot apices (where meristematic cells are more abundant) than in roots, flower buds, open flowers and siliques, which, in turn, displayed 10-fold

more expression than the whole rosettes that were used as a reference. The lowest levels of *ICU2* activity were found in leaves and stems. The *icu2-1* point mutation did not significantly change the transcriptional activity of the *ICU2* gene in rosettes or in shoot apices (Figure 6B). The same conclusion can also be reached by examining the expression profiles of *ICU2* obtained from Genevestigator (<http://www.genevestigator.ethz.ch>; Zimmermann *et al.*, 2004).

Using a semi-quantitative method, we have already demonstrated the ectopic expression of the *AG*, *AP1*, *AP3* and *PI* genes in the leaves of the *icu2-1* mutant, (Serrano-Cartagena *et al.*, 2000). In this work, we used QRT-PCR to quantitatively analyze the expression of these genes and to analyze that of other genes, which included several members of the MADS-box family [*SEPALLATA3* (*SEP3*; Pelaz *et al.*, 2000), *CAULIFLOWER* (*CAL*; Kempin *et al.*, 1995), *FRUITFULL* (*FUL*; Gu *et al.*, 1998), *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*; Michaels and Amasino, 1999), and *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*; Lee *et al.*, 2000)], as well as meristem identity and flowering time genes [*FT*, *LEAFY* (*LFY*; Weigel *et al.*, 1992), and *WUSCHEL* (*WUS*; Laux *et al.*, 1996)]. We found strongly upregulated the *AG*, *AP1*, *AP3*, *PI*, *SEP3* (and *SEP1* and *SEP2*; data not shown), *CAL*, *FUL*, *SOC1* and *FT* genes both in excised leaves and whole rosettes of the *icu2-1* mutant (Figure 5C-D), as well as *LFY* and, particularly, *WUS* only in whole rosettes (Figure 5D). To ascertain whether derepression of the *AG*, *AP1*, *AP3* or *PI* floral organ identity genes might in turn be the cause of the derepression of the rest of the studied genes, we obtained the *icu2-1 ag-1*, *icu2-1 ap1-1*, *icu2-1 ap3-4* and *icu2-1 pi-1* double mutants, and found no significant differences between their QRT-PCR analyses and those of the *icu2-1* single mutant (data not shown). These results indicated that derepression of *SEP3*, *SEP1*, *SEP2*, *CAL*, *FUL*, *SOC1*, *FT*, *LFY* and *WUS* is not an indirect consequence of *AG*, *AP1*, *AP3* or *PI* deregulation in the *icu2-1* mutant.

Given the pivotal contribution of *AG* and *FT* derepression to the phenotype of the *icu2-1*, *clf-2* and *tfl2-2* mutants, and due to the important role of *SEP3* and *WUS* in flower

organogenesis and meristem function, respectively, we decided to quantify the expression of these four genes in the *icu2-1*, *clf-2*, *tfl2-2* and *emf2-5* single mutants, as well as in the *icu2-1 tfl2-2*, *icu2-1 clf-2* and *clf-2 tfl2-2* double mutants. We found the *AG*, *SEP3*, *FT* and *WUS* genes to be upregulated (Figure 5E). *AG* and *FT* transcript levels were similar in the double mutants and the *emf2-5* single mutant, and clearly higher than those observed in the *icu2-1*, *clf-2* and *tfl2-2* single mutants. The highest *WUS* transcript levels were observed in the *icu2-1* single mutant and the *icu2-1 tfl2-2* and *icu2-1 clf-2* double mutants, suggesting a role for *ICU2* in the repression of this meristematic gene.

The *AG* locus is enriched in the H3ac active mark in the *icu2-1* mutant

The synergistic interactions among *ICU2*, *CLF*, *TFL2*, *EMF2*, *FAS1* and *FAS2* described here and the derepression of regulatory genes that we observed in the *icu2-1* mutant suggested a role for *ICU2* in epigenetic inheritance and plant chromatin packaging. In addition, it is known that expression of *AG* and *STM*, which are direct *CLF* targets, depends on their histone methylation pattern (Schubert *et al.*, 2006). This prompted us to perform a chromatin immunoprecipitation analysis to test whether the *icu2-1* mutation affects epigenetic marks in *AG*, which is derepressed in the *icu2-1* mutant.

We tested the di-methylation of Lysine 9 of histone H3 (H3K9me₂), which in *Arabidopsis thaliana* is localized within silent heterochromatin (Lindroth *et al.*, 2004), and for the tri-methylalition of Lysine 27 of H3 (H3K27me₃), which is preferentially associated with open euchromatin regions (reviewed in Henikoff, 2005). We detected a weak reduction of both epigenetic marks in the promoter and second intron of the *AG* gene (Figure 7). We also tested H3 acetylation, and found a noticeable enrichment of H3ac in the *AG* promoter in the *icu2-1* mutant (Figure 7). To determine whether or not these histone modifications were associated to changes in DNA methylation, we analyzed by bisulfite genomic sequencing the *AG* promoter and found that Cytosine methylation was not significantly different in the *icu2-1* mutant (0.38%; 15 clones sequenced) and the En-2 wild type (1.32%; 10 clones).

ICU2 interacts with TFL2 *in vitro*

To analyze the physical interaction between ICU2 and TFL2, we expressed in bacteria TFL2 fused to the GST protein. Both GST and GST-TFL2 proteins bound to sepharose beads were incubated with the carboxylic half of the wild-type ICU2 protein (ICU2-ct) and that of its mutated version (ICU2-1-ct), which had been translated *in vitro* in the presence of radiolabelled methionine. GST-TFL2 interacted with the full length ICU2-ct but not with the full length ICU2-1-ct protein (Figure 8). Interestingly, a smaller subproduct of the synthesis of the ICU2-1-ct protein, which according to the molecular weight deducted from its migration in the gel contains the HP1-binding domain but not the amino acid changed by the *icu2-1* mutation, was able to interact with GST-TFL2. This result indicated that the wild-type ICU2 protein interacts with TFL2 and that the *icu2-1* mutation disturbs somehow such interaction.

The spatial expression patterns of AG and TFL2 are patchy in the *icu2-1* mutant

To visualize the spatial expression pattern of AG in *icu2-1/icu2-1* leaves, a transgenic line carrying the *pAG-I::GUS* reporter construct (Sieburth and Meyerowitz, 1997) was crossed to *icu2-1/icu2-1* and En-2 plants. No GUS staining was observed in the leaves of the F₂ plants carrying the transgene in a wild-type background (Figure 9A), whereas patches of GUS-stained cells were frequent in the *pAG-I::GUS;icu2-1/icu2-1* leaves (Figure 9B-D). This patchy ectopic AG expression was displayed by mesophyll, epidermal and vascular cells of *icu2-1/icu2-1* leaves. The expression of *pAG-I::GUS* was also studied in a *tfl2-2/tfl2-2* mutant background, GUS staining only being found in vascular tissues (data not shown).

The spatial distribution of the TFL2 protein was studied in En-2 and *icu2-1/icu2-1* leaves by using the *gTFL2:GFP* transgene (Kotake *et al.*, 2003), which contains the whole coding sequence and the promoter of *TFL2*. All wild-type leaf cells displayed a nuclear GFP signal (Figure 9E), as reported previously (Gaudin *et al.*, 2001; Kotake *et al.*, 2003). A similar GFP subcellular localization was observed in many transgenic *icu2-1/icu2-1*

leaves (Figure 9F), which displayed in addition patches of cells in which the signal was both nuclear and cytoplasmic (Figure 9G) and extremely high (Figure 9H). Although the size and distribution of the patches showing ectopic AG expression were very similar to those showing perturbation of TFL2 subcellular distribution, we have no proof of their colocalization.



DISCUSSION

Mutant alleles of *ICU2*, a plant gene encoding a DNA polymerase α subunit

Five eukaryotic DNA polymerases have been classically described (α , β , δ , ϵ and γ ; Kornberg and Baker, 1991), to which at least another 10 have been added in the last years (Hubscher *et al.*, 2002). The β and ϵ polymerases have been associated with repair, and the α and δ with replication, all of them in the nucleus, whereas the γ polymerase is required for mitochondrial DNA replication. The *Arabidopsis thaliana* gene encoding DNA polymerase ϵ is the only plant DNA polymerase gene that has been studied at a mutational level so far, all its described mutant alleles causing gametic or embryonic lethality (Ronceret *et al.*, 2005; Jenik *et al.*, 2005).

We positionally cloned *ICU2* (At5g67100), a single copy gene encoding the catalytic subunit of DNA polymerase α , and identified and characterized three *icu2* mutant alleles. DNA polymerase α is an essential piece in the cell cycle, where it is required for the initiation of replication; in all eukaryotes it consists of a catalytic core, two primases and the so-called B-subunit (of 170, 50, 60 and 70-75 kDa, respectively; Uchiyama *et al.*, 2004). These proteins are encoded in *Arabidopsis thaliana* by the At5g67100, At5g41880, At1g67320 and At1g67630 genes, respectively, about which no mutational analysis has been published until now. Consistent with its important role in the initiation of DNA replication, transcription of the gene encoding the DNA polymerase α catalytic subunit is known to be cell-cycle regulated in *Drosophila melanogaster*, *Schizosaccharomyces pombe* and human cells (Wahl *et al.*, 1988; Hirose *et al.*, 1991; Bouvier *et al.*, 1992). In plants, its activity has been seen to peak before the S phase in rice and maize (Yokoi *et al.*, 1997; Gómez Roig and Vázquez-Ramos, 2003). As expected, the *ICU2* promoter included the consensus sequence characterizing cell-cycle-regulated genes, and its expression was higher in the tissues showing higher cell division rates, such as the shoot apex.

As expected from the essential role played by replication machinery elements, including DNA polymerase α , the strong *icu2-2* and *icu2-3* insertional alleles caused fully penetrant zygotic lethality when homozygous and incompletely penetrant gametophytic lethality, probably because of loss of DNA polymerase activity. The early lethality of these alleles is likely to be due to their inability to contribute to the initiation of replication in gametogenesis or early postfertilization. Although no phenotypic evidence of perturbation in DNA replication was observed in the *icu2-1* mutant, we cannot exclude that it also lacks some degree of polymerase α activity. The phenotypic effects of the *icu2-2* allele were the most severe, and the lethality of the *icu2-1/icu2-2* genotype versus the viability of *icu2-1/icu2-3* suggested that *icu2-2* might not only be an extreme loss-of-function allele but also antimorphic. Although our *icu2* alleles might shed light on plant DNA replication, further molecular research on their effects on the polymerase activity of ICU2 will be needed, which is beyond the scope of this work.

Genetic and physical interactions between ICU2 and TFL2

As many other DNA polymerases, the structure of the catalytic DNA polymerase α subunit has been compared with a right hand and divided into three canonical domains termed palm, fingers and thumb (Wang *et al.*, 1997; Rothwell and Waksman, 2005). In *Saccharomyces cerevisiae*, single mutations in the palm region affect replication fidelity and genomic stability (Limsirichaikul *et al.*, 2003; Niimi *et al.*, 2004), whereas those damaging the fingers reduce processivity or the replication rate (Ogawa *et al.*, 2003). In *Schizosaccharomyces pombe*, only a few weak alleles of *Swi-7*, the gene encoding DNA polymerase α , have been isolated and null alleles are recessive lethal (Singh and Klar, 1993). The *swi7-H4* allele carries a mutation in the conserved box VI and uncouples mitosis and DNA synthesis (Murakami and Okayama, 1995). The *swi7-1* allele causes a Gly to Glu change in the position 1116 of the thumb domain (12 residues upstream to the MIR domain) and perturbs mating-type switching. These results suggest a role for DNA

replication in the organization of cellular differentiation programs (Singh and Klar, 1993). The *icu2-1* mutation described here affects the thumb, changing the three-dimensional structure of the ICU2 protein, which probably affects accessibility to its MIR domain.

Both the presence of a MIR domain in ICU2 and the genetic interaction described here between the *icu2-1* and *tfl2-2* mutations pointed to the physical interaction of ICU2 and TFL2. In addition, a computer-based prediction of protein structure suggested that the *icu2-1* mutation collapses the ICU2 thumb, which in turn could reduce or abolish the access of TFL2 to the MIR domain. We confirmed these genetic evidences by demonstrating that TFL2 binds to wild-type ICU2, a protein-protein interaction that is impaired by the amino acid substitution caused by the *icu2-1* mutation.

We found in the *icu2-1* mutant an abnormal subcellular distribution of TFL2, which was restricted to the nucleus in most leaf cells, but appeared in both the nucleus and the cytoplasm in other cells, which were often clustered. This suggested that reduced or abolished interaction between ICU2 and TFL2 perturbs the nucleocytoplasmic distribution of TFL2. However, we cannot rule out the possibility of position effect variegation, due to the characteristics of the genomic region flanking the *gTFL2:GFP* transgene, as the cause of the patchy redistribution and increase of the TFL2:GFP protein.

A link between DNA replication and chromatin-mediated gene repression in the Plant Kingdom

Several lines of evidence indicate a link between the DNA replication machinery and cellular memory (McNairn and Gilbert, 2003; Vermaak *et al.*, 2003; Craig, 2004). On the one hand, mutations in the origin recognition complexes affect the repression state of different genes in yeast and perturb position effect variegation in *Drosophila melanogaster* (Pak *et al.*, 1997). On the other hand, some chromatin-associated proteins, such as HP1 or those of the CAF complexes, are known to physically interact with elements of the replication machinery, such as PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Zhang *et al.*, 2000; Ehrenhofer-Murray, 2004; Sarraf and Stancheva, 2004). In addition, the DNA

polymerase α Swi7 binds to the HP1-homolog Swi6 in *Schizosaccharomyces pombe*, and the *swi7-1* and *swi7-H4* mutants, which lack such interaction, display deregulation of the mating-type region and an abnormal chromosomal localization of Swi6. These latter observations indicate that some epigenetic marks are replicated simultaneously to DNA with the participation of the DNA replication complexes, at least in the fission yeast (Ahmed *et al.*, 2001; Nakayama *et al.*, 2001).

We hypothesize that the ICU2 DNA polymerase α plays a role in epigenetic inheritance in *Arabidopsis thaliana* by facilitating the interaction of TFL2 with histones, which results in propagation of epigenetic marks. In the *icu2-1* mutant, this re-heterochromatinization polymerase-mediated process would be impaired, making unstable the repression of many genes. Given that the *icu2-1* mutation does not strongly affect viability or fertility, the interaction between ICU2 and TFL2 is probably not essential in *Arabidopsis thaliana* or not completely abolished in the *icu2-1* mutant, since the MIR domain remains intact. In fact, in *Schizosaccharomyces pombe* mutants lacking Swi6-Swi7 interaction, DNA replication activity is almost normal and only the silencing of specific chromosomal regions is perturbed.

Chromatin-mediated gene repression is reduced by the *icu2-1* mutation but not completely abolished, as suggested by the morphological aberrations and gene deregulation levels of the *icu2-1* and *tfl2-2* mutants, which are weaker than those of the *icu2-1 tfl2-2* double mutant. The weak phenotype of the *tfl2-2* mutant may be due to redundancy with other genes of the chromodomain family. In the *icu2-1* mutant chromatin-mediated cellular memory might fail for some genes in some cells and their progeny as a consequence of impaired TFL2-ICU2 interaction, which in turn would reduce or abolish TFL2-histone interaction, making unstable the repression of TFL2-targeted genes. This clonal behaviour might explain the patchy pattern of epidermal cell size, AG ectopic expression and TFL2 intracellular distribution found in the leaves of the *icu2-1* mutant.

