



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Contribución al análisis funcional de los
genes de la ruta de los microARN en
Arabidopsis**

Jimmy Andrés Sampedro Guerrero

Tutoras:

María Rosa Ponce Molet

Raquel Sarmiento Mañús

Unidad de Genética

Instituto de Bioingeniería

Máster Universitario en Biotecnología y Bioingeniería

Curso académico 2018/2019

MARÍA ROSA PONCE MOLET, Catedrática de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

RAQUEL SARMIENTO MAÑÚS, Profesora Asociada de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por Jimmy Andrés Sampredo Guerrero como Trabajo de Fin del Máster en Biotecnología y Bioingeniería. Las investigaciones que se reflejan en esta memoria han sido desarrolladas íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.



María Rosa Ponce Molet

Raquel Sarmiento Mañús

Elche, 28 de junio de 2019.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	1
II.- INTRODUCCIÓN	2
II.1.- <i>Arabidopsis thaliana</i> , la especie vegetal modelo por excelencia	2
II.2.- El silenciamiento génico mediado por los microARN (miARN).....	2
II.3.- Los mutantes de la maquinaria de la ruta de los miARN	3
II.4.- El Complejo de Ensamblaje de la Cromatina CAF-1	5
II.5.- El mutante <i>fas1-1</i>	6
II.6.- Biogénesis del ribosoma en <i>Arabidopsis</i>	7
II.6.1.- Estructura del ADNr 45S y biogénesis de los ARNr en <i>Arabidopsis</i>	7
II I.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	10
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	11
IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria	11
IV.1.1.- Abreviaturas, acrónimos y fórmulas químicas	11
IV.1.2.- Gramática y terminología.....	12
IV.1.3.- Citas bibliográficas.....	12
IV.2.- Estirpes empleadas en este trabajo.....	12
IV.3.- Cultivo de <i>Arabidopsis</i>	12
IV.3.1.- Cultivo en placa de Petri	12
IV.3.2.- Medios de cultivo líquido.....	13
IV.3.3.- Medios de cultivo sólidos.....	14
IV.3.4.- Cultivo en maceta.....	14
IV.4.- Disoluciones.....	15
IV.4.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico.....	15
IV.4.2.- Disoluciones para la electroforesis de ADN	15
IV.4.3.- Disoluciones para los ensayos de hibridación de tipo <i>northern</i>	16
IV.4.3.1.- Disoluciones para electroforesis de ARN.....	16
IV.4.3.2.- Disoluciones para la transferencia.....	16
IV.4.3.3.- Disoluciones para la hibridación, lavado y detección de ARN	17
IV.5.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos	17
IV.5.1.- Aislamiento de ácidos nucleicos	17
IV.5.1.1.- Aislamiento de ADN genómico	17
IV.5.1.2.- Aislamiento de ARN	18
IV.6.- Síntesis de ADN.....	18
IV.6.1.- Síntesis de oligonucleótidos y amplificaciones mediante PCR	18

IV.6.2 .- Genotipado de mutantes	19
IV.6.2.1 .- Identificación molecular de mutaciones insercionales	19
IV.6.2.2 .- Genotipado mediante análisis de CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences).....	20
IV.6.2.3 .- Identificación molecular de mutaciones por secuenciación	20
IV.7 .- Hibridación de <i>northern</i>	21
V .- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
V.1 .- Análisis de interacciones génicas entre mutantes en el gen <i>FAS1</i> y los de la maquinaria de los miARN.....	24
V.1.1 .- Análisis de las interacciones genéticas de <i>FAS1</i> con <i>AGO1</i>	25
V.1.1.1 .- Genotipado de las familias F ₄ <i>fas1-1</i> x <i>ago1-52</i> y <i>fas1-1</i> × <i>ago1-27</i>	25
V.1.1.2 .- Fenotipo de los dobles mutantes <i>fas1-1 ago1-52</i> y <i>fas1-1 ago1-27</i>	28
V.1.2 .- Análisis de las interacciones genéticas de <i>FAS1</i> con <i>HYL1</i>	29
V.1.2.1 .- Genotipado de las familias F ₃ <i>fas1-1</i> x <i>hyl1-2</i> y <i>fas1-1</i> × <i>hyl1-11</i>	29
V.1.2.2 .- Fenotipo de los dobles mutantes <i>fas1-1 hyl1-2</i> y <i>fas1-1 hyl1-11</i>	32
V.1.3 .- Interacciones genéticas de <i>FAS1</i> con <i>HST</i> y <i>HEN1</i>	33
V.2 .- Mutantes del procesamiento del ARNr 45S	33
V .- CONCLUSIONES	38
VI .- BIBLIOGRAFÍA	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Esquema simplificado de la ruta de silenciamiento mediado por miARN.....	4
Figura 2.- Fenotipos de los mutantes de la maquinaria de los miARN.....	5
Figura 3.- Esquema del empaquetamiento del ADN en los nucleosomas.....	6
Figura 4.- Esquema de la ruta del procesamiento del pre-ARNr 45S en Arabidopsis	8
Figura 5.- Esquema del genotipado de líneas insercionales de ADN-T.....	20
Figura 6.- Esquema del montaje para la transferencia de ARN de un gel de agarosa a una membrana de nylon.	22
Figura 7.- Localización de la mutación <i>fas1-1</i> en el gen <i>FAS1</i> y sus efectos fenotípicos.....	25
Figura 8.- Genotipado de los presuntos dobles mutantes	26
Figura 9.- Identificación molecular de las mutaciones <i>ago1-27</i> y <i>ago1-52</i> en los individuos dobles mutantes seleccionados.	27
Figura 10.- Fenotipos de los dobles mutantes <i>fas1-1 ago-52</i> y <i>fas1-1 ago1-27</i>	28
Figura 11.- Genotipado de <i>FAS1</i> en los presuntos dobles mutantes <i>fas1-1 hyl1</i>	30
Figura 12.- Genotipado de las mutaciones <i>hyl1-2</i> y <i>hyl1-11</i>	31
Figura 13.- Fenotipos de los dobles mutantes <i>fas1-1 hyl1-2</i> y <i>fas1-1 hyl1-11</i>	32
Figura 14.- Fenotipos de los posibles dobles mutantes <i>fas1-1 hen1-13</i> y <i>fas1-1 hst-16</i>	33
Figura 15.- Esquema de la detección de los pre-ARNr con las sondas S2, S7 y S9.	34
Figura 16.- Análisis de <i>northern</i> de los mutantes de la maquinaria de los miARN con la sonda S7	35
Figura 17.- Análisis de <i>northern</i> de los mutantes de la maquinaria de los microARN con la sonda S9	36
Figura 18.- Análisis de <i>northern</i> del mutante <i>fas1-4</i>	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Abreviaturas empleadas en este trabajo	11
Tabla 2.- Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	19
Tabla 3.- Alelos mutantes utilizados en este TFM	24





I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Los microARN (miARN) son ARN endógenos y de pequeño tamaño que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional, inhibiendo la traducción o induciendo la degradación de sus ARNm diana, de los que son complementarios. En el laboratorio de la profesora María Rosa Ponce se han obtenido mutantes de varios de los genes de la maquinaria de los miARN, y en este Trabajo de Fin de Máster hemos investigado otras posibles funciones de estos genes. Hemos analizado las interacciones entre genes de esta ruta (*AGO1* y *HYL1*) y de la remodelación de la cromatina (*FAS1*), así como investigado su posible implicación en la biogénesis del ribosoma. Con este objetivo hemos obtenido los dobles mutantes *fas1-1 ago1-52*, *fas1-1 ago1-27*, *fas1-1 hyl1-2* y *fas1-1 hyl1-11*, cuyos fenotipos sinérgicos sugieren una conexión entre las rutas de regulación génica y el ensamblaje de la cromatina. Además, hemos realizado hibridaciones de *northern* para determinar si existe una alteración en los mutantes de la maquinaria de los miARN en la maduración de los ARN ribosómicos (ARNr), puesto que resultados previos del laboratorio apuntaban a su participación en la biogénesis del ribosoma. Hemos determinado que el mutante *hyl1-12* presenta múltiples alteraciones en el procesamiento del pre-ARNr 45S, lo que indicaría la participación de *HYL1* en este proceso.

Palabras clave: *microARN, ARNr, ribosoma, Arabidopsis.*

miRNAs are endogenous and small RNAs that regulate gene expression at post-transcriptional level, inhibiting translation or inducing the degradation of their target mRNAs, of which are complementary. In the laboratory of Maria Rosa Ponce, some mutants of the miRNA machinery have been obtained, and in this TFM we have investigated other possible functions of these genes. We have analyzed the interactions between the genes involved in this process (*AGO1* and *HYL1*) and in chromatin remodeling (*FAS1*). With this objective, we have obtained the double mutants *fas1-1 ago1-52*, *fas1-1 ago1-27*, *fas1-1 hyl1-2* and *fas1-1 hyl1-11*, whose synergistic phenotypes suggest a connection between these processes. In addition, we have performed northern blot hybridizations to determine if the maturation of the rRNAs is altered in the mutants of the miRNA machinery, because our previous results pointed to their participation in the biogenesis of the ribosome. We have determined that the processing of the 45S pre-rRNA is defective in the *hyl1-12* mutant, suggesting the participation of *HYL1* in this process.

Keywords: *microRNA, rRNA, ribosome, Arabidopsis.*



II.- INTRODUCCIÓN

II.- INTRODUCCIÓN

II.1.- *Arabidopsis thaliana*, la especie vegetal modelo por excelencia

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh es una brassicácea de pequeño tamaño distribuida en la gran mayoría de continentes y que se introdujo en los laboratorios hace unos 40 años como organismo modelo en el estudio de la genética y de la biología molecular vegetal (Meinke *et al.*, 1998). Desde entonces, la comunidad de investigadores que utilizan esta planta como sistema experimental no ha dejado de crecer, debido a sus múltiples ventajas, entre las que destacan: su facilidad de cultivo, de realización de cruzamientos y de transformación con ADN exógeno, su ciclo de vida corto para ser un vegetal (aproximadamente 6 semanas desde la germinación de la semilla hasta la obtención de silicuas maduras), su alta tasa de fecundidad y un genoma de tan sólo 125 Mb, que fue el primero vegetal en secuenciarse (Smyth, 1990; Van Norman y Benfey, 2009; Wienkoop *et al.*, 2010; Woodward y Bartel, 2018). A estas características propias del organismo se añade la ingente cantidad de recursos genéticos y genómicos desarrollados durante su relativa corta vida como especie modelo, la mayoría de dominio público, entre las que cabe destacar las colecciones de líneas insercionales que están permitiendo la caracterización funcional de un gran número de genes. Además, existen varios portales destinados a la investigación con *Arabidopsis*, siendo el central el Arabidopsis Information Resource (TAIR; <http://www.arabidopsis.org>), que recopila y actualiza datos genéticos y genómicos de esta especie, reúne numerosos recursos bioinformáticos para analizarlos y da acceso a los bancos de distribución de semillas y clones. Aunque carece de valor comercial, la mayoría del conocimiento generado en *Arabidopsis*, así como muchas de las herramientas desarrolladas para su estudio, han podido extrapolarse a otras especies vegetales de interés agronómico, y también en muchos casos a animales (Chang *et al.*, 2016).

II.2.- El silenciamiento génico mediado por los microARN (miARN)

Los mecanismos que controlan el silenciamiento génico fueron descubiertos a principios de los 90, al intentar sobreexpresar el gen que codifica la chalcona sintasa, enzima implicada en la síntesis flavonoides/antocianinas que proporcionan el color violeta en *Petunia hybrida*. Paradójicamente, observaron una disminución del color violeta en los pétalos, comprobando la inactivación del transgén y del gen endógeno, denominando a este fenómeno cosupresión (Napoli *et al.*, 1990). Más tarde, Andrew Fire y Craig Mello evidenciaron en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* una mayor capacidad de silenciamiento génico con un ARN bicatenario exógeno que con un ARN antisentido del

gen de interés, que era la estrategia común en esos momentos para la obtención de fenocopias de mutantes para alelos nulos e hipomorfos. Esta nueva tecnología fue denominada por sus autores interferencia de RNA (RNAi), y a los ARN bicatenarios inductores, ARN interferentes (Fire *et al.*, 1998).

Los mecanismos de silenciamiento génico basados en ARN interferentes regulan a nivel transcripcional y postranscripcional la expresión de genes endógenos y el silenciamiento de genes foráneos, proveniente de virus o de elementos transponibles (Guo *et al.*, 2016). Los ARN interferentes son pequeños, de entre 21 a 24 nt, y se clasifican según su procedencia y mecanismo de biogénesis, siendo los miARN, los mejor estudiados. Los genes de los miARN, denominados genes *MIR*, se transcriben a partir de genes endógenos (Lu *et al.*, 2004). Se han identificado en Arabidopsis un total de 325 genes *MIR*, que han sido agrupados en más de 50 familias, 18 de ellas conservadas en las plantas (Nozawa *et al.*, 2012).

La transcripción de los genes *MIR* genera ARN con capacidad de formar estructuras en forma de horquilla que son procesados en dos etapas por una ribonucleasa de tipo III, que en Arabidopsis es DICER-LIKE 1 (DCL1), homóloga a la proteína DICER en los animales, para generar una molécula bicatenaria, en la que una de las cadenas es el miARN. A DCL1 le acompañan otras proteínas, que colaboran en estas etapas de maduración de los miARN, entre ellas HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1), con capacidad de unión a ARN bicatenario (Fang y Qi, 2016). HUA ENHANCER 1 (HEN1) estabiliza la molécula de ARN generada por DCL1, metilando los extremos 3' de las dos cadenas. La exportina HASTY (HST) se encarga del transporte nucleo-citoplásmico. Una vez en el citoplasma, una de las dos cadenas, la del miARN maduro, se incorpora al RISC (RNA-induced silencing complex), un complejo riboproteico cuyo núcleo catalítico es una ribonucleasa III de la familia ARGONAUTE (AGO), que en la mayoría de los casos es AGO1 (Verdel *et al.*, 2004). El RISC es guiado por el miARN hacia su ARNm diana, uniéndose por complementariedad de bases y formando la estructura miARN-ARNm que es reconocida por la proteína AGO1 que degrada o inhibe la traducción del ARNm (Arribas-Hernández *et al.*, 2016).

II.3.- Los mutantes de la maquinaria de la ruta de los miARN

Una de las líneas de investigación del laboratorio de la profesora María Rosa Ponce es contribuir a la comprensión del silenciamiento génico controlado por los miARN, analizando mutantes de genes cuyos productos participan en estas rutas (en adelante, mutantes de la maquinaria; Figura 1, página 4).

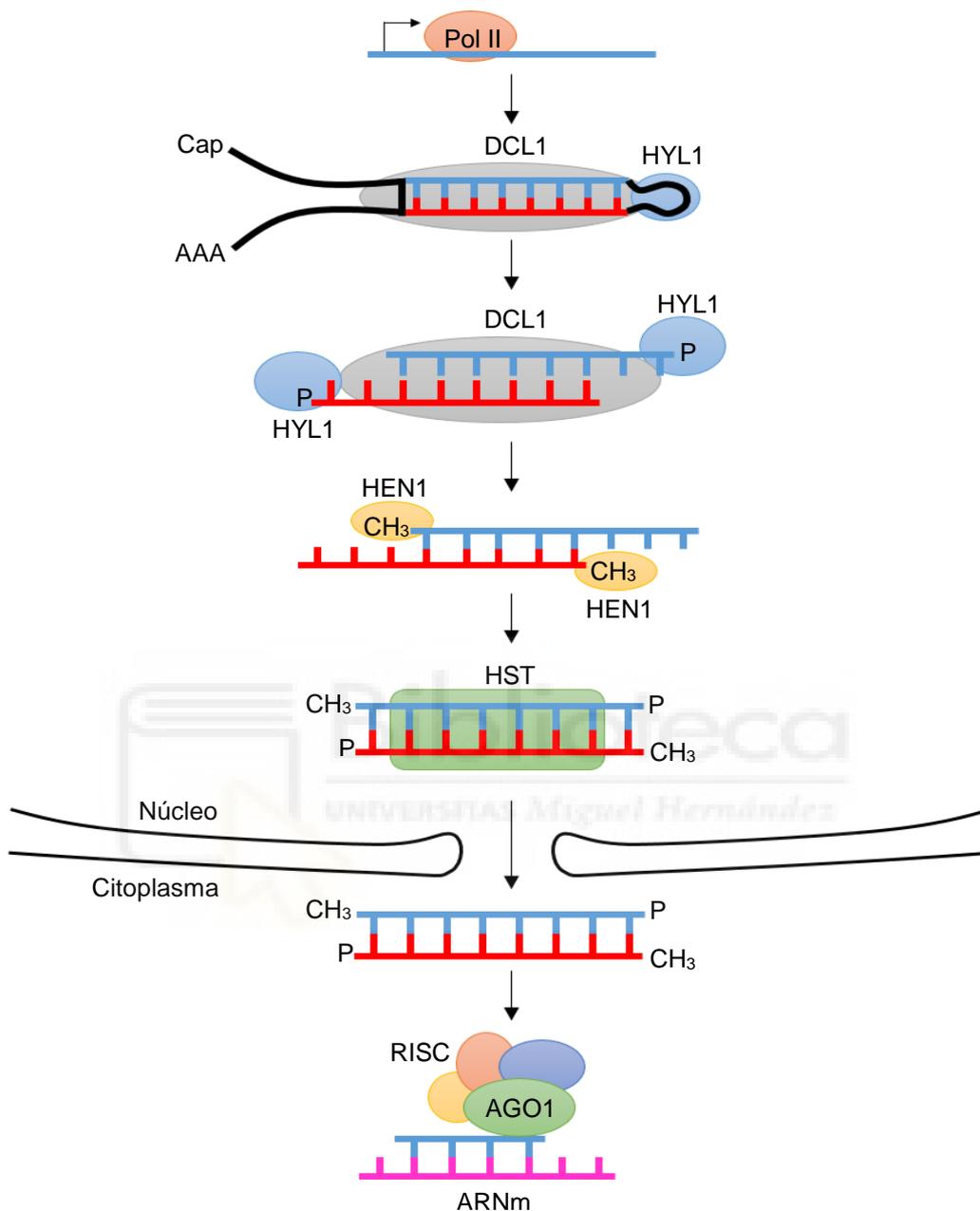


Figura 1.- Esquema simplificado de la ruta de silenciamiento mediado por miARN. Representación esquemática de la transcripción de un gen *MIR* que genera un precursor de los miARN, al que se le unen las proteínas DCL1 y HYL1, que lo procesan y cortan para generar un ARN bicatenario. HEN1 estabiliza por metilación los extremos 5' de la molécula bicatenaria resultante, previo a su exportación por HST. En el citoplasma, el miARN se incorpora al complejo RISC que contienen a AGO1, guiándolo hacia su ARNm, del que es complementario. Por simplificación, sólo se mencionan las proteínas de los genes que se han estudiado en este TFM.

