



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Contribución al análisis funcional de *POL5*,
RRP36, *UTP22* y *UTP18* mediante el
silenciamiento parcial de su expresión con
microARN artificiales**

Gabriela Alejandra Báez Barroso

Tutores:

María Rosa Ponce Molet

Adrián Cabezas Fuster

Área de Genética

Departamento de Biología Aplicada

Máster en Biotecnología y Bioingeniería

Facultad de Ciencias Experimentales/Instituto de Bioingeniería

Curso académico 2022-2023

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

ADRIÁN CABEZAS FUSTER, Doctor por la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por Gabriela Alejandra Báez Barroso como Trabajo de Fin del Máster en Biotecnología y Bioingeniería. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Adrián Cabezas Fuster

María Rosa Ponce Molet

Elche, 1 de septiembre de 2023

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE TABLAS	II
I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVES	1
II.- INTRODUCCIÓN	2
II.1.- <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo vegetal.....	2
II.2.- El ribosoma eucariótico.....	2
II.2.1.- Estructura y expresión de los ADNr.....	3
II.2.2.- Maduración del pre-ARNr 45S.....	4
II.2.3.- Función y estructura del procesoma SSU.....	5
II.2.3.1.- El procesoma SSU en <i>Arabidopsis</i>	7
II.2.3.2.- Presuntos ortólogos de componentes del procesoma en <i>Arabidopsis</i>	7
II.3.- Silenciamiento génico postranscripcional mediado por microARN	10
II.4.- Los miARN artificiales como herramienta de inactivación génica.....	11
III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	12
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	13
IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria	13
IV.2.- Nomenclatura genética	13
IV.3.- Estirpes de <i>Arabidopsis</i> empleadas en este trabajo	14
IV.4.- Condiciones de cultivo de <i>Arabidopsis</i>	14
IV.4.1.- Cultivo en placa de Petri	14
IV.4.2.- Cultivo en maceta.....	15
IV.4.3.- Recolección de semillas	16
IV.4.4.- Cruzamientos	16
IV.5.- Disoluciones	17
IV.5.1.- Medios de cultivo para <i>Arabidopsis</i>	17
IV.5.1.1.- Medio de cultivo líquido	17
IV.5.1.2.- Medios de cultivo sólidos.....	17
IV.5.1.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos.....	18
IV.5.2.- Tampones y otras disoluciones de uso general	18
IV.5.2.1.- Disoluciones para extracción de ADN	18
IV.5.2.2.- Disoluciones para electroforesis de ADN	18
IV.5.3.- Tampones y disoluciones para los análisis de <i>northern</i>	19
IV.5.3.1.- Disoluciones para la electroforesis de ARN	19
IV.5.3.2.- Disoluciones para la transferencia de ARN	19
IV.5.3.3.- Disoluciones para la hibridación, lavado y detección	20
IV.6.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos.....	20
IV.6.1.- Síntesis de oligonucleótidos.....	20
IV.6.2.- Amplificaciones mediante PCR.....	21

IV.6.3.- Aislamiento de ácidos nucleicos	21
IV.6.3.1.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis	21
IV.6.3.2.- Aislamiento de ARN de Arabidopsis	22
IV.6.4.- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	22
IV.7.- Análisis de <i>northern</i>	22
IV.8.- Caracterización fenotípica de estirpes de Arabidopsis	24
V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
V.1.- Aislamiento y caracterización fenotípica de las líneas <i>amiR-POL5</i> , <i>amiR-RRP36</i> , <i>amiR-UTP18</i> y <i>amiR-UTP22</i>	25
V.2.- Análisis del silenciamiento postranscripcional de la expresión de <i>POL5</i> , <i>RRP36</i> , <i>UTP18</i> y <i>UTP22</i> en las líneas <i>amiR</i>	31
V.3.- Caracterización del gen <i>BMS1</i>	32
V.4.- Análisis del procesamiento del pre-ARNr 45S	36
V.4.1.- Procesamiento del pre-ARNr 45S en las líneas <i>amiR-POL5</i> , <i>amiR-RRP36</i> , <i>amiR-UTP18</i> y <i>amiR-UTP22</i>	36
V.4.2.- Análisis del procesamiento del pre-ARN 45S en el mutante <i>den9</i>	39
VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	41
VII.- BIBLIOGRAFÍA.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Representación de la estructura y organización del ADNr 45S de Arabidopsis.....	3
Figura 2.- Representación esquemática del procesamiento del pre-ARNr 45S en Arabidopsis.....	5
Figura 3.- Esquema del ensamblaje cotranscripcional del procesoma SSU en el pre-ARNr 35S naciente.....	6
Figura 4.- Representación esquemática de la conexión entre la transcripción de los genes de ADNr 35S y la de los genes de las PR	9
Figura 5.- Representación esquemática de los genes diana de los amiARN	25
Figura 6.- Fenotipos morfológicos de plantas portadoras del transgén productor del <i>amiR-POL5.1</i>	28
Figura 7.- Fenotipos morfológicos de plantas portadoras del transgén productor del <i>amiR-RRP36.2</i>	29
Figura 8.- Fenotipos morfológicos de plantas portadoras de transgenes productores de los <i>amiR-UTP18.1</i> y <i>amiR-UTP22.1</i>	30
Figura 9.- Silenciamiento génico postranscripcional producido por la presencia de los amiARN ensayados.....	31
Figura 10.- Fenotipos morfológicos de los mutantes insercionales del gen <i>BMS1</i>	33
Figura 11.- Esquema del gen <i>BMS1</i> y resultados del genotipado de los alelos <i>bms1</i> en las líneas SAIL_1293_E04 y SALK_061887.....	34
Figura 12.- Genotipado de las plantas F ₁ derivadas de los cruzamientos <i>den9</i> × <i>bms1-1</i>	36
Figura 13.- Esquema de los precursores de los ARNr 18S, 5,8S y 25S originados durante el procesamiento del pre-ARNr 45S en Arabidopsis	37
Figura 14.- Análisis de <i>northern</i> con la sonda S7 en las líneas <i>amiR-POL5</i> , <i>amiR-RRP36</i> , <i>amiR-UTP18</i> y <i>amiR-UTP22</i> con fenotipo mutante.....	38
Figura 15.- Análisis de <i>northern</i> con la sonda S2 con ARN de individuos de las líneas <i>amiR-POL5</i> , <i>amiR-RRP36</i> , <i>amiR-UTP18</i> y <i>amiR-UTP22</i> con fenotipo mutante	39
Figura 16.- Análisis de <i>northern</i> con la sonda S7 con ARN del mutante <i>den9</i>	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Estirpes de Arabidopsis usadas en este trabajo.....	14
Tabla 2.- Oligonucleótidos usados en este trabajo	20
Tabla 3.- Líneas T ₁ seleccionadas	26

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVES

En este Trabajo de Fin de Máster (TFM) hemos contribuido a la caracterización funcional de los genes *DNA POLYMERASE V (POL5)*, *RIBOSOMAL RNA PROCESSING 36 (RRP36)*, *U THREE PROTEIN 18 (UTP18)*, *UTP22* y *BMh SENSITIVE 1 (BMS1)* en *Arabidopsis thaliana*, cuyos ortólogos de *Saccharomyces cerevisiae* codifican proteínas que forman parte del procesoma SSU, que es clave para la maduración del ARN ribosómico (ARNr) 18S y el ensamblaje de la subunidad menor del ribosoma o 40S. Se han estudiado los efectos de la inactivación parcial de estos genes en líneas *amiR-POL5*, *amiR-RRP36*, *amiR-UTP18* y *amiR-UTP22*, portadoras de transgenes que expresan microARN artificiales (líneas *amiR*) y que fueron obtenidas en el laboratorio antes del inicio de este trabajo. Paralelamente, hemos iniciado el análisis funcional del gen *BMS1*, mediante el análisis del mutante puntual *denticulata9 (den9)*, y de dos mutantes insercionales. Los fenotipos morfológicos y moleculares de plantas de algunas de estas líneas *amiR* y de *den9*, sugieren que *POL5*, *RRP36*, *UTP18*, *UTP22* y *BMS1* de *Arabidopsis* son factores de la biogénesis del ribosoma, actuando en la maduración del ARNr 18S, como sus ortólogos de la levadura.

Palabras clave: *Arabidopsis*, *POL5*, *RRP36*, *UTP18*, *UTP22*, *BMS1*, procesoma SSU, microARN artificial, *amiR*.