The dose level of HP1 is known to affect position effect variegation in *Drosophila melanogaster* (Ayyanathan *et al.*, 2003), which is consistent with a dynamic structure of

silent chromatin, as proposed in the site-exposure model (Ahmad and Henikoff, 2002). In the *icu2-1* mutant, silent chromatin might lack epigenetic marks after replication longer than in the wild type, allowing misexpression of some genes. It is worth mentioning that ectopic expression of *AG* does not show a patchy pattern in the *tfl2-2* and *clf-2* mutants, in which it is uniform, which correlates with their not patchy morphological phenotype, consisting of leaf epidermal cells of reduced size (Larsson *et al.*, 1998; Serrano-Cartagena *et al.*, 2000). The patchy phenotype caused by the *icu2-1* mutation might be a useful trait for analysing the mechanism by which the epigenetic marks are transmitted through mitosis after DNA replication.

Other genetic interactions of *ICU2*

We found the *emf2-5* mutation to be epistatic to *icu2-1*, *clf-2* and *tfl2-2*. In addition, the morphological and molecular phenotypes of the *icu2-1 tfl2-2*, *icu2-1 clf-2*, *tfl2-2 clf-2* double mutants are very similar to those of the *emf2-5* single mutant. Taken together, these results suggest that *EMF2* acts in the same pathway, or has a more general role than that of *ICU2*, *TFL2* and *CLF*. It is worth noting that the phenotypes of weak *emf2* alleles are reminiscent of those of strong *clf* alleles (Chanvivattana *et al.*, 2004), whereas those of the weak *clf-9* mutation and *icu2-1* are very similar. It seems that all these genes affect with different strengths the same biological process, which would be specifically related with the repression of *FT* and *AG*, among others.

The phenotype of the *clf-2* mutant is weaker than those of the *icu2-1 clf-2* and *tfl2 clf-2* double mutants, suggesting that other PcG proteins or complexes participate in the repression mechanism, as has recently been proposed based on the partial redundancy found between *CLF* and *SWINGER* (*SWN*; Chanvivattana *et al.*, 2004). The synergistic phenotype of the *icu2-1/icu2-1;fas1-/fas1-1* double mutants, together with the lethality of the *icu2-1/icu2-1;fas2-1/fas2-1* genotype, and the reduced frequency of the *icu2-1/icu2-1;FAS2/fas2-1* and *ICU2/icu2-1;fas2-1/fas2-1* plants clearly indicate a functional relationship between *ICU2* and the CAF-1 histone deposition complex. These

observations reinforce the notion of a functional relationship between chromatin remodelling machinery and the ICU2 DNA polymerase α .

Several genes derepressed by the *icu2-1* mutation are TFL2 targets

Quantitative RT-PCR analyses in the *icu2-1* mutant allowed us to identify the upregulation of several closely related MADS-box genes of the MIKC group (Parenicova *et al.*, 2003) mainly responsible for floral organ identity, including *SEP1*, *SEP2*, *SEP3*, *AG*, *AP1*, *AP3*, *PI*, *CAL* and *FUL*. In addition, the flowering promoter gene *FT* was found upregulated, while the flowering repressor gene *FLC* was downregulated. Derepression of these genes could be an indirect effect of the derepression of the direct targets of *ICU2*, as suggested by the demonstration of the regulation of *SEP3* and *FUL* by *FT* (Teper-Bamnolker and Samach, 2005).

Some of the genes that we found derepressed in the *icu2-1* mutant have been found upregulated in a microarray analysis performed on the *tf12-3* mutant (*AG*, *AP3*, *FLC*, *PI* and *SEP3*; Nakahigashi *et al.*, 2005), and some are targeted by the TFL2 protein and enriched in the H3K27me3 repressive mark in the wild type (*AG*, *AP3*, *FLC* and *LFY*; Turck *et al.*, 2007).

Another gene found derepressed in the *icu2-1* mutant, *WUS*, is known to be regulated by the *FAS1* and *FAS2* chromatin assembling factors, which are related with chromatin packaging and DNA replication (Kaya *et al.*, 2001). This suggests that *WUS*, an important meristematic gene, might also be regulated by chromatin-mediated gene silencing. Indeed, *WUS* is overexpressed as a consequence of loss-of-function of the *GCN5* gene, which encodes a histone acetyltransferase in *Arabidopsis thaliana* (Bertrand *et al.*, 2003). Unexpectedly, we did not find the phenotypic traits characteristic of *WUS* overexpression, perhaps because the overexpression of other genes suppressed its effects. Our results bring to mind those obtained by other authors on the repression of homeotic genes in *Drosophila melanogaster* and mammals, and that of mating-type genes in yeasts, and reinforce previous results indicating that floral transition, the major

developmental switch in plant life, is controlled mainly by chromatin-mediated gene silencing (reviewed in He and Amasino, 2005; Reyes 2006).



MATERIALS AND METHODS

Plant material and culture conditions

Unless otherwise stated, all the mutations used in this work were recessive and of loss-of-function. The *icu2-1* (N329) mutant (which we initially named *icu2* in Serrano-Cartagena *et al.*, 2000) and its corresponding wild type, Enkheim-2 (En-2; N1138), as well as the *ag-1* (NW25; in the *Ler* genetic background), *ttl2-2* (N3797; Col), *clf-2* (N290; *Ler*), *ft-1* (N56; *Ler*), *fas1-1* (N265; En-2) and *fas2-1* (N266; *Ler*) lines were provided by the NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre, UK). The *icu2-2* (in the Col genetic background), *icu2-3* (*Ler*) and *emf2-5* (*Ler*) mutants and the *pAG-I::GUS* (No-0) and *gTFL2::GFP* (Col) transgenic lines were provided by the GABI-Kat (<http://www.mpiz-koeln.mpg.de/GABI-Kat/>), Jonathan Clarke, Nobumasa Yoshida, Justin Goodrich and Koji Goto, respectively.

Plants were grown in sterile (in 150-mm diameter Petri plates containing 100 ml Murashige-Skoog agar medium including 1% sucrose) or non-sterile (in pots containing a 2:2:1 mixture of perlite, vermiculite, and sphagnum moss) conditions, at 20±1°C, 60-70% relative humidity and continuous illumination of 7000 lx, as described in Ponce *et al.* (1998). Sterile cultures were performed at a density of 100 regularly spaced seeds per plate in Conviron TC16 tissue culture chambers, and the plants were either collected to be studied or transferred to soil 21 days after sowing. When required, culture media were supplemented with 25 µg/ml kanamycin or 10 µg/ml sulfadiazine.

Sequencing

The synthetic oligonucleotides used for cycle sequencing (Table 2) were bought from Perkin-Elmer Applied Biosystems UK or from Sigma-Genosys UK. The sequences of the wild-type En-2 and mutant alleles of the *ICU2* gene were obtained from both strands of the products of PCR amplifications of overlapping segments of the At5g67100 gene, whose wild-type Col-0 sequence was already available. Sequencing reactions were carried out with ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kits in 5 µl reaction

volumes, and sequencing electrophoreses were performed on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer as described in Pérez-Pérez *et al.* (2004).

Complementation of the *icu2-1* mutation

A 9467-bp DNA molecule, encompassing the whole *ICU2* transcription unit, was PCR amplified in 50- μ l reaction mixes, by using the K21H1 TAC as a template and the primers shown in Table 2, whose 5' tails included *NotI* and *SalI* restriction sites. The Expand Long Template PCR System (Roche, 1681834) was used following the indications of the manufacturer and a polymerization time of 11 min. The PCR product obtained was digested with *NotI* and *SalI* and cloned into the pGreenII0179 vector (Hellens *et al.*, 2000). Competent *Escherichia coli* DH5 α cells were transformed and transformants were isolated on LB plates supplemented with 25 μ g/ml kanamycin, 5% (w/v) X-Gal, and 50 mg/ml isopropylthio- β -galactoside, and tested by PCR for the presence of the construct. Plasmid DNA was isolated from positive clones and used to transform competent *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 cells carrying the pSoup helper plasmid (Hellens *et al.*, 2000). *A. tumefaciens* transformants were selected on LB medium supplemented with 25 μ g/ml kanamycin and 5 μ g/ml tetracycline. Liquid cultures of the positives clones were used for *in planta* transformations of *Arabidopsis thaliana* wild-type and mutant plants (Bechtold and Pelletier, 1998). For the isolation of transformant plants, T₂ seeds were sown in agar plates supplemented with 40 μ g/ml hygromycin. The presence of the transgene in the putative transformants was verified by PCR.

GUS staining and GFP visualization

Homozygotes for either the *gTFL2:GFP* or *pAG-I:GUS* transgenes were crossed to mutant *icu2-1/icu2-1* and wild-type En-2 plants, and their F₁ allowed to selfpollinate. F₂ plants carrying the transgene were selected in 25 μ g/ml kanamycin-supplemented plates. For GUS analyses, 21-day-old plants carrying the *pAG-I:GUS* transgene in wild-type and *icu2-1/icu2-1* backgrounds were collected and treated with 90% acetone for 15 min on ice.

Samples were then washed with 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 3 mM $K_4Fe(CN)_6$, 3 mM $K_3Fe(CN)_6$ and 0.1% Triton X-100 for 2 min on ice, and then covered with 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide (X-Gluc) in the same buffer, and incubated overnight at 37°C. After staining, leaves were cleared in an ethanol series. For GFP visualization, vegetative leaves of the 4th and 5th node were excised from 21-day-old plants carrying the *gTFL2:GFP* construct, mounted in water on slides and directly observed by confocal laser scanning microscopy in a Leica TCS-NT microscope equipped with FITC/TRITC filters.

QRT-PCR

Quantitative RT-PCR amplifications and measurements were performed as described in Pérez-Pérez *et al.* (2004) in an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System. For each of the genes under study, a primer pair was designed (Table 2) to amplify a product of approximately 100 bp. To avoid amplification of genomic DNA, the 5' and 3' ends from each pair matched the sequences of two adjacent exons.

Plants were collected 21 days after sowing, frozen in liquid-N₂ and ground in RNase-free conditions. RNA was extracted with the Qiagen Rneasy Plant Mini Kit (74904), and finally resuspended in 88 μ l of RNase-free water and treated with DNaseI at 37°C for 30 min. RNA was then precipitated and resuspended in 40 μ l of RNase-free water. 3-5 μ g of the RNA solution obtained were reverse transcribed using SuperScript II Reverse Transcriptase (Gibco/BRL), following the manufacturer's instructions. One μ l of the resulting cDNA solution was used as template in a 25- μ l QRT-PCR reaction mix, which included 12.5 μ l of the SYBR-Green PCR Master Kit (Applied Biosystems, 4309155) and 0.4 μ M of primers. Relative quantification of gene expression was carried out using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ or comparative C_T method (Livak and Schmittgen, 2001). Reactions were made in triplicate and the expression levels were normalized using the C_T values obtained for the *ORNITHINE TRANSCARBAMILASE (OTC)* housekeeping gene

(Quesada *et al.*, 1999), which was used as an internal reference gene (Pérez-Pérez *et al.*, 2004; Cnops *et al.*, 2004).

Pull-down assays

TFL2 cDNA was amplified from 5-day-old seedling mRNA using the SuperscriptIII one step-RT-system (Invitrogen) using specific primers spanning from the ATG to the stop codons. The cDNA was cloned in the Gateway compatible vector D221 (Invitrogen). Afterwards, the cDNA was cloned into the pGEX-gateway adapted vector using the Gateway recombination protocol and introduced into the BL21 bacterial strain to express the recombinant GST or GST-TFL2 proteins under standard conditions. The recombinant proteins were bound to Glutathione sepharose beads (Amersham) and washed extensively with PBS-0.1% Tween20. The amount of protein bound to beads was quantified by resolving the proteins in a SDS-PAGE and staining the gel with SYPRO Ruby (Invitrogen).

The *ICU2* wild-type (En-2) and *icu2-1* mutant alleles were cloned as described for *TFL2*, the only exception being that only a segment of the full-length cDNA, from nucleotide position 2041 after the ATG to the stop codon was cloned. The wild-type and mutant fragments were named *ICU2-ct* and *icu2-1-ct*, respectively. Both of them contained the region encoding the putative TFL2-binding domain, as well as that including the *icu2-1* mutation (in the *icu2-1-ct* fragment), and were cloned into pDEST17 (Invitrogen) and used for *in vitro* translation with the Wheat Germ system (Promega) in the presence of ³⁵S-methionine following the instructions of the manufacturer.

For the pull-down assays, 1 µg of GST or GST-TFL2 bound to Glutathione sepharose beads (GE healthcare) was incubated with the ³⁵S-labelled protein in PBS-0.1% Tween20 at 4°C for 3 h. Afterwards, the beads were washed 4 times during 15 min with 1.5 ml of PBS-0.2% Tween20. Proteins were resolved on an SDS-PAGE/8% bis-acrylamide gel, and the ³⁵S-products were detected by autoradiography.

Bisulfite sequencing

Genomic DNA was extracted from 21-day-old plants and bisulfite treated using the EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, D5005) and the following reaction conditions: 10 min at 98°C, 10 min at 53°C, 8 cycles consisting of 6 min at 53°C and 30 min at 37°C, and a final step of 4°C. A 2- μ l aliquot of bisulfite treated DNA was used for each PCR amplification. Primer design (Table 2) and PCR conditions were similar to those previously described (Clark *et al.*, 1994). PCR products were cloned by using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen). 10-15 individual clones were sequenced for each experiment.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

ChIP was performed according to the protocol in the EpiQuik Plant ChIP Kit manual (Epigentek, P-2014) using 2-week-old En-2 and *icu2-1/icu2-1* seedlings and the following antibodies: Anti-dimethyl H3K9 (Upstate Biotechnology 07-212) and anti-trimethyl-H3K27 (07-449) (Lindroth *et al.*, 2004), Anti-acetyl-H3 (06-599), anti-acetyl-H3K9 (07-352) and anti-acetyl-H3K14 (07-353). We used the *ORNITHINE TRANSCARBAMILASE (OTC)* housekeeping gene for normalization (Quesada *et al.*, 1999). Semiquantitative PCR values were obtained as described in Schubert *et al.* (2006).

Acknowledgements

Thanks are due to the NASC for providing seeds, to C. Gutiérrez, H. Candela, J.M. Pérez-Pérez, V. Quesada and P. Robles for comments on the manuscript, to J.M. Serrano and V. García for technical assistance, and to A. Martínez-Laborda for his help in the low-resolution mapping of *ICU2* in the MBK5-K8K14 interval. This work was supported by fellowships (to J.M.B. and R.G.B.) and grants (BMC2002-02840 and BMC2005-01031 to J.L.M., BMC2003-09763 to M.R.P. and BIO2004-01749 to J.C.P.) from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain.