Las mutaciones de pérdida de función en estos genes de la maquinaria de los miARN en *Arabidopsis* (Figura 2, página 5), son altamente pleiotrópicas. *DCL1* y *AGO1* son genes esenciales (Vaucheret *et al.*, 2004) y sus alelos hipomorfos se parecen mucho a los nulos de *HYL1* y *HEN1* (Vazquez *et al.*, 2004), y menos a los de *HST* (Bollman *et al.*, 2003).

Los mutantes en genes de la maquinaria de los miARN crecen lentamente y manifiestan alteraciones en la morfología general de la planta, que incluyen peciolo muy cortos de sus hojas vegetativas o la ausencia de una delimitación clara con el limbo (Figura 2, página 5), flores que se abren prematuramente, desarrollo anormal del fruto y reducción de la fertilidad. Sus respuestas a numerosos estreses abióticos y bióticos se encuentran también alteradas.

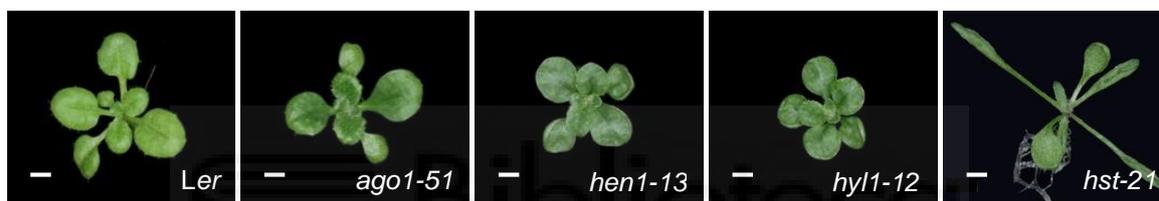


Figura 2.- Fenotipos de los mutantes de la maquinaria de los miARN. Las fotografías se tomaron 15 dde. Las barras de escala representan 1 mm. Modificado de Jover-Gil *et al* (2012).

Todos estos rasgos ponen de manifiesto los numerosos genes que controlan, cuyos productos participan en aspectos muy diferentes del desarrollo y respuestas ambientales de la planta.

II.4.- El Complejo de Ensamblaje de la Cromatina CAF-1

La unidad básica de empaquetamiento del material genético en los genomas eucariotas es el nucleosoma, en los que las histonas, proteínas básicas cargadas positivamente, se asocian con el ADN, cargado negativamente, con alta afinidad. En los nucleosomas, el ADN se empaqueta alrededor de un octámero compuesto por dos tetrámeros: uno formado por las histonas H2A y H2B y otro por H3 y H4. Los nucleosomas se ensamblan, remodelan y desensamblan en numerosos momentos de la vida de una célula, para posibilitar procesos esenciales como la replicación o la transcripción. Las chaperonas de histonas son las proteínas que regulan las distintas etapas del ensamblaje del nucleosoma y el intercambio de histonas. En la especie humana la actividad chaperona de histonas reside en el complejo triheterotrimérico CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR-1

(CAF-1), que consta de las subunidades p150, p60 y p48, mientras que las subunidades en la levadura se denominan CAC1, CAC2 y CAC3 (Varas *et al.*, 2017).

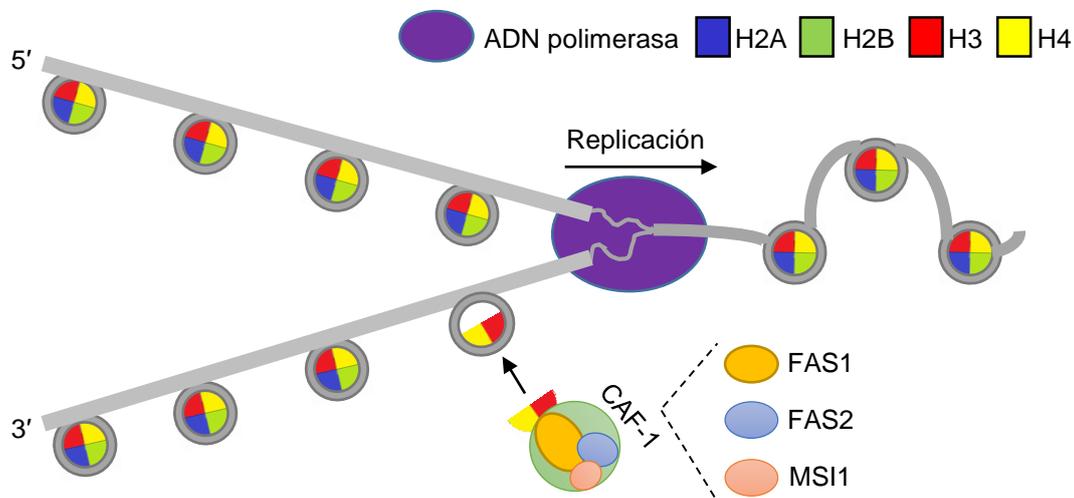


Figura 3.- Esquema del empaquetamiento del ADN en los nucleosomas. Anclaje del tetrámero H3-H4 por la subunidad FAS1 del complejo CAF-1, en dirección a la nueva cadena de ADN sintetizada tras la replicación. Dibujado a partir de Ransom *et al.* (2010).

En *Arabidopsis*, CAF-1 está formada por las subunidades FASCIATA1 (FAS1), FAS2 y MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1), ortólogas de p150, p60 y p48, respectivamente (Mozgová *et al.*, 2010). CAF-1 se localiza en los sitios de síntesis del ADN, unida al cofactor de la ADN polimerasa delta, PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA), que sirve como andamiaje para el replisoma, las proteínas que participan en la replicación del ADN (Duc *et al.*, 2015). CAF-1 mantiene la integridad del genoma, ya que facilita la reestructuración de la cromatina después de desenrollarse para formar las horquillas de replicación (Kaya *et al.*, 2001). En el complejo, FAS1 interactúa con el tetrámero H3-H4 y con el replisoma, depositando el tetrámero H3-H4 directamente en el ADN sintetizado durante la replicación (Figura 3, página 6). FAS2 se une al ANTI-SILENCING FACTOR 1 (ASF1) que participa en el ensamblaje del tetrámero H3-H4, mientras que MSI1 media la interacción con complejos que mantienen la memoria epigenética durante el desarrollo (Muchová *et al.*, 2015).

II.5.- El mutante *fas1-1*

En el año 1947, el investigador Erna Reinholz mutagenizó con rayos X semillas de la estirpe silvestre Enkheim (En-2). Del escrutinio de esta mutagénesis se aisló *fasciata 1-1*

(*fas1-1*), un mutante pleiotrópico que presenta varios tallos secundarios que convergen en un mismo punto en el tallo principal, que es fasciado. Sus hojas son estrechas y dentadas, manifiesta alteraciones en las flores y una fertilidad reducida (Reinholz, 1966). La pérdida de función de *FAS1* provoca también hipersensibilidad a agentes genotóxicos, incremento en la frecuencia de recombinación homóloga y en la integración de ADN-T, acortamiento progresivo de los telómeros y pérdida de repeticiones del ADNr 45S, que codifica tres de los ARNr, que forman parte del ribosoma (Kirik *et al.*, 2006; Mozgová *et al.*, 2010)

II.6.- Biogénesis del ribosoma en Arabidopsis

La biogénesis del ribosoma es un proceso fundamental para todas las células, procariotas y eucariotas. El ribosoma eucariota está compuesto por la subunidad menor o 40S y la mayor o 60S, que se sintetizan en el nucléolo y nucleoplasma, y se ensamblan en el citoplasma para dar lugar al ribosoma maduro. La subunidad 40S está formada por el ARNr 18S y por aproximadamente 33 proteínas ribosómicas (PR), y su principal función es la decodificación del ARNm. Por otro lado, la subunidad grande 60S se encuentra formada por los ARNr 25S, 5.8S y 5S y por aproximadamente 47 PR, e interviene en la formación de enlaces peptídicos catalizados por peptidil transferasas (Weis *et al.*, 2015).

II.6.1.- Estructura del ADNr 45S y biogénesis de los ARNr en Arabidopsis

La biogénesis del ribosoma en las plantas, se inicia con la transcripción del ADNr 45S por la ARN polimerasa I (Pol I) en el nucléolo, generándose un precursor policistrónico denominado pre-ARNr 45S, que codifica los tres ARNr mayores, el 25S, 18S y 5,8S. El cuarto ARNr, el 5S, lo transcribe la ARN polimerasa III (Pol III) en el nucleoplasma.

El nucléolo es un compartimento nuclear que carece de membrana y que en las plantas posee una cavidad central denominada cavidad nucleolar o vacuola nucleolar, que contiene ciertos ARN nucleolares pequeños (snoARN) que participan en la biogénesis de los ARNr, formando complejos riboproteicos denominados ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNP; Kojima *et al.*, 2018).

El ADNr 45S se encuentra repetido en tándem en múltiples copias en todos los eucariotas, siendo unas 750 en Arabidopsis, repartidas en las regiones de los organizadores nucleolares (NOR), localizados en las constricciones secundarias de los cromosomas acrocéntricos 2 y 4. En torno a los NOR se organiza en la interfase el nucléolo, donde tiene lugar la síntesis del pre-ARNr 45S, que desaparece durante la mitosis (Kalinina *et al.*, 2018).

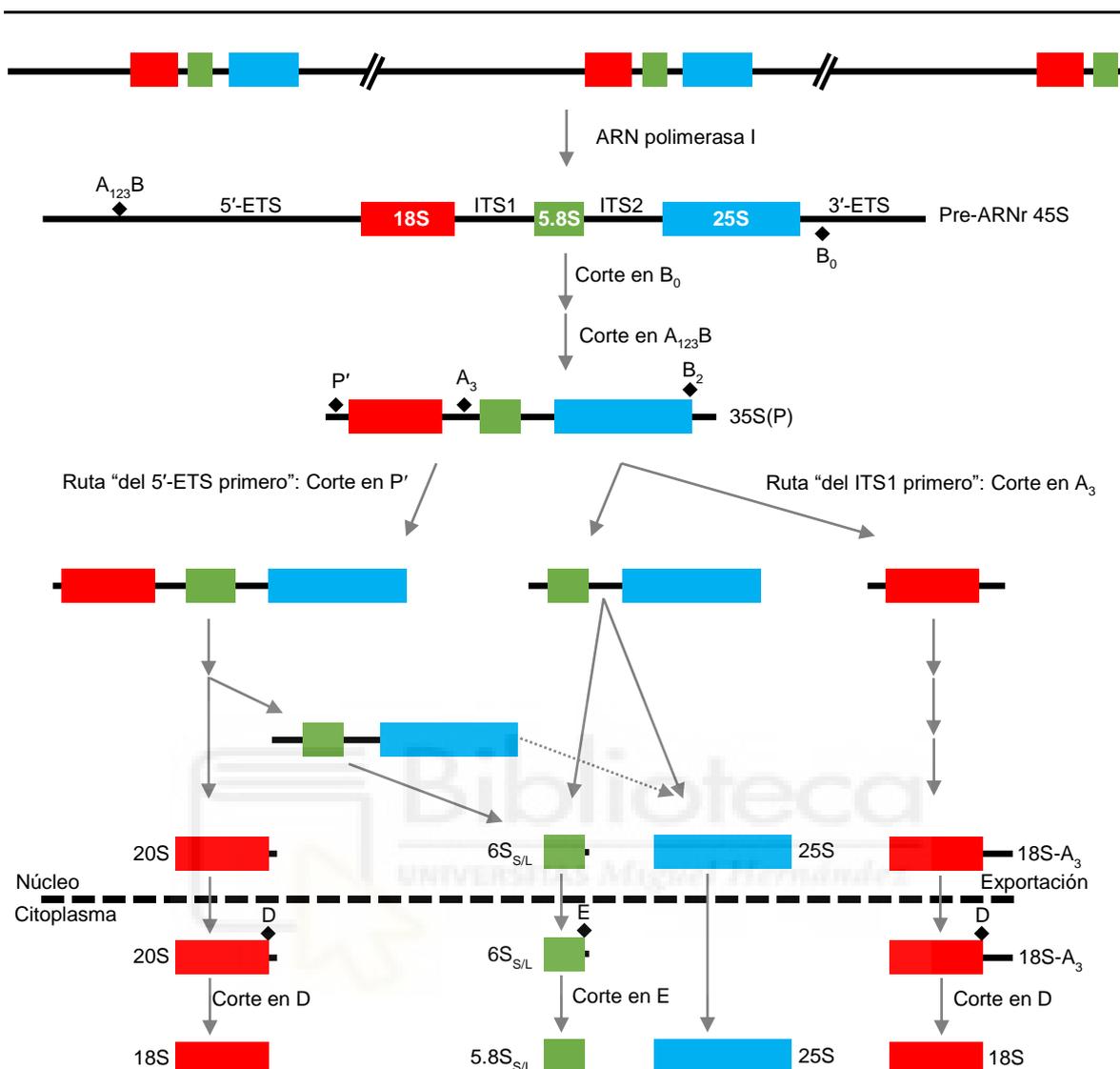


Figura 4.- Esquema de la ruta del procesamiento del pre-ARNr 45S en *Arabidopsis*. Las flechas señalan las diferentes etapas y rutas del procesamiento. Las extensiones de los intermediarios no están dibujados a escala. Tomado de Micol Ponce, 2017, que lo modificó a partir de Zakrzewska-Placzek *et al.* (2010), Schillewaert *et al.* (2012) y Weis *et al.* (2015).

El procesamiento del pre-ARNr 45S, que está muy conservado en todos los eucariotas, es muy complejo y comprende varias etapas y rutas alternativas, en la que se eliminan mediante cortes endo y exonucleolíticos los espaciadores internos 1 y 2 (ITS1 e ITS2), que separan las regiones correspondientes a los ARNr maduros, y los externos 5'-ETS y 3'-ETS, que constituyen los extremos no codificantes de las copias, resultando en los ARNr maduros 5.8S, 18S y 25S. Esta maduración de los ARNr del 45S divergen en dos rutas de biogénesis: a) tras el corte en P' del ITS1 en la ruta de "primero el 5'-ETS" o b) tras el corte en A₃ en la ruta "primero el ITS1" (Figura 4, página 8). La maduración de todos

ellos ocurre en el nucléolo, nucleoplasma y citoplasma, excepto el ARNr 25S que termina su maduración en el nucleoplasma (Figura 4, página 8). Los ARNr se incorporan a los pre-60S y pre-40S, que son exportados a través de los nucleoporos de la membrana nuclear al citoplasma, para finalizar su maduración. Finalmente, las subunidades maduras 60S y 40S se ensamblan formando el ribosoma 80S (Soprano *et al.*, 2018).





III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En el laboratorio del profesor José Luis Micol se realizó un escrutinio de mutantes de *Arabidopsis* con alteraciones en la arquitectura foliar, identificando entre otros muchos, 41 con hojas recurvadas hacia el haz, que se denominaron *incurvata (icu)* (Berná *et al.*, 1999). La clonación posicional de varios mutantes *icu* en el laboratorio de la profesora María Rosa Ponce, reveló que eran alelos de genes de la maquinaria de los miARN: *ago1-51* y *ago1-52*, ambos hipomórficos, y los nulos *hyl1-12*, *hen1-13* y *hst-21* (Jover-Gil *et al.*, 2012).

Los genes *DCL*, *HYL1*, *HEN1*, *HST* y *AGO1* tienen papeles clave en el silenciamiento génico mediado por miARN, y algunas otras funciones independientes. En los mutantes de estos genes se han encontrado alteraciones transitorias en la compactación de la cromatina y sobreexpresión generalizada de genes meióticos, implicados en la reparación por recombinación homóloga, e hipersensibilidad a agentes inductores de rupturas en la doble cadena de ADN (estos resultados son frutos de la colaboración con el grupo de Juan Luis Santos, de la Universidad Complutense de Madrid; Oliver *et al.*, 2017). También se ha evidenciado en el laboratorio, relaciones sinérgicas con mutantes en genes que codifican factores del procesamiento del pre-ARNr 45S, así como alteraciones en la expresión del ADNr 45S, que está bajo control epigenético.