In this Master's Thesis, we have contributed to the functional characterization of the *DNA POLYMERASE V (POL5)*, *RIBOSOMAL RNA PROCESSING 36 (RRP36)*, *U THREE PROTEIN 18 (UTP18)*, *UTP22*, and *BMh SENSITIVE 1 (BMS1)* genes in *Arabidopsis thaliana*, whose orthologs in *Saccharomyces cerevisiae* encode proteins that are part of the SSU processome, involved in ribosomal RNA (rRNA) 18S maturation and assembly of the small ribosomal subunit or 40S. The effects of the partial inactivation of these genes have been analysed in several *amiR-POL5*, *amiR-RRP36*, *amiR-UTP18*, and *amiR-UTP22* lines, carrying transgenes expressing artificial microRNAs (*amiR* lines) that were generated in the laboratory prior to the start of this work. Additionally, we have initiated the functional analysis of the *BMS1* gene by analyzing the *denticulata9 (den9)* mutant and two insertional lines that disrupt it. The morphological and molecular phenotypes of plants of several *amiR* lines and *den9* suggest that *Arabidopsis* *POL5*, *RRP36*, *UTP18*, *UTP22*, and *BMS1* proteins are also involved in ribosome biogenesis, acting in the maturation of 18S rRNA, similar to their yeast orthologs.

Keywords: *Arabidopsis*, *POL5*, *RRP36*, *UTP18*, *UTP22*, *BMS1*, SSU processome, artificial microRNA, *amiR*.

II.- INTRODUCCIÓN

II.- INTRODUCCIÓN

II.1.- *Arabidopsis thaliana* como modelo vegetal

Arabidopsis thaliana (de ahora en adelante, *Arabidopsis*) es una planta angiosperma dicotiledónea que se encuentra en todos los continentes y en todo tipo de climas. Pertenece a la familia *Brassicaceae* al igual que otras especies comerciales como el nabo, la col o la mostaza, pero carece de interés agronómico. Sin embargo, posee características clave que han propiciado su desarrollo como el sistema modelo en biología vegetal por excelencia (Meinke *et al.*, 1998): (1) su ciclo de vida corto, entre 6 y 8 semanas y (2) su elevada fertilidad, que permite la obtención de generaciones sucesivas rápidamente y realizar análisis genéticos, y (3) su pequeño tamaño, que la hace fácilmente manipulable y cultivable. A nivel genético, (4) posee un genoma pequeño (125-135 Mb), que fue completamente secuenciado en el año 2000 gracias a la iniciativa Genoma de *Arabidopsis* (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000), (5) es diploide, lo que permite el estudio de mutaciones recesivas, y (6) se puede transformar fácilmente con *Agrobacterium tumefaciens*, lo que permite introducir y mantener establemente en esta planta cualquier transgén (Koornneef y Meinke, 2010).

II.2.- El ribosoma eucariótico

El ribosoma citosólico eucariótico (en adelante, el ribosoma), denominado 80S por su coeficiente de sedimentación, es la maquinaria celular responsable de la traducción de los ARN mensajeros (ARNm) nucleares a proteínas. Está compuesto por cuatro ARN ribosómicos (ARNr) y unas 80 proteínas ribosómicas (PR) que se ensamblan en dos subunidades: la mayor o 60S, que contiene los ARNr 25S (en las plantas y las levaduras; 28S en los metazoos), 5,8S y 5S y 48 PR; y la subunidad menor o 40S, constituida por el ARNr 18S y 33 PR (Wilson y Doudna Cate, 2012). La subunidad 40S descodifica el ARNm y selecciona el anticodón correspondiente, mientras que la 60S cataliza el enlace peptídico entre dos aminoácidos (Greber y Ban, 2016).

La biogénesis del ribosoma es un proceso complejo y evolutivamente muy conservado, que requiere la acción de las tres ARN polimerasas (ARN pol), I, II, y III y de más de 200 factores de la biogénesis del ribosoma (FBR; Sáez-Vásquez y Delseny, 2019). Tiene lugar en tres compartimentos celulares, ya que comienza en el nucleolo con la transcripción de los genes de los ADNr, continúa en el nucleoplasma y termina con el ensamblaje de las subunidades 60S y 40S en el citoplasma. La producción de ribosomas consume cerca del 80% de la energía celular y su regulación está, por tanto, estrechamente relacionada con cambios en los niveles de ATP celular (Maekawa *et al.*, 2018).

II.2.1.- Estructura y expresión de los ADNr

Los ARNr están codificados por los genes de los ADNr, que se encuentran en un gran número de copias, agrupadas en tándem, y que son de dos tipos: las del ADNr 45S (en las plantas, 47S en los metazoos y 35S en los hongos) y las del ADNr 5S. El ADNr 45S/47S/35S es una unidad transcripcional que contiene las secuencias de los ARNr 25S, 18S y 5,8S separados por dos espaciadores internos que se transcriben (ITS: *Internal Transcribed Spacer*), el ITS1, entre las secuencias del ARNr 18S y la del 5,8S, y el ITS2, entre las del ADNr 5,8S y la del 25S. Sus extremos están flanqueados por dos espaciadores externos que también se transcriben (ETS: *External Transcribed Spacer*): el 5'-ETS y el 3'-ETS (Henras *et al.*, 2015; Sáez-Vásquez y Delseny, 2019; Figura 1). Cada unidad la transcribe la ARN pol I, generando un transcrito policistrónico primario, llamado pre-ARNr 45S en las plantas, que sufre un complejo proceso de maduración para dar lugar a los ARNr 25S, 18S y 5,8S maduros.

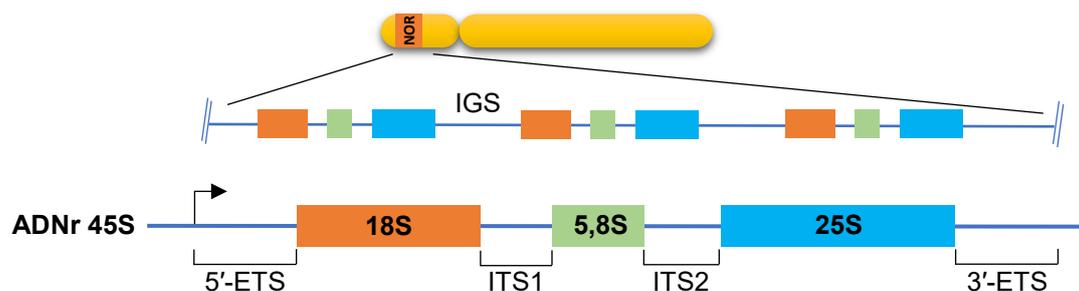


Figura 1.- Representación de la estructura y organización del ADNr 45S de Arabidopsis. Las regiones codificantes de los ARNr se han dibujado con rectángulos de distintos colores, separados por los espaciadores transcritos internos (ITS) y flanqueadas por los espaciadores transcritos externos (ETS). El promotor del gen se encuentra aguas arriba de la flecha negra, que indica el sitio de inicio de la transcripción. Figura adaptada de Chandrasekhara *et al.* (2015).

El genoma haploide de Arabidopsis posee unas 750 copias del ADNr 45S en tándem, separadas entre sí por las secuencias espaciadoras intergénicas (IGS: *Intergenic Spacer*), regiones que no se transcriben y en las que se encuentran señales reguladoras de la transcripción y de la maduración de los pre-ARNr (Copenhaver y Pikaard, 1996). Estas copias están organizadas en *loci* específicos en los extremos de los brazos cortos de los cromosomas 2 y 4, formando las regiones del organizador nucleolar (NOR; *Nucleolus Organizer Region*) 2 y 4, respectivamente (Chandrasekhara *et al.*, 2016). No todas las copias del ADNr 45S son transcripcionalmente activas: en el ecotipo silvestre Columbia-0 (Col-0), las copias del NOR2 se encuentran transcripcionalmente silenciadas excepto en los primeros días del desarrollo,

mientras que las del NOR4 se transcriben durante el resto del ciclo vital de la planta (Chandrasekhara *et al.*, 2016).

Los genes del ADNr 5S codifican el ARNr 5S. Cada unidad es de 500 pb, de las cuales se estima que 120 componen la región codificante del ARNr 5S y 380 son regiones espaciadoras. El genoma haploide de *Arabidopsis* contiene unas mil copias, distribuidas en las regiones pericentroméricas de los cromosomas 3, 4 y 5, que transcribe la ARN pol III (Campell *et al.*, 1992; Murata *et al.*, 1997). La expresión de las repeticiones del cromosoma 5 es mayor que las de los cromosomas 3 y 4, debido a una configuración más abierta y permisiva de la cromatina en ese locus (Simon *et al.*, 2018).

II.2.2.- Maduración del pre-ARNr 45S

La maduración del pre-ARNr 45S, producto primario de la transcripción del ADNr 45S por la ARN pol I, consiste en la eliminación de los ITS1 y 2 y los 5' y 3'-ETS mediante una serie de cortes endo y exonucleolíticos, ejecutados o mediados por FBR, para dar lugar a los ARNr maduros 25S, 18S y 5,8S. Las posiciones de los cortes han sido en su mayoría identificadas por homología con las de la levadura, en el pre-ARNr 35S (Sáez-Vásquez y Delseny, 2019). En *Arabidopsis*, se han descrito 13 puntos de corte: cuatro en los 5'-ETS (en dirección 5'→3', son P, P₁, P' y P₂) e ITS1 (D, A₂, A₃, B₁), tres en el ITS2 (E, C₂ y C₁) y dos en el 3'-ETS (B₂ y B₀; Sáez-Vásquez y Delseny, 2019; Figura 2, en la página 5).