FIGURES

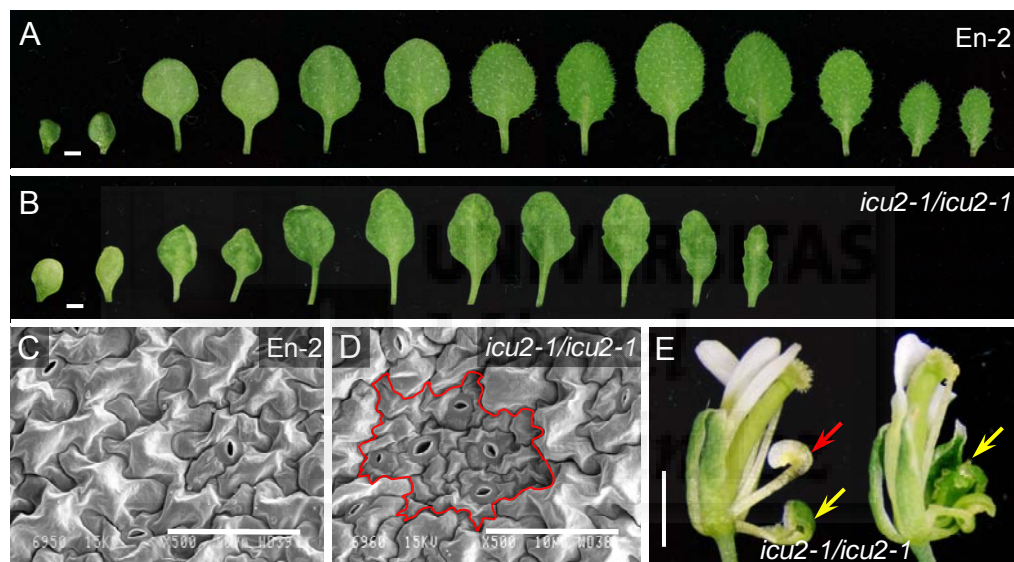
Barrero *et al.*, Figure 1

Figure 1.- Leaf and flower phenotypic traits of the *icu2-1* mutant. The pictures correspond to (A, B) excised cotyledons (left) and leaves, (C, D) scanning electron micrographs of the central region of the adaxial surface of third node leaf laminae (obtained as described in Serrano-Cartagena *et al.*, 2000), and (E) flowers, from (A, C) the En-2 wild type, and (B, D, E) *icu2-1/icu2-1* plants. A patch of epidermal cells with reduced size is highlighted in D. Arrows in E indicate partial homeotic transformations of sepals into carpels (yellow) and petals into stamens (red). Scale bars represent 1 mm (A, B, E) or 100 μ m (C, D).

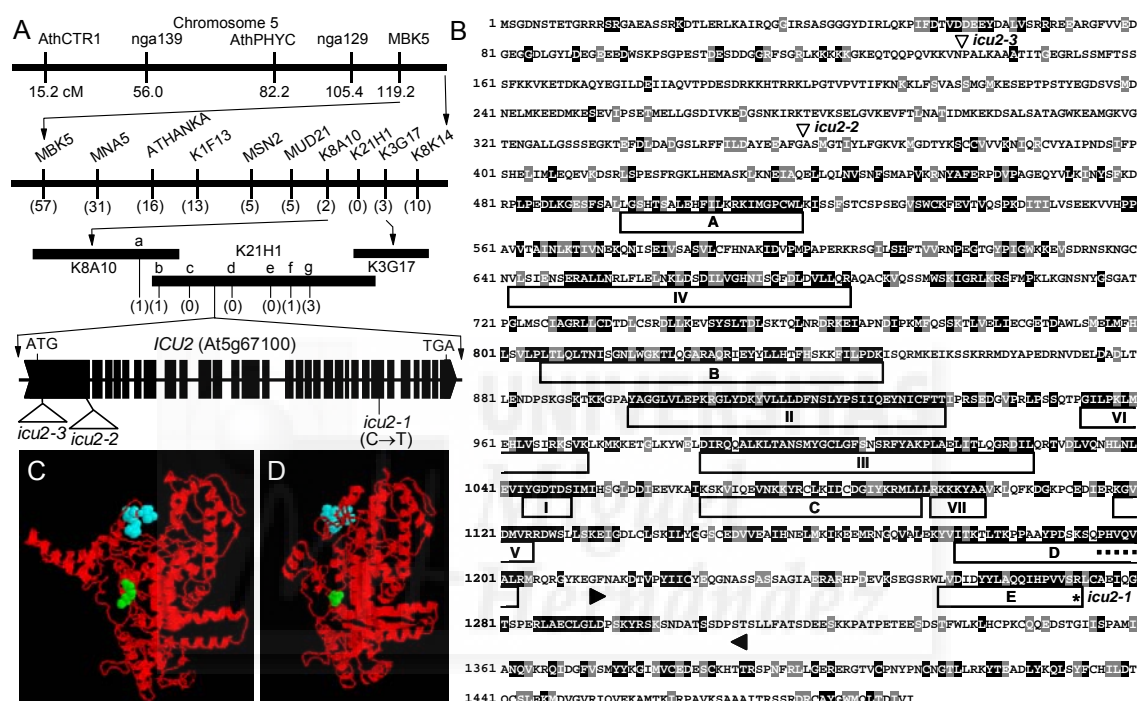
Barrero *et al.*, Figure 2

Figure 2.- Positional cloning and structural analysis of the *ICU2* gene. (A) Map-based strategy followed for the cloning of the *icu2-1* mutation. A mapping population of 1000 F_2 plants, derived from *icu2-1/icu2-1* x *Ler* and *icu2-1/icu2-1* x *Col-0* crosses (the *icu2-1* mutation was in an *En-2* genetic background) was used to delimit *ICU2* to a region of 90 kb, which encompassed three overlapping transformation-competent artificial chromosome (TAC; Liu *et al.*, 1999) clones. Several of the candidate genes were amplified and sequenced, allowing us to develop and use for further analyses seven

previously unidentified SNP markers (SNPk8a10a to g; see Table 2), which were polymorphic between En-2 and either *Ler* or Col-0. This reduced the candidate region to 50 kb, all whose putative transcription units (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>) were PCR amplified and sequenced. Only the At5g67100 gene, which encodes the catalytic subunit of DNA polymerase α , was found to carry a point mutation in the *icu2-1* mutant. The number of informative recombinants identified is indicated in parentheses. In the representation of the structure of the *ICU2* gene, exons are indicated by boxes, introns by lines between boxes, and T-DNA (*icu2-2*) and *Ds* (*icu2-3*) insertions by triangles. (B) Predicted amino acid sequence of the catalytic subunit of DNA polymerase α in *Arabidopsis thaliana*. The domains named as I-VII in Wang *et al.* (1989) and A-E in Miyazawa *et al.* (1993) are boxed. The region assumed to interact with primase is bordered by arrowheads (Biswas *et al.*, 2003). The putative HP1-binding pentamer (MIR domain) is indicated by a dotted line, the position of the *icu2-1* mutation by an asterisk, and the *icu2-2* (T-DNA) and *icu2-3* (*Ds*) insertions by triangles. Residues shaded in black and grey indicate, respectively, the identities and similarities found after the alignment of the sequence of the *Arabidopsis thaliana* DNA polymerase α catalytic subunit (GI 15240200) with those of *Homo sapiens* (8393995), *Mus musculus* (6679409), *Drosophila melanogaster* (217344), *Caenorhabditis elegans* (32565317), *Oryza sativa* (6015010), *Schizosaccharomyces pombe* (6018683) and *Neurospora crassa* (32416196). The sequences were aligned using the CLUSTAL-X 1.5b program (Thompson *et al.*, 1997) and shaded with BOX SHADE 3.21 (Hoffman and Baron, http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). The gaps generated by the alignment have been removed. (C, D) Models for the three-dimensional structure of the protein products of the En-2 wild-type (C) and *icu2-1* (D) alleles of the *ICU2* gene. The residue affected by the mutation is coloured in green, and the HP1-binding domain is highlighted in blue. The three-dimensional models were obtained by using the 3D-JIGSAW (Bates *et al.*, 2001; <http://www.bmm.icnet.uk/~3djigsaw/>) and RasMol 2.7 (Sayle and Milner-White, 1995; <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>) programs.

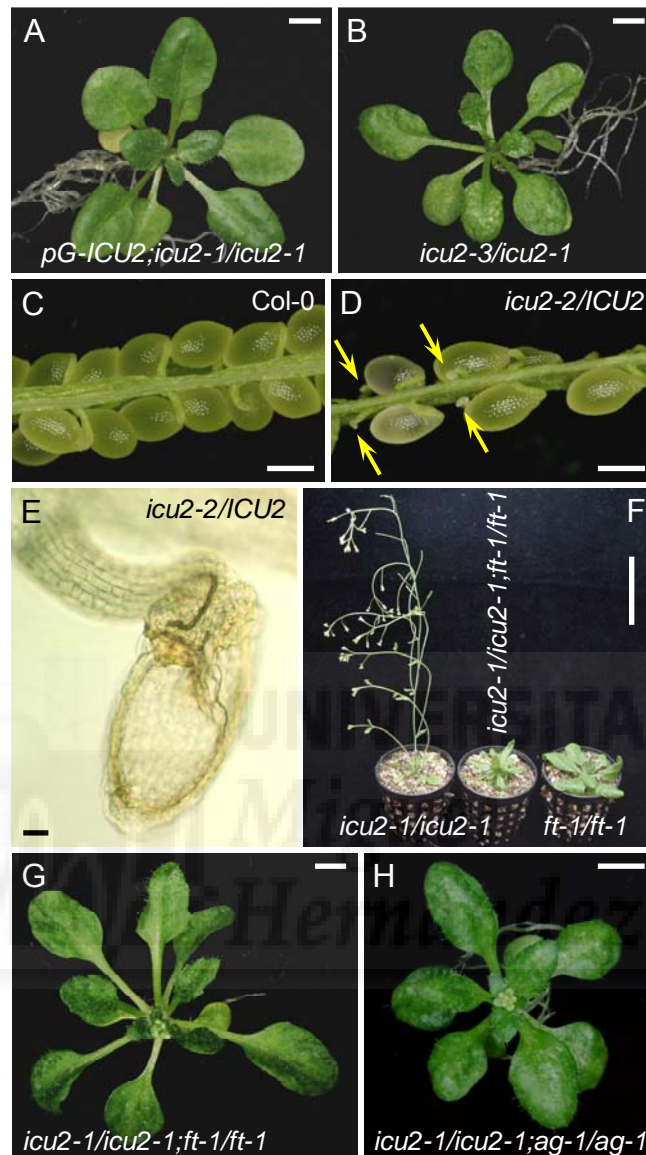
Barrero *et al.*, Figure 3

Figure 3.- Other phenotypic traits of *icu2* alleles and suppression of some of them by *ag* and *ft* mutations. (A, B) Rosettes from (A) a phenotypically wild-type transgenic line carrying the *pG-ICU2* wild-type transgene in an *icu2-1/icu2-1* background, demonstrating the phenotypic rescue of *icu2-1* by the wild-type allele of At5g67100, and (B) an *icu2-3/icu2-1* heterozygote, which is indistinguishable to the *icu2-1/icu2-1* homozygotes. (C-E) Dissected siliques from selfed (C) Col-0 and (D) heterozygous *icu2-2/ICU2* (in a Col-0 genetic background) plants. Arrows in D indicate abnormal seeds that are likely to be aborted or unfertilized ovules. One of the latter is magnified in E as seen with Nomarski optics, and did not display any embryonic structure, which were clearly visible in the

morphologically normal seeds. (F-H) Suppression of some of the phenotypic traits of the *icu2-1* mutation by loss-of-function mutations in *FT* and *AG*. (F, G) Early flowering is suppressed in *icu2-1/icu2-1;ft-1/ft-1*, and (H) leaf incurvature in *icu2-1/icu2-1;ag-1/ag-1* double mutant plants. Photographs were taken 21 (A, B, G, H), 40 (C-E) and 35 (F) days after sowing. Scale bars represent 2 mm (A, B, G, H), 1 mm (C, D), 0.1 mm (E) or 5 cm (F).



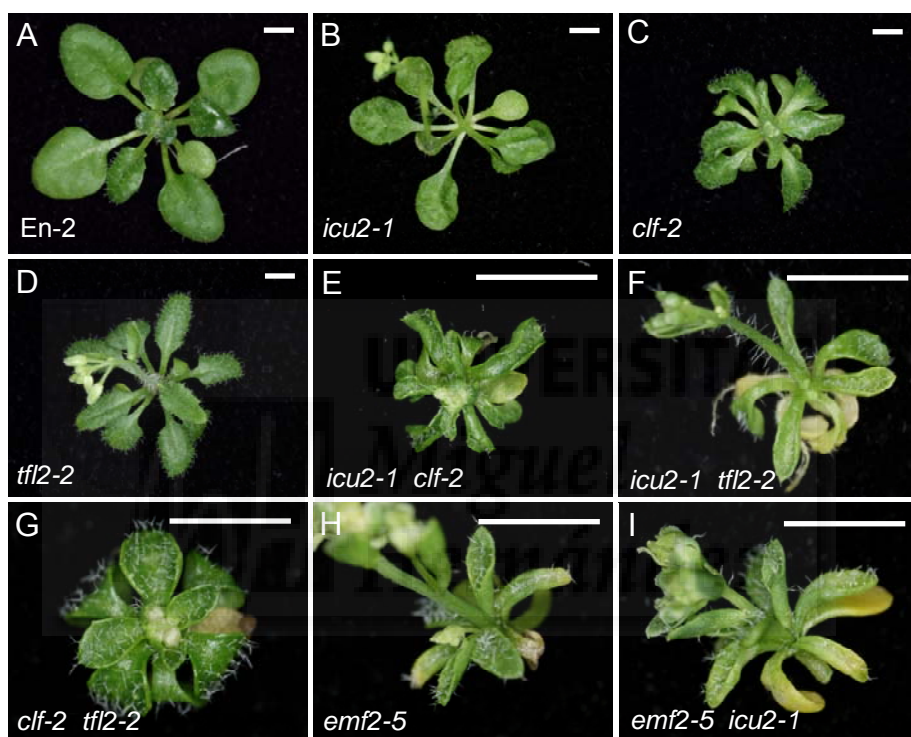
Barrero *et al.*, Figure 4

Figure 4.- Genetic interactions between mutations affecting *ICU2* and genes involved in chromatin-mediated cellular memory. Rosettes are shown for (A) the wild-type *En-2* and (B-D, H) single and (E-G, I) double mutants. All plants shown were homozygous for the indicated mutations. Pictures were taken 21 days after sowing. Scale bars indicate 2 mm.

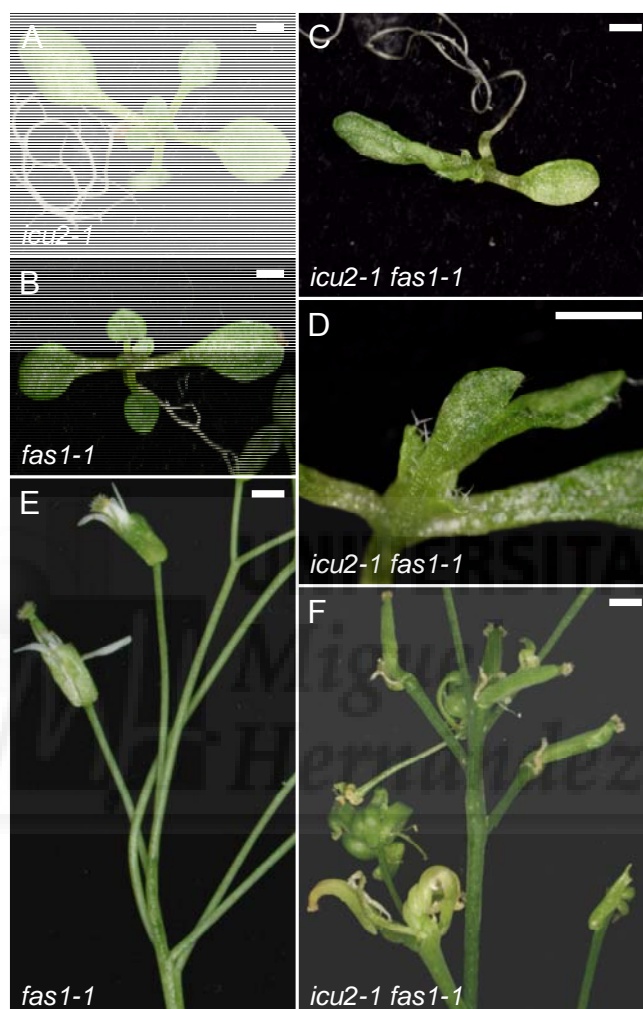
Barrero *et al.*, Figure 5

Figure 5.- Genetic interactions between mutations affecting *ICU2* and *FAS1*. Plants are shown for (A, B, E) single and (C, D, F) double mutants. A magnification of the lateral view of C is highlighted in D. All plants shown were homozygous for the indicated mutations and all the mutants are in an En-2 background. Pictures were taken 10 days (A-D) and 2 months (E, F) after sowing. Scale bars indicate 1 mm.