El complejo remodelador de la cromatina CAF-1 está formado por las proteínas FASCIATA1 (*FAS1*), *FAS2* y MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (*MSI1*), como se comentó en la introducción. Del mismo modo que ocurre con los mutantes de la ruta de los miARN, se ha relacionado al gen *FAS1* con otros procesos, además de su participación en el ensamblaje de los nucleosomas, como la reparación del ADN mediante recombinación homóloga y el mantenimiento de los telómeros y las repeticiones del ADNr 45S. Hipotetizamos que podría existir una relación funcional entre los componentes de la ruta de los miARN y el complejo CAF-1, en relación a la biogénesis del ribosoma.

El objetivo general de este TFM es el de contribuir al análisis funcional de los genes de la ruta de los miARN, en relación a la biogénesis del ribosoma. Como objetivos específicos nos planteamos (1) la obtención y análisis de dobles mutantes de pérdida de función de genes de la maquinaria de los miARN y de *FAS1*, para establecer si estos genes pudieran estar funcionalmente relacionados, y (2) el análisis del procesamiento del pre-ARNr 45S en los mutantes de la maquinaria de los miARN y en mutantes *fas*, mediante ensayos de *northern*.



IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria

Para la redacción de esta memoria se han seguido las pautas definidas en varias Tesis doctorales previas (Ponce Molet, 1996; Berná Amorós, 1997; Serrano Cartagena, 1998; Robles Ramos, 1999; Candela Antòn, 2001; Pérez Pérez, 2003; Sarmiento Maños, 2011; Micol Ponce, 2017), Trabajos de Fin de Grado (Navarro Quiles, 2015; Ruiz Bayòn, 2015; Juan Vicente, 2016; Sendra Ortolá, 2017) y de Fin de Máster (Micol Ponce, 2011; Ruiz Bayòn, 2016; Juan Vicente, 2017; Fontcuberta Cervera, 2018), realizados en los laboratorios de J.L. Micol y M.R. Ponce. En algunos apartados de Materiales y métodos se reproducen literalmente párrafos tomados de dichos trabajos.

IV.1.1.- Abreviaturas, acrónimos y fórmulas químicas

Hemos aplicado la normativa de la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) en lo referente a la formulación química y a las denominaciones de los compuestos empleados en este trabajo. No obstante, se ha preferido emplear los acrónimos castellanizados ADN y ARN —de uso común en los medios de comunicación españoles—, en lugar de los recomendados por la IUPAC, DNA y RNA, para los ácidos desoxirribonucleico y ribonucleico, respectivamente. Esta elección no está basada en ningún argumento que se considere incontestable; ambas opciones son aceptadas por el Diccionario de la Lengua Española (vigésimotercera edición, 2015) de la Real Academia Española (RAE). En esta memoria se emplean numerosas abreviaturas y acrónimos, la mayoría de los cuales se definen la primera vez que aparecen en el texto. Además, se han utilizado las abreviaturas de la Tabla 1, que corresponden mayoritariamente a las unidades de medida empleadas, que son las del Sistema Internacional.

Tabla 1.- Abreviaturas empleadas en este trabajo

A: absorbancia	m: metros	pb: pares de bases
cm: centímetros	M: molar	rpm: revoluciones por minuto
dde: días después de la estratificación	Mb: megabases	s: segundos
<i>et al.: et alii</i> (y otros)	mg: miligramos	v/v: volumen/volumen
g: gramos	min: minutos	W: vatios
Hz: hercios	ml: mililitros	°C: grados centígrados
h: horas	mm: milímetros	µg: microgramos
kg: kilogramos	mM: milimolar	µl: microlitros
l: litros	m/v: masa/volumen	µM: micromolar
MΩ: megaohmios	nm: nanómetros	µmol: micromoles

IV.1.2.- Gramática y terminología

Tal como recomienda la RAE en su Ortografía de la lengua española (2010), en esta memoria no se realiza el plural de las siglas añadiendo al final una s minúscula: se escribe “el ADN” y también “los ARN”. Se emplean algunos extranjerismos de uso común que carecen de una traducción al español generalmente aceptada, tales como *eppendorf* o *splicing*. El carácter foráneo de estas palabras se ha destacado en cursiva. No hemos traducido al español algunos de los nombres de genes y proteínas mencionados en esta memoria; en estos casos solo hemos usado la cursiva para los genes.

IV.1.3.- Citas bibliográficas

Las referencias en el texto se ordenan cronológicamente, siguiéndose un orden alfabético para autores de artículos publicados en el mismo año. Todos los autores de una publicación son mencionados en la bibliografía, mientras que en el texto solamente se cita al primero de ellos, salvo cuando son dos, que se menciona a ambos.

En este trabajo se citan como fuentes, en varias ocasiones, direcciones de Internet (URL; Uniform Resource Locator), en el formato <http://...> Estas citas se hacen con plena conciencia de que algunas de ellas son transitorias. Se trata de bases de datos, programas o documentos que existen sólo en formato electrónico y no tienen un equivalente impreso en papel, por lo que no pueden ser citados de otro modo que el empleado en esta memoria.

IV.2.- Estirpes empleadas en este trabajo

En este trabajo se han utilizado las estirpes silvestres de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Columbia-0 (Col-0), Enkheim-2 (En-2) y Landsberg *erecta* (Ler), obtenidas inicialmente del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC; <http://arabidopsis.info/>). También se han empleado los mutantes homocigóticos para los alelos, que se indican en la Tabla 3, en la página 25.

IV.3.- Cultivo de Arabidopsis

Los cultivos de Arabidopsis se realizaron a partir de semillas que habían sido previamente conservadas a 4°C durante al menos un día. Los cultivos se llevaron a cabo en placa de Petri o en maceta.

IV.3.1.- Cultivo en placa de Petri

La mayoría de los cultivos se iniciaron en placas de Petri de 15 cm de diámetro, que contenían unos 100 ml de medio sólido GM. La siembra de las semillas de Arabidopsis se

llevó a cabo tras su esterilización por inmersión con agitación, durante 8-12 min, en una disolución acuosa del 40% en lejía comercial (NaClO al 4 5% m/v) y 2 ml/l de Triton X 100 al 1% v/v, realizando a continuación tres lavados sucesivos con agua estéril.

La siembra en placas de Petri se realizó con material estéril, en una cabina de flujo laminar horizontal Telstar BH 100 o MH 100. Se sembraron de 16 a 100 semillas por placa de Petri, espaciándolas regularmente sobre la superficie del medio con la ayuda de una pipeta Pasteur y una plantilla dispuesta bajo la placa. Tras su siembra, las placas de Petri fueron precintadas con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, que constituye una barrera efectiva para cualquier partícula en aerosol, sin impedir el intercambio de gases con el exterior. Las placas de Petri inoculadas con las semillas se estratificaron durante al menos 24 h en posición invertida, a 4°C y en la oscuridad, con el fin de sincronizar su germinación, tras lo que fueron cultivadas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50-60% de humedad relativa, bajo iluminación continua de 75 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ de luz blanca, suministrada por tubos fluorescentes Sylvania Standard F20W/133-RS Cool White en cámaras de cultivo Conviron TC16 o TC30. El flujo de aire en estas cámaras es ascendente, impidiendo la condensación de agua en el interior de la tapa de las placas de Petri.

El crecimiento de las plantas 14 dde es tal que se puede apreciar a simple vista la morfología de la roseta y de sus hojas vegetativas, pudiendo discriminar a los individuos mutantes de los silvestres, en base a sus diferencias morfológicas.

IV.3.2.- Medios de cultivo líquido

Medio mínimo ATM: KNO_3 5 mM; KH_2PO_4 2,5 mM; MgSO_4 2 mM; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2 mM; FeNaEDTA 51 μM ; H_3BO_3 70 μM ; MnCl_2 14 μM ; CuSO_4 0,5 μM ; ZnSO_4 1 μM ; NaMoO_4 0,2 μM ; NaCl 10 μM ; y CoCl_2 0,01 μM Kranz y Kirchheim, 1987.

Para su preparación se añaden, a 900 ml de agua, 5 ml de KNO_3 1 M; 2,5 ml de KH_2PO_4 1 M; 2 ml de MgSO_4 1 M; 2 ml de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 M; 2 ml de FeNaEDTA 20 mM; y 1 ml de la disolución de micronutrientes, ajustando el volumen final a 1 l. Todas las disoluciones madre (*stock solutions*) se preparan en las concentraciones indicadas y se esterilizan por filtración. Las disoluciones madre de las sales deben añadirse a los 900 ml de agua, y no a la inversa, a fin de evitar la precipitación de complejos insolubles de fosfato cálcico.

La composición de la disolución de micronutrientes es la siguiente: H_3BO_3 70 mM; MnCl_2 14 mM; CuSO_4 0,5 mM; ZnSO_4 1 mM; NaMoO_4 0,2 mM; NaCl 10 mM y CoCl_2 0,01 mM. Se prepara añadiendo, a 900 ml de agua, 4,32 g de H_3BO_3 ; 2,77 g de

MnCl₂·4H₂O; 124 mg de CuSO₄·5H₂O; 287 mg de ZnSO₄·7H₂O; 48,7 mg de NaMoO₄·2H₂O; 584,4 mg de NaCl; y 2,38 mg de CoCl₂·6H₂O. Finalmente, se añade agua hasta 1 l.

IV.3.3.- Medios de cultivo sólidos

Los medios de cultivo sólidos fueron preparados por adición de agar para plantas (Plant Agar, Duchefa) y por adición de gelificante alimenticio (Gelrite, Duchefa), a una concentración final del 0,7% m/v, tras la disolución del resto de los componentes en agua desionizada, con una resistividad media de 15 MΩ/mm²·m. Una vez finalizada su esterilización en autoclave, a 1 kg/cm² y 121°C durante 20 min, los medios de cultivo se estabilizaron en un baño a 55°C antes de su vertido en placas de Petri, que se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal Telstar BH 100 o MH 100. Las placas de Petri con medio sólido fueron conservadas hasta un mes a una temperatura de 4°C, en posición invertida y precintadas.

Medio GM (Germinatium Medium): NH₄NO₃ 10,3 mM; H₃BO₃ 50,1 μM; CaCl₂ 1,5 mM; CoCl₂·6H₂O 0,05 μM; CuSO₄·5H₂O 0,05 μM; Na₂EDTA 55,4 μM; MgSO₄ 0,75 mM; MnSO₄·H₂O 50 μM; NaMoO₄·2H₂O 0,5 μM; KI 2,5 μM; KNO₃ 9,4 mM; KH₂PO₄ 0,62 mM; ZnSO₄·7H₂O 15 μM; sacarosa 29,2 mM; MES [ácido 2-(N-morfolino)-etano sulfónico] 2,3 mM, y 7 g/l de agar para plantas.

Para su preparación, se añadieron, a 900 ml de agua, 2,2 g de sales de Murashige y Skoog (Duchefa; Murashige y Skoog, 1962), 10 g de sacarosa y 0,5 g de MES (ácido 2-[N-morfolino]etano sulfónico). Se agitó la suspensión en un agitador magnético hasta la total disolución de sus componentes y se ajustó el pH a 5,7 con KOH 5 M y KOH 1 M (este último sirve para aproximar lo máximo posible). Posteriormente, se ajustó el volumen final a 1 l y se añadieron 7,5 g de agar para plantas o Gelrite. Por último, se esterilizó en autoclave.

IV.3.4.- Cultivo en maceta

Los cultivos en maceta se efectuaron en bandejas de plástico de 28 × 50 cm, con 42 alveolos, cada uno de ellos de 5 × 5 cm (diámetro × altura), introducidas en cubetas de unos 7 cm de profundidad. Se introdujo en cada alveolo, previamente a su relleno con el sustrato, una maceta de rejilla de 5 × 5 cm (diámetro × altura). Las macetas de rejilla impiden que el sustrato se adhiera al alveolo, facilitando la extracción de las plantas. Se empleó como sustrato una mezcla de perlita (granulometría de 1 a 3 mm; 105-125 kg/m³), vermiculita (granulometría de 1 a 3 mm; 80-100 kg/m³) y turba no fertilizada (turba rubia de musgo *Sphagnum*, de estructura gruesa; Grobmull Neuhaus), en una proporción

volumétrica 2:2:1. Cada alveolo se destinó al cultivo de una sola planta, que en la mayoría de los casos fue trasplantada, con ayuda de unas pinzas, desde la placa de Petri en la que había permanecido durante las primeras tres semanas de su ciclo de vida.

Estos cultivos permanecieron cubiertos con un plástico transparente, en el que se realizaron algunos agujeros a fin de evitar una excesiva condensación de agua, durante 6 días. Cuando se produce el alzado y la elongación de los entrenudos al término de la etapa vegetativa, se aísla a las plantas trasplantadas enfundándolas con cilindros de plástico transparente, denominados aracones (aracons; Beta Tech), que impiden el contacto entre individuos adyacentes y facilitan la recolección de las semillas.

Los cultivos en maceta se mantuvieron en una cámara climatizada, a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50-60% de humedad relativa, bajo iluminación continua, con luz blanca suministrada por tubos fluorescentes Sylvania 160 W F72T12 CW VHO Cool White o Philips F72T12/D/VHO 160 W 1500 SF, totalizando unos $75 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$.

Las bandejas estuvieron permanentemente subirrigadas, manteniéndose un nivel de unos 2-3 cm de agua en el fondo de las cubetas. El aporte de nutrientes se llevó a cabo dos veces por semana, mediante la adición de medio mínimo ATM. A partir del momento en que la floración se interrumpe, se suspende el riego, propiciándose así el secado de las plantas, que son mantenidas en la cámara de cultivo al menos dos semanas más, para proceder finalmente a la recolección de sus semillas.

IV.4.- Disoluciones

Se empleó siempre agua desionizada, con una resistividad media de $15 \text{ M}\Omega\text{mm}^2\cdot\text{m}$, y las disoluciones se conservaron a temperatura ambiente, salvo que se indique lo contrario.

IV.4.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico

Tampón de extracción: Tris-HCl 100 mM pH 8,0; Na_2EDTA 50 mM; NaCl 0,5 M. Se prepara a partir de disoluciones madre Tris-HCl 1 M; Na_2EDTA 0,5 M y NaCl 5 M. Puede conservarse varios meses a 4°C .

SDS al 20%: Se prepara disolviendo, a 68°C , 100 g de SDS (dodecilo sulfato de sodio) en 500 ml de agua y ajustando el pH a 7,2 con HCl.

IV.4.2.- Disoluciones para la electroforesis de ADN

TAE 50x: Tris-base [Tris-(hidroximetil)aminometano] 2 M; 5,71% v/v de ácido acético glacial; Na_2EDTA 50 mM pH 8,0. El pH final debe ser 7,6. Para preparar un litro se

mezclan 242 g de Tris-base, 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de Na₂EDTA 0,5 M pH 8,0.

Tampón de carga 6× para electroforesis en geles de agarosa: 20% m/v de Ficoll; 0,25% m/v de xilencianol; 0,25% m/v de azul de bromofenol; Na₂EDTA 10 mM. El tampón de carga se preparó con dos, uno o ningún colorante en función de las necesidades de visualización del ADN en el gel de agarosa.

Marcador de peso molecular para electroforesis en geles de agarosa: Se diluye el marcador (1 kb ladder de Gibco/BRL; 1 µg/µl) en tampón de carga hasta una concentración de 0,1 µg/µl. Se utilizan 6 µl por pocillo de un gel de agarosa convencional. Se conserva a -20°C.

IV.4.3.- Disoluciones para los ensayos de hibridación de tipo *northern*

IV.4.3.1.- Disoluciones para electroforesis de ARN

Todas las disoluciones se preparan con agua tratada con carbonato de dietilo (dietil pirocarbonato; DEPC), un potente inhibidor de RNAsas.

Agua tratada con DEPC: Se añade a un litro de agua 1 ml de DEPC, se agita vigorosamente y se mantiene a temperatura ambiente durante al menos 16 h, momento en el que se autoclava. Se mantiene a temperatura ambiente.

MOPS 10x: NaMOPS 0,2 M; NaOAc 50 mM; Na₂EDTA 10mM. El pH final debe ser 7,0. Para preparar un litro se mezclan 41,2 g de MOPS, 6,57 g de CH₃COONa y 3,7 g de EDTA en 800 ml de agua. Una vez disuelto, se enrasa a un litro con agua. El recipiente se cubre con papel de aluminio para evitar el contacto con la luz y se almacena a temperatura ambiente.

Tampón de carga: Para preparar el volumen necesario para una muestra de ARN (20 µl), se mezclan 12 µl de formamida desionizada; 4,44 µl de formaldehído al 37% v/v; 1,2 µl de tampón MOPS 10x; 2,4 µl de tampón de carga 6x para geles de agarosa convencionales y 0,8 µl de bromuro de etidio al 10% m/v.

Marcador de peso molecular: En el momento de la electroforesis, se diluyen 2 µl del marcador de peso molecular de ARN (RNA molecular weight marker I digoxigenin-labeled 0.3-6.9 kb; Roche) con 6 µl de agua.

IV.4.3.2.- Disoluciones para la transferencia

SSC 20x: NaCl 3 M; citrato sódico 0,3 M. Para preparar un litro se disuelven 175,3 g de NaCl y 88,2 g de citrato de sodio en 700 ml de agua tratada con DEPC. Se ajusta el

pH a 7,0 con HCl 0,3 M y se enrasa a un litro con agua. La disolución se autoclava y almacena a temperatura ambiente.