La maduración del pre-ARNr 45S comienza con la eliminación de parte de los 5' y 3'-ETS, con el corte en los puntos P y B₀, generando el pre-ARNr 35S. A continuación, el procesamiento sigue una de las tres rutas alternativas: la ruta del ITS1 primero, la mayoritaria en eucariotas, la del 5'-ETS primero, minoritaria, o la del ITS2 primero, exclusiva de plantas y que solo se da en algunas condiciones de estrés (Sáez-Vásquez y Delseny, 2019).

La ruta del ITS1 primero comienza con el corte en el punto A₃, separando la región codificante del ARNr 18S en el fragmento P-A₃, de la que contiene las secuencias de los ARNr 25S y 5,8S, en el 27SA₃. El pre-ARNr P-A₃ sufre cortes en los puntos P₁ y P', situados en la región 5'-ETS que aún se mantiene en este intermediario, para generar el pre-ARNr 20S, cuyo procesamiento en el punto A₂ produce el ARNr 18S maduro. El corte en el punto B₁ del fragmento 27SA₃ elimina el ITS1 por completo y lo convierte en el 27SB_{SL}, que posteriormente es escindido en el punto C₂ para rendir los fragmentos 7S_{SL} y 26S, precursores de los ARNr 5,8S y 25S, respectivamente.

La ruta del 5'-ETS primero comienza con el corte en el punto P', generando el pre-ARNr 33S, cuya escisión en el punto P₂ rinde el pre-ARNr 32S, en el que ya se ha eliminado por

completo el 5'-ETS. El procesamiento en el punto A_2 rinde los intermediarios 20S y 27SB_{S/L}, que sigue el mismo procesamiento que el que se produce en la ruta del ITS2 primero para generar los ARNr 18S, 5,8S y 25S maduros (Sáez-Vásquez y Delseny, 2019).

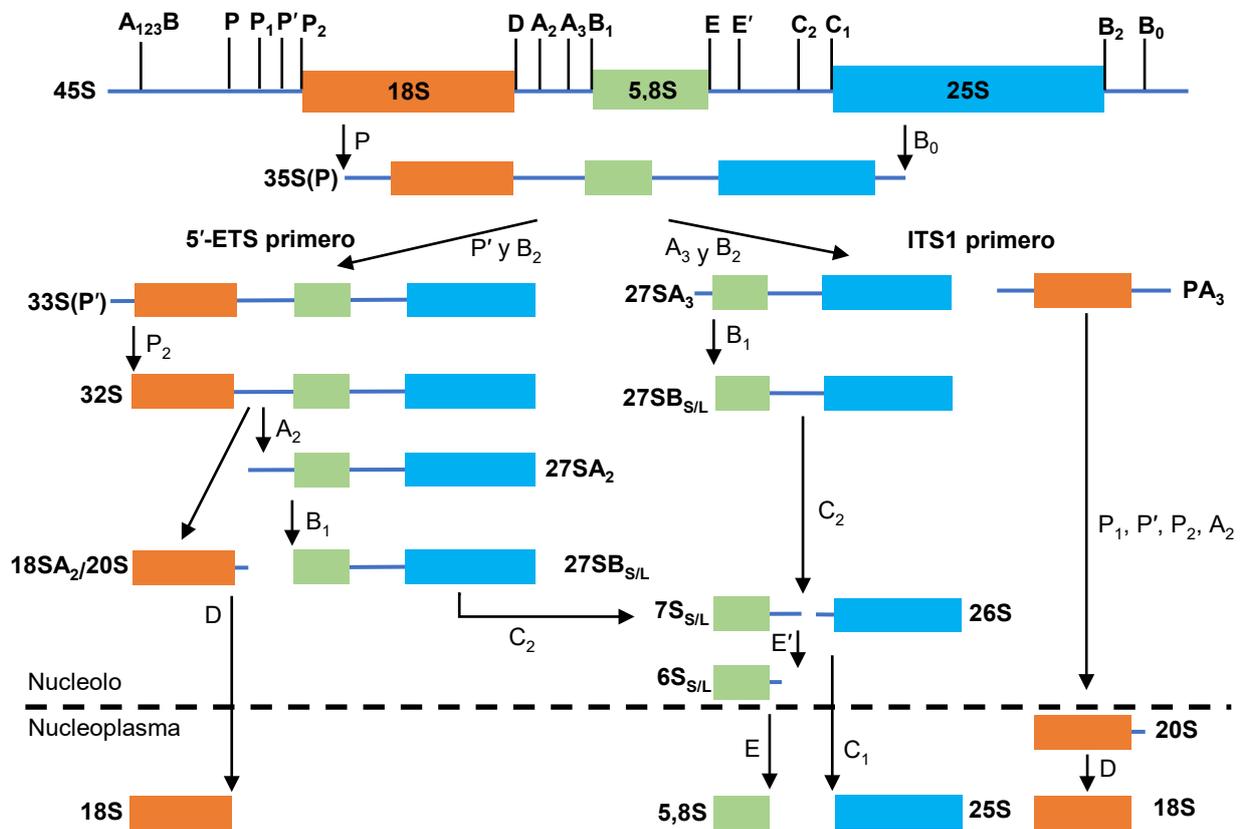


Figura 2.- Representación esquemática del procesamiento del pre-ARNr 45S en Arabidopsis. Se han representado la ruta 5'-ETS primero (izquierda) y del ITS1 primero (derecha). Las líneas negras indican la posición de los puntos de corte en el pre-ARNr 45S. Las flechas negras indican los cortes que se producen en cada etapa. El tamaño de los intermediarios y los sitios de corte no se representan a escala. Figura adaptada de Sáez-Vásquez *et al.* (2019).

II.2.3.- Función y estructura del procesoma SSU

El procesoma de la subunidad menor del ribosoma, también conocido como SSU (*Small SUBunit*) o partícula pre-ribosómica 90S, es una ribonucleoproteína que se asocia cotranscripcionalmente al pre-ARNr naciente y participa en su procesamiento y en el ensamblaje y la maduración de la subunidad 40S (Phipps *et al.*, 2011). La composición y función del procesoma SSU se ha estudiado principalmente en la levadura, donde se ha descrito su implicación en el procesamiento del 5'-ETS y el ITS1 en el pre-ARNr 35S para generar el ARNr 18S maduro (Sloan *et al.*, 2014). Aunque hay evidencias de su conservación

en eucariotas, todavía no se ha demostrado su existencia en organismos vegetales (Sáez-Vásquez y Delseny, 2019).

El procesoma SSU de la levadura se organiza en el nucleolo durante la transcripción del pre-ARNr 35S, sobre el cual se ensamblan progresivamente los FBR que lo conforman. En la levadura, el procesoma SSU está constituido por el subcomplejo de la ribonucleoproteína pequeña nucleolar (snoRNP) U3, los subcomplejos U Three Protein (Utp) A, B y C, el subcomplejo ternario M Phase Phosphoprotein10 (Mpp10)-Imp3-Imp4 y el subcomplejo BMh Sensitive1 (Bms1; Sloan *et al.*, 2014; Gallagher, 2019; Figura 3).