Barrero et al., Figure 6

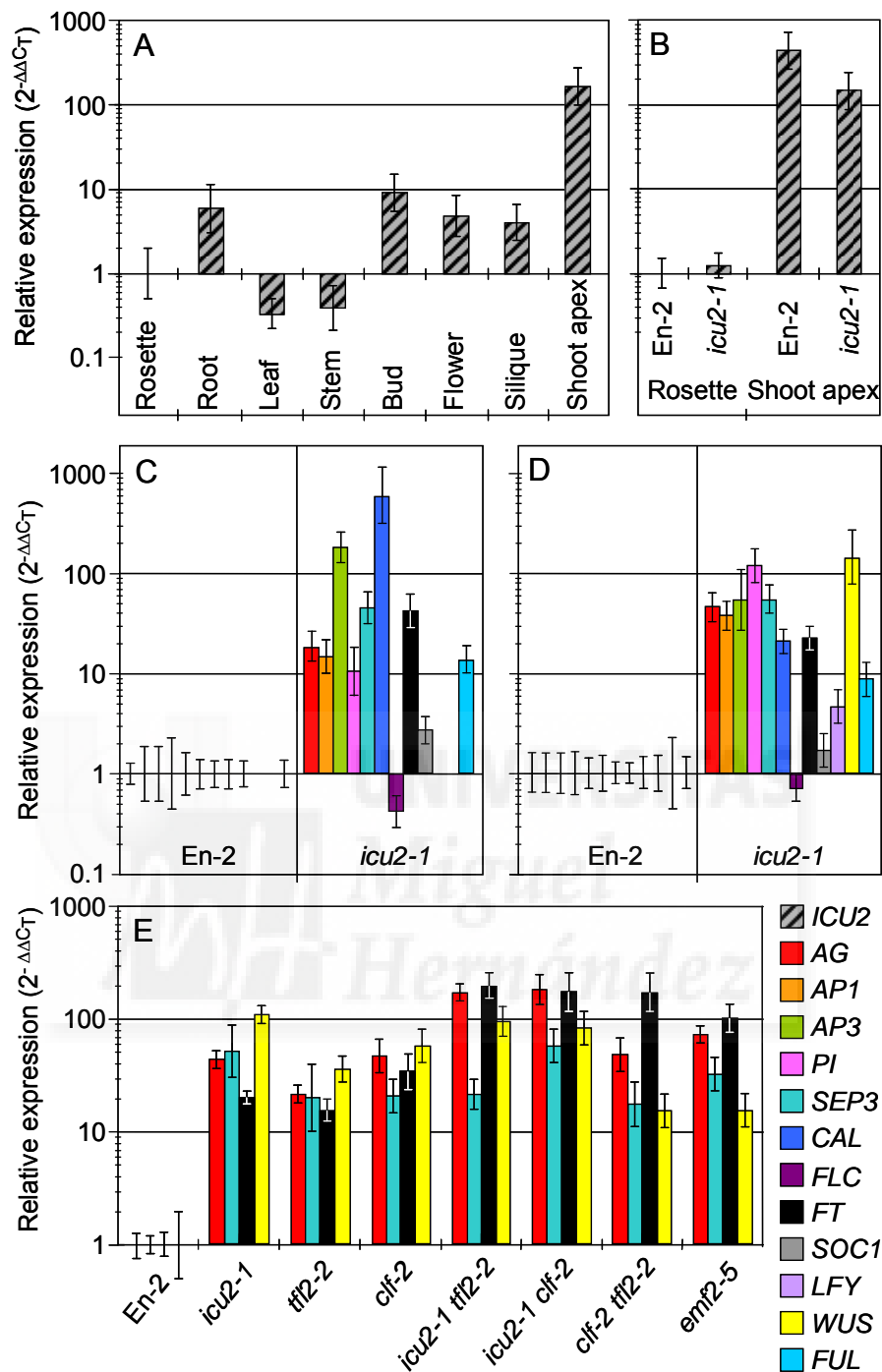


Figure 6.- QRT-PCR analyses. Quantitations are shown for the transcript levels of (A, B) *ICU2* in (A) assorted tissues of the wild-type *En-2*, and (B) rosettes and shoot apices of *En-2* and the *icu2-1* mutant, as well as (C-E) for those of the indicated genes in (C) leaves or (D, E) whole rosettes of (C, D) the *icu2-1* mutant and (E) some other single and double mutants. All plants were homozygous for the mutations indicated. Plant material was collected 21 days after sowing, the roots being removed before the extraction of rosette RNA. All data were referred (using the 2^{-ΔΔC_T} method) to those obtained for the *En-2* wild type, to which a value of 1 were given.

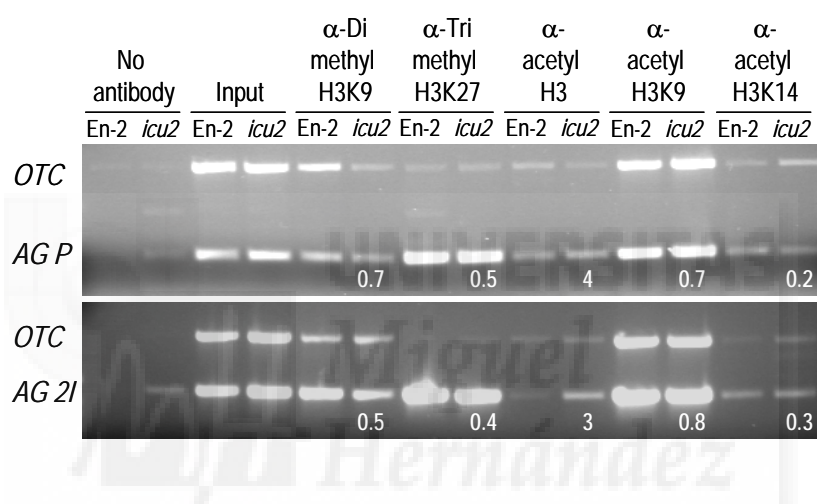
Barrero *et al.*, Figure 7

Figure 7.- Chromatin immunoprecipitation assay. The histone methylation and acetylation patterns of the promoter (*AG P*) and second intron (*AG 2I*) of *AG* in the En-2 wild type and the *icu2-1* mutant (lanes headed as *icu2*) were tested. Semiquantitative ChIP duplex PCR was used to amplify the *OTC* gene and regions of the *AG* gene. Numbers below gel lanes indicate the ratio of the intensity of *AG* products, compared to that of *OTC* products after normalization with input products intensity (Schubert *et al.*, 2006).

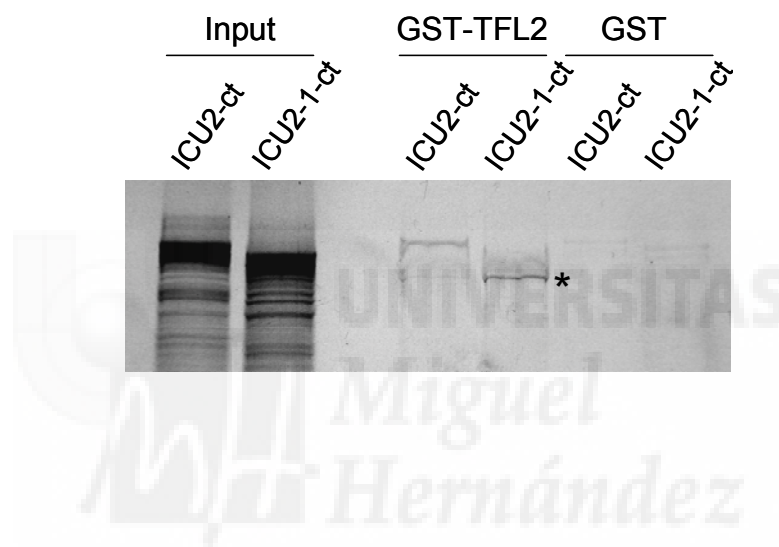
Barrero *et al.*, Figure 8

Figure 8.- GST pull-down assay demonstrating direct interaction between the TFL2 and ICU2 proteins. The carboxylic half of the wild-type ICU2 protein (ICU2-ct) and that of its mutated version (ICU2-1-ct) were translated *in vitro* in the presence of ^{35}S -Met. GST-TFL2, but not GST, was able to interact with the full-length ICU2-ct as well as with a truncated ICU2-1-ct protein (indicated by an asterisk), which does not include the amino acid changed by the *icu2-1* mutation. GST-TFL2 did not interact with the full-length ICU2-1-ct. The input lane shows the signal from 10% of the amount of *in vitro* translated ICU2-ct and ICU2-1-ct proteins present in each of the remaining samples.

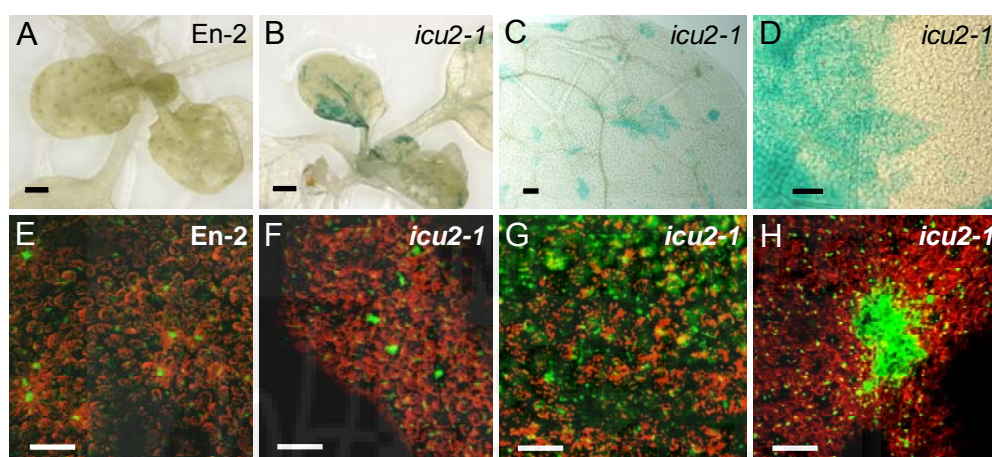
Barrero *et al.*, Figure 9

Figure 9.- AG and TFL2 spatial expression patterns in the *icu2-1* mutant. (A-D) GUS staining of leaves of transgenic plants carrying the *pAG-l::GUS* construct in (A) En-2 and (B-D) *icu2-1/icu2-1* backgrounds. (E-H) Confocal micrographs of leaves from transgenic plants carrying the *gTFL2:GFP* construct in (E) En-2 and (F-H) *icu2-1/icu2-1* backgrounds. All plants shown were homozygous for the indicated mutations. Pictures were taken 21 days after sowing. Scale bars represent 1 mm (A, B) or 100 μ m (C-H).

TABLES

Table 1.- Transmission of *icu2* alleles

Crosses (female x male)	Seed phenotype as shown			Phenotypes of plants grown on									
	in opened siliques			antibiotic-supplemented medium						non-supplemented medium			
	Aborted or unfertilized ovules	Aborted seeds	Mature seeds	Ungerminated seeds	Sul ^R Wt	Sul ^R Icu2	Sul ^S	Kan ^R Wt	Kan ^R Icu2	Kan ^S	Ungerminated seeds	Wt	Icu2
<i>ICU2/ICU2</i> x <i>ICU2/ICU2</i>	2	0	726								0	175	
<i>icu2-1/icu2-1</i> x <i>icu2-1/icu2-1</i>	102	0	327								0		175
<i>ICU2/icu2-2</i> x <i>ICU2/icu2-2</i>	413	0	424	0	84	467							
<i>ICU2/ICU2</i> x <i>ICU2/icu2-2</i>	63	0	118	9	6	38							
<i>ICU2/icu2-2</i> x <i>ICU2/ICU2</i>	99	0	90	22	11	126							
<i>ICU2/icu2-3</i> x <i>ICU2/icu2-3</i>	160	45	389	0			275			273			
<i>ICU2/ICU2</i> x <i>ICU2/icu2-3</i>	40	9	62	7			27			30			
<i>ICU2/icu2-3</i> x <i>ICU2/ICU2</i>	17	4	100	8			92			104			
<i>icu2-1/icu2-1</i> x <i>ICU2/icu2-2</i>	41	2	15	8	0	0	2				9	22	0
<i>ICU2/icu2-2</i> x <i>icu2-1/icu2-1</i>	106	0	65	26	0	0	84				14	71	0
<i>icu2-1/icu2-1</i> x <i>ICU2/icu2-3</i>	24	11	36	10				0	9	12	0	10	10
<i>ICU2/icu2-3</i> x <i>icu2-1/icu2-1</i>	54	18	175	1				0	44	50	3	68	53
<i>icu2-1/icu2-3</i> x <i>icu2-1/icu2-3</i>	99	100	172	7				0	87	46	2	0	36
<i>ICU2/icu2-2</i> x <i>ICU2/icu2-3</i>	28	1	5	2	3	9	4			12			

Sul^R: Sulfadiazine resistant. Sul^S: Sulfadiazine sensitive. Kan^R: Kanamycine resistant. Kan^S: Kanamycine sensitive. Wt: Wild-type morphology. Icu2: Mutant morphology, indistinguishable from that of *icu2-1/icu2-1* plants.