IV.4.3.3.- Disoluciones para la hibridación, lavado y detección de ARN

Disolución de hibridación: Na₂HPO₄ 0,5 M (pH 7,2); EDTA 1 mM (pH 7); SDS al 7% (w/v). Para preparar un litro se mezclan 134 g de Na₂HPO₄·7H₂O, 4 ml H₃PO₄ al 85% (v/v), 20 ml de EDTA 0,5 M y 550 ml de agua destilada. La disolución se autoclava, a continuación, se agregan 350 ml de SDS al 20% y se almacena a temperatura ambiente.

Disolución de lavado 1: SSC 2x y SDS 1%. Se mezclan 40 ml de SSC 20x y 1 ml de SDS al 20% y se enrasa a 200 ml con agua.

Disolución de lavado 2: SSC 0,2x y SDS 1%. Se mezclan 4 ml de SSC 20x y 1 ml de SDS al 20% y se enrasa con agua hasta 200 ml.

Disolución de detección 1: ácido maléico 0,1 M; NaCl 0,15 M; Tween 200 al 3 % v/v. Para preparar un litro se disuelven 11,68 g de ácido maléico y 8,76 g de NaCl en 700 ml de agua. Se ajusta el pH a 8,0 con NaOH y se enrasa a 997 ml con agua. La disolución se autoclava y almacena a temperatura ambiente. En el momento de su uso, se añaden 3 ml de Tween-20.

Disolución de detección 2: 0,5% m/v de agente bloqueante en la disolución de detección 1. En el momento en que debe usarse, se disuelven, calentando lentamente hasta que burbujee, 0,5 g de agente bloqueante en 100 ml de disolución 1. La disolución se deja enfriar al menos durante 20 min antes de su uso.

Disolución de detección 3: Tris-HCl 0,1 M; NaCl 0,1 M. Se prepara a partir de las disoluciones 1M de cada componente. Para preparar 200 ml, se mezclan 20 ml de Tris-HCl 0,1 M y 20 ml de NaCl 0,1 M y se enrasa con 160 ml de agua.

IV.5.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

IV.5.1.- Aislamiento de ácidos nucleicos

En este trabajo se han aislado únicamente ADN y ARN de Arabidopsis.

IV.5.1.1.- Aislamiento de ADN genómico

El ADN genómico utilizado como molde en las reacciones de amplificación mediante PCR se purificó empleando una versión simplificada del método de Dellaporta *et al.* (1983). Para ello, se introdujo en un tubo *ependorf* el material vegetal, habitualmente una hoja de la roseta, y se añadieron 500 µl de tampón de extracción y 2-3 perlas de vidrio de 3 mm de diámetro, previamente esterilizadas en autoclave. Las muestras se agitaron a 30 Hz durante 3 min en un macerador MM300 Mixer Mill (Qiagen 85120). A continuación, se

añadieron 35 μl de SDS al 20%, incubando la mezcla en un baño termostático a 65°C durante 10 min. Se añadieron 130 μl de KOAc 5 M y se incubó en hielo durante 5 min. Se centrifugó el tubo durante otros 10 min a la máxima velocidad en una microfuga (12.000-13.000 rpm). El sobrenadante se transfirió a un tubo *ependorf* nuevo y se precipitó el ADN con 640 μl de isopropanol y 60 μl de NaOAc 3 M, durante 20 min a 20°C. Seguidamente, se centrifugó durante otros 10 min a la máxima velocidad de la microfuga. Se eliminó el sobrenadante mediante decantación y se lavó el precipitado con 300 μl de etanol del 70%. Se centrifugó una vez más durante 3 min, se decantó de nuevo el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente. Por último, se resuspendió el ADN en 50 μl de agua y se almacenó a 4°C.

IV.5.1.2.- Aislamiento de ARN

Para la obtención de ARN se recolectaron 3 rosetas de 15 días en tubos *ependorf* que se sumergieron rápidamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron en hielo para su uso inmediato o se almacenaron a -80°C.

Las extracciones se llevaron a cabo empleando el *kit* comercial RNeasy (Qiagen 74904), siguiendo el protocolo de purificación total de ARN de células vegetales. Todas las centrifugaciones se realizaron en una microfuga a temperatura ambiente y a una velocidad de (10.000 rpm). Se determinó su concentración midiendo su absorbancia a 260 nm (A_{260}) en un espectrofotómetro y su pureza estableciendo los cocientes A_{260}/A_{280} , que debía ser próximo a 2. Su integridad se estableció mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% m/v.

IV.6.- Síntesis de ADN

IV.6.1.- Síntesis de oligonucleótidos y amplificaciones mediante PCR

Todos los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados por Sigma-Aldrich (Reino Unido). Sus secuencias, así como el propósito de su utilización se recogen en la Tabla 2.

Las condiciones de reacción de las amplificaciones mediante PCR dependieron de la naturaleza del ADN empleado como molde. Los cebadores se añadieron a una concentración final de 0,4 μM . La concentración final de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos fue de 0,2 mM. Se empleó la polimerasa *GoTaq* (Promega), una versión recombinante de la *Taq* de *Thermus aquaticus*, que es barata y suficientemente procesiva.

Tabla 2.- Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Propósito	Mutante	Nombre	Secuencia (5'→3')
Genotipado de mutantes	<i>fas1-1</i>	<i>fas1-1_F</i>	ACTATGGTAGCTGTGAAGAGTG
		<i>fas1-1_R</i>	TGAGCTGTTCTTCTGCATCATG
	<i>hyl1-11</i>	F21M12.9-6F	TTCTGTAAGTTATTGCTCTTGTC
		F21M12.9-2R	TCGTTTTGACAATGATCAGTAGG
	<i>ago1-27</i>	AGO1-F8	TCTGCCACCCTACAGAGTTTG
	<i>ago1-52</i>	AGO1-R6	GTCATAAAGATAGATAGAGGGTG
	<i>hyl1-2</i>	F21M12.9-5F	CCTCCACTGATGTTTCCTCTG
		F21M12.9-1R	CGATTGAAGAATCCAGGCAAAG
		LBb1.3	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT

Las reacciones se llevaron a cabo en tubos *ependorf* de pared fina de 0,2 ml, en termocicladores Applied Biosystems 2700 o 9700, o BIO-RAD MyCycler o T100, en los que se programó un número de ciclos comprendido entre 35 y 40. La duración de la etapa de polimerización dependió del tamaño de la molécula que se pretendía amplificar, asumiéndose que la *GoTaq* sintetiza ADN a razón de una kb/min. Los volúmenes de reacción oscilaron entre 10 y 25 μ l.

IV.6.2.- Genotipado de mutantes

Se han realizado tres tipos de genotipados, todos ellos tenían como punto de partida la amplificación por PCR de la región genómica que contenía la mutación. Para las líneas insercionales, la discriminación entre alelos se basó en la observación directa de los productos de PCR. La presencia o ausencia de las mutaciones puntuales pudo establecerse por análisis de restricción de los productos de PCR o por su secuenciación por Sanger, dependiendo del caso.

IV.6.2.1.- Identificación molecular de mutaciones insercionales

Para el genotipado de mutaciones insercionales se emplearon volúmenes de 10 μ l que incluían los cebadores descritos en el apartado IV.6.1, combinándose LP y RP (F + R) para la amplificación del alelo silvestre del gen a estudio y LB con RP (LB + R) para el mutante. (Figura 5, página 20).

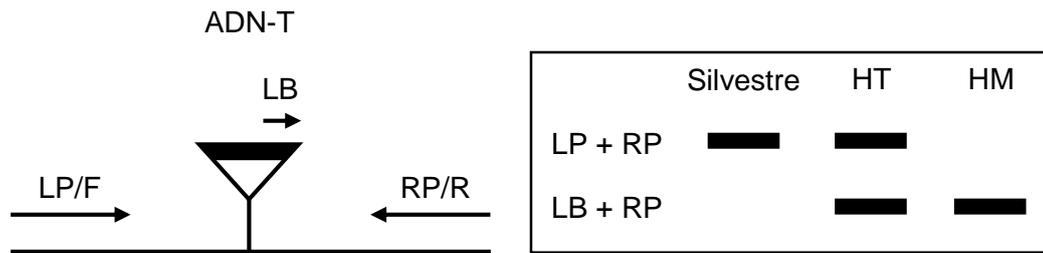


Figura 5.- Esquema del genotipado de líneas insercionales de ADN-T. Las abreviaturas HT y HM corresponden a heterocigoto y homocigoto mutante, respectivamente. Modificado de la página de <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>.

IV.6.2.2.- Genotipado mediante análisis de CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)

La metodología de CAPS se basa en la discriminación entre dos segmentos de ADN, habitualmente productos de PCR, basada en la presencia o ausencia de una diana de restricción. En el caso de la mutación *fas1-1*, se elimina la diana de restricción *Bse*YI (CCCAGC), presente en el alelo silvestre. Las digestiones se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ l, que incluían 5 μ l de los 10 de la reacción de PCR, 0,5 Unidades de la enzima *Bse*YI (New England Biolabs; NEB) 0,5 μ l y 1 μ l del tampón 10xNEB, recomendado por el fabricante. La reacción se mantuvo a 37°C durante 90 min en un termociclador. A continuación, se inactivó la enzima incubándola a 80°C durante 20 min. Finalmente, la mitad de los volúmenes de las digestiones se cargaron en un gel de agarosa al 1% m/v.

IV.6.2.3.- Identificación molecular de mutaciones por secuenciación

Para el genotipado de mutaciones puntuales que debían identificarse por secuenciación de Sanger, se realizaron amplificaciones de los segmentos de ADN que contenían las correspondientes mutaciones, en un volumen de 25 μ l. Se utilizaron 2 μ l para comprobar la presencia y el tamaño de los productos, sometiéndolos a electroforesis en un gel de agarosa al 1 % m/v. Los 23 μ l restantes se trataron con una mezcla de las enzimas exonucleasa I y FastAP (Invitrogen), según las recomendaciones del fabricante; la primera de ellas es una nucleasa de cadena sencilla que elimina los cebadores no incorporados; FastAP es una fosfatasa alcalina que desfosforila los nucleótidos no incorporados. Las muestras, junto con un alícuota de los cebadores necesarios para su secuenciación, se enviaron a la empresa STAB VIDA (<https://www.stabvida.com/>).

IV.7.- Hibridación de *northern*

La hibridación de tipo *northern* permite la detección de moléculas de ARN de interés, utilizando una sonda complementaria. Comienza con la extracción del ARN, su separación mediante electroforesis en geles de agarosa, su transferencia a una membrana, hibridación con la sonda y detección. En este TFM se han empleado como sondas oligonucleótidos marcados en su extremo 5' con una molécula de digoxigenina. La detección se llevó a cabo con un anticuerpo antidigoxigenina (anti-DIG) conjugado con la enzima fosfatasa alcalina y con el sustrato CDP-Star ($C_{18}H_{19}Cl_2O_7Na_2P$) mediante una reacción quimioluminiscente. Cuando la fosfatasa alcalina desfosforila el sustrato incoloro se produce la emisión de luz que es detectada mediante una película de rayos X.

Para la electroforesis del ARN se disolvieron en un microondas 1,45 g de agarosa en 100 ml de agua. En paralelo, se preparó una disolución con formaldehído al 36% y MOPS 10x añadiendo de cada uno 12,1 ml y 7 ml, respectivamente. Ambas disoluciones se calentaron durante 30 min a 55°C, se mezclaron y vertieron en un portageles donde la mezcla solidificó. Se prepararon las muestras diluyendo 3 µg de ARN con agua, hasta alcanzar un volumen de 8 µl. Se añadió a cada muestra 20 µl del tampón de carga, se desnaturalizaron a 65°C durante 10 min y transfirieron a hielo, en donde se mantuvieron hasta su carga en el gel. La electroforesis trascurrió a 90 V durante unas 2 h, usando tampón MOPS 1X como electrolito.

Tras la electroforesis se enjuagó el gel dos veces con agua durante 10 min, y otras dos veces con SSC 10x durante 15 min. Tras los lavados, se llevó a cabo la transferencia del ARN del gel de agarosa a una membrana de nailon.

Para proceder a la transferencia, se colocó como soporte el portageles en posición invertida en una bandeja con 400 ml de SSC 10x, que se usó como tampón de transferencia. Se cubrió con una tira de papel de filtro Whatman del ancho del portagel y de longitud suficiente para que los extremos se sumerjan en el tampón de transferencia. Sobre el papel, se colocó el gel y sobre éste la membrana de nailon que humedecida con SSC 10x. Por último, se añadieron sobre la membrana 3 papeles de filtro Whatman del mismo tamaño que el gel, también humedecidos con SSC 10x, y una columna de papeles de filtro de uso general en el laboratorio, de unos 4 cm de grosor y una placa de metacrilato del mismo tamaño. El montaje se presionó con el peso de una botella de 100 ml llena de agua, y se dejó durante toda la noche (Figura 6, página 22).



Figura 6.- Esquema del montaje para la transferencia de ARN de un gel de agarosa a una membrana de nylon.

Terminada la transferencia, se procedió a fijar covalentemente el ARN a la membrana con un *crosslinker*, exponiendo la cara que se había mantenido en contacto con el gel durante la transferencia a una radiación UV de $120 \mu\text{J}/\text{cm}^2$. A continuación, se inició la etapa de hibridación, que se realizó en tubos de hibridación con la disolución de prehibridación, en un horno a 65°C y rotación constante. Se introdujo la membrana en el tubo con 20 ml de la disolución de prehibridación durante 2 h. Se desechó la disolución y se sustituyó con otros 10 ml de disolución de hibridación (disolución de prehibridación más 350 ng de la sonda), dejándola toda la noche en las mismas condiciones que la prehibridación.

Tras la hibridación, se realizaron 4 lavados a temperatura ambiente con 50 ml de disolución de lavado, dos de 5 min con la disolución 1 y otras dos de 15 min con la 2. A continuación, se inició la detección, que se realizó a temperatura ambiente. Para ello, se transfirió la membrana a un tubo de hibridación con 20 ml de la disolución de detección 1, y se mantuvo en el horno de hibridación durante 5 min. Se desechó la disolución y se añadieron 20 ml de la disolución de detección 2, manteniéndose 30 min, antes de cambiar esta disolución por 15 ml de la misma a la que se había añadido $1 \mu\text{l}$ del anti-DIG-AP (Roche), incubándose durante 20 min. Después, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con 50 ml de la disolución de detección 1 y finalmente se lavó la membrana con 50 ml de disolución de detección 3, durante 5 min. Se extendió la membrana sobre un plástico transparente y se añadió sobre ella, hasta cubrirla en su totalidad, CDP-Star (Roche), un

sustrato luminiscente por la actividad de la fosfatasa alcalina. Se cubrió con otra lámina de plástico transparente. Se tapó con papel de aluminio para proteger el sustrato de la luz, y se incubó la reacción quimioluminiscente durante 5 min. A continuación, se introdujo el *sándwich* de plástico que contenía la membrana en el casete de revelado, y en una habitación oscura se colocó una película sensible a rayos X, manteniéndose durante un tiempo que varió entre 30 min y 1 h, en función de la sonda.

Para el revelado, se dispusieron en fila, en una habitación oscura, tres cubetas de uso fotográfico. La primera con líquido revelador (AGFA, Bélgica), en la que se introdujo la película de rayos X hasta que las bandas se hicieron visibles, transfiriéndose entonces a la segunda que contenía el líquido fijador (AGFA, Bélgica), que detendría la reacción de revelado, en donde se mantuvo durante 3 min, para finalmente lavarla con agua en la tercera cubeta.





V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1.- Análisis de interacciones génicas entre mutantes en el gen *FAS1* y los de la maquinaria de los miARN

El análisis de dobles mutantes es una herramienta clásica del análisis genético que permite inferir la función de un gen, o identificar genes funcionalmente relacionados. Se entiende por interacción sinérgica la que genera en dobles mutantes rasgos más extremos, o nuevos, o que suprime los de los mutantes simples parentales. También es una evidencia de relación funcional la aparición de epistasia, que se produce cuando los rasgos fenotípicos producidos por la homocigosis de una mutación enmascaran los de la otra, en los dobles mutantes. Sin embargo, si el doble mutante no presenta cambios fenotípicos con respecto a sus parentales, observándose la mera suma de los fenotipos, se asume que existe aditividad y por tanto, que los genes implicados en los cruzamientos no están funcionalmente relacionados (Pérez-Pérez *et al.*, 2009).

Para el análisis de los dobles mutantes se analizaron inicialmente poblaciones F₃ o F₄ procedentes de los cruzamientos entre *fas1-1* (en fondo genético En-2) y algunos mutantes de la maquinaria de los miARN, obtenidos a partir de Ler o Col-0 (Tabla 3).