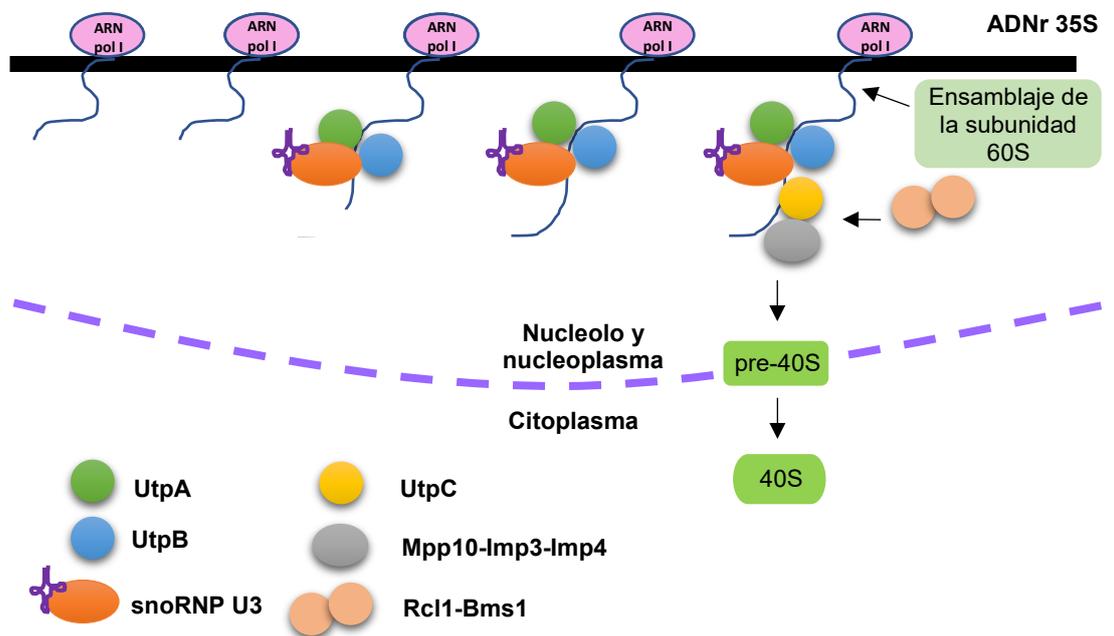


Figura 3.- Esquema del ensamblaje cotranscripcional del procesoma SSU en el pre-ARNr 35S naciente. Se han representado los distintos subcomplejos del procesoma SSU, destacándose con distintos colores: UtpA (verde), UtpB (azul), UtpC (amarillo), snoRNP U3 (naranja), el trivalente Mpp10-Imp3-Imp4 (gris) y el bivalente Rcl1-Bms1 (beige). La ARN pol I (rosa) se representa transcribiendo el ADNr 35S (línea negra). También se representa la formación de la partícula pre-40S, precursora de la subunidad 40S y su traslocación al citoplasma. La línea discontinua representa la envoltura nuclear. Figura adaptada de Sáez-Vásquez *et al.* (2019).

El subcomplejo snoRNP U3 está formado por el ARN pequeño nucleolar (snoRNA) U3 y cuatro proteínas asociadas: Fibrillarin/Nucleolar Protein1 (Nop1), Nop56, Small Nuclear Ribonucleoprotein13 (Snu13) y Ribosomal RNA Processing 9 (Rrp9; Phipps *et al.*, 2011). U3 es una parte esencial del procesoma SSU ya que su región 5 de U3 contiene secuencias complementarias al 5'-ETS del precursor del 18S, hibridando con él y marcando los puntos de corte A₀, A₁ y A₂ (Phipps *et al.*, 2011; Sloan *et al.*, 2014).

El subcomplejo UtpA está formado por las proteínas Utp4, Utp5, Utp8, Utp9, Utp10, Utp15, Utp17 y Pol5, y es el primer subcomplejo en ser incorporado al pre-ARNr (Phipps *et al.*, 2011). Posteriormente se incorporan los subcomplejos UtpB y UtpC, en un orden que todavía no se ha establecido. El subcomplejo UtpB incluye las proteínas Utp1, Utp6, Utp12, Utp13, Utp18 y Utp21, mientras que el subcomplejo UtpC está compuesto por las proteínas Utp22, Rrp7, Rrp36 y las cuatro subunidades de la quinasa de caseína: Casein Kinase A1 (Cka1), Cka2, Ckb1 y Ckb2.

El complejo Mpp10-Imp3-Imp4 está formado por la M Phase Phosphoprotein 10 (Mpp10) y las Interacting Mpp10p Protein 3 y 4 (Imp3 y Imp4; Dunbar *et al.*, 1997; Lee y Baserga, 1999). El subcomplejo Bms1 incluye las proteínas Bms1 y U3 RNA 3-Phosphate Cyclase-Like1 (Rcl1). Rcl1 se asocia específicamente al snoRNA U3, aunque no forma parte del complejo snoRNP U3 (Wegierski *et al.*, 2001).

Todos los componentes del procesoma SSU intervienen en el procesamiento del pre-ARNr 35S y la pérdida de función de cualquiera de ellos se evidencia por defectos en el procesamiento en los puntos de corte A₀, A₁ o A₂, y en la reducción de los niveles de ARNr 18S maduro (Phipps *et al.*, 2011).

II.2.3.1.- El procesoma SSU en Arabidopsis

En organismos vegetales se han identificado proteínas ortólogas a los componentes del procesoma SSU de la levadura y los humanos. La anotación del genoma de Arabidopsis ha revelado la presencia de la mayor parte de sus componentes, aunque casi ninguno de ellos se ha estudiado. Los genes AT5G52490, AT1G56110, AT4G12600 y AT4G05410 codifican las ortólogas de levadura Nop1, Nop56, Snu13 y Rrp9, que son las proteínas asociadas al snoRNA U3 (Barneche *et al.*, 2001; Matsumura *et al.*, 2016). Asimismo, se conoce la existencia de las ortólogas de Imp3, Imp4 y Mpp10, codificadas por los genes AT5G15750, AT1G63780 y AT5G66540, respectivamente. La mayor parte de los componentes de los subcomplejos UtpA, UtpB y UtpC están codificadas en el genoma de Arabidopsis, a excepción de algunas proteínas, como Utp5, Utp8, Utp9 y Utp30 (Matsumura *et al.*, 2016). De entre todas ellas, sólo RRP7 ha sido estudiado en Arabidopsis (Micol-Ponce *et al.*, 2018).

II.2.3.2.- Presuntos ortólogos de componentes del procesoma en Arabidopsis

Con el objetivo de contribuir a la identificación y caracterización del procesoma SSU en las plantas, en el presente TFM se ha pretendido contribuir a establecer la función de los

presuntos ortólogos de Pol5, Rrp36, Utp18 y Utp22 en Arabidopsis, ninguno de los cuales se ha estudiado previamente.

Pol5 se identificó por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* por su actividad polimerasa de ADN *in vitro* (Shimizu *et al.*, 2002). Posteriormente se determinó que, *in vivo*, Pol5 carece de actividad polimerasa y participa en la maduración de la subunidad 60S de los ribosomas, uniéndose cerca de las secuencias activadoras de las unidades repetidas de ADNr 35S y regulando su transcripción (Shimizu *et al.*, 2002). Además, participa en el procesamiento del ITS2, uniéndose al precursor 27SA₂ y separándose tras el corte en el pre-ARNr 27SB. La pérdida de función de Pol5 provoca la acumulación de los precursores 35S y 27SB y la disminución de los niveles de ARNr 25S pero no del 18S, resultando en la disminución de subunidades 60S libres, lo que sugiere que Pol5 es necesario para el procesamiento del ITS2 (Ramos-Sáenz *et al.*, 2019). Su ortóloga humana es la proteína supresora de tumores MYB BINDING PROTEIN (MYBBP1A) que regula la expresión del ADNr 47S (Ramos-Sáenz *et al.*, 2019), mientras que en Arabidopsis, su presunta ortóloga está codificada por el gen AT5G64420.

En la levadura, Rrp36, que forma parte del subcomplejo UtpC, precipita con los pre-ARNr 35S, 33S y 32S (Gérus *et al.*, 2010) y también interacciona con el snoRNA U3 y las proteínas Rrp9 y Rrp5, necesarias para el ensamblaje del complejo UtpC (Pérez-Fernández *et al.*, 2007). La pérdida de función de Rrp36 provoca la acumulación del pre-ARNr 35S y la disminución de los pre-ARNr 33S y 32S, lo que indica que el corte en los sitios A₀ y A₁ está afectado. También disminuyen los niveles de los pre-ARNr 20S, que provoca un déficit del ARNr 18S maduro y, por tanto, de subunidades 40S (Gérus *et al.*, 2010). En Arabidopsis, la proteína ortóloga de Rrp36 está codificada por el gen AT1G12650.

En la levadura, Utp18 es una proteína esencial que forma parte del subcomplejo UtpB (Dragon *et al.*, 2002). Utp18 y Nop53, cuya ortóloga en Arabidopsis es SMALL ORGAN4 (SMO4; Micol-Ponce *et al.*, 2020), son proteínas adaptadoras del exosoma y actúan sobre diferentes sustratos. Utp18 y Nop53 comparten el dominio N-terminal LFXφD, denominado AIM (*arch-interacting motif*), que utilizan para reclutar a la helicasa mRNA Transport 4 (Mtr4), que a su vez recluta al exosoma para degradar el 5'-ETS y los productos de desecho de este procesamiento (Utp18) o para madurar el ARNr 5,8S (Nop53; Thoms *et al.*, 2015). Además, Utp18 interacciona con componentes de los subcomplejos Mpp10 y snoRNP U3 (Bernstein *et al.*, 2004). La pérdida de función de Utp18 en la levadura produce una acumulación del pre-ARNr 35S y una disminución de los pre-ARNr 27SA₂, 20S y del ARNr 18S maduro, lo que sugiere una posible función de Utp18 en el corte de los sitios A₀, A₁ y A₂ (Bernstein *et al.*,

2004). En *Arabidopsis*, la presunta ortóloga de Utp18 está codificada por el gen AT5G14050. El estudio de SMO4 (NOP53) en nuestro laboratorio reveló su conservación funcional con la de la levadura (Micol-Ponce *et al.*, 2020).