Table 2.- Primer sets used in this work

Purpose	Template	Oligonucleotide sequences (5'→3')		PCR product size (bp) and polymorphisms ¹
		Forward primer	Reverse primer	
Linkage analysis	<i>SNPk8a10-a</i>	TTTTGCTCTTCTCGTCGGTGAA	TCAGTAAAACCTACCTTAGACC	961; A324 (Col-0), G (En-2, <i>Ler</i>)
	<i>SNPk21h1-b</i>	AGAAATACTATGCTGCATTGTCC	TTCTTCTCCATAAATTCACCAAAC	714; G145 (Col-0, En-2), C (<i>Ler</i>)
	<i>SNPk21h1-c</i>	ACTTCAGTGC GAAGCACCCC	AGA ACTTTATCAGACA ACTCTCC	253 (Col-0, En-2), 246 (<i>Ler</i>)
	<i>SNPk21h1-d</i>	TTGAATGGAAGAGTTAAATGGTG	ATGATTACGTAAAATCACGGAATG	686; G460 (Col-0), C (En-2), A (<i>Ler</i>)
	<i>SNPk21h1-e</i>	CAGCGTCTTTCCCATTACACTT	ATACTCCCATCTACATCCTACAT	1739; G205 (Col-0, En-2), C (<i>Ler</i>); C812 (Col-0, En-2), G (<i>Ler</i>)
	<i>SNPk21h1-f</i>	TTAACTCCCTGAGCTTCTTCC	GCGCTAATGATTCGTAGAAGC	406; T165 (Col-0, En-2), A (<i>Ler</i>)
	<i>SNPk21h1-g</i>	TCTACGATTATCATCCTAATGGC	TCTCCTTTCTCTAAATTAACCCC	1331; A627 (Col-0, <i>Ler</i>), C (En-2)
Genomic DNA amplification and cycle sequencing	<i>ICU2</i>	TTGCAGTTTAAGGATGGGAAGC	TGATTTACCTCATCAGGATGC	871
	<i>ICU2</i>	ATAGAGAACAATGATTTTGGATATG	TA ACTGGAACAGTACCTGGTAG	1053
	<i>ICU2</i>	AGGTTACTCCAGATGAGTCGG	ACTCGCCTTTAAGATCTTCTGG	1275
	<i>ICU2</i>	AAATCGTCTGTTTTCTTACATCTC	TGTGAAGGATCACAACACAGC	1106
	<i>ICU2</i>	AAATCAAAGAACGGCTGCAATG	AGTAAGCTGGAGAGTGAGAGG	1236
	<i>ICU2</i>	TCTTTTCTTT CAGATTGAATGTGG	TTAGACGATTATGTCAGAATTAGG	990
	<i>ICU2</i>	AGTATTGATTGGTGA CTGCTGC	ATTTTCTGCAAGAAAGGGTATGC	1089
	<i>ICU2</i>	TCTGTGCAGGTAATGCTAGC	GTGCTTGCATGACTCGTCTTC	1024
	<i>FAS1</i>	ACTATGGTAGCTGTGAAGAGTG	TGAGCTGTTCTTCTGCATCATG	567
	<i>FAS2</i>	TATTTCTGGCTCAGTGGACAAC	GATCCATCAGGTGACCATGAC	502
Confirmation of insertions	<i>ICU2</i> and <i>Ds</i>	ATAGAGAACAATGATTTTGGATATG	ACCCGACCGGATCGTATCGGT ²	854
	<i>Ds</i> and <i>ICU2</i>	GAAACGGT CGGGAACTAGCTCTAC ³	ACTCGCCTTTAAGATCTTCTGG	1405
	T-DNA	CCACACGTGGATCGATCCGTCG ⁴	GAACCCTAATTCCTTATCTGGG ⁵	1181
	<i>ICU2</i> and T-DNA	ATAGAGAACAATGATTTTGGATATG	ATATTGACCATCATACTCATTGC ⁶	1590

Rescue	<i>ICU2</i>	ATAGCGGCCGCGTCTGAGCAAGTTTTTTTCTCTG ⁷	ATAGTCGACGCAGAAACTCATTCCCAATTCC ⁸	9467
	pGreenII0179	TCTTCGCTATTACGCCAGCTG	GCGGATAACAATTTACACACAGG	332
ORT-PCR	<i>AG</i>	CCGATCCAAGAAGAATGAGCTCTT	CATTTTCAGCTATCTTTGCACGAA	110
	<i>AP1</i>	CGACGTCAATACAACTGGTCGAT	CTTAGGGCTCATTGCTTGCA	116
	<i>AP3</i>	CCCTAACACCACAACGAAGGAGAT	GTTTCCTCTGGTTTCTTGCAATC	103
	<i>CAL</i>	CTCACGTTAATGCACAGACGAA	AGATCCTTGAGGCTCATTGGTT	126
	<i>FLC</i>	TTGAACTTGTGGATAGCAAGCTT	CGGTCTTCTGGCTCTAGTCA	121
	<i>FT</i>	GAACAACCTTTGGCAATGAGATT	CACCCTGGTGCATACACTGTT	120
	<i>FUL</i>	CGACTCTTGCATGGAGAGGAT	CTTGAGCTTAGCATGTTCTAGAA	120
	<i>ICU2</i>	TGTTGAAGGAGGTCAGTTATTCT	CACAAGTGTGGGATGACTGAA	118
	<i>LFY</i>	CCCACCAAGGTGACGAACCA	ACAGTGAACGTAGTGTCGCATT	93
	<i>OTC</i>	TGAAGGGACAAAGTTGTGTATGTT	CGCAGACAAAGTGGAAATGGA	94
	<i>PI</i>	TTCAAATGCCTGAGCTCCAGTT	GCTAAGCATGAGAACCTTAGCA	83
	<i>SEP3</i>	TTAGCAGTTGAACTTAGTAGCCA	CCAAGATCTTCTCCCAACAGAT	100
	<i>SOC1</i>	GCCAGCTCCAATATGCAAGATA	CTTCATATTTCAAATGCTGCATATT	108
	<i>WUS</i>	TGGATCTATGGAACAAGACTGTT	GGCTTTGCTCTATCGAAGAAGT	113
Bisulfite	<i>AG</i> promoter	AAGAAGAAGATTGATATTTGTTGTAAT	CTTATTA AAAACACCCCAAATTA AA	281
sequencing ⁹	<i>AG</i> 2 nd intron	AGATTTAGTTTTGTAGAATTAAGATTT	TCAAATATATAATATAATATAATTCATAAA	378
ChIP	<i>AG</i> promoter	GAAGAAGATCGATATTTGTTGTAAC	ATTAAGGACACCCCAAATTGAG	276
	<i>AG</i> 3' 2 nd intron	TTCTTCTTCTCGTGCTCTGTTT	ATCTAAATCTTCAAGTACTTGTTAG	606
	<i>AG</i> 3' 2 nd intron	ATTCAGTTTTGTAGA ACTAAGATTC	AATATATGATATGATATAATTCATGAG	373
	<i>AG</i> 3' 2 nd intron	TTACTTTCTTTCTTATCTCTAGC	TACTAGTTTGAGTAATGTAGTTCCG	485
	<i>AG</i> 5' 2 nd intron	CTCTCTCATTATGGGTA CTGAG	TCAAATCGACCACTTGCACAGT	742
	<i>AG</i> 5' 2 nd intron	TGGAACGTTGTGATGTTACTCG	TCAAATCGACCACTTGCACAGT	478

¹Polymorphisms are indicated by numbers that correspond to positions within the PCR amplification product, starting from the 5' end of the forward primer. ²⁻⁶The sequences of Ds3-1² and Ds5-1³ were obtained from the *Arabidopsis* Transposon Insertion Service, and those of Sulf-9525⁴, Sulf-10706⁵ and Lb-8409⁶ from http://www.gabi-kat.de/General_Information/GABI-Kat-pAC161T-DNAmapPr.html. ^{7, 8}The 5' tails of these oligonucleotides include restriction sites for *NotI*⁷ and *SalI*⁸. ⁹We also used M13 forward and reverse standard primers.



REFERENCES

- Ahmad, K., and Henikoff, S.** (2002). Epigenetic consequences of nucleosome dynamics. *Cell* **111**, 281-284.
- Ahmed, S., Saini, S., Arora, S., and Singh, J.** (2001). Chromodomain protein Swi6-mediated role of DNA polymerase alpha in establishment of silencing in fission Yeast. *J. Biol. Chem.* **276**, 47814-47821.
- Ayyanathan, K., Lechner, M.S., Bell, P., Maul, G.G., Schultz, D.C., Yamada, Y., Tanaka, K., Torigoe, K., and Rauscher, F.J. III** (2003). Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev.* **17**, 1855-1869.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T.** (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**, 120-124.
- Bastow, R., Mylne, J.S., Lister, C., Lippman, Z., Martienssen, R.A., and Dean, C.** (2004). Vernalization requires epigenetic silencing of *FLC* by histone methylation. *Nature* **427**, 164-167.
- Bates, P.A., Kelley, L.A., MacCallum, R.M., and Sternberg, M.J.E.** (2001). Enhancement of Protein Modelling by Human Intervention in Applying the Automatic Programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins Suppl.* **5**, 39-46.
- Bechtold, N., and Pelletier, G.** (1998). In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol. Biol.* **82**, 259-266.
- Bertrand, C., Bergounioux, C., Domenichini, S., Delarue, M., and Zhou, D.X.** (2003). *Arabidopsis* histone acetyltransferase AtGCN5 regulates the floral meristem activity through the *WUSCHEL/AGAMOUS* pathway. *J. Biol. Chem.* **278**, 28246-28251.
- Biswas, S.B., Khopde, S.M., Zhu, F.X., and Biswas, E.E.** (2003). Subunit interactions in the assembly of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase alpha. *Nucleic Acids Res.*

31, 2056-2065.

- Bouvier, D., Pignede, G., Damagnez, V., Tillit, J., de Recondo, A.M., and Baldacci, G.** (1992). DNA polymerase alpha in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: identification and tracing of the catalytic subunit during the cell cycle. *Exp. Cell. Res.* **198**, 183-190.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R., and Meyerowitz, E.M.** (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **1**, 37-52.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R., and Meyerowitz, E.M.** (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* **112**, 1-20.
- Bowman, J.L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E.M., and Smyth, D.R.** (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development* **119**, 721-743.
- Chaboute, M.E., Clement, B., Sekine, M., Philipps, G., and Chaubet-Gigot, N.** (2000). Cell cycle regulation of the tobacco ribonucleotide reductase small subunit gene is mediated by E2F-like elements. *Plant Cell* **12**, 1987-2000.
- Chanvivattana, Y., Bishopp, A., Schubert, D., Stock, C., Moon, Y.H., Sung, Z.R., and Goodrich, J.** (2004). Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development* **131**, 5263-5276.
- Chen, X., and Meyerowitz, E.M.** (1999). *HUA1* and *HUA2* are two members of the floral homeotic *AGAMOUS* pathway. *Mol. Cell* **3**, 349-360.
- Chen, L., Cheng, J. C., Castle, L., and Sung, Z. R.** (1997). *EMF* genes regulate *Arabidopsis* inflorescence development. *Plant Cell* **9**, 2011-2024.
- Clark, S., Harrison, J., Paul, C.L., and Frommer, M.R.** (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucl. Acids Res.* **22**, 2990-2997.
- Cnops, G., Jover-Gil, S., Peters, J.L., Neyt, P., De Block, S., Robles, P., Ponce, M.R., Gerats, T., Micol, J.L., and Van Lijsebettens, M.** (2004). The *rotunda2* mutants identify a role for the *LEUNIG* gene in vegetative leaf morphogenesis. *J. Exp. Bot.* **55**, 1529-1539.

- Craig, J.M.** (2004). Heterochromatin-many flavours, common themes. *Bioessays* **27**, 17-28.
- Cunliffe, V.T.** (2003). Memory by modification: the influence of chromatin structure on gene expression during vertebrate development. *Gene* **305**, 141-150.
- Ehrenhofer-Murray, A.E.** (2004). Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2335-2349.
- Elgin, S.C., and Grewal, S.I.** (2003). Heterochromatin: silence is golden. *Curr. Biol.* **13**, R895-R898.
- Farrona, S., Hurtado, L., Bowman, J.L., and Reyes, J.C.** (2004). The *Arabidopsis thaliana* SNF2 homolog AtBRM controls shoot development and flowering. *Development* **131**, 4965-4975.
- Francis, N.J., and Kingston, R.E.** (2001). Mechanisms of transcriptional memory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 409-421.
- Fransz, P.F., and de Jong, J.H.** (2002). Chromatin dynamics in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 560-567.
- Fry, C.J., and Farnham, P.J.** (1999). Context-dependent transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* **274**, 29583-29586.
- Gaudin, V., Libault, M., Pouteau, S., Juul, T., Zhao, G., Lefebvre, D., and Grandjean, O.** (2001). Mutations in *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1* affect flowering time and plant architecture in *Arabidopsis*. *Development* **128**, 4847-4858.
- Gendall, A.R., Levy, Y.Y., Wilson, A., and Dean, C.** (2001). The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell* **107**, 525-535.
- Gil, J., Bernard, D., and Peters, G.** (2005). Role of polycomb group proteins in stem cell self-renewal and cancer. *DNA Cell Biol.* **24**, 117-125.
- Gomez Roig, E., and Vazquez-Ramos, J.M.** (2003). Maize DNA polymerase alpha is phosphorylated by a PCNA-associated cyclin/Cdk complex: effect of benzyladenine. *J. Plant Physiol.* **160**, 983-990.

- Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E.M., and Coupland, G.** (1997). A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* **386**, 44-51.
- Grewal, S.I., and Elgin, S.C.** (2002). Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 178-187.
- Grewal, S.I., and Moazed, D.** (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* **301**, 798-802.
- Gu, Q., Ferrandiz, C., Yanofsky, M.F., and Martienssen, R.** (1998). The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* **125**, 1509-1517.
- He, Y., and Amasino, R.M.** (2005). Role of chromatin modification in flowering-time control. *Trends Plant Sci.* **10**, 30-35.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M.** (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **42**, 819-832.
- Henikoff, S.** (2005). Histone modifications: Combinatorial complexity or cumulative simplicity? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 5308–5309.
- Hirose, F., Yamaguchi, M., Nishida, Y., Masutani, M., Miyazawa, H., Hanaoka, F., and Matsukage, A.** (1991). Structure and expression during development of *Drosophila melanogaster* gene for DNA polymerase alpha. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4991-4998.
- Hoek, M., and Stillman, B.** (2003). Chromatin assembly factor 1 is essential and couples chromatin assembly to DNA replication *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12183-12188.
- Hubscher, U., Maga, G., and Spadari, S.** (2002). Eukaryotic DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 133-163.
- Irish, V.F., and Yamamoto, Y.T.** (1995). Conservation of floral homeotic gene function between *Arabidopsis* and *Antirrhinum*. *Plant Cell* **7**, 1635-1644.
- Jack, T., Brockman, L.L., and Meyerowitz, E.M.** (1992). The homeotic gene *APETALA3*

of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* **68**, 683-697.

Jenik, P.D., Jurkuta, R.E., and Barton, M.K. (2005). Interactions between the Cell Cycle and Embryonic Patterning in *Arabidopsis* Uncovered by a Mutation in DNA Polymerase epsilon. *Plant Cell* **17**, 3362-3377.

Kaya, H., Shibahara, K.I., Taoka, K.I., Iwabuchi, M., Stillman, B., and Araki, T. (2001). *FASCIATA* genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell* **104**, 131-142.

Kempin, S.A., Savidge, B., and Yanofsky, M.F. (1995). Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. *Science* **267**, 522-525.

Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., and Araki, T. (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* **286**, 1960-1962.

Kornberg, A. and Baker, T. (1991). DNA replication. 2nd edition. Freeman and Company. New York. 197-210.

Kotake, T., Takada, S., Nakahigashi, K., Ohto, M., and Goto, K. (2003). *Arabidopsis* *TERMINAL FLOWER 2* gene encodes a heterochromatin protein 1 homolog and represses both *FLOWERING LOCUS T* to regulate flowering time and several floral homeotic genes. *Plant Cell Physiol.* **44**, 555-564.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**, 116-120.

Larsson, A.S., Landberg, K., and Meeks-Wagner, D.R. (1998). The *TERMINAL FLOWER2* (*TFL2*) gene controls the reproductive transition and meristem identity in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**, 597-605.

Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J., and Jurgens, G. (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 87-96.

Lee, H., Suh, S., Park, E., Cho, E., Ahn, J.H., Kim, S., Lee, J.S., Kwon, Y.M., and Lee, I. (2000). The *AGAMOUS-LIKE 20* MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **14**, 2366-2376.