Tabla 3.- Alelos mutantes utilizados en este TFM

Mutante	Fondo	Mutágeno	Mutación	Efecto proteína	Tipo	Referencia
<i>ago1-27</i>	Col-0	EMS	Puntual (C→T)	Cambio de sentido	Hipomorfo	Morel <i>et al.</i> , 2002
<i>ago1-52</i>	Ler	EMS	Puntual (G→A)	Truncamiento	Hipomorfo	Jover-Gil <i>et al.</i> , 2012
<i>hst-16</i>	Col-0	ADN-T	Inserción	Truncamiento	Nulo	Park <i>et al.</i> , 2005
<i>hen1-6</i>	Col-0	ADN-T	Inserción	Truncamiento	Nulo	Li <i>et al.</i> , 2005
<i>hen1-13</i>	Ler	Neutrones	Reorganización	Truncamiento	Nulo	Li <i>et al.</i> , 2005
<i>hyl1-2</i>	Col-0	ADN-T	Inserción		Nulo	Song <i>et al.</i> , 2007
<i>hyl1-11</i>	Ler	EMS	Puntual (C→T)	Sin sentido	Nulo	Jover-Gil <i>et al.</i> , 2012
<i>fas1-1</i>	En-2	Rayos X	Puntual (C→T)	Sin sentido	Nulo	Reinholz, 1966
<i>fas1-4</i>	Col-0	ADN-T	Inserción	Truncamiento	Nulo	Mozgová <i>et al.</i> , 2010

Estas poblaciones procedían de cruzamientos que se habían realizado previamente en el laboratorio y como entendimos que la mezcla de fondos genéticos pudiera contribuir a la interpretación errónea de los resultados, se han repetido en este TFM algunos de los cruzamientos, utilizando el alelo insercional *fas1-4* (en fondo Col-0; Exner *et al.*, 2006), cuyas F₂ aún no han sido analizadas. No hemos encontrado mutantes *fas1* en fondo Ler.

V.1.1.- Análisis de las interacciones genéticas de *FAS1* con *AGO1*

V.1.1.1.- Genotipado de las familias F₄ *fas1-1* x *ago1-52* y *fas1-1* x *ago1-27*

Para la identificación de los dobles mutantes *fas1-1 ago1-52* y *fas1-1 ago1-27*, se sembraron las F₄ provenientes de los cruzamientos de *fas1-1* y *ago1-52* y *ago1-27*, seleccionándose aquellos individuos que presentaron un fenotipo más extremo que el de cualquiera de sus parentales.

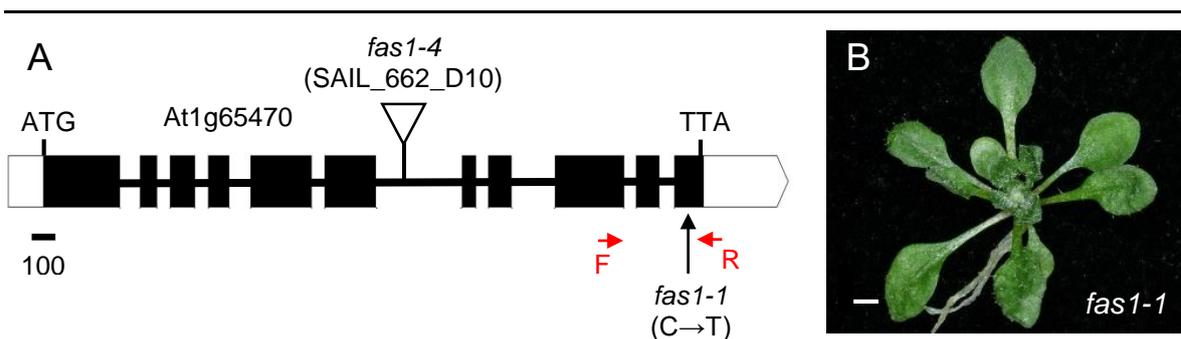


Figura 7.- Localización de la mutación *fas1-1* en el gen *FAS1* y sus efectos fenotípicos. (A) Estructura de la unidad transcripcional del gen *FAS1* con indicación de la posición de las mutaciones *fas1-4* y *fas1-1*. Los rectángulos negros representan los exones, y las líneas que los separan, los intrones. Se representan en color blanco las regiones líder (5'-UTR) y tráiler (3'-UTR). (B) Fenotipo del mutante *fas1-1*. La fotografía se tomó 15 dde. La barra de escala representa 1 mm.

Se extrajo su ADN genómico (véase el apartado IV.5.1.1) y se comprobó la presencia de la mutación *fas1-1* en homocigosis (Figura 7A y Figura 7B, página 25) mediante análisis de CAPS, tal como se describe en el apartado IV.6.2.2. La mutación *fas1-1* elimina la diana de restricción *BseYI* (CCCAGC), presente en el alelo silvestre, generando dos productos de 451 y 116 pb en el caso del alelo silvestre y no digiriendo el producto del mutante, de 567pb. La discriminación entre alelos se realizó teniendo en cuenta únicamente las bandas de tamaño mayor puesto que, para poder separarlas, las electroforesis transcurrieron durante un tiempo prolongado, lo que provocó que la de 116 pb se saliera del gel.

Diez de los once individuos de los cruzamientos por *ago1-52* resultaron ser homocigóticos para *fas1-1* y sólo el individuo 7 fue heterocigótico. En el caso de los cruzamientos por *ago1-27*, se encontraron plantas con los tres genotipos, siendo mayoritarios los homocigóticos para el alelo silvestre (12 de 19) y sólo dos individuos, el 6 y el 9 fueron homocigóticos para *fas1-1*. Este último resultado fue inesperado, ya que se seleccionaron para el análisis individuos con fenotipos extremos (Figura 8, página 26).

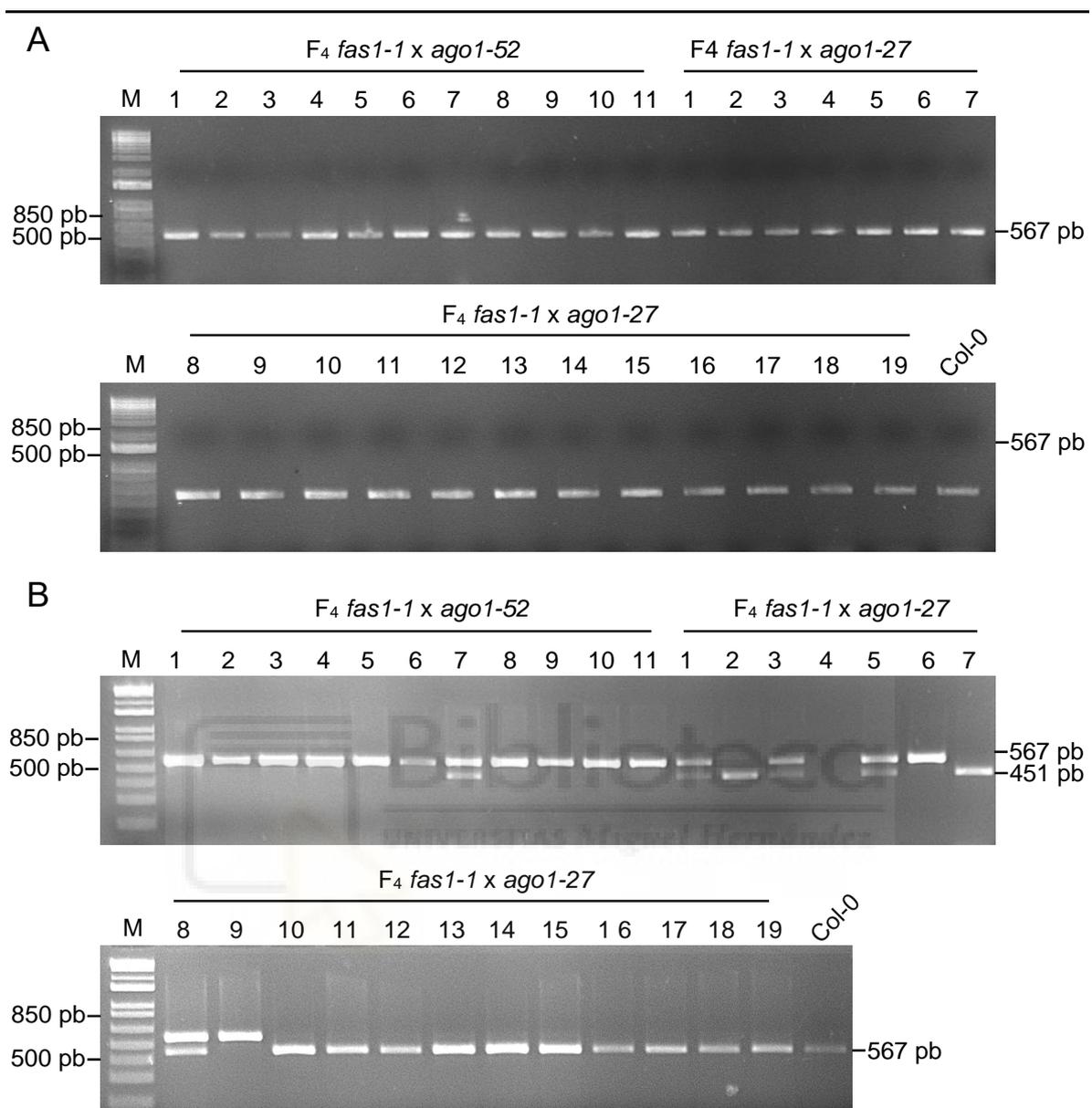


Figura 8.- Genotipado de los presuntos dobles mutantes. (A) Resultados de las amplificaciones del gen *FAS1* con ADN genómico de los individuos seleccionados, provenientes de los cruzamientos de *fas1-1 x ago1-52* y *fas1-1 x ago1-27*. (B) Resultados de las digestiones enzimáticas de la amplificación mostrada en A, con la endonucleasa de restricción *BseYI*. Se empleó ADN genómico de Col-0 como control positivo. La abreviatura M corresponde al marcador de peso molecular.

Debe tenerse en cuenta que la expresividad de las mutaciones *ago1*, así como las del resto de los mutantes de la maquinaria de los miARN, es variable ya en su propio fondo genético, y más aún cuando se mezclan fondos, lo que pudiera contribuir a confusión en la selección.

Se seleccionaron los individuos 1, 2, 3 y 10 del cruzamiento por *ago1-52* y el 6 y 9 del de *ago1-27*, para genotipar las mutaciones puntuales *ago1-52* y *ago1-27*, que se encuentran muy próximas en el gen (Figura 9A, página 27), pero que sólo se pueden verificar por secuenciación.

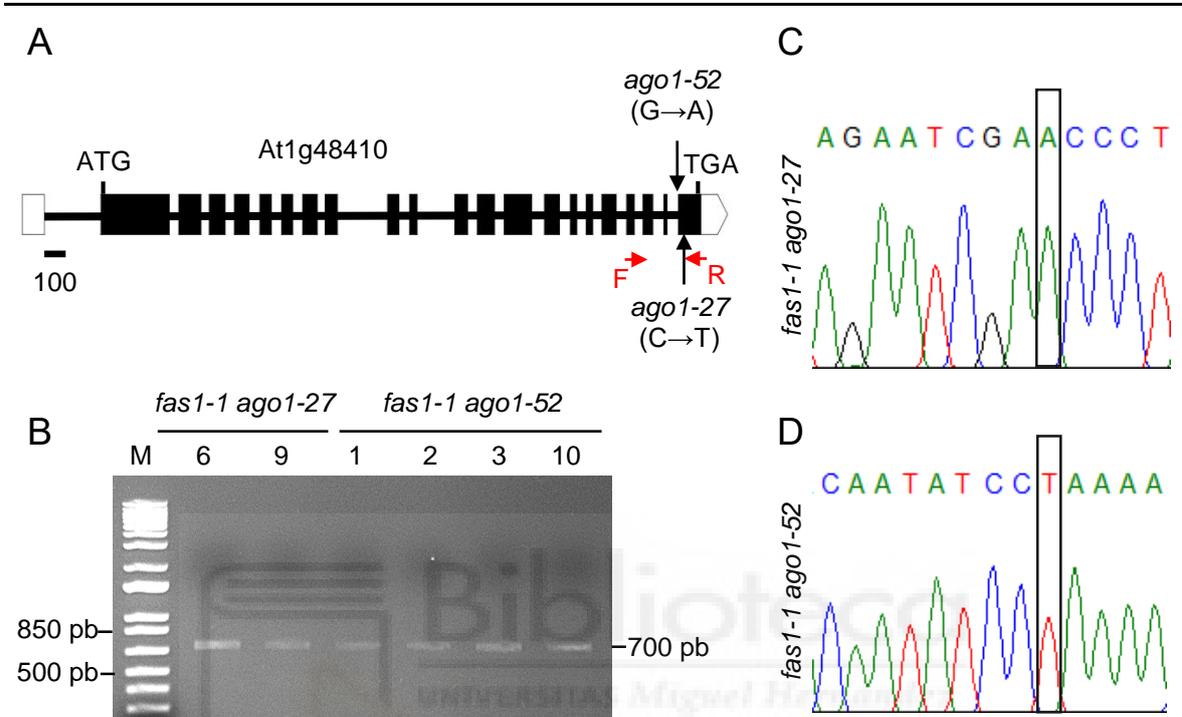


Figura 9.- Identificación molecular de las mutaciones *ago1-27* y *ago1-52* en los individuos dobles mutantes seleccionados. (A) Estructura de la unidad de transcripción del gen *AGO1* indicando la posición de las mutaciones con flechas negras. Los rectángulos negros representan los exones, las líneas que los separan, los intrones y las flechas rojas los cebadores usados en el genotipado. Se representan en color blanco las regiones líder (5'-UTR) y tráiler (3'-UTR) (B) Amplificación del gen *AGO1*. (C y D) Electroferogramas parciales obtenidos de la secuenciación de las bandas indicadas en B. Se encuadran en un rectángulo negro la posición de las mutaciones *ago1-27* y *ago1-52*, respectivamente.

Se amplificó por PCR el gen *AGO1* empleando los cebadores AGO1-F8 y AGO1-R6 (Tabla 2.-), obteniendo un producto de aproximadamente 700 pb (Figura 9B, página 27) que posteriormente fue secuenciado con el cebador AGO1-R6. Los seis individuos resultaron ser homocigóticos para el correspondiente alelo *ago1* (Figura 9C y Figura 9D, página 27).

V.1.1.2.- Fenotipo de los dobles mutantes *fas1-1 ago1-52* y *fas1-1 ago1-27*

Entre los individuos *fas1-1 ago1-52* encontramos dos tipos de fenotipos claramente diferenciados.

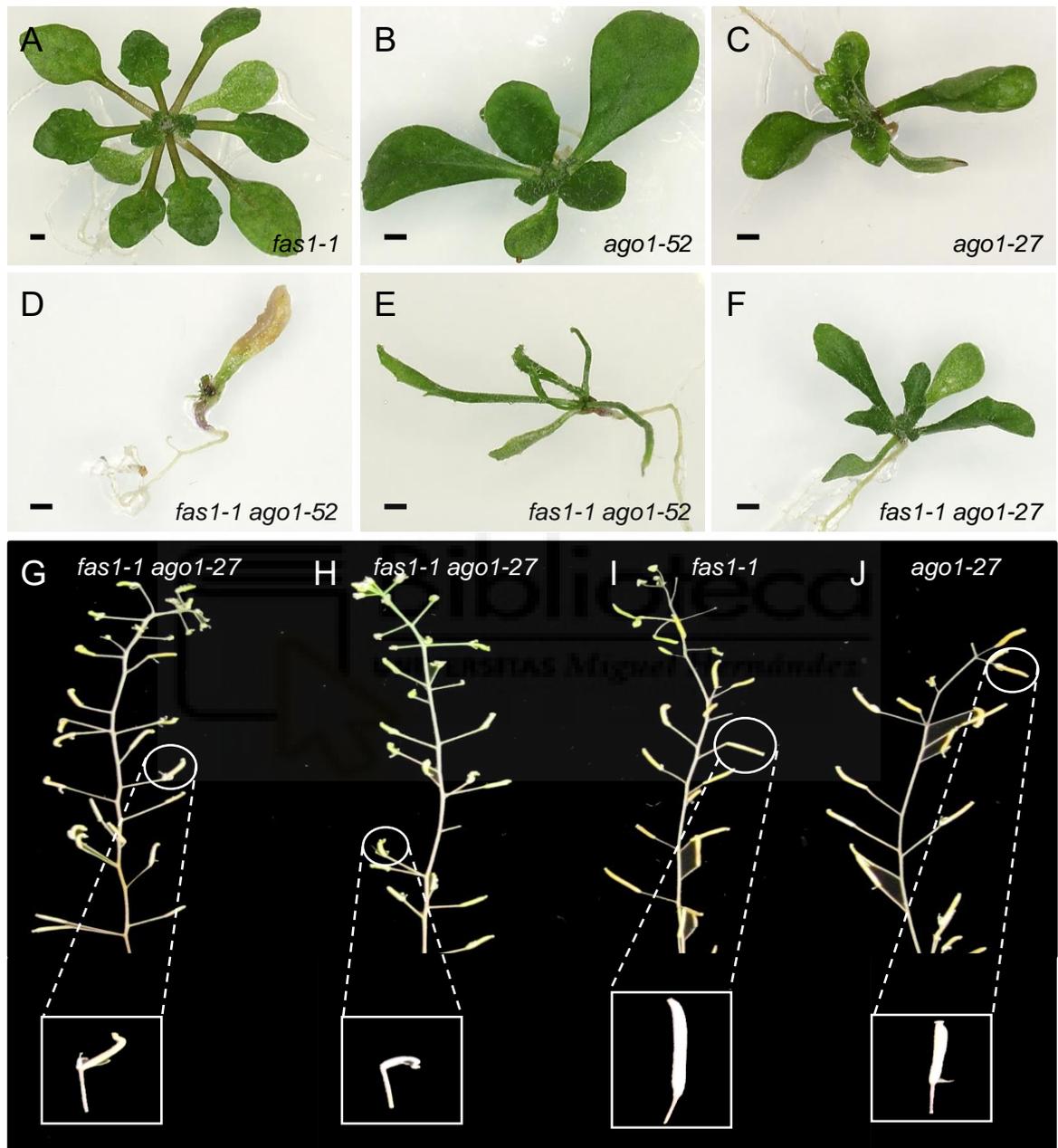


Figura 10.- Fenotipos de los dobles mutantes *fas1-1 ago1-52* y *fas1-1 ago1-27*. Rosetas de los mutantes (A) *fas1-1*, (B) *ago1-52*, (C) *ago1-27*, (D y E) doble mutante *fas1-1 ago1-52* y (F) doble mutante *fas1-1 ago1-27*. Silicuas del doble mutante (G y H) *fas1-1 ago1-27* y de los mutantes simples (I) *fas1-1* y (J) *ago1-27*. Se muestran imágenes magnificadas del fenotipo de las silicuas marcadas con un círculo. Las fotografías se tomaron (A-F) 18 dde y (G-J) 52 dde. Las barras de escala representan 1 mm.