Utp22, a diferencia de las proteínas descritas anteriormente, tiene una función dual y transitoria en dos complejos. Por un lado, forma parte del subcomplejo UtpC del procesoma SSU. Cuando no está incorporada en el UtpC, se une a las proteínas Interact With Fork Head1 (Ifh1), Rrp7 y Casein Kinase2 (Ck2) para formar el complejo CURI (Figura 4), que coordina la transcripción de los genes de los ADNr 35S por la ARN pol I con la de los genes de los PR por la ARN pol II (Rudra *et al.*, 2007).

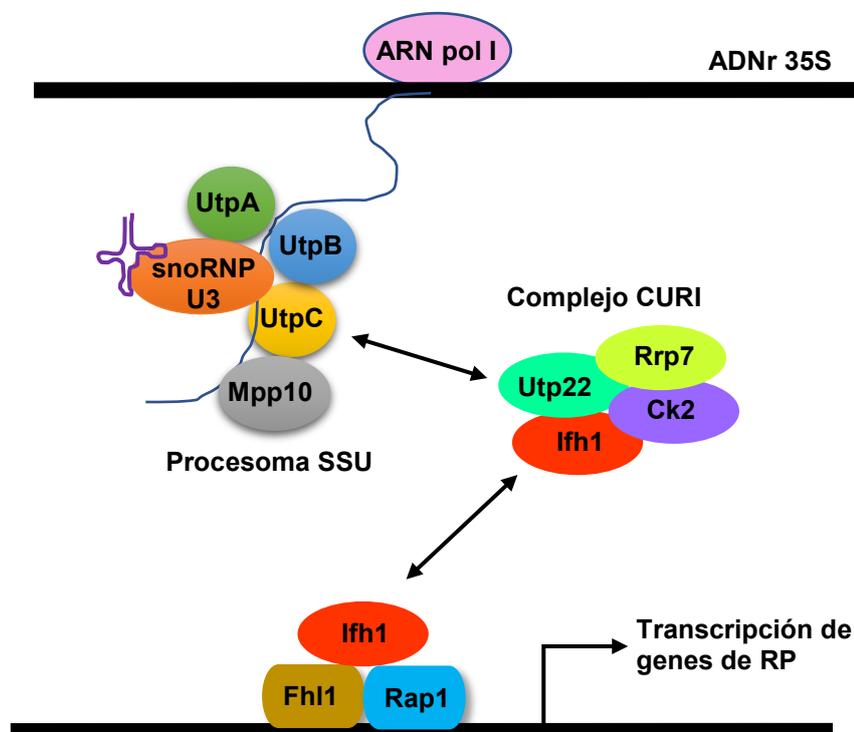


Figura 4.- Representación esquemática de la conexión entre la transcripción de los genes de ADNr 35S y la de los genes de las PR. Se representa el procesoma SSU con sus cinco subcomplejos, el complejo CURI y el Ifh1-Fhl1-Rap1. Las flechas bidireccionales representan la bifuncionalidad de Utp22 e Ifh1. Figura adaptada de Rudra *et al.* (2007).

La proteína Ifh1 es una activadora transcripcional esencial de los genes de las PR, ya que junto a Forkhead-Like1 (Fhl1) y Represor/Activating Protein1 (Rap1), se une a sus promotores y promueve su transcripción por la ARN pol II (Rudra *et al.*, 2007). Cuando el ADNr 35S se está transcribiendo, Utp22 está incorporada al subcomplejo UtpC, e Ifh1 está unida a los promotores de las PR permitiendo su transcripción. Pero cuando se detiene la

transcripción de los ADNr, Utp22 se libera del subcomplejo UtpC y secuestra a Iff1 para formar el complejo CUR1 y, por lo tanto, inhibir la transcripción de los genes que codifican PR. De esta forma, se mantiene un equilibrio transcripcional entre todos los componentes, siendo Utp22 una proteína clave para evitar la síntesis de PR en ausencia de transcripción de ADNr (Albert *et al.*, 2016). En Arabidopsis, AT1G63810 codifica la presunta ortóloga de Utp22.

En la levadura, Bms1 actúa como una GTPasa nuclear (Gelperin *et al.*, 2001), encargada de incorporar la nucleasa Rcl1 al pre-ribosoma 90S, que corta en el sitio A₂ del pre-ARNr 35S (Horn *et al.*, 2011). Tanto Bms1 como Rcl1 son proteínas esenciales en la levadura (Billy, 2000; Wegierski *et al.*, 2001). La pérdida de Bms1 altera el procesamiento en los sitios de corte A₀, A₁ y A₂, disminuyendo el precursor 27SA₂ y la cantidad de ARNr 18S maduro (Wegierski *et al.*, 2001). Además, la inhibición de la interacción Bms1-Rcl1 da lugar a la acumulación de los pre-ARNr 35S, 33S y 23S y una disminución de los pre-ARNr 27A₂ y 20S (Delprato *et al.*, 2014). AT1G06720 y AT5G22100 codifican las presuntas ortólogas de las proteínas Bms1 y Rcl1, respectivamente, pero tampoco se han estudiado (Matsumura *et al.*, 2016).

II.3.- Silenciamiento génico postranscripcional mediado por microARN

En los eucariotas, la regulación postranscripcional tiene gran importancia y algunos de estos procesos está mediado por microARN (miARN), ARN monocatenarios pequeños (20-24 nt) y endógenos que silencian la expresión génica, impidiendo la traducción de sus ARNm diana, de los que son complementarios (Liu *et al.*, 2017).

Los genes de los miARN (genes *MIR*) los transcribe la ARN pol II, generando precursores, denominados pri-miARN, con capacidad de formar enlaces intracatenarios por complementariedad de bases, adoptando forma de horquilla. Los pri-miARN sufren procesos de maduración más o menos complejos, que se producen en el núcleo, ejecutados en Arabidopsis por las proteínas DICER-LIKE1 (DCL1), DNA-BINDING PROTEIN 1 (DRB1) e HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1; Liu *et al.*, 2017), entre otras, para dar lugar a una molécula bicatenaria, en la que el miARN constituye una de las cadenas. Los grupos 2'-OH de las ribosas de sus extremos 5' son metilados por HUA ENHANCER 1 (HEN1) para evitar su degradación y el dúplex es exportado al citoplasma (Bologna y Voinnet, 2014).

Una vez en el citoplasma, el miARN maduro se incorpora al complejo de silenciamiento RNA-INDUCE SILENCING COMPLEX (RISC) del que una RNasa, que es un miembro de la familia ARGONAUTE (AGO), y que en Arabidopsis es principalmente AGO1, es el elemento central (Bologna y Voinnet, 2014). El miARN dirige al RISC al ARNm diana, del que es

parcialmente complementario, lo que provoca la degradación del ARNm o el impedimento de su traducción. En las plantas, el mecanismo más frecuente es la degradación del ARNm diana, que contiene una región con una complementariedad casi perfecta con el miARN. Sin embargo, los ARNm de los animales tienen varias regiones con una complementariedad muy imperfecta con el miARN que los regula, lo que produce mayoritariamente el bloqueo de su traducción (Liu *et al.*, 2017). Los miARN participan en la defensa contra infecciones virales en las plantas, en la transducción de señales, en el desarrollo y en el crecimiento (Voinnet, 2009).

II.4.- Los miARN artificiales como herramienta de inactivación génica

A diferencia de los animales, en las plantas los miARN presentan una complementariedad casi completa con los ARNm diana, lo que los convierte en un mecanismo de silenciamiento altamente específico y fácilmente programable (Liu *et al.*, 2017). Hasta la llegada de las técnicas de edición génica basadas en el sistema bacteriano *CRISPR-cas* (Makarova *et al.*, 2015), era muy difícil obtener mutantes con fenotipo morfológico de genes redundantes, y prácticamente imposible construir mutantes múltiples si los genes redundantes, habitualmente parálogos, estaban próximos en el genoma, como ocurre cuando la duplicación génica que los originó es reciente. La estrategia empleada para el silenciamiento post-transcripcional de estos genes ha sido el diseño de miARN artificiales (amiARN), capaces de silenciar un solo gen pero también a grupos de parálogos (Schwab *et al.*, 2006; Eamens *et al.*, 2011; Jover-Gil *et al.*, 2014).

Aunque las técnicas *CRISPR-cas* están desplazando en muchas aplicaciones a las basadas en ARN interferentes, la utilidad de los amiARN es enorme en los casos en el que el gen diana sea esencial y, por tanto, no sea posible obtener mutantes nulos viables para estudiar su función. Los amiARN no generan mutantes sino fenocopias de alelos, habitualmente hipomorfos, ya que el silenciamiento no suele ser completo (Jover-Gil *et al.*, 2014). Esta estrategia se ha aplicado en el laboratorio, al constatar que los alelos nulos de los genes *POL5*, *RRP36*, *UTP18* y *UTP22* no son viables (Martínez Fenoll, 2022). Por tanto, se diseñaron dos amiARN diferentes para silenciar parcialmente la expresión de dichos genes y poder estudiar así su fenotipo morfológico y molecular, para entender su función.