- Leyser, H.M., and Furner, I.J.** (1992). Characterization of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **116**, 397-403.
- Li, Y., Rosso, M.G., Strizhov, N., Viehoveer, P., and Weisshaar, B.** (2003). GABI-Kat SimpleSearch: a flanking sequence tag (FST) database for the identification of T-DNA insertion mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* **19**, 1441-1442.
- Limsirichaikul, S., Ogawa, M., Niimi, A., Iwai, S., Murate, T., Yoshida, S., and Suzuki, M.** (2003). The Gly-952 residue of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase alpha is important in discriminating correct deoxyribonucleotides from incorrect ones. *J. Biol. Chem.* **278**, 19079-19086.
- Lindroth, A.M., Shultis, D., Jasencakova, Z., Fuchs, J., Johnson, L., Schubert, D., Patnaik, D., Pradhan, S., Goodrich, J., Schubert, I., Jenuwein, T., Khorasanizadeh, S., and Jacobsen, S.E.** (2004). Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with CHROMOMETHYLASE3. *EMBO J.* **23**, 4286-4296.
- Lippman, Z., and Martienssen, R.** (2004). The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* **431**, 364-370.
- Livak, K. J., and Schmittgen T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* **25**, 402-408.
- Liu, Y.G., Shirano, Y., Fukaki, H., Yanai, Y., Tasaka, M., Tabata, S., and Shibata, D.** (1999). Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6535-6540.
- Mandel, M.A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B., and Yanofsky, M.F.** (1992). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* **360**, 273-277.
- Mathieu, O., and Bender, J.** (2004). RNA-directed DNA methylation. *J. Cell Sci.* **117**, 4881-4888.
- McNairn, A.J., and Gilbert, D.M.** (2003). Epigenomic replication: linking epigenetics to DNA replication. *Bioessays* **25**, 647-656.

- Michaels, S.D., and Amasino R.M.** (1999). *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* **11**, 949-956.
- Miyazawa, H., Izumi, M., Tada, S., Takada, R., Masutani, M., Ui, M., and Hanaoka, F.** (1993). Molecular cloning of the cDNAs for the four subunits of mouse DNA polymerase alpha-primase complex and their gene expression during cell proliferation and the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **268**, 8111-8122.
- Moon, Y.H., Chen, L., Pan, R.L., Chang, H.S., Zhu, T., Maffeo, D.M., and Sung, Z.R.** (2003). *EMF* genes maintain vegetative development by repressing the flower program in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 681-693.
- Murakami, H., and Okayama, H.** (1995). A kinase from fission yeast responsible for blocking mitosis in S phase. *Nature* **374**, 817-819.
- Murzina, N., Verreault, A., Laue, E., and Stillman, B.** (1999). Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol. Cell* **4**, 529-540.
- Nakahigashi, K., Jasencakova, Z., Schubert, I., and Goto, K.** (2005). The *Arabidopsis* HETEROCHROMATIN PROTEIN1 Homolog (TERMINAL FLOWER2) Silences Genes Within the Euchromatic Region but not Genes Positioned in Heterochromatin. *Plant Cell Physiol.* **46**, 1747-1756.
- Nakayama, J., Klar, A.J., and Grewal, S.I.** (2000). A chromodomain protein, Swi6, performs imprinting functions in fission yeast during mitosis and meiosis. *Cell* **101**, 307-317.
- Nakayama, J., Allshire, R.C., Klar, A.J., and Grewal, S.I.** (2001). A role for DNA polymerase α in epigenetic control of transcriptional silencing in fission yeast. *EMBO J.* **20**, 2857-2866.
- Niimi, A., Limsirichaikul, S., Yoshida, S., Iwai, S., Masutani, C., Hanaoka, F., Kool, E.T., Nishiyama, Y., and Suzuki, M.** (2004). Palm mutants in DNA polymerases alpha and eta alter DNA replication fidelity and translesion activity. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2734-2746.

- Otte, A.P., and Kwaks, T.H.** (2003). Gene repression by Polycomb group protein complexes: a distinct complex for every occasion? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 448-454.
- Ogawa, M., Limsirichaikul, S., Niimi, A., Iwai, S., Yoshida, S., and Suzuki, M.** (2003). Distinct function of conserved amino acids in the fingers of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase alpha. *J. Biol. Chem.* **278**, 19071-19078.
- Pak, D.T., Pflumm, M., Chesnokov, I., Huang, D.W., Kellum, R., Marr, J., Romanowski, P., and Botchan, M.R.** (1997). Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell* **91**, 311-323.
- Parenicova, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D.S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H.E., Ingram, R.M., Kater, M.M., Davies, B., Angenent, G.C., and Colombo, L.** (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *Plant Cell* **15**, 1538-1551.
- Paro, R., Strutt, H., and Cavalli, G.** (1998). Heritable chromatin states induced by the Polycomb and trithorax group genes. *Novartis Found. Symp.* **214**, 51-61.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E., and Yanofsky, M.F.** (2000). B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* **405**, 200-203.
- Pérez-Pérez, J.M., Ponce, M.R., and Micol J.L.** (2004). The *ULTRACURVATA2* gene of *Arabidopsis* encodes an FK506-binding protein involved in auxin and brassinosteroid signaling. *Plant Physiol.* **134**, 101-117.
- Peterson, C.L., and Laniel, M.A.** (2004). Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* **14**, R546-R551.
- Piñeiro, M., Gomez-Mena, C., Schaffer, R., Martinez-Zapater, J.M., and Coupland, G.** (2003). EARLY BOLTING IN SHORT DAYS is related to chromatin remodeling factors and regulates flowering in *Arabidopsis* by repressing *FT*. *Plant Cell* **15**, 1552-1562.
- Ponce, M.R., Quesada, V., and Micol, J.L.** (1998). Rapid discrimination of sequences flanking and within T-DNA insertions in the *Arabidopsis* genome. *Plant J.* **14**, 497-501.
- Quesada, V., Ponce, M.R., and Micol, J.L.** (1999). *OTC* and *AUL1*, two convergent and

- overlapping genes in the nuclear genome of *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. **461**, 101-106.
- Quivy, J.P., Roche, D., Kirschner, D., Tagami, H., Nakatani, Y., and Almouzni, G.** (2004). A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication. EMBO J. **23**, 3516-3526.
- Reyes, J.C.** (2006). Chromatin modifiers that control plant development. Curr. Opin. Plant Biol. **9**, 21-27.
- Reyes, J.C., and Grossniklaus, U.** (2003). Diverse functions of Polycomb group proteins during plant development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **14**, 77-84.
- Ronceret, A., Guillemot, J., Lincker, F., Gadea-Vacas, J., Delorme, V., Bechtold, N., Pelletier, G., Delseny, M., Chaboute, M.E., and Devic, M.** (2005). Genetic analysis of two *Arabidopsis* DNA polymerase epsilon subunits during early embryogenesis. Plant J. **44**, 23-36.
- Rothwell, P.J., and Waksman, G.** (2005). Structure and mechanism of DNA polymerases. Adv. Protein Chem. **71**, 401-440.
- Rountree, M.R., Bachman, K.E., Herman, J.G., and Baylin, S.B.** (2001). DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. Oncogene **20**, 3156-3165.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., and Weisshaar, B.** (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. Plant Mol. Biol. **53**, 247-259.
- Sarraf, S.A., and Stancheva, I.** (2004). Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. Mol. Cell **15**, 595-605.
- Sayle, R.A., and Milner-White, E.J.** (1995). RASMOL: biomolecular graphics for all. Trends Biochem. Sci. **20**, 374.
- Schönrock, N., Exner, V., Probst, A., Gruissem, W., and Hennig, L.** (2006). Functional genomic analysis of CAF-1 mutants in *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. **281**, 9560-9568.

- Schubert, D., Clarenz, O., and Goodrich, J.** (2005). Epigenetic control of plant development by Polycomb-group proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 553-561.
- Schubert, D., Primavesi, L., Bishopp, A., Roberts, G., Doonan, J., Jenuwein, T., and Goodrich, J.** (2006). Silencing by plant Polycomb-group genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27. *EMBO J.* **25**, 4638-4649.
- Serrano-Cartagena, J., Robles, P., Ponce, M.R., and Micol, J.L.** (1999). Genetic analysis of leaf form mutants from the *Arabidopsis* Information Service collection. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 725-739.
- Serrano-Cartagena, J., Candela, H., Robles, P., Ponce, M.R., Pérez-Pérez, J.M., Piqueras, P., and Micol, J.L.** (2000). Genetic analysis of *incurvata* mutants reveals three independent genetic operations at work in *Arabidopsis* leaf morphogenesis. *Genetics* **156**, 1363-1377.
- Sieburth, L.E., and Meyerowitz, E.M.** (1997). Molecular dissection of the *AGAMOUS* control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell* **9**, 355-365.
- Singh, J., and Klar, A.J.** (1993). DNA polymerase-alpha is essential for mating-type switching in fission yeast. *Nature* **361**, 271-273.
- Smothers, J.F., and Henikoff, S.** (2000). The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Curr. Biol.* **10**, 27-30.
- Soppe, W.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I., and Fransz, P.F.** (2002). DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **21**, 6549-6559.
- Teper-Bamnolker, P., and Samach, A.** (2005). The flowering integrator FT regulates *SEPALLATA3* and *FRUITFULL* accumulation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* **17**, 2661-2675.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G.** (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence

alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882.

- Turck, F., Roudier, F., Farrona, S., Martin-Magniette, M.L., Guillaume, E., Buisine, N., Gagnot, S., Martienssen, R.A., Coupland, G., and Colot, V.** (2007). Arabidopsis TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 Lysine 27. *PLoS Genetics* **3**, e86.
- Uchiyama, M., and Wang, T.S.** (2004). The B-subunit of DNA polymerase alpha-primase associates with the origin recognition complex for initiation of DNA replication. *Mol. Cell Biol.* **24**, 7419-7434.
- Vermaak, D., Ahmad, K., and Henikoff, S.** (2003). Maintenance of chromatin states: an open-and-shut case. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 266-274.
- Wagner, D., and Meyerowitz, E.M.** (2002). SPLAYED, a novel SWI/SNF ATPase homolog, controls reproductive development in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **12**, 85-94.
- Wahl, A.F., Geis, A.M., Spain, B.H., Wong, S.W., Korn, D., and Wang, T.S.** (1988). Gene expression of human DNA polymerase alpha during cell proliferation and the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 5016-5025.
- Wang, T.S., Wong, S.W., and Korn, D.** (1989). Human DNA polymerase alpha: predicted functional domains and relationships with viral DNA polymerases. *FASEB J.* **3**, 14-21.
- Wang, J., Sattar, A.K., Wang, C.C., Karam, J.D., Konigsberg, W.H., and Steitz, T.A.** (1997). Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69. *Cell* **89**, 1087-1099.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F., and Meyerowitz, E.M.** (1992). *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* **69**, 843-859.
- Wong, S.W., Wahl, A.F., Yuan, P.M., Arai, N., Pearson, B.E., Arai, K., Korn, D., Hunkapiller, M.W., and Wang, T.S.** (1998). Human DNA polymerase alpha gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases. *EMBO J.* **7**, 37-47.
- Yang, C.H., Chen, L.J., and Sung, Z.R.** (1995). Genetic regulation of shoot development in *Arabidopsis*: role of the *EMF* genes. *Plant Cell* **7**, 421-435.

- Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A., and Meyerowitz, E.M.** (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* **346**, 35-39.
- Yoshida, N., Yanai, Y., Chen, L., Kato, Y., Hiratsuka, J., Miwa, T., Sung, Z.R., and Takahashi, S.** (2001). EMBRYONIC FLOWER2, a novel polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 2471-2481.
- Yokoi, M., Ito, M., Izumi, M., Miyazawa, H., Nakai, H., and Hanaoka, F.** (1997). Molecular cloning of the cDNA for the catalytic subunit of plant DNA polymerase alpha and its cell-cycle dependent expression. *Genes Cells* **2**, 695-709.
- Zhang, Z., Shibahara, K., and Stillman, B.** (2000). PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast. *Nature* **408**, 221-225.
- Zilberman, D., Cao, X., and Jacobsen, S.E.** (2003). *ARGONAUTE4* control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* **299**, 716-719.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiol.* **136**, 2621-2632.



**ANEXO II:
COMUNICACIONES A CONGRESOS**

**Caracterización parcial del cromosoma del cloroplasto
de la palmera datilera, *Phoenix dactylifera***

R. González-Bayón, M.M. Alonso-Peral,
M.R. Ponce, y J.L. Micol

División de Genética e Instituto de Bioingeniería. Universidad Miguel Hernández. Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

La palmera datilera (*Phoenix dactylifera* L.), cultivada fundamentalmente por su fruto comestible, aunque también por su valor ornamental, es una planta monocotiledónea dioica de gran importancia agronómica y socioeconómica para numerosos países. A pesar de todo esto se desconoce totalmente su genética, por lo que es de suma importancia el desarrollo de herramientas que permitan su estudio. Con este fin, hemos desarrollado un método de purificación de ADN total y un método de purificación de ADN cloroplástico a partir de hojas de esta especie. A partir de este último, hemos obtenido la secuencia parcial del cromosoma del cloroplasto mediante una estrategia de clonación en el vector plasmídico pGEM-3Zf(+).

El objetivo final es el desarrollo de un procedimiento rápido y sencillo de genotipado de individuos de palmera datilera. Dicho método estará basado en la identificación de microsatélites polimórficos y/o polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) una vez obtenida la secuencia completa del cromosoma del cloroplasto.

Cuarto Congreso de la Sociedad Española de Genética
El Escorial-Complutense, 2003
Póster

Análisis genético y molecular de los genes *VENOSA* de *Arabidopsis thaliana*

M.R. Ponce¹, R. González-Bayón¹, V. Quesada¹, A. Vera², y J.L. Micol¹

¹División de Genética e Instituto de Bioingeniería. Universidad Miguel Hernández. Campus de Elche. 03202 Elche, Alicante. España. mrponce@umh.es

²División de Genética, Universidad Miguel Hernández, Campus de San Juan, 03550 Alicante, España.

En una búsqueda de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología de la hoja, hemos aislado quince estirpes cuyo fenotipo hemos denominado Venosa (Ven). Presentan una nerviación foliar muy manifiesta, como consecuencia de alguna perturbación en la distribución espacial de los pigmentos fotosintéticos, cuyo resultado es que las células circundantes a los conductos vasculares, fundamentalmente la vena primaria y las secundarias, están coloreadas de verde mucho más intensamente que los tejidos intervenales. Su análisis genético indica que pertenecen a seis grupos de complementación. Hemos determinado las posiciones de mapa de estos seis genes mediante análisis del ligamiento a microsatélites polimórficos, concluyendo que *VEN1* radica en el cromosoma 5 (a $7,96 \pm 4,49$ cM del marcador AthCTR1), *VEN2* en el 2 (a $0,00 \pm 0,18$ cM de nga168), *VEN3* en el 1 (a $3,34 \pm 3,29$ cM de AthZFPG), *VEN4* en el 5 (a $2,78 \pm 2,75$ cM de AthPHYC), *VEN5* en el 2 (a $0,00 \pm 0,18$ cM de nga361) y *VEN6* en el 3 (a $0,00 \pm 0,16$ cM de AthGAPab). Estamos intentando determinar su naturaleza molecular mediante un abordaje posicional.

Cuarto Congreso de la Sociedad Española de Genética

El Escorial-Complutense, 2003

Póster

Las mutaciones en el gen *RETICULATA* de *Arabidopsis thaliana* alteran drásticamente la arquitectura interna de la hoja, pero no su forma

R. González-Bayón¹, E.A. Kinsman⁴, V. Quesada¹, A. Vera², K.A. Pyke³,
M.R. Ponce¹, y J.L. Micol¹

¹División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, España.

²División de Genética, Universidad Miguel Hernández, Campus de San Juan, 03550 Alicante, España.

³Plant Science Division, School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington campus, Loughborough, Leicestershire LE12 5RD, Reino Unido.

⁴School of Life Sciences, University of Surrey Roehampton, Roehampton, London, Reino Unido.