El primero en el que la plántula germinada apenas desarrolla una diminuta hoja (Figura 10D, página 28) y un segundo donde las plantas desarrollan alguna hoja con fenotipo acicular, alargadas y estrechas (Figura 10E, página 28). En ambos casos resultaron letales por no completar su ciclo de vida, hecho que evidencia la sinergia fenotípica de este doble mutante.

Los dos dobles mutantes *fas1-1 ago1-27* aislados mostraron rosetas con fenotipo muy similar al de su parental *ago1-27*, pero menor tamaño (Figura 10F, página 28). Sin embargo, a diferencia de sus parentales, los dos individuos dobles mutantes aislados desarrollando silicuas extremadamente pequeñas, retorcidas y prácticamente vacías de semillas (Figura 10G y Figura 10H, página 28).

El desarrollo anormal de las silicuas en *Arabidopsis*, está asociado con problemas en la fertilidad debido a la carencia de embriones y/o la presencia de óvulos sin desarrollar. La disminución considerable de la fertilidad y la descendencia de estos dobles mutantes respecto a los mutantes simples, permite concluir que del mismo modo que en el doble mutante *fas1-1 ago1-52*, el doble mutante *fas1-1 ago1-27* es sinérgico.

V.1.2.- Análisis de las interacciones genéticas de *FAS1* con *HYL1*

V.1.2.1.- Genotipado de las familias F₃ *fas1-1* x *hyl1-2* y *fas1-1* x *hyl1-11*

Para la identificación de los dobles mutantes *fas1-1 hyl1-2* y *fas1-1 hyl1-11*, se sembraron las F₃ provenientes de los respectivos cruzamientos, seleccionándose aquellos individuos que presentaron un fenotipo *hyl1* o más extremo que el de cualquiera de sus parentales. Para el genotipado de la mutación *fas1-1* se procedió tal como se describe en el genotipado de las F₄ *fas1 ago1* (Apartado V.1.1.1 en la página 24).

Se comprobó que todas las plantas analizadas, exceptuando las 8, D, E y F del cruzamiento *fas1-1* por *hyl1-2* eran homocigóticos para la mutación *fas1-1* (Figura 11, página 30), y se seleccionaron para genotipar las mutaciones *hyl1*.

La mutación *hyl1-2* (SALK_064863) es insercional (Figura 12A, página 31) y para su genotipado se emplearon los cebadores F21M12.9-5F (LP), F21M12.9-1R (RP) y LBb1.3 (Tabla 2). La combinación (LP + RP) permite la amplificación de un fragmento de 692 pb en el alelo silvestre (Figura 12B, página 31) y la combinación (LP + LB) una de aproximadamente 610 pb, únicamente detectable si el individuo posee el ADN-T, ya que el cebador LBb1.3 hibrida en su borde izquierdo (LB). Siete de los 9 individuos de fenotipos más extremos (1-7) fueron dobles mutantes *fas1-1 hyl1-2* (Figura 12B, página 31).

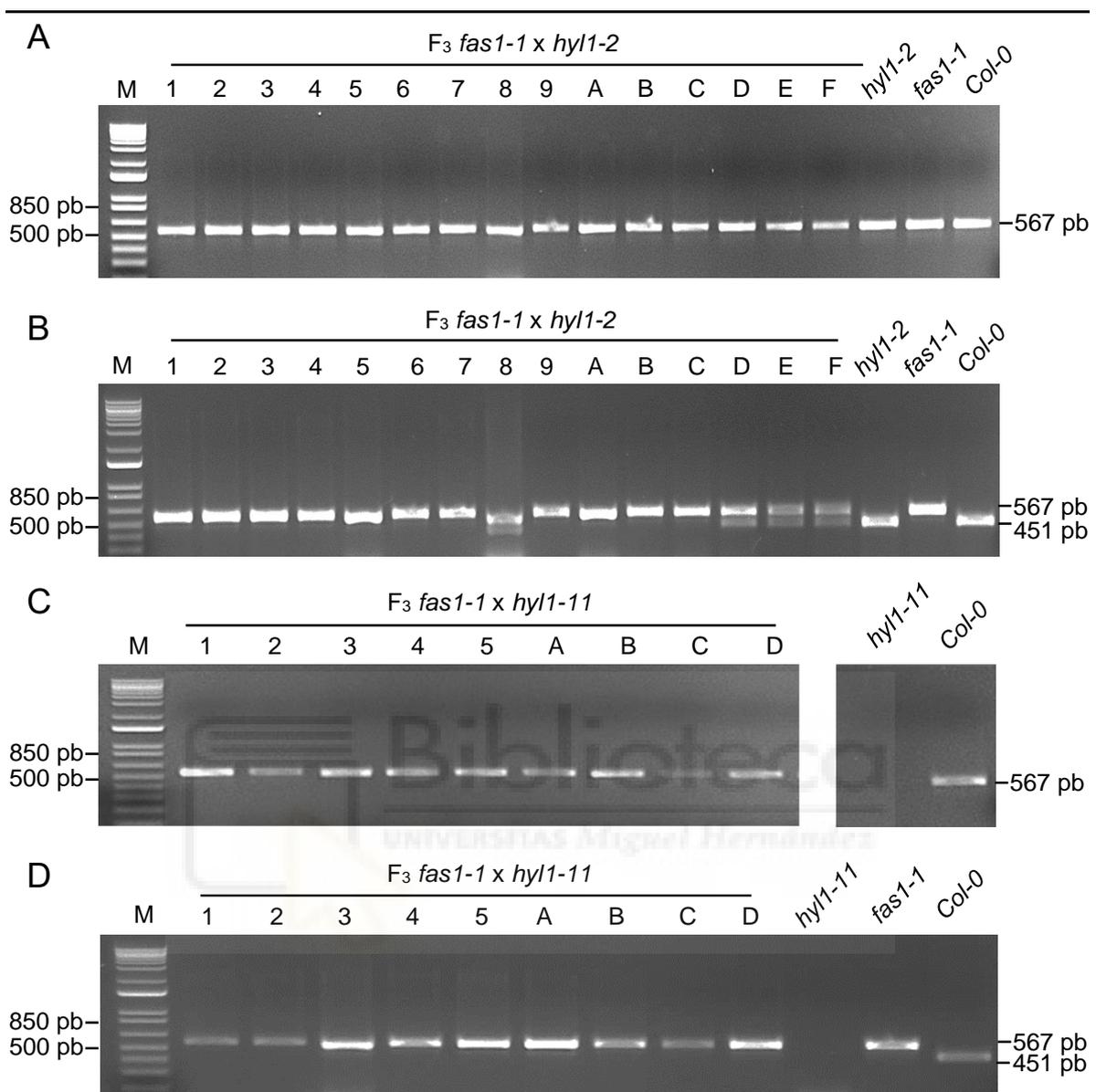


Figura 11.- Genotipado de *FAS1* en los presuntos dobles mutantes *fas1-1 hyl1*. (A y C) Resultados de las amplificaciones del gen *FAS1* con ADN genómico de los individuos seleccionados, provenientes de los cruzamientos de (A) *fas1-1 x hyl1-2* y (C) *fas1-1 x hyl1-11*. (B y D) Resultados de las digestiones enzimáticas con la enzima *BseYI* de las amplificaciones mostradas en A y C, respectivamente. Se empleó ADN genómico de *Col-0*, *fas1-1*, *hyl1-11* y *hyl1-2* como controles de la digestión. La abreviatura M corresponde al marcador de peso molecular.

Para el genotipado de la mutación *hyl1-11* (Figura 12A, página 31), se amplificó el gen *HYL1* con los cebadores F21M12.9-6F y F21M12.9-2R (Tabla 2) y se envió a secuenciar el producto resultante, de 500 pb de los individuos 3, 4, 5, 6 y 7 secuenciándose con el cebador F21M12.9-2R (Figura 12C, página 31).

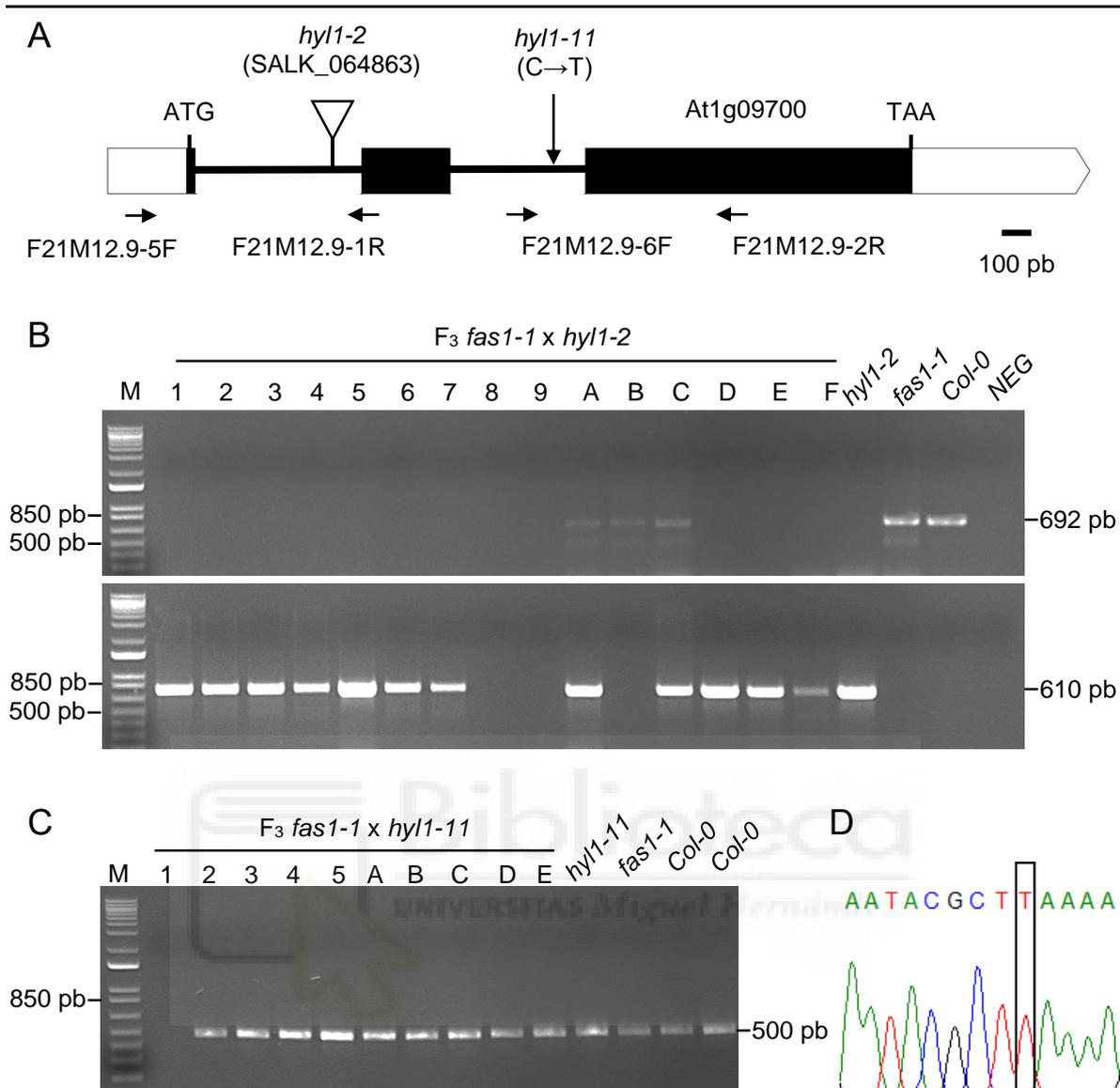


Figura 12.- Genotipado de las mutaciones *hyll-2* y *hyll-11*. (A) Estructura de la unidad transcripcional del gen *HYLI* indicando la posición de las mutaciones. Los rectángulos negros representan los exones, las líneas que los separan, los intrones y las flechas los cebadores empleados en el genotipado. Se representan en color blanco las regiones líder (5'-UTR) y tráiler (3'-UTR). (B) Amplificación empleando la combinación de cebadores (LP + RP) arriba y (LP + LB) abajo utilizando ADN de individuos F₃ *fas1-1* x *hyll-2* en las imágenes de arriba y abajo, respectivamente. (C) Amplificación del gen *HYLI* en los individuos seleccionados de familias F₃ *fas1-1* x *hyll-11*. (D) Electroferograma parcial obtenido de la secuenciación de las bandas indicadas en C. Se encuadra en un rectángulo negro la posición de la mutación *hyll-11*.

Concluimos que los individuos 3 y 4 eran los dobles mutantes *fas1-1 hyll-11* (Figura 12D, página 31). También se han realizado los cruzamientos entre los mutantes *hyll-2* (SALK_064863) y *hyll-11* x *fas1-4* (SAIL_662_D10) para obtener los dobles mutantes en el mismo fondo genético Col-0, actualmente vamos a analizar la progenie F₂.

V.1.2.2.- Fenotipo de los dobles mutantes *fas1-1 hyl1-2* y *fas1-1 hyl1-11*

Los dobles mutantes *fas1-1 hyl1-2* tienen menos hojas y más pequeñas que sus parentales, lo que genera una reducción importante en el tamaño final de la roseta (Figura 13C y Figura 13D, página 32). En su etapa reproductiva el alzado de las plantas es menor que en los mutantes simples, produciendo un tallo principal muy endeble y varios tallos secundarios que emergen de un mismo punto, como se observa en el parental *fas1-1* (Figura 13F y Figura 13G, página 32). Los dobles mutantes *fas1-1 hyl1-11*, que son letales, únicamente desarrollan pequeñas estructuras amorfas en lugar de hojas, impidiendo distinguir claramente una roseta (Figura 13J y Figura 13K, página 32).

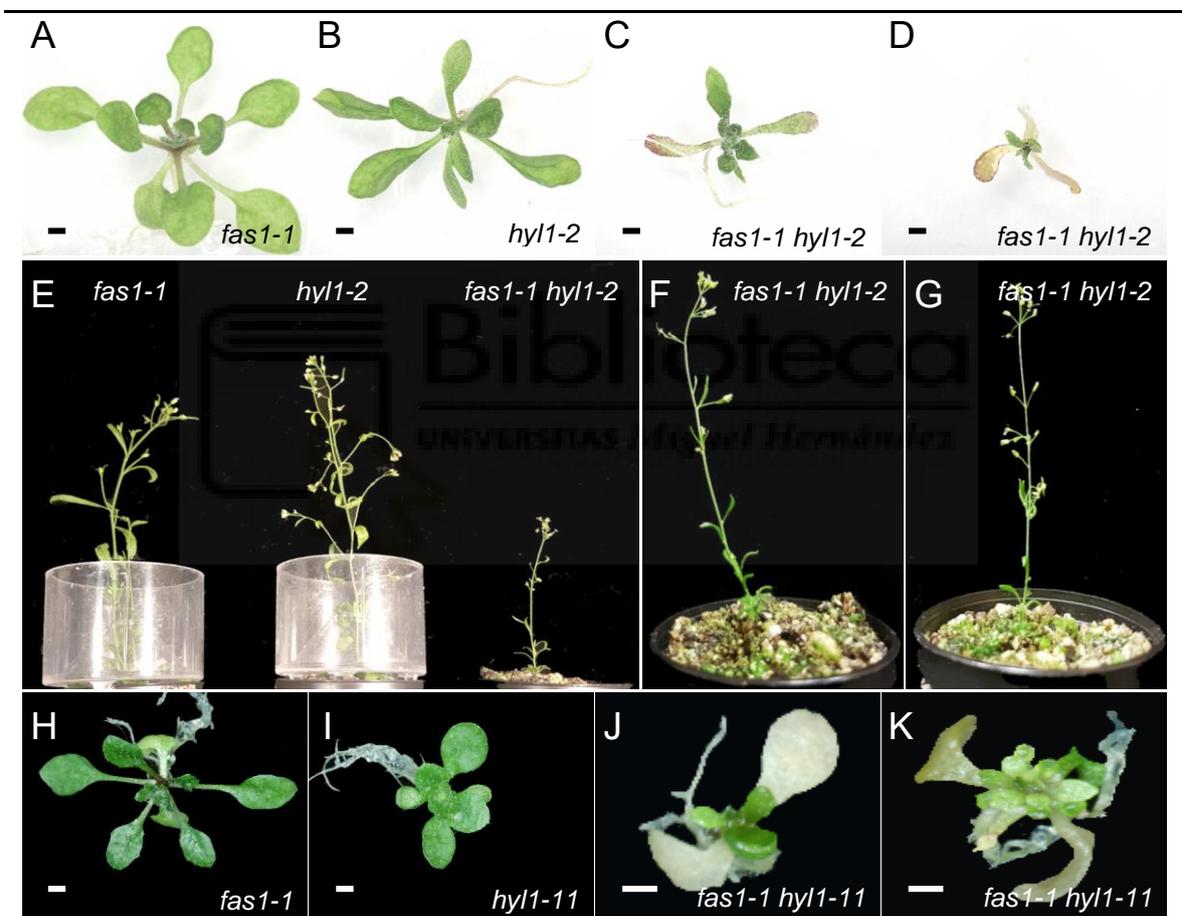


Figura 13.- Fenotipos de los dobles mutantes *fas1-1 hyl1-2* y *fas1-1 hyl1-11*. (A) *fas1-1*, (B) *hyl1-2*, (C y D) doble mutante *fas1-1 hyl1-2*. (E-G) Porte de la planta del doble mutante *fas1-1 hyl1-2* con sus parentales. (F y G) Detalle del fenotipo del doble mutante *fas1-1 hyl1-2* en el porte. (H-K) Fenotipo del doble mutante *fas1-1 hyl1-11*. Las fotografías se tomaron (A-D) y (H-K) 18 dde y (E-G) 32 dde. Las barras de escala representan 1 mm.