III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La principal línea de investigación en el laboratorio de la profesora María Rosa Ponce (en adelante, el laboratorio) es entender cómo se coordina la biogénesis del ribosoma en *Arabidopsis*, identificando y caracterizando funcionalmente nuevos reguladores. Para ello se sigue una aproximación genética, que consiste en la obtención de mutantes nulos o hipomorfos de los genes candidatos, para deducir de su ausencia, su función. En los últimos años, en el laboratorio se han estudiado varios FBR, como SMO4, RRP7, RPS24A y RPS24B, constatando una alta conservación funcional con los ortólogos de la levadura (Micol-Ponce *et al.*, 2018; Micol-Ponce *et al.*, 2020; Cabezas-Fuster *et al.*, 2023).

El procesoma SSU se ha caracterizado en la levadura y su existencia se supone en *Arabidopsis*, en base a la anotación de su genoma, fundamentalmente, pero no se ha demostrado ni investigado. Este es el caso de los genes AT5G64420, AT1G12650, AT5G14050 y AT1G63810, que codifican las supuestas ortólogas de las proteínas que forman parte del procesoma SSU de la levadura Pol5, Rrp36, Utp18 y Utp22, respectivamente. Algunos podrían actuar también como reguladores de la expresión del ADNr 45S. Uno de los objetivos actuales del laboratorio es determinar la función de estos genes de *Arabidopsis*, en la regulación de la expresión del ADNr 45S y en el procesamiento del pre-ARNr 45S.

El análisis de líneas insercionales de *POL5*, *RRP36*, *UTP18* y *UTP22* llevada a cabo en el laboratorio, reveló que todos ellos son genes esenciales, como ocurre en la levadura, ya que la homocigosis de sus alelos insercionales, que son muy probablemente nulos, causa letalidad embrionaria o gametofítica. Para poder estudiar la función de estos genes, evitando la letalidad asociada a su ausencia de la función, se diseñaron dos amiARN para silenciar parcialmente la expresión de cada uno, y se obtuvieron plantas transformadas con los transgenes productores de estos amiARN (Martínez Fenoll, 2022).

En este TFM se ha continuado con la estrategia anteriormente descrita, seleccionando y analizando las líneas portadoras de los transgenes. Se ha pretendido obtener líneas estables, en las que los transgenes estuvieran en homocigosis. Las líneas se utilizarían para establecer la función de los genes silenciados, mediante el análisis de la biogénesis del ribosoma, en concreto la expresión del ADNr 45S y el procesamiento del pre-ARN 45S.

También se ha abordado en este TFM parte de la caracterización funcional del gen AT1G06720, que codifica la presunta ortóloga de *Bms1*, otro componente del procesoma SSU. Este estudio se inició a partir del mutante *denticulata 9 (den9)*, procedente de una colección de mutantes foliares del laboratorio del profesor José Luis Micol (Berná *et al.*, 1999; Navarro Quiles, 2016; Ortega Menaches, 2020) y que generosamente ha compartido con nosotros. A diferencia del resto de los mutantes nulos anteriormente citados, *den9* es viable.

VI.- 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, Trabajos de Fin de Grado y Trabajos de Fin de Máster, realizados en los laboratorios de José Luis Micol y María Rosa Ponce, y que pueden consultarse en: <https://genetics.edu.umh.es>. En este apartado de Materiales y métodos se reproducen literalmente algunos párrafos de dichos trabajos, ya que corresponden a protocolos bien establecidos en ambos laboratorios.

Se utilizan numerosas abreviaturas y acrónimos, correspondientes en su mayoría a las unidades de medida del Sistema Internacional, y otras específicamente empleadas en Biología Molecular. Además, se ha procurado obedecer 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 utilizados 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.

Como recomienda la RAE en su Ortografía de la lengua española (2010), no se realiza el plural de las siglas añadiendo al final una “s” minúscula: se escribe “el ARNr” y “los ARNr” o “el FBR” y “los FBR”. Se escriben en cursiva algunos anglicismos de uso común, que carecen de una traducción al español generalmente aceptada.

IV.2.- Nomenclatura genética

La nomenclatura que se aplica en esta memoria a genes, mutaciones y fenotipos se atiene estrictamente a las pautas propuestas para Arabidopsis por Meinke y Koornneef, 1997, cuya versión más reciente puede encontrarse en <http://www.arabidopsis.org>. Los alelos de un gen se indican con abreviaturas en cursiva, empleándose las mayúsculas para el silvestre y las minúsculas para los mutantes. Las proteínas se indican en tipografía normal, con mayúsculas. Si existen diferentes genes que han recibido la misma denominación, se les distingue añadiendo un número al grupo de dos, tres o cuatro letras que les denota. Los diferentes alelos mutantes de un gen reciben un distintivo numérico, separado por un guion del identificador del gen. Sirva como ejemplo de lo anterior que hemos estudiado el mutante *bms1-1* del gen *BMH SENSITIVE 1 (BMS1)*, cuyo producto es la proteína BMH SENSITIVE 1 (BMS1).

No existe una nomenclatura de aceptación general para los genotipos de Arabidopsis. Hemos empleado la expresión línea (también planta, individuo, semilla, plántula o cualquier

órgano) *bms1-1* para referirnos a cualquier homocigoto para esta mutación. Salvo que se indique lo contrario, las plantas que se describen en este trabajo son homocigóticas para las mutaciones que se mencionan en cada caso.

Hemos empleado la nomenclatura universalmente aceptada para las líneas portadoras de amiARN, con el prefijo *amiR* seguido de un guión y del nombre del gen diana, seguido de un punto y un número que indica el amiARN que porta, cuya numeración es arbitraria, en el caso en que se hayan diseñado más de uno (Jover-Gil *et al.*, 2014), como es el caso. Cada planta T₁ portadora de un *amiR* se ha distinguido de las otras con un guión y un número. Como resultado, las líneas o plantas, por ejemplo, para inactivar *POL5*, se han denominado *amiR-POL5.1-1*, *amiR-POL5.1-3* o *amiR-POL5.2-1*.

IV.3.- Estirpes de *Arabidopsis* empleadas en este trabajo

Hemos empleado las estirpes silvestres y mutantes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. que se recogen en la Tabla 1. Sus semillas se conservaron en tubos *ependorf* a 4°C.

Tabla 1.- Estirpes de *Arabidopsis* usadas en este trabajo

Estirpe	Código del NASC	Fondo genético	Mutágeno y mutación	Genes mutados	Origen
<i>Ler</i>	NW20	<i>Ler</i>	Tipo silvestre	-	1
Col-0	N1092	Col-0	Tipo silvestre	-	1
<i>den9</i>	-	<i>Ler</i>	EMS (G→A)	AT1G06720	2
SALK_061887	N561887	Col-0	ADN-T en el 3'-UTR	AT1G06720	3
SAIL_1293_E04	N848419	Col-0	ADN-T en el 3'-UTR	AT1G06720	3

¹Obtenida inicialmente del NASC y replicada varias veces por autofecundación en el laboratorio de J.L. Micol. ²Berná *et al.* (1999). ³Se indica el código AGI del gen anotado en la colección SALK o SAIL, que no es necesariamente el que causa el fenotipo foliar del mutante a estudio.

IV.4.- Condiciones de 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.4.1.- Cultivo en placa de Petri

La mayoría de los cultivos se iniciaron en placas de Petri de 14 cm de diámetro, que contenían unos 100 ml de medio sólido GM (apartado IV.7.1.2, en la página 17). La siembra de las semillas de *Arabidopsis* se llevó a cabo tras su esterilización por inmersión con

agitación, durante 5 min en etanol al 70% y durante 8-10 min (usualmente), 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 cabinas de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Se sembraron de 16 a 60 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 fueron precintadas con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, que constituye una barrera efectiva para cualquier partícula en aerosol sin impedir el intercambio de gases.

Las placas de Petri 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 unos 75 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2$ de luz blanca, suministrada por tubos fluorescentes Sylvania Standard F20W/133-RS Cool White o tubos led ToLEDo T8 10 W 4000 K Cool White en cámaras de cultivo Conviron TC16.

Las plantas de interés, cuyo cultivo se había iniciado mediante siembra en placa de Petri, fueron posteriormente trasplantadas a macetas, en las que completaron su ciclo de vida en las condiciones que se detallan en el apartado siguiente.