Se han descrito en *Arabidopsis thaliana* numerosos mutantes cuya característica común es una venación foliar muy manifiesta, ya que su red vascular es intensamente verde y destaca sobre un limbo pálido. Uno de estos mutantes fue denominado *reticulata-1* (*re-1*) por Redei en 1964 y ha sido utilizado durante décadas como marcador genético clásico para el análisis de ligamiento. Hemos aislado cinco alelos recesivos del gen *RE*, que han sido caracterizados a la vez que *re-1*, demostrando que su fenotipo foliar reticulado se debe a una reducción considerable en la densidad de las células del mesófilo intervenal. Las hojas de las plantas *re* presentan una ligera disminución en tamaño pero una forma casi normal, a pesar de que les faltan numerosas células del mesófilo, que son sustituidas por espacios aéreos intercelulares, lo que sugiere que el correcto desarrollo de los tejidos internos incide en la determinación del grosor de la hoja, pero muy poco en la forma de ésta, que parece depender en mayor medida de la epidermis. Nuestros resultados indican que las mutaciones hipomorfas en el gen *RE* perturban específicamente la división de las células del mesófilo en estadios tempranos de la organogénesis foliar. Hemos clonado posicionalmente el gen *RE* y caracterizado molecularmente sus alelos, varios de los cuales son a todas luces nulos. *RE* es *LCD1*, recientemente identificado por la sensibilidad al ozono y a *Pseudomonas syringae* causada por *lcd1-1*, su único alelo conocido hasta ahora, y codifica una proteína de función desconocida y expresión ubicua.

VII Reunión de Biología Molecular de Plantas

Benalmádena, 2004

Póster

Mutations in the *RETICULATA* gene strongly modify internal architecture but not organ shape in vegetative leaves

V. Quesada¹, E.A. Kinsman³, R. González-Bayón¹,
M.R. Ponce¹, K.A. Pyke², and J.L. Micol¹

¹División de Genética and Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Spain.

²Plant Science Division, School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington campus, Loughborough, Leicestershire LE12 5RD, UK.

³School of Life Sciences, University of Surrey Roehampton, Roehampton, London SW15 3SN, UK.

A number of mutants have been described in *Arabidopsis thaliana* whose leaf vascular network can be clearly distinguished as a green reticulation on a paler lamina. One of these reticulate mutants was named *reticulata* (*re*) by Redei in 1964 and has been used for years as a classical genetic marker for linkage analysis. We identified five novel recessive alleles of the *RE* gene, which we have characterised together with the original *re-1* recessive mutation. The *re* alleles studied here are null or hypomorphic mutations causing a marked reduction in the density of mesophyll cells in interveinal leaf regions, which does not result from perturbed plastid development in specific cells but rather from a dramatic change in internal leaf architecture. Our results suggest that loss-of-function mutations in the *RE* gene specifically perturb mesophyll cell division in the early stages of leaf organogenesis. The morphology of vascular and mesophyll cells is apparently normal in *re* plants, but the density of the vascular network of their leaves is reduced, suggesting that a reduction in the proliferation of mesophyll cells during leaf development affects recruitment to vascular cell fate. It is interesting that the leaves of *re* mutants are of almost normal shape in spite of their extremely reduced mesophyll cell density, which suggests that the epidermis plays a major role in regulating leaf shape in *Arabidopsis thaliana*, whereas the correct development of the mesophyll tissue is more important in the control of leaf thickness. The *RE* gene was positionally cloned and found to be identical to the recently cloned *LCD1* gene, which was identified based on the increased sensitivity to ozone and virulent *Pseudomonas syringae* caused by its mutant allele *lcd1-1*. The *RE* (*LCD1*) gene is ubiquitously expressed and encodes a protein of unknown function.

15th International Conference on Arabidopsis Research

Berlín, 2004

Póster

**Las mutaciones en el gen *RETICULATA* de *Arabidopsis thaliana*
alteran drásticamente la arquitectura interna de la hoja, pero no su forma**

R. González-Bayón¹, E.A. Kinsman³, V. Quesada¹, P. Robles¹,
M.R. Ponce¹, K.A. Pyke², y J.L. Micol¹

¹División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante. (rgonzalez@umh.es)

²Plant Science Division, School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington campus, Loughborough, Leicestershire LE12 5RD, Reino Unido.

³School of Life Sciences, University of Surrey Roehampton, Roehampton, London, Reino Unido.

Se han descrito en *Arabidopsis thaliana* numerosos mutantes cuya característica común es una venación foliar muy manifiesta, ya que su red vascular es intensamente verde y destaca sobre un limbo pálido. Uno de estos mutantes fue denominado *reticulata-1* (*re-1*) por Redei en 1964 y ha sido utilizado durante décadas como marcador genético clásico para el análisis de ligamiento. Hemos aislado seis alelos recesivos del gen *RE*, que han sido caracterizados a la vez que *re-1*, demostrando que su fenotipo foliar reticulado se debe a una reducción considerable en la densidad de las células del mesófilo intervenal. Las hojas de las plantas *re* presentan una ligera disminución en tamaño pero una forma casi normal, lo que sugiere que el correcto desarrollo de los tejidos internos incide en la determinación del grosor de la hoja, pero muy poco en la forma de ésta, que parece depender en mayor medida de la epidermis. Hemos clonado posicionalmente el gen *RE*, que ha resultado ser *LCD1*, identificado por la sensibilidad al ozono y a *Pseudomonas syringae* causada por su alelo mutante *lcd1-1*. Nuestros resultados indican que las mutaciones hipomorfas en este gen perturban específicamente la división de las células del mesófilo en estadios tempranos de la organogénesis foliar. El gen *RE* pertenece a una familia génica, de la que también es miembro At5g22790, al que hemos denominado *RE2*. Ambos codifican proteínas de función desconocida y expresión ubicua. Hemos obtenido dobles mutantes de *re* y *re2*, entre sí y con otras estirpes de fenotipos similares, como *dov1*, *cue1* y *ven1*.

Quinto Congreso de la Sociedad Española de Genética

Roquetas de Mar, 2005

Póster

***RE* y *RE2* son funcionalmente redundantes
y necesarios para la organogénesis foliar
y el desarrollo reproductivo en *Arabidopsis thaliana***

R. González-Bayón , V. Quesada, P. Robles, L. Campello,
M.R. Ponce, y J.L. Micol

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

Se han descrito en *Arabidopsis thaliana* muchos mutantes con una venación foliar muy manifiesta, ya que su red vascular es intensamente verde y destaca sobre un limbo pálido. Uno de estos mutantes fue denominado *reticulata-1* (*re-1*) por Redei en 1964 y ha sido utilizado durante décadas como marcador genético clásico para el análisis de ligamiento. Hemos aislado seis alelos recesivos del gen *RE*, que han sido caracterizados a la vez que *re-1*, demostrando que su fenotipo foliar reticulado se debe a una reducción considerable en la densidad de las células del mesófilo intervenal. Hemos clonado posicionalmente el gen *RE*, que ha resultado ser *LCD1*, que había sido identificado por la sensibilidad al ozono causada por su alelo mutante *lcd1-1*. Nuestros resultados indican que las mutaciones hipomorfas y nulas en este gen perturban específicamente la división de las células del mesófilo en estadios tempranos de la organogénesis foliar. El parólogo más cercano a *RE* es At5g22790, al que hemos denominado *RE2*. Sus productos proteicos presentan un 71% de semejanza. El análisis de los individuos F₂ procedentes del cruzamiento *re-6/re-6* × *re2-1/re2-1* sugiere que *RE* y *RE2* son necesarios para la organogénesis foliar y el desarrollo reproductivo y embrionario. Los patrones de expresión espacial de estos genes, junto con el análisis global de la expresión génica mediante micromatrices.

VIII Reunión de Biología Molecular de Plantas

Pamplona, 2006

Póster

Caracterización de los genes *VEN4* y *VEN5* de *Arabidopsis thaliana*

R. González-Bayón, F.M. Lozano,
M.R. Ponce, y J.L. Micol

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

En una búsqueda de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología foliar, hemos aislado quince estirpes cuyo fenotipo hemos denominado Venosa (Ven). Presentan una nerviación foliar muy manifiesta, como consecuencia de alguna perturbación en la distribución espacial de los pigmentos fotosintéticos, cuyo resultado es que las células que circundan a la vena primaria y las secundarias son verdes mientras que los tejidos intervenales son amarillentos. El análisis genético de las mutaciones *ven* indica que corresponden a seis genes (*VEN1-VEN6*), cuyas posiciones de mapa hemos determinado mediante análisis del ligamiento a microsatélites polimórficos. Hemos clonado posicionalmente dos de ellos, comprobando que *VEN4* codifica una fosfohidrolasa y *VEN5* una proteína de la envuelta del cloroplasto, ambas de función desconocida. Estamos estudiando las interacciones entre las mutaciones *ven4*, *ven5* y otras que causan fenotipos relacionados.

VIII Reunión de Biología Molecular de Plantas

Pamplona, 2006

Póster

***ICU2* codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa α ,
que participa en la memoria celular mediada por la cromatina
en *Arabidopsis thaliana***

R. González-Bayón, J.M. Barrero, J.C. del Pozo¹,
M.R. Ponce, y J.L. Micol

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

¹Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Carretera de la Coruña Km 7, 28040 Madrid.

Hemos identificado tres alelos del gen *INCURVATA2* de *Arabidopsis thaliana*. Uno de ellos, *icu2-1*, es recesivo e hipomorfo y causa floración temprana e hiponastia foliar, así como transformaciones homeóticas entre órganos florales, similares a las causadas por los alelos de insuficiencia de función del gen de identidad de órgano floral *APETALA2*. Los alelos nulos *icu2-2* e *icu2-3* son recesivos y letales embrionarios. Mediante un análisis transcriptómico de ARN extraído de las hojas del mutante *icu2-1* y su posterior validación mediante RT-PCR cuantitativa, hemos constatado la desrepresión ectópica de los genes *APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILLATA*, *SEPALLATA3*, *CAULIFLOWER*, *FRUITFULL* y *FLOWERING LOCUS T*, entre otros. Además, la obtención de dobles mutantes nos ha permitido establecer que las mutaciones *curly leaf*, *terminal flower2* y *embryonic flower2* interaccionan con *icu2-1*. Hemos clonado posicionalmente el gen *ICU2*, comprobando que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa α . Nuestros resultados genéticos y moleculares indican que el producto del gen *ICU2* participa en la replicación del ADN y en la memoria celular mediada por la cromatina. Estamos estudiando las interacciones entre las proteínas *ICU2* y *TFL2* en la estirpe silvestre y el mutante *icu2-1*.

VIII Reunión de Biología Molecular de Plantas

Pamplona, 2006

Póster

Análisis genético y molecular de los genes funcionalmente redundantes

RE y RE2 de Arabidopsis thaliana

R. González-Bayón , V. Quesada, P. Robles, L. Campello,
M.R. Ponce, y J.L. Micol

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

Se han descrito en *Arabidopsis thaliana* muchos mutantes con una venación foliar muy manifiesta, ya que su red vascular es intensamente verde y destaca sobre un limbo pálido. Uno de estos mutantes fue denominado *reticulata-1 (re-1)* por Redei en 1964 y ha sido utilizado durante décadas como marcador genético clásico para el análisis de ligamiento. Hemos aislado seis alelos recesivos del gen *RE*, que han sido caracterizados a la vez que *re-1*, demostrando que su fenotipo foliar reticulado se debe a una reducción considerable en la densidad de las células del mesófilo intervenal. Hemos clonado posicionalmente el gen *RE*, que ha resultado ser *LCD1*, que había sido identificado por la sensibilidad al ozono causada por su alelo mutante *lcd1-1*. Nuestros resultados indican que las mutaciones hipomorfas y nulas en este gen perturban la división de las células del mesófilo en estadios tempranos de la organogénesis foliar. Hemos denominado *RE2* al parálogo más cercano a *RE*, cuyos alelos nulos no causan alteraciones morfológicas. La semejanza entre *RE* y *RE2* es de un 71%, y codifican proteínas de función desconocida. Hemos determinado el patrón de expresión de *RE* y estamos haciendo otro tanto con *RE2*. El análisis de la progenie de varios cruzamientos *re/re* × *re2/re2* indica que los genotipos *re/re;re2/re2* son letales, y que las plantas *re/re;RE2/re2* aparecen en una proporción muy inferior a la esperada. El fenotipo de estas últimas es sinérgico y sugiere que *RE* y *RE2* son redundantes y necesarios no sólo para la organogénesis foliar sino también para el desarrollo reproductivo y embrionario. Estamos analizando los patrones de expresión espacial de estos genes en la estirpe silvestre, así como el transcriptoma de las plantas *re/re*, *re2/re2* y *re/re;RE2/re2*.

XXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

Elche, 2006

Póster

**La memoria celular mediada por la cromatina depende de la interacción
entre *ICU2* y *TFL2* en *Arabidopsis thaliana***

R. González-Bayón, J.M. Barrero, J.C. del Pozo¹,
M.R. Ponce, y J.L. Micol

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Campus de la Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Cantoblanco, Madrid.

Hemos identificado tres alelos del gen *INCURVATA2* de *Arabidopsis thaliana*. Uno de ellos, *icu2-1*, es recesivo e hipomorfo y causa floración temprana e hiponastia foliar, así como transformaciones homeóticas entre órganos florales, similares a las ocasionadas por los alelos de insuficiencia de función del gen de identidad de órgano floral *APETALA2*. Los alelos nulos *icu2-2* e *icu2-3* son recesivos y letales embrionarios. Mediante un análisis transcriptómico de ARN extraído de las hojas del mutante *icu2-1* y su posterior validación mediante RT-PCR cuantitativa, hemos constatado la desrepresión ectópica de los genes *APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILLATA*, *SEPALLATA3*, *CAULIFLOWER*, *FRUITFULL* y *FLOWERING LOCUS T*, entre otros. Además, la obtención de dobles mutantes nos ha permitido establecer que las mutaciones *curly leaf*, *terminal flower2* y *embryonic flower2* interaccionan con *icu2-1*. Hemos clonado posicionalmente el gen *ICU2*, comprobando que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa α . Hemos demostrado también la interacción física entre las proteínas *ICU2* y *TFL2*. Nuestros resultados genéticos y moleculares indican que el producto del gen *ICU2* participa en la replicación del ADN y en la memoria celular mediada por la cromatina.

XXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

Elche, 2006

Póster

**La epidermis y el mesófilo contribuyen desigualmente a la forma final
de las hojas de *Arabidopsis thaliana***

R. González-Bayón, V. Quesada, P. Robles, L. Campello,
M.R. Ponce, y J.L. Micol

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

Se han descrito en *Arabidopsis thaliana* muchos mutantes con una venación foliar muy manifiesta, ya que su red vascular es intensamente verde y destaca sobre un limbo pálido. Uno de estos mutantes fue denominado *reticulata-1* (*re-1*) por Redei en 1964 y ha sido utilizado durante décadas como marcador genético clásico para el análisis de ligamiento. Hemos aislado seis alelos recesivos del gen *RE*, que han sido caracterizados a la vez que *re-1*, demostrando que su fenotipo foliar reticulado se debe a una reducción considerable en la densidad de las células del mesófilo intervenal. Nuestros resultados indican que las mutaciones hipomorfas y nulas en este gen perturban específicamente la división de las células del mesófilo en estadios tempranos de la organogénesis foliar. El parálogo más cercano a *RE* es At5g22790, al que hemos denominado *RE2*, cuyos alelos nulos no causan ninguna alteración morfológica. El análisis de la progenie de varios cruzamientos *re/re* × *re2/re2* indica que los genotipos *re/re;re2/re2* son letales, y que las plantas *re/re;RE2/re2* aparecen en una proporción muy inferior a la esperada. El fenotipo de estas últimas es sinérgico y sugiere que *RE* y *RE2* son redundantes y necesarios para la organogénesis foliar y el desarrollo reproductivo y embrionario. Estamos analizando los patrones de expresión espacial de estos genes en la estirpe silvestre, así como el transcriptoma de las plantas *re/re*, *re2/re2* y *re/re;RE/re2*.