Interpretamos estos resultados y los de *ago1* como sinérgicos, lo que sugeriría la participación conjunta de estos genes en la biogénesis del ribosoma, quizá a través de la

compactación de la cromatina, puesto que los mutantes *ago1* y *hyl1* presentan descompactación durante la meiosis masculina, tal como hemos descubierto en colaboración con el grupo de J. L. Santos (Oliver *et al.*, 2017).

V.1.3.- Interacciones genéticas de *FAS1* con *HST* y *HEN1*

Del mismo modo que hemos identificado los dobles mutantes *fas1 ago1* y *fas1 hyl1* estamos analizando las familias F_2 y F_3 de los siguientes dobles mutantes *fas1-1 hen1-13*, *fas1-1 hen1-6*, *fas1-1 hst-16* y *fas1-1 hst-21*. Así mismo hemos realizado los cruzamientos de los mutantes *ago1-52*, *ago1-27*, *hyl1-2*, *hyl1-11*, *hst-21*, *hst-16*, *hen1-6* y *hen1-13* con el mutante *fas1-4*, (SAIL_662_D10) que se encuentra en fondo genético Col-0. Y los resultados previos del análisis de las F_3 *fas1-1* x *hen1-13* y F_3 *fas1-1* x *hst-16* se observan en la Figura 14, página 33.

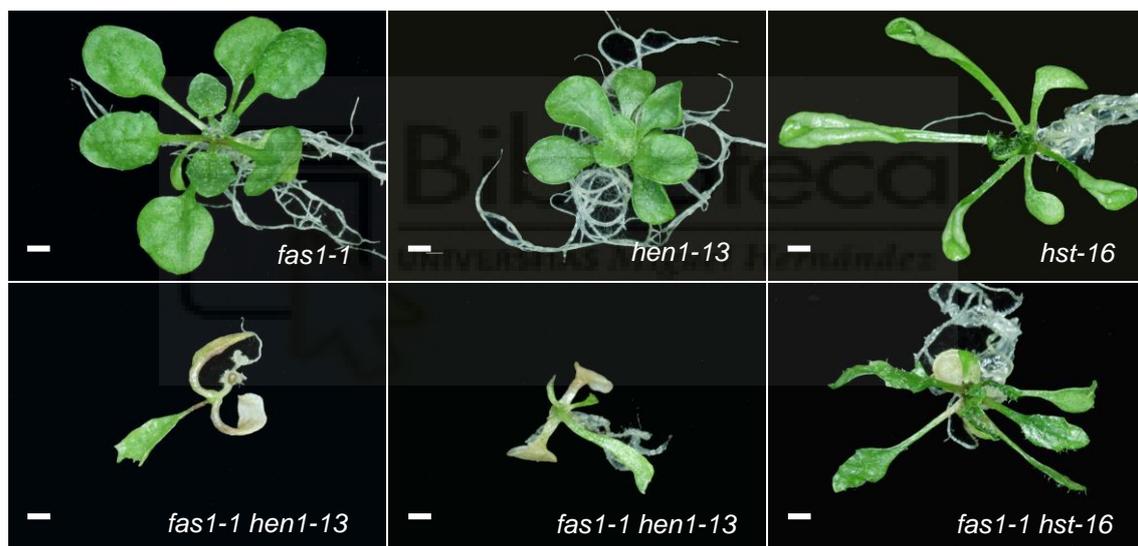


Figura 14.- Fenotipos de los posibles dobles mutantes *fas1-1 hen1-13* y *fas1-1 hst-16*. Las fotografías se tomaron 15 dde. Las barras de escala representan 1 mm.

V.2.- Mutantes del procesamiento del ARNr 45S

En el laboratorio, se han obtenido interacciones sinérgicas entre los mutantes de la maquinaria de los miARN y *smo4-3* y *rrp7-1*, afectados en los genes *SMALL ORGAN 4* (*SMO4*; Micol Ponce, 2017) y *RIBOSOMAL RNA PROCESSING 7* (*RRP7*; Micol-Ponce *et al.*, 2018), cuyos productos son nucleolares y participan en la biogénesis de los ARNr 5,8S y 18S, respectivamente. Por tanto, hemos considerado la posibilidad de que los mutantes de la maquinaria de los miARN presentaran alteraciones en alguna etapa del procesamiento del pre-ARNr 45S (Figura 4, página 8).

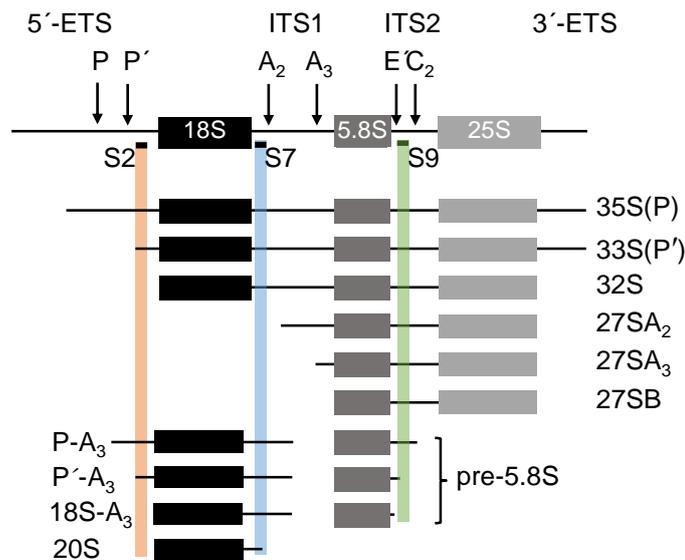


Figura 15.- Esquema de la detección de los pre-ARNr con las sondas S2, S7 y S9. Tomado de Micol-Ponce *et al* (2018), que lo modificó a partir de Hang *et al.* (2014). 5'-ETS y 3'-ETS, representan los espaciadores externos. ITS1 e ITS2, representan los espaciadores internos. Las franjas verticales de color naranja, azul y verde marcan las regiones de los pre-ARNr con las que hibridan las sondas S2, S7 y S9, respectivamente.

Realizamos ensayos de hibridación de *northern* con las sondas S2, S7 y S9, con las que se detectan distintos precursores del procesamiento (Figura 15, página 34). Utilizamos ARN de *Ler*, *ago1-52*, *hyl1-12*, *hen1-13*, *hst-21* y *fas1-4*.

Con la sonda S7 pudimos observar, en las tres replicas biológicas de ARN empleadas, que el mutante *hyl1-12* parecía que se acumulaban los precursores 35S(P)/33S(P')/32S, P-A₃ y P'-A₃/18S-A₃/20S, pero la diferencia en la carga de ARN en el gel no permitió extraer más conclusiones (Figura 16, página 35).

Sin embargo, en los resultados del ensayo de *northern* realizado con la sonda S9 se observa una clara acumulación de los precursores 35S(P)/33S(P')/32S, 27SA₂/27SA₃/27SB y pre-5.8S en el mutante *hyl1-12*, y las cantidades de ARN depositadas en cada pocillo fue más similar (Figura 17, página 36).

El documentador de gels del laboratorio incluye un software (VisionCapt) para la cuantificación relativa de las intensidades de las bandas, que se suele utilizar en el laboratorio en los ensayos de *northern*. Sin embargo, las intensidades de las bandas con los ARN silvestres, en esta segunda hibridación, fueron tan tenues que nos ha resultado imposible utilizarlo. No obstante, creemos que el resultado con *hyl1-12* es bastante

convinciente. Se repetirán estos análisis de *northern* con ARN de otros alelos de *HYL1*, para cerciorarnos de este resultado, que consideramos preliminar pero muy sugerente.

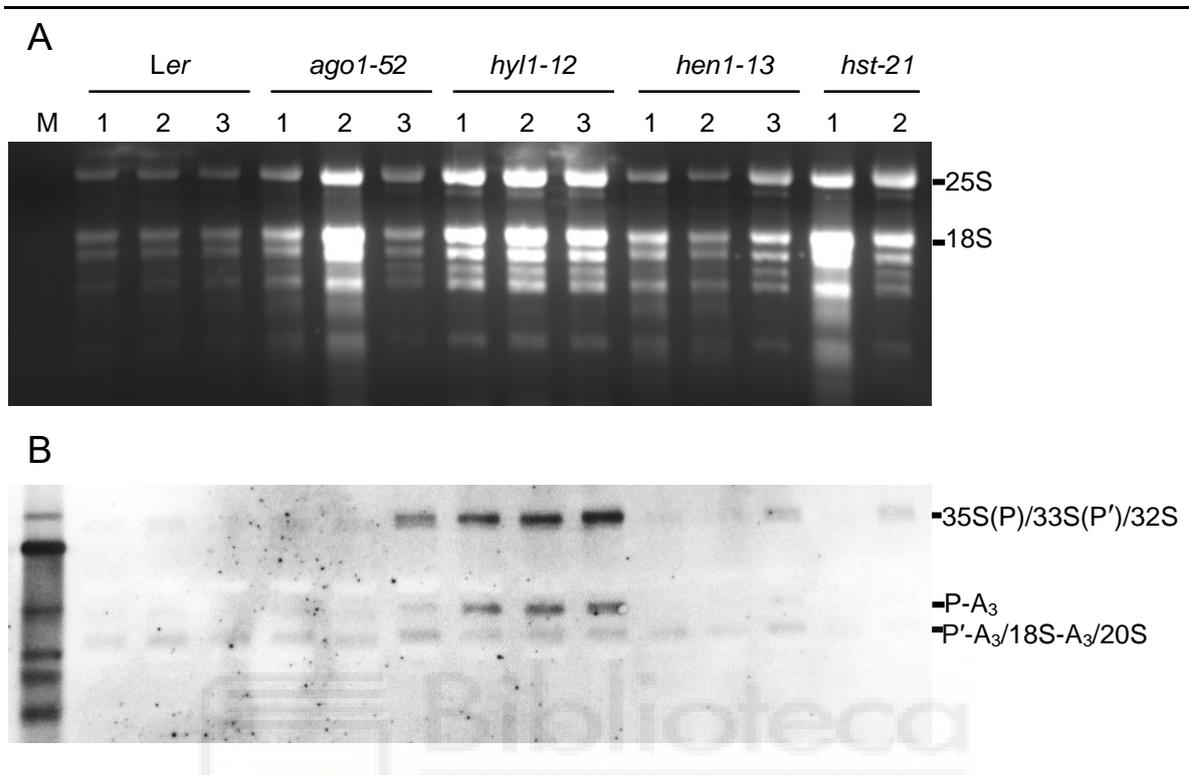


Figura 16.- Análisis de *northern* de los mutantes de la maquinaria de los miARN con la sonda S7. (A) Resultados de las electroforesis del ARN de *Ler*, *ago1-52*, *hyl1-11*, *hen1-13* y *hst-21*, en un gel teñido con bromuro de etidio. Se utilizaron tres réplicas biológicas de cada genotipo. M se corresponde con el marcador de peso molecular. Se indican las bandas correspondientes a los ARNr maduros del ribosoma del citoplasma 25S y 18S. (B) Resultados de la hibridación con la sonda S7. Se indica en el lateral derecho el nombre de los precursores detectados. Los precursores 35S(P)/33S(P')/32S y P'-A₃/18S-A₃/20S presentan tamaños muy similares que no pueden resolverse en un gel de agarosa al 1,2% (M/v).

La acumulación de los pre-ARNr 35S(P)/33S(P')/32S, 27SA₂/27SA₃/27SB y pre-5.8S que hemos observado a nivel cualitativo en *hyl1-12* sugiere que *HYL1* esté implicado en alguna de las dos rutas alternativas que conducen a la síntesis del ARNr 18S y 5,8S, la del 5'-ETS primero (se corta antes el 5'-ETS que el ITS1) o la del ITS1 primero (se corta antes el ITS1 que el 5'-ETS; Figura 4, en la página 8).

La acumulación de los pre-ARNr 35S(P)/33S(P')/32S, 27SA₂/27SA₃/27SB y pre-5.8S sugiere la posibilidad de que el gen *HYL1* esté implicado bien en la ruta 5'-ETS primero o en la ruta del ITS1 primero.

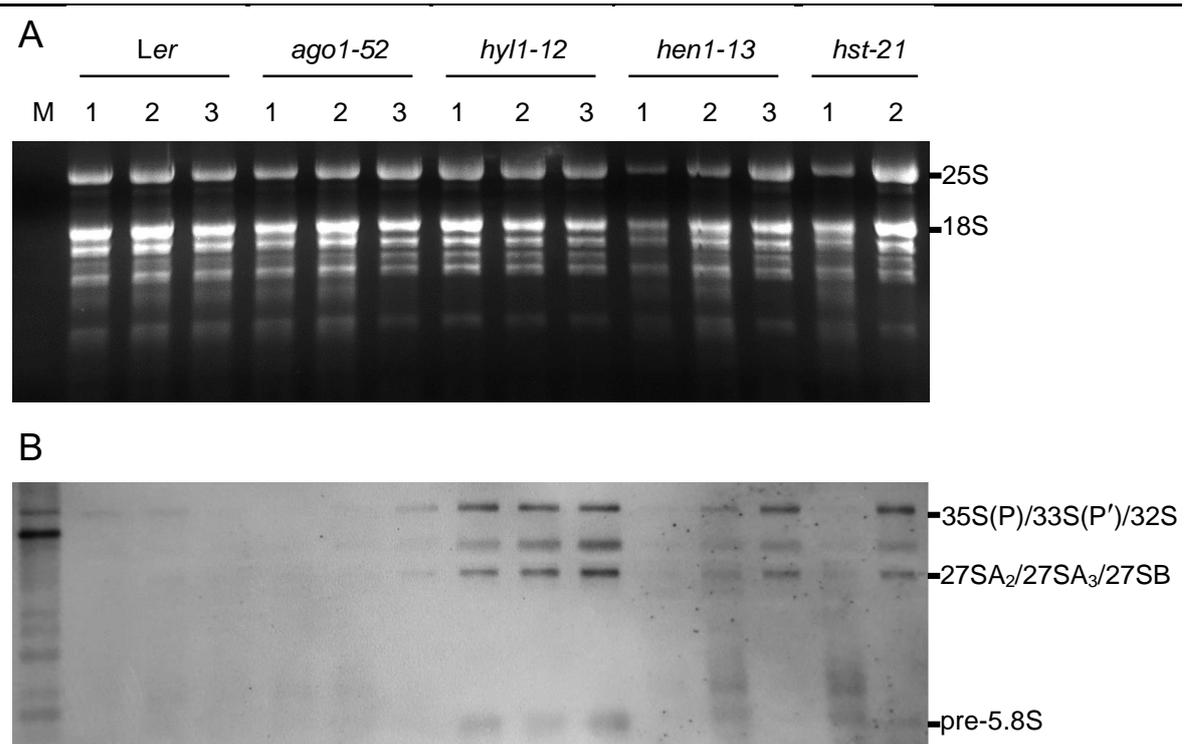


Figura 17.- Análisis de *northern* de los mutantes de la maquinaria de los microARN con la sonda S9. (A) Resultados de las electroforesis del ARN de *Ler*, *ago1-52*, *hyl1-11*, *hen1-13* y *hst-21*, en un gel teñido con bromuro de etidio. Se utilizaron tres réplicas biológicas de cada genotipo. M se corresponde con el marcador de peso molecular. (B) Resultados de la hibridación con la sonda S9. Se han marcado en el lateral derecho el nombre de los precursores detectados.

En cualquier caso, los niveles de los ARNr maduros serían suficientemente altos en *hyl1-12* para no comprometer su viabilidad, ya que en el caso contrario causaría letalidad en los primeros estadios de desarrollo, como ocurre con algunos mutantes de la ruta de biogénesis del ribosoma para los que no existe redundancia funcional o rutas alternativas viables para la síntesis de los ARNr maduros.

Finalmente, quisimos comprobar si el mutante *fas1-4* el procesamiento del pre-ARNr 45S estaba también alterado, y para ello repetimos los ensayos de *northern* con las sondas S2, S7 y S9 (Figura 18, página 37). Incluimos en estos análisis como control los mutantes *smo4-3* y *mtr4-2*, con defectos en el procesamiento del pre-ARNr 45S. No observamos acumulación o disminución en ninguno de los precursores en comparación con la estirpe silvestre Col-0, por lo que pensamos que la interacción de *AGO1* y *HYL* con *FAS1* posiblemente se deba a la alteración en el número de copias del ADNr 45S en los mutantes de la maquinaria de los miARN, aspecto que nos proponemos determinar próximamente.