IV.4.2.- Cultivo en maceta

Los cultivos en maceta se efectuaron en bandejas de plástico de 28 x 50 cm, con 42 alveolos, cada uno de ellos de 5 x 5 cm (diámetro x 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 x 5 cm (diámetro x altura). Las macetas de rejilla impiden que el sustrato se adhiera al alveolo, facilitando la extracción de las plantas para la realización de cruzamientos o la recolección de semillas. 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 pinzas, desde la placa de Petri en la que había permanecido durante las primeras tres semanas de su ciclo de vida.

Las plantas recién trasplantadas permanecieron durante 3-5 días cubiertas con un plástico transparente, en el que se realizaron algunos agujeros para reducir la condensación de agua. Cuando se manifestó el alzado y la elongación de los entrenudos al término de la etapa vegetativa, se aisló 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 climática visitable, 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, Philips F72T12/D/VHO 160 W 1500 SF, o tubos led ToLEDo T8 20 W 4000 K Cool White, totalizando unos $75 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$.

Las macetas y bandejas de alveolos 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 (apartado IV.7.1.1, en la página 17). Se suspendió el riego cuando la floración se interrumpió, para propiciar el secado de las plantas, que fueron mantenidas en la cámara al menos dos semanas más, para proceder finalmente a la recolección de sus semillas.

IV.4.3.- Recolección de semillas

Para la recolección de todas las semillas de una planta seca, producto de su autofecundación, se restregó dicha planta contra un colador, que se sujetó sobre un papel de filtro. La mezcla de semillas, fragmentos de silicuas y otras partes secas de la planta que cayó sobre el papel fue cribada con un colador de malla más fina que la del primero. Se eliminaron así todas las partículas más grandes que las semillas. Estas últimas se almacenaron en tubos *ependorf*, que se conservaron a 4°C en oscuridad.

IV.4.4.- Cruzamientos

Seguimos el procedimiento de emasculación descrito por Kranz y Kirchheim (1987) para el cruzamiento entre estirpes, una de las cuales se utilizó como donante (parental masculino), y la otra, como receptora de polen (parental femenino). Se eligió un grupo de capullos florales en el ápice de un tallo inflorescente de la planta que se usó como parental femenino, eliminando las flores maduras, presuntamente autofecundadas, y los capullos, a excepción de aquellos cuyos pétalos fueron apenas visibles. A estos se les extirparon los sépalos, pétalos y estambres inmaduros, obteniendo flores con un pistilo no fecundado como única estructura funcional. Estas manipulaciones se realizaron con pinzas de microcirugía esterilizadas por inmersión en etanol al 95% y secadas al aire, a fin de destruir cualquier traza de polen. De la planta donante de polen se extirpó una flor madura, presionándola con las pinzas a la altura de los sépalos, a fin de poner en contacto varias de sus anteras con el pistilo de la flor receptora del polen. El cruzamiento se señaló adhiriendo al tallo, junto a la flor fecundada, una etiqueta en la que se indicó el genotipo del parental masculino empleado para

la polinización. Finalmente, la planta fecundada por este procedimiento fue devuelta a la cámara de cultivo, en la que permaneció hasta la formación y maduración de la silicua, que fue recogida y depositada en un tubo *eppendorf* adecuadamente rotulado.

IV.5.- Disoluciones

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

IV.5.1.- Medios de cultivo para Arabidopsis

Los medios de cultivo mencionados en este apartado se prepararon disolviendo sus componentes en agua. Todas las esterilizaciones en autoclave se efectuaron a $1 \text{ kg}/\text{cm}^2$ y 121°C durante 20 min. Su adición a un medio de cultivo esterilizado en autoclave se realizó tras estabilizar a este último a 55°C .

IV.5.1.1.- Medio 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 añadieron, 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 se prepararon en las concentraciones indicadas y se esterilizaron 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 preparó añadiendo, a 900 ml de agua, 4,32 g de H_3BO_3 ; 2,77 g de $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 124 mg de $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 287 mg de $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 48,7 mg de $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 584,4 mg de NaCl, y 2,38 mg de $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Finalmente, se añadió agua hasta 1 l.

IV.5.1.2.- Medios de cultivo sólidos

Los medios de cultivo sólidos se prepararon por adición de Gelrite (Duchefa), a una concentración final del 0,6% m/v, tras la disolución del resto de los componentes en agua. Una vez finalizada su esterilización en autoclave, los medios de cultivo se mantuvieron durante

20-30 min en un baño a 55°C antes de su vertido en placas de Petri, que se realizó en cabinas de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Las placas de Petri con medio sólido se conservaron hasta un mes a 4°C, en posición invertida y precintadas.

Medio GM (Germination Medium): NH_4NO_3 10,3 mM; H_3BO_3 50,1 μM ; CaCl_2 1,5 mM; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,05 μM ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,05 μM ; Na_2EDTA 55,4 μM ; MgSO_4 0,75 mM; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 50 μM ; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 μM ; KI 2,5 μM ; KNO_3 9,4 mM; KH_2PO_4 0,62 mM; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 μM ; sacarosa 29,2 mM; MES [ácido 2-(N-morfolino)-etano sulfónico] 2,3 mM, y 6 g/l de Gelrite.

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 hasta la total disolución de sus componentes y se ajustó el pH a 5,7 con KOH 1 M. Posteriormente, se ajustó el volumen a 1 l y se añadieron 6 g de Gelrite. Se esterilizó en autoclave.

IV.5.1.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos

El medio GM se suplementó con higromicina B (Invitrogen) a una concentración final de 15 $\mu\text{g/ml}$, con el objetivo de seleccionar plantas portadoras de transgenes. El antibiótico se añadió al medio después de que este hubiera sido esterilizado en autoclave.

IV.5.2.- Tampones y otras disoluciones de uso general

IV.5.2.1.- Disoluciones para extracción de ADN

Tampón de extracción: Tris-HCl 100 mM pH 8,0; Na_2EDTA 50 mM, y NaCl 0,5 M. Para preparar 50 ml de tampón TE se añadieron 5 ml de Tris-HCl 1 M, 5 ml de Na_2EDTA 0,5 M y 5 ml de NaCl 5M a 35 ml de agua estéril. Puede conservarse varios meses a 4°C.

SDS al 20%: Se preparó 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 1 N.

Acetato de potasio 5 M: Se preparó disolviendo, a 50°C, 49,1 g de KCH_3COO (acetato de potasio) en 50 ml de agua y ajustando el pH a 7,5 con CH_3COOH (ácido acético glacial). Finalmente se enrasó el volumen a 100 ml con agua.

Acetato de sodio 3 M pH 5,2: Se preparó disolviendo 12,3 g de acetato de sodio (NaCH_3COO) en 50 ml de agua, y ajustando el pH a 5,2 con ácido acético glacial en una campana extractora de gases. Por último, se esterilizó en autoclave

IV.5.2.2.- Disoluciones para electroforesis de ADN

Tampón TAE 50x: Tris-base [Tris-(hidroximetil)aminometano] 2 M; 5,71% v/v de CH_3COOH , y Na_2EDTA 50 mM pH 8,0. El pH final debe ser 7,6. Para preparar un litro se

mezclaron 242 g de Tris-base, 57,1 ml de CH₃COOH glacial y 100 ml de Na₂EDTA 0,5 M pH 8,0.

Tampón de carga 6x 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, y Na₂EDTA 10 mM.

Marcador de peso molecular para electroforesis en geles de agarosa: Se diluyó el marcador (1 kb Plus DNA ladder de Invitrogen; 1 µg/µl) en tampón de carga hasta una concentración de 0,1 µg/µl. Se usaron 6 µl por pocillo de un gel de agarosa convencional. Se conservó a -20°C.

IV.5.3.- Tampones y disoluciones para los análisis de *northern*

IV.5.3.1.- Disoluciones para la 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.

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.5.3.2.- Disoluciones para la transferencia de ARN

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.5.3.3.- Disoluciones para la hibridación, lavado y detección

Disolución de hibridación: Na_2HPO_4 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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 ml H_3PO_4 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.6.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

IV.6.1.- Síntesis de oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos usados en este trabajo (Tabla 2) fueron sintetizados por Merck.