V Congreso de la Sociedad Española de Biología del Desarrollo

Alicante, 2006

Póster

Clonación posicional de los genes *VEN4* y *VEN5* de *Arabidopsis thaliana*

R. González-Bayón, F.M. Lozano, L. Campello,
M.R. Ponce, y J.L. Micol

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

En una búsqueda de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología foliar, hemos aislado quince estirpes cuyo fenotipo hemos denominado Venosa (Ven). Presentan una nerviación foliar muy manifiesta, como consecuencia de alguna perturbación en la distribución espacial de los pigmentos fotosintéticos, cuyo resultado es que las células que circundan a la vena primaria y las secundarias son verdes mientras que los tejidos intervenales son amarillentos. El análisis genético de las mutaciones *ven* indica que corresponden a seis genes (*VEN1-VEN6*), cuyas posiciones de mapa hemos determinado mediante análisis del ligamiento a microsatélites polimórficos. Hemos clonado posicionalmente dos de ellos, comprobando que *VEN4* codifica una presunta fosfohidrolasa y *VEN5* una proteína de la envuelta del cloroplasto. Estamos estudiando las interacciones entre las mutaciones *ven4*, *ven5* y otras que causan fenotipos relacionados.

V Congreso de la Sociedad Española de Biología del Desarrollo

Alicante, 2006

Póster

El gen *ICU2* participa en la herencia epigenética en *Arabidopsis thaliana*

R. González-Bayón, J.M. Barrero, J.C. del Pozo¹,
M.R. Ponce, y J.L. Micol

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

¹Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Carretera de la Coruña Km 7, 28040 Madrid.

Hemos identificado tres alelos del gen *INCURVATA2* de *Arabidopsis thaliana*. Uno de ellos, *icu2-1*, es recesivo e hipomorfo y causa floración temprana e hiponastia foliar, así como transformaciones homeóticas entre órganos florales, similares a las causadas por los alelos de insuficiencia de función del gen de identidad de órgano floral *APETALA2*. Los alelos nulos *icu2-2* e *icu2-3* son recesivos y letales embrionarios. Mediante un análisis transcriptómico de ARN extraído de las hojas del mutante *icu2-1* y su posterior validación mediante RT-PCR cuantitativa, hemos constatado la desrepresión ectópica de los genes *APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILLATA*, *SEPALLATA3*, *CAULIFLOWER*, *FRUITFULL* y *FLOWERING LOCUS T*, entre otros. Además, la obtención de dobles mutantes nos ha permitido establecer que las mutaciones *curly leaf*, *terminal flower2* y *embryonic flower2* interactúan con *icu2-1*. Hemos clonado posicionalmente el gen *ICU2*, comprobando que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa α . Nuestros resultados genéticos y moleculares indican que el producto del gen *ICU2* participa en la replicación del ADN y en la memoria celular mediada por la cromatina. Estamos estudiando las interacciones entre las proteínas *ICU2* y *TFL2* en la estirpe silvestre y el mutante *icu2-1*.

V Congreso de la Sociedad Española de Biología del Desarrollo

Alicante, 2006

Póster

**Análisis genético y molecular de los mutantes *denticulata*, *venosa* y *exigua*
de *Arabidopsis thaliana***

P. Robles, A. Mollá-Morales, R. González-Bayón, V. Miguela, C. Reche,
M.R. Ponce, y J.L. Micol

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

Estamos estudiando varios mutantes de *Arabidopsis thaliana* que manifiestan alteraciones en la morfología foliar, con el propósito de identificar genes implicados en el control del crecimiento y la morfogénesis de las plantas. Uno de ellos es *denticulata30* (*den30*), cuyas hojas son estrechas e indentadas y muestran en su mesófilo células más grandes y desorganizadas que las silvestres, y en su epidermis algunas células pavimentosas de gran tamaño. Por su parte, el rasgo más característico del mutante *venosa1-1* (*ven1-1*) es su venación conspicua, que destaca por su color mucho más verde que el de los tejidos intervenales. Este rasgo morfológico externo ha sido asociado con anterioridad a una proliferación insuficiente de los tejidos internos de la hoja. Estamos estudiando también 12 mutantes *exigua* (*exi*), que pertenecen a 8 grupos de complementación y presentan hojas con una forma relativamente normal, un tamaño reducido y una pigmentación verde oscura. Las células del mesófilo en empalizada de algunos de estos mutantes son más pequeñas que las silvestres. Hemos iniciado un abordaje posicional a la clonación de los genes *DEN30*, *VEN1* y algunos de los *EXI*. Hemos determinado que la mutación *den30*, que fue inducida mediante bombardeo con neutrones rápidos, es una delección de 30 kb que afecta a 10 genes, entre ellos los que codifican los tres únicos miembros de la subfamilia CYP82C de los citocromos P450, cuya función en *Arabidopsis thaliana* se desconoce. En cuanto a *ven1-1*, que fue inducida mediante tratamiento con metanosulfonato de etilo, es una mutación puntual que sustituye una serina por asparragina. Hemos obtenido un alelo insercional, *ven1-2*, y establecido que el producto del gen *VEN1* es la subunidad α de la antranilato sintasa, enzima clave en la ruta de biosíntesis del triptófano, cuyo papel en el desarrollo foliar no había sido descrito.

Sexto Congreso de la Sociedad Española de Genética

León, 2007

Póster

**Clonación posicional y caracterización de los genes *RUG2* y *VEN4*
de *Arabidopsis thaliana***

V. Quesada, R. Sarmiento-Mañús, R. González-Bayón, E. Leyva-Díaz,
L. Medina-Ruiz, M.R. Ponce, y J.L. Micol

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

Las mutaciones recesivas *rugosa2* (*rug2*) y *venosa4* (*ven4*) alteran considerablemente la pigmentación, pero apenas la forma, de las hojas de *Arabidopsis thaliana*. Las hojas del mutante *rug2-1* son variegadas, con alternancia de sectores verdes y pálidos, así como más redondeadas y pequeñas, y con una epidermis más irregular que las del tipo silvestre. La despigmentación es también patente en el tallo, las hojas caulinares, los sépalos y las silicuas. El mesófilo de este mutante es pobre en células, cuyos cloroplastos muestran una morfología aberrante y una disminución en su tamaño y número. Por su parte, los mutantes *ven4* presenta una nerviación foliar muy manifiesta, como consecuencia de una distribución espacial anómala de los pigmentos fotosintéticos, de forma que las células que rodean a la vena primaria y las secundarias son verdes mientras que los tejidos intervenales son amarillentos. Hemos clonado posicionalmente el gen *RUG2*, que codifica una proteína similar a los factores de terminación de la transcripción mitocondrial de otros eucariotas, y *VEN4*, cuyo producto es una presunta fosfohidrolasa. Estamos caracterizando dos alelos hipomorfos del gen *RUG2*, cuatro de *VEN4* y uno de At4g38160, un parálogo de *RUG2* al que hemos denominado *RUG3*. Estamos llevando a cabo un análisis de interacciones genéticas entre las mutaciones *rug2*, *rug3*, *ven4* y otras que causan fenotipos similares.

Sexto Congreso de la Sociedad Española de Genética

León, 2007

Póster

**Abordajes directos e inversos a la disección genética del desarrollo de la hoja
en la planta modelo *Arabidopsis thaliana***

R. González-Bayón, F.M. Lozano, M.M. Alonso-Peral, V. Aguilera, A. Mollá-Morales, R. Sarmiento-Mañús, A. Ferrández-Ayela, D. Esteve-Bruna, M.V. Bas-Niñerola, S. Rubio-Díaz, D. Hernández-Romero, J.M. Pérez-Pérez, P. Robles, V. Quesada, M.R. Ponce, y J.L. Micol

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

En *Arabidopsis thaliana*, una crucífera sin valor comercial, pueden conjugarse las técnicas clásicas del análisis genético con las de la ingeniería genética a un nivel que sólo se ha alcanzado con animales como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*. Su uso experimental ha resultado fructífero para la disección genética y molecular de numerosos aspectos de la biología de las plantas y es la especie que permite llevar a cabo análisis causales del desarrollo vegetal con mayores perspectivas de éxito.

El punto de partida de la disección genética clásica de un proceso biológico es el aislamiento de mutantes que presenten algún rasgo fenotípico que los distinga del tipo silvestre. La efectividad de este abordaje convencional al análisis de las funciones génicas se ha incrementado sustancialmente por la disponibilidad de la secuencia completa del genoma nuclear de *Arabidopsis thaliana*, que ha permitido el desarrollo de nuevas herramientas. Por un lado, ha supuesto un espectacular incremento en el número de marcadores moleculares, útiles para la cartografía de alta resolución que conduce a la clonación posicional de los genes a estudio. Por otro, ha hecho realidad los abordajes de genética inversa propiamente dicha, merced a la generación de colecciones exhaustivas de alelos insercionales nulos y de procedimientos de saturación local en mutaciones puntuales.

La existencia de numerosos mutantes que manifiestan alteraciones en la morfología foliar constituye una prueba de que el desarrollo de las hojas de las plantas está controlado genéticamente. El grupo que presenta esta ponencia pretende contribuir a la comprensión de los mecanismos de control del desarrollo, está interesado en la regulación genética de la organogénesis y ha optado por estudiar el desarrollo foliar en *Arabidopsis thaliana*. Hemos llevado a cabo en primer lugar un intento de mutagénesis de saturación, que ha conducido al aislamiento, caracterización fenotípica, análisis de

complementación, de ligamiento y de interacciones de varios cientos de mutantes, y a la clonación posicional y caracterización funcional de más de veinte genes.

Al abordaje clásico descrito en el párrafo anterior hemos añadido recientemente otro de genética inversa, como miembros del consorcio europeo AGRON-OMICS, basado en el fenotipado a gran escala de la morfología y la ultraestructura foliar de una colección de mutantes insercionales de dominio público, que incluye alelos presuntamente nulos de prácticamente todos los genes de *Arabidopsis thaliana*. En el consorcio español TRANSPLANTA estudiaremos en plantas transgénicas los efectos sobre el desarrollo foliar (a) de la sobreexpresión de determinados factores de transcripción, y (b) del bloqueo simultáneo, mediante microARN artificiales, de la expresión de todos los miembros de algunas familias de genes que codifican factores de transcripción.



XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Genética

León, 2007

Conferencia pronunciada por J.L. Micol, por invitación.

Disección genética de la organogénesis foliar en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*: Abordajes directos e inversos

R. González Bayón, F.M. Lozano García, V. Aguilera Díaz, A. Mollá Morales, R. Sarmiento Mañús, A. Ferrández Ayela, S. Rubio Díaz, D. Hernández Romero, J.M. Pérez Pérez, P. Robles Ramos, V. Quesada Pérez, M.R. Ponce Molet, y J.L. Micol Molina

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante

En *Arabidopsis thaliana*, una crucífera sin valor comercial, pueden conjugarse las técnicas clásicas del análisis genético con las de la ingeniería genética a un nivel que sólo se ha alcanzado con animales como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*. Su uso experimental ha resultado fructífero para la disección genética y molecular de numerosos aspectos de la biología de las plantas y es la especie que permite llevar a cabo análisis causales del desarrollo vegetal con mayores perspectivas de éxito.

El punto de partida de la disección genética clásica de un proceso biológico es el aislamiento de mutantes que presenten algún rasgo fenotípico que los distinga del tipo silvestre. La efectividad de este abordaje convencional al análisis de las funciones génicas se ha incrementado sustancialmente por la disponibilidad de la secuencia completa del genoma nuclear de *Arabidopsis thaliana*, que ha permitido el desarrollo de nuevas herramientas. Por un lado, ha supuesto un espectacular incremento en el número de marcadores moleculares, útiles para la cartografía de alta resolución que conduce a la clonación posicional de los genes a estudio. Por otro, ha hecho realidad los abordajes de genética inversa propiamente dicha, merced a la generación de colecciones exhaustivas de alelos insercionales nulos y de procedimientos de saturación local en mutaciones puntuales.

La existencia de numerosos mutantes que manifiestan alteraciones en la morfología foliar constituye una prueba de que el desarrollo de las hojas de las plantas está controlado genéticamente. El grupo que presenta esta ponencia pretende contribuir a la comprensión de los mecanismos de control del desarrollo, está interesado en la regulación genética de la organogénesis y ha optado por estudiar el desarrollo foliar en *Arabidopsis thaliana*. Hemos llevado a cabo en primer lugar un intento de mutagénesis de saturación, que ha conducido al aislamiento, caracterización fenotípica, análisis de

complementación, de ligamiento y de interacciones de varios cientos de mutantes, y a la clonación posicional y caracterización funcional de más de veinte genes.

Al abordaje clásico descrito en el párrafo anterior hemos añadido recientemente otro de genética inversa, como miembros del consorcio europeo AGRON-OMICS, basado en el fenotipado a gran escala de la morfología y la ultraestructura foliar de una colección de mutantes insercionales de dominio público, que incluye alelos presuntamente nulos de prácticamente todos los genes de *Arabidopsis thaliana*. En el consorcio español TRANSPLANTA estudiaremos en plantas transgénicas los efectos sobre el desarrollo foliar (a) de la sobreexpresión de determinados factores de transcripción, y (b) del bloqueo simultáneo, mediante microARN artificiales, de la expresión de todos los miembros de algunas familias de genes que codifican factores de transcripción.



XVII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal

X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal

Alcalá de Henares, 2007

Conferencia pronunciada por J.L. Micol, por invitación.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la financiación por el Ayuntamiento de Elche (Proyecto ICBO20), el MCYT (BMC2002-02840) y el MEC (BFU2005-01031) y a una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (F.P.I.) del MCYT.

A mis directores, José Luis Micol y María Rosa Ponce, por haberme permitido iniciar mi carrera investigadora en su laboratorio y bajo su atenta dirección.

A María Rosa Ponce, Héctor Candela, José Manuel Pérez, Sara Jover y José María Barrero, por recibirme con los brazos abiertos, enseñarme y guiarme durante mis primeros pasos en este laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio iniciales Víctor Quesada, Andrea Hricová, Sara Jover, José María Barrero, Asunción Brotons, María Magdalena Alonso y Francisca María Lozano, por su amistad y comprensión tanto en los buenos como en los malos momentos.

A mis compañeros de laboratorio actuales Víctor Quesada, Pedro Robles, Francisca María Lozano, Verónica Aguilera, Almudena Mollá, Almudena Ferrández y Raquel Sarmiento, por su amistad, compañerismo y paciencia durante mis últimos años en el laboratorio.

A José Manuel Pérez, por volver y devolverme la motivación que me faltaba en los momentos finales de esta tesis.

A las nuevas postdocs Silvia Rubio y Diana Hernández, por su ayuda y amistad, a pesar de que no hemos coincidido durante mucho tiempo en el laboratorio.

A José Manuel Serrano, Verónica García y Tania Trujillo, por facilitar nuestro trabajo con su labor técnica.

A Amparo Albiñana, por toda su ayuda, colaboración y paciencia en los momentos en los que la he necesitado.

En definitiva, a todos los miembros del laboratorio por hacer que cada día me guste más este trabajo.

A mi familia, por su ayuda, ya que sin ella todo esto hubiera sido más difícil.

A mi niña Alba, porque lo es todo para mí.