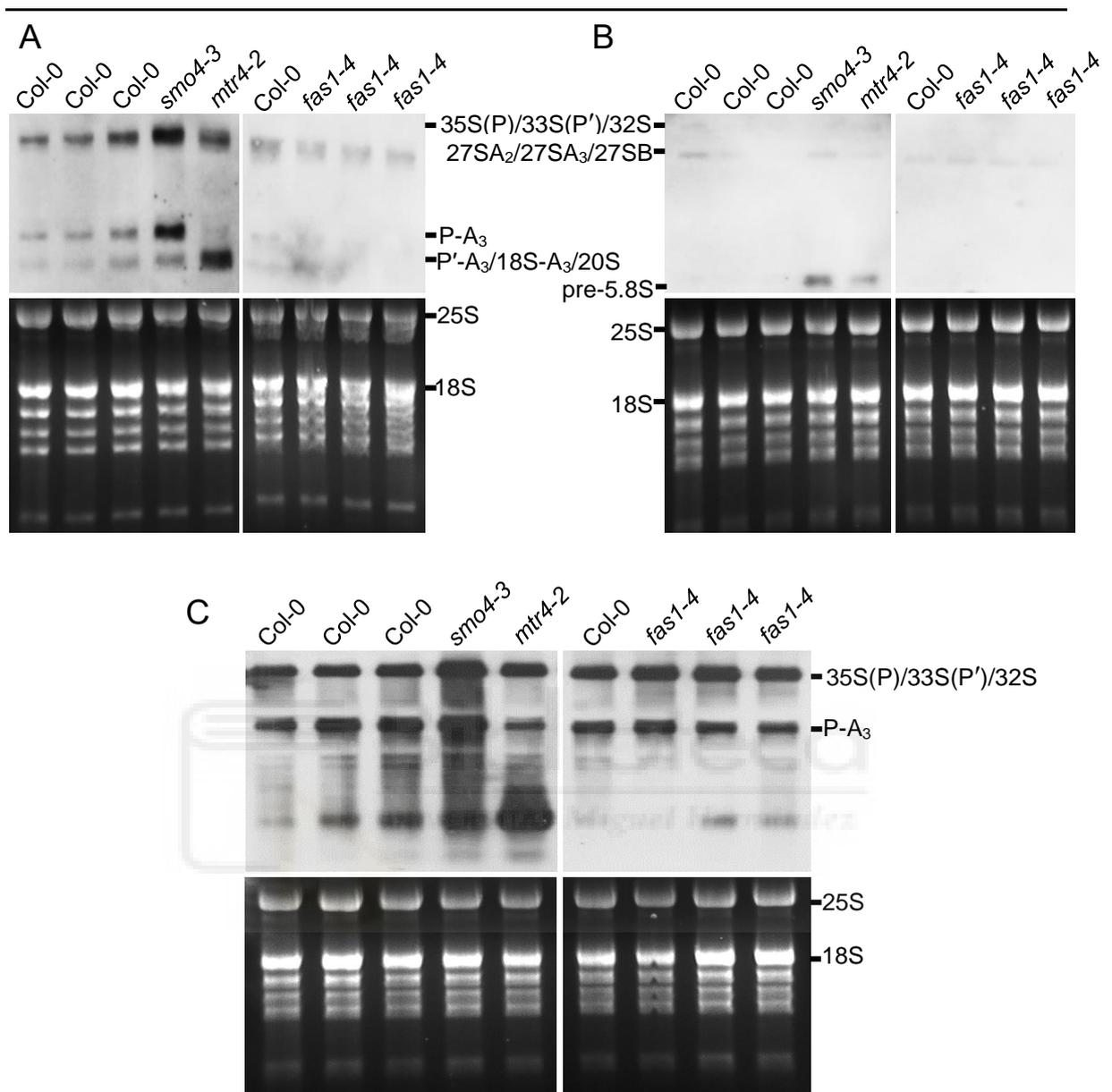


Figura 18.- Análisis de *northern* del mutante *fas1-4*. (A) Detección de los precursores 35S(P)/33S(P')/32S, P-A₃ y P'-A₃ empleando la sonda S7. (B) Detección de los precursores 35S(P)/33S(P')/32S, 27SA₂/27SA₃/27SB y pre-5.8S empleando la sonda S9. (C) Detección de los precursores 35S(P)/33S(P')/32S y P-A₃ empleando la sonda S2. Se utilizaron tres réplicas biológicas de cada genotipo. M se corresponde con el marcador de peso molecular. En el caso de (A y B) se han marcado en la parte central el nombre de los precursores detectados y en (C) se han marcado en el lateral derecho.



VI.- CONCLUSIONES

V.- CONCLUSIONES

La biogénesis del ribosoma es un proceso con múltiples etapas, altamente controlado a diferentes niveles. Desde la regulación del número de copias de ADNr 45S que deben expresarse en cada momento del desarrollo y en cada tejido concreto, hasta el procesamiento de los diversos precursores de los ARNr maduros, que forman parte del ribosoma o incluso su correcto ensamblaje gracias a las PR. En la actualidad se ha avanzado mucho en el conocimiento de los mecanismos subyacentes a la formación del ribosoma, pero todavía existen muchas incógnitas por resolver. El laboratorio de M.R. Ponce ha contribuido caracterizando funcionalmente genes como *MAS2*; *SMO4* y *RRP7*, implicados directamente en la biogénesis del ribosoma de *Arabidopsis* a distintos niveles.

En este TFM hemos pretendido contribuir a desvelar la relación funcional entre los genes de la ruta de los miARN y la biogénesis del ribosoma. Hemos obtenido los dobles mutantes *fas1-1 ago1-52*, *fas1-1 ago1-27*, *fas1-1 hyl1-2* y *fas1-1 hyl1-11* que muestran fenotipos sinérgicos, siendo letales en algunos casos y extremadamente estériles en otros. Dado que los mutantes *fas1-1* pierden progresivamente copias del ADNr 45S, situados en los NOR, pensamos que la interacción genética de *FAS1* con los genes *AGO1* y *HYL1*, se podría deber a la descondensación de la cromatina en los NOR o a cambios en el número de repeticiones del ADNr, y por tanto compartir un papel en la biogénesis del ribosoma, aunque éste sea indirecto

En consonancia con la implicación de los mutantes de la ruta de los miARN en la traducción, hemos determinado la acumulación de los pre-ARN 35S, 27S y 5,8S en el mutante *hyl1-12*, cambios similares a los observados en el mutante *smo4-3*. Este resultado nos indicaría la participación de *HYL1*, no solo en la maduración de los miARN, sino también en el procesamiento del pre-ARNr 45S y por tanto, en la biogénesis de los ARNr y del ribosoma. A diferencia de lo observado en *hyl1-12*, los mutantes *fas1-4*, *hen1-13*, *hst-21* y *ago1-52* no presentan cambios en los niveles de los precursores de los ARNr respecto al silvestre. Estos resultados apoyan la hipótesis, indicada en el párrafo anterior, de que la relación funcional entre *FAS1* y los genes de la ruta de los miARN podría deberse a diferencias en los niveles de expresión del ADNr 45S, que podría estar comprometida en *fas1-1* por la pérdida de repeticiones del ADNr 45S. La continuación de este trabajo con nuevos experimentos de *northern*, de expresión y de comprobación del número de copias de los ADNr 45S nos permitirán conocer la naturaleza de la relación funcional entre los estos genes en los que hemos centrado nuestra investigación en este TFM.



VII.- BIBLIOGRAFÍA

VI.- BIBLIOGRAFÍA

- Arribas-Hernández, L., Kielpinski, L.J., y Brodersen, P. (2016). mRNA decay of most Arabidopsis miRNA targets requires slicer activity of AGO1. *Plant Physiology* **171**, 2620-2632.
- Berná Amorós, G. (1997). Disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*: aislamiento y caracterización de mutantes inducidos mediante metanosulfonato de etilo. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante.
- Bollman, K.M., Aukerman, M.J., Park, M.Y., Hunter, C., Berardini, T.Z., y Poethig, R.S. (2003). *HASTY*, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development* **130**, 1493.
- Candela Antón, H. (2001). Análisis genético de la formación del patrón de venación de la hoja en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Chang, C., Bowman, J.L., y Meyerowitz, E.M. (2016). Field guide to plant model systems. *Cell* **167**, 325-339.
- Duc, C., Benoit, M., Le Goff, S., Simon, L., Poulet, A., Cotterell, S., Tatout, C., y Probst, A.V. (2015). The histone chaperone complex HIR maintains nucleosome occupancy and counterbalances impaired histone deposition in CAF-1 complex mutants. *The Plant Journal* **81**, 707-722.
- Exner, V., Taranto, P., Schönrock, N., Gruissem, W., y Hennig, L. (2006). Chromatin assembly factor CAF-1 is required for cellular differentiation during plant development. *Development* **133**, 4163.
- Fang, X., y Qi, Y. (2016). RNAi in plants: an argonaute-centered view. *Plant Cell* **28**, 272-285.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., y Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Fontcuberta Cervera, S. (2018). Análisis de las interacciones genéticas del gen *SMO4*, que codifica un factor de la biogénesis del ribosoma en Arabidopsis. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández.
- Guo, Q., Liu, Q., Smith, N.A., Liang, G., y Wang, M.B. (2016). RNA silencing in plants: mechanisms, technologies and applications in horticultural crops. *Current genomics* **17**, 476-489.
- Jover-Gil, S., Candela, H., Robles, P., Aguilera, V., Barrero, J.M., Micol, J.L., y Ponce, M.R. (2012). The microRNA pathway genes *AGO1*, *HEN1* and *HYL1* participate in leaf proximal-distal, venation and stomatal patterning in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **53**, 1322-1333.
- Juan Vicente, L. (2016). Obtención de transgenes para el análisis funcional de los genes *CP3* (*CUPULIFORMIS3*), *CP4* y *CP5* de Arabidopsis. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Juan Vicente, L. (2017). Caracterización funcional de los genes *CP3*, *CP4* y *CP5* de Arabidopsis. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández.
- Kalinina, N.O., Makarova, S., Makhotenko, A., Love, A.J., y Talianky, M. (2018). The multiple functions of the nucleolus in plant development, disease and stress responses. *Frontiers in Plant Science* **9**, 132-132.
- Kaya, H., Shibahara, K.I., Taoka, K.I., Iwabuchi, M., Stillman, B., y Araki, T. (2001). *FASCIATA* genes for Chromatin Assembly Factor-1 in Arabidopsis maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell* **104**, 131-142.
- Kirik, A., Pecinka, A., Wendeler, E., y Reiss, B. (2006). The Chromatin Assembly Factor subunit *FASCIATA1* is involved in homologous recombination in plants. *Plant Cell* **18**, 2431-2442.
- Kojima, K., Tamura, J., Chiba, H., Fukada, K., Tsukaya, H., y Horiguchi, G. (2018). Two nucleolar proteins, GDP1 and OLI2, function as ribosome biogenesis factors and are preferentially involved in promotion of leaf cell proliferation without strongly affecting leaf adaxial-abaxial patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **8**, 2240-2240.
- Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1987). Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service* **24**.
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., y Chen, X. (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Current Biology* **15**, 1501-1507.
- Lu, S., Shi, R., Tsao, C.C., Yi, X., Li, L., y Chiang, V.L. (2004). RNA silencing in plants by the expression of siRNA duplexes. *Nucleic Acids Research* **32**, e171-e171.

- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D., y Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* **282**, 662.
- Micol-Ponce, R., Sarmiento-Mañus, R., Ruiz-Bayón, A., Montacle, C., Sáez-Vazquez, J., y Ponce, M.R. (2018). *Arabidopsis RIBOSOMAL RNA PROCESSING 7* is required for 18S rRNA maturation. *Plant Cell* **30**, 2855-2872.
- Micol-Ponce, R., Sarmiento-Mañus, R., Fontcuberta-Cervera, S., Cabezas-Fuster, A., Montacle, C., Sáez-Vazquez, J., y Ponce, M.R. (2019). Conserved and divergent functions of *Arabidopsis* SMALL ORGAN 4 in 45S pre-rRNA processing. *Plant Journal* **Enviado**.
- Micol Ponce, R. (2011). Aislamiento y caracterización de nuevas mutaciones supresoras del fenotipo de *argonaute1-52*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández.
- Micol Ponce, R. (2017). Análisis de la contribución de los genes *MAS2*, *SMO4* y *RRP7* al metabolismo del ARN ribosómico en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández
- Morel, J.-B., Godon, C., Mourrain, P., Béclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., y Vaucheret, H. (2002). Fertile hypomorphic *ARGONAUTE (ago1)* mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* **14**, 629-639.
- Mozgová, I., Mokros, P., y Fajkus, J. (2010). Dysfunction of chromatin assembly factor 1 induces shortening of telomeres and loss of 45S rDNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**, 2768-2780.
- Muchová, V., Amiard, S., Mozgová, I., Dvořáčková, M., Gallego, M.E., White, C., y Fajkus, J. (2015). Homology-dependent repair is involved in 45S rDNA loss in plant CAF-1 mutants. *The Plant Journal* **81**, 198-209.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Napoli, C., Lemieux, C., y Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279.
- Navarro Quiles, C. (2015). Obtención de transgenes para el análisis funcional de los genes *DEN3*, *DEN7* y *DEN9* en *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández
- Nozawa, M., Miura, S., y Nei, M. (2012). Origins and evolution of microRNA genes in plant species. *Genome Biology and Evolution* **4**, 230-239.
- Oliver, C., Pradillo, M., Jover-Gil, S., Cuñado, N., Ponce, M.R., y Santos, J.L. (2017). Loss of function of *Arabidopsis* microRNA-machinery genes impairs fertility, and has effects on homologous recombination and meiotic chromatin dynamics. *Scientific Reports* **7**, 9280-9280.
- Park, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., y Poethig, R.S. (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 3691-3696.
- Pérez-Pérez, J.M., Candela, H., y Micol, J.L. (2009). Understanding synergy in genetic interactions. *Trends in Genetics* **25**, 368-376.
- Pérez Pérez, J.M. (2003). Caracterización genética y molecular de los mutantes ultracurvata de *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Ponce Molet, M.R. (1996). Aislamiento y caracterización molecular de genes de la superfamilia del TGF-beta que se expresan en el embrión de *Strogylocentrotus purpuratus*. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante.
- Ransom, M., Dennehey, B.K., y Tyler, J.K. (2010). Chaperoning histones during DNA replication and repair. *Cell* **140**, 183-195.
- Reinholz, E. (1966). Radiation induced mutants showing changed inflorescence characteristics. *Arabidopsis Information Service* **3**, 19-20.
- Robles Ramos, P. (1999). Análisis genético de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología de la hoja. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Ruiz Bayón, A. (2015). Análisis funcional de los genes *NOP53* y *RRP7* de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Ruiz Bayón, A. (2016). Análisis funcional de los interactores de *MAS2* de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández.
- Sarmiento Mañus, R. (2011). Análisis genético de mutantes variegados en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.

- Schillewaert, S., Wacheul, L., Lhomme, F., y Lafontaine, D.L.J. (2012). The evolutionarily conserved protein Las1 is required for pre-rRNA processing at both ends of ITS2. *Molecular and Cellular Biology* **32**, 430-444.
- Sendra Ortolá, M. (2017). El gen *ABCE3* participa en la morfogénesis foliar en *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- 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 de Alicante.
- Smyth, D. (1990). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for studying the molecular basis of morphogenesis. *Functional Plant Biology* **17**, 323-331.
- Song, L., Han, M.H., Lesicka, J., y Fedoroff, N. (2007). Arabidopsis primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the cajal body. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 5437-5442.
- Soprano, A.S., Smetana, J.H.C., y Benedetti, C.E. (2018). Regulation of tRNA biogenesis in plants and its link to plant growth and response to pathogens. *Elsevier* **1861**, 344-353.
- Van Norman, J.M., y Benfey, P.N. (2009). *Arabidopsis thaliana* as a model organism in systems biology. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems Biology and Medicine* **1**, 372-379.
- Varas, J., Santos, J.L., y Pradillo, M. (2017). The absence of the Arabidopsis chaperone complex CAF-1 produces mitotic chromosome abnormalities and changes in the expression profiles of genes Involved in DNA repair. *Frontiers in Plant Science* **8**, 525-525.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P., y Bartel, D.P. (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes and development* **18**, 1187-1197.
- Vazquez, F., Gascioli, V., Crété, P., y Vaucheret, H. (2004). The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Current Biology* **14**, 346-351.
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S.I.S., y Moazed, D. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* **303**, 672-676.
- Weis, B.L., Kovacevic, J., Missbach, S., y Schleiff, E. (2015). Plant-specific features of ribosome biogenesis. *Trends in Plant Science* **20**, 729-740.
- Wienkoop, S., Baginsky, S., y Weckwerth, W. (2010). *Arabidopsis thaliana* as a model organism for plant proteome research. *Journal of Proteomics* **73**, 2239-2248.
- Woodward, A.W., y Bartel, B. (2018). Biology in bloom: a primer on the *Arabidopsis thaliana* model system. *Genetics* **208**, 1337.
- Zakrzewska-Placzek, M., Souret, F.F., Sobczyk, G.J., Green, P.J., y Kufel, J. (2010). Arabidopsis thaliana XRN2 is required for primary cleavage in the pre-ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* **38**, 4487-4502.