Tabla 2.- Oligonucleótidos usados en este trabajo

Propósito	Nombre	Secuencia (5'→3')
Genotipado de AT1G06720 (<i>BMS1</i>) y de sus líneas insercionales	den9_F	CTCTAACGACAGCCTTGCAAC
	den9_R	CAGAGTTTTTCACCTGTAGCCG
	LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
	LB_1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC

Tabla 2 (continuación).- Oligonucleótidos usados en este trabajo

Propósito	Nombre	Secuencia (5'→3')
Análisis del silenciamiento génico por RT-qPCR	POL5.1-F	CTATGGCAGTTGACAGAGA
	POL5.1-R	TTGTGGCTTATCTGAATTTT
	RRP36.2-F	ACTATCTCAAAAAATCGGAAAT
	RRP36.2-R	CAAACTGCTTATCTCTATTCCCT
	UTP18.1-F	GGCAGATTCCCTGACTACGAG
	UTP18.1-R	TGTA CT CAGACCCAGAGATCAA
	UTP22.1-F	AACGTAGATGAATCGCATATAACA
	UTP22.1-R	ATTGGATTT CATAGCCACTTCTAA
	ACT2-F	GCACCCTGTTCTTCTTACCG
	ACT2-R	ATCCAGCACAATACCGGTTGTA

IV.6.2.- Amplificaciones mediante PCR

Se usó la enzima GoTaq Flexi (Promega) para las amplificaciones de ADN genómico de *Arabidopsis* y de ADNc; es una versión recombinante, barata y muy procesiva de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*. Los cebadores y los desoxirribonucleótidos se añadieron a una concentración final de 0,4 μ M y 0,2 mM, respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo en termocicladores BioRad T100 Thermal Cycler. Los volúmenes de reacción oscilaron entre 10 μ l, dependiendo del uso posterior de los productos de amplificación.

Los programas de PCR que hemos usado incluían una etapa previa de calentamiento a 95°C durante 90 s, seguida de 35 ciclos en los que se repetía una fase de 30 s a 95°C para desnaturalizar los moldes, otra de 15 s a la temperatura de hibridación de los cebadores y una final a 72°C para la polimerización, cuya duración dependió del tamaño del producto de PCR esperado, a razón de 1 min/kb en el caso de la polimerasa GoTaq Flexi. Se programó una etapa final, no cíclica, de 10 min a 72°C, para el rellenado de las moléculas bicatenarias con colas 5' sobresalientes.

Se programaron temperaturas de hibridación entre 5 y 10°C inferiores a las de fusión (T_m), que se calcularon con los programas Tm Calculator y Multiple Primer Analyzer (ThermoFisher). Este último calcula también la probabilidad de que un oligonucleótido forme apareamientos intracatenarios y autodímeros.

IV.6.3.- Aislamiento de ácidos nucleicos

IV.6.3.1.- Aislamiento de ADN genómico de *Arabidopsis*

El ADN genómico se purificó según Dellaporta *et al.* (1983), con algunas modificaciones, siguiendo el procedimiento habitual del laboratorio. Se introdujo en un tubo *ependorf* una planta entera recolectada 14 días después de la estratificación (dde) y se le

añadieron 500 µl de tampón de extracción, macerándola en un macerador automático (MixerMill 300, Qiagen). A continuación, se añadieron 35 µl de SDS al 20%, incubando la mezcla en un baño termostático a 65°C durante 5 min. Finalmente, se añadieron 130 µl de KCH₃COO 5 M, incubando durante 15 min a 4°C, y centrifugando durante 10 min a 13.000 rpm (14.927 g) en una microfuga. El sobrenadante se transfirió a un tubo *ependorf* vacío, se precipitó durante 20 min a -20°C con 640 µl de isopropanol y 60 µl de NaCH₃COO 3 M, y se centrifugó durante otros 10 min a 10.000 rpm. El precipitado se lavó con 300 µl de etanol del 70% y se centrifugó una vez más durante 5 min, tras lo cual se dejó secar a temperatura ambiente, para resuspenderlo después en 300 µl de agua y almacenar la disolución a 4°C.

IV.6.3.2.- Aislamiento de ARN de Arabidopsis

Las extracciones de ARN se realizaron a partir de rosetas recolectadas 15 dde, que se introdujeron en tubos *ependorf*, se transfirieron inmediatamente a nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Las extracciones se realizaron con *TRI Reagent* (Sigma-Aldrich), según las indicaciones del fabricante. Para eliminar posibles trazas de ADN genómico se realizó un tratamiento adicional con la DNasa *TURBO DNA-free* (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante.

IV.6.4.- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Se utilizaron geles del 1% m/v en agarosa para las electroforesis de ADN. Las electroforesis se realizaron en cubetas horizontales, empleando como electrolito TAE 1x (apartado VI.8.3.2, en la página 18). La disolución de la agarosa en el tampón se realizó mediante calentamiento en un microondas. Una vez enfriada la disolución a 55°C se añadió bromuro de etidio hasta una concentración de 0,5 µg/ml. Las electroforesis en geles de agarosa se llevaron a cabo a voltaje constante: se aplicaron 90 V en geles preparados con 50 ml de TAE 1x y 120 V para geles preparados con volúmenes mayores (75, 100 y 200 ml). La visualización de las moléculas se consiguió iluminando los geles con luz UV de 312 nm, fotografiándose las imágenes en un documentador de geles Vilber E-Box VX5.

IV.7.- Análisis de *northern*

La hibridación de tipo *northern* permite la detección de moléculas de ARN de interés, utilizando una sonda complementaria, que puede ser de ADN o ARN. 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 sus extremos con una molécula de

digoxigenina. La detección se realizó mediante una reacción quimioluminiscente, utilizando un anticuerpo antidigoxigenina (anti-DIG) conjugado con una enzima con actividad fosfatasa alcalina y el sustrato CDP-Star (C₁₈H₁₉Cl₂O₇Na₂P). La desfosforilación por la fosfatasa alcalina del sustrato CDP-Star emite luz, que impresiona una película de rayos X, permitiendo detectar la señal.

Para la electroforesis del ARN se disolvieron en un microondas 0,7 g de agarosa en 50 ml de agua. En paralelo, se preparó una disolución con formaldehído al 36% y MOPS 10x añadiendo de cada uno 3,6 ml y 6 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 2 µg de ARN con agua, hasta alcanzar un volumen de 6 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 la transferencia, se colocó un portageles en posición invertida dentro de una bandeja con 400 ml de SSC 10x, como tampón de transferencia. Se cubrió con una tira de papel de filtro Whatman, humedecido en el SSC 10x previamente, 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. 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.

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 µJ/cm². 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 10 ml de la disolución de prehibridación durante 2 h. Se desechó la disolución y se sustituyó con 8 ml de disolución de hibridación (disolución de prehibridación con 350 ng de sonda), dejándola toda la noche en las mismas condiciones que la prehibridación.

Tras la hibridación, se realizaron dos lavados de 5 min a temperatura ambiente con 25 ml de disolución SSC 2x 0,1% SDS, un lavado de 15 min a 65°C con 25 ml SSC 0,2x 0,1%

SDS, uno con 10 ml de disolución 1 a temperatura ambiente y uno con 10 ml de disolución 2 durante 30 min a temperatura ambiente.

A continuación, se inició la detección, que se realizó a temperatura ambiente. Se transfirió la membrada a un tubo de hibridación con 8 ml de la disolución de detección 2 a la que se le añadió 0,75 U de anti-DIG-AP (Roche), y se mantuvo en el horno de hibridación durante 20 min. Después, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con 25 ml de la disolución de detección 1 y finalmente se lavó la membrana con 25 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 cubrió 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), 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), que detendría la reacción de revelado, en donde se mantuvo durante 3 min, para finalmente lavarla con agua en la tercera cubeta.

IV.8.- Caracterización fenotípica de estirpes de Arabidopsis

Las observaciones de rutina de las plantas se llevaron a cabo con una lupa binocular Olympus SZ30 60TR. Las fotografías de plantas cultivadas en placas se tomaron con una lupa trinocular Nikon SMZ1500, dotada de una cámara fotográfica Nikon DS-Ri2, con iluminación provista por una fuente de luz led anular de 72 mm de diámetro HAYEAR MSCled72.

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1.- Aislamiento y caracterización fenotípica de las líneas *amiR-POL5*, *amiR-RRP36*, *amiR-UTP18* y *amiR-UTP22*

En *Arabidopsis*, los genes AT5G64420, AT1G12650, AT5G14050 y AT1G63810 codifican las presuntas ortólogas de las proteínas que forman parte del procesoma SSU de la levadura Pol5, Rrp36, Utp18 y Utp22, respectivamente. La mayoría de los genes que codifican las proteínas de este complejo son esenciales para la supervivencia de la levadura, causando sus alelos nulos letalidad (Vandenbol y Portetelle, 1999; Shimizu *et al.*, 2002; Bernstein *et al.*, 2004; Gérus *et al.*, 2010). Antes del inicio de este trabajo, se caracterizaron líneas insercionales portadoras de alelos presuntamente nulos de estos genes, y se determinó que, en homocigosis, todos ellos provocaban letalidad embrionaria o gametofítica (Martínez Fenoll, 2022). Para evitar la letalidad asociada a la pérdida de función total de estos genes, se decidió obtener líneas portadoras de transgenes productores de amiARN, en las que se silenciara parcialmente la expresión de *POL5*, *RRP36*, *UTP18* y *UTP22*, dificultando la traducción de sus ARNm. Se diseñaron dos amiARN diferentes para cada uno de los genes, con el objetivo de obtener al menos una línea que silenciase lo suficiente el gen diana para producir un fenotipo mutante morfológico y molecular evidente, pero viable (Figura 5).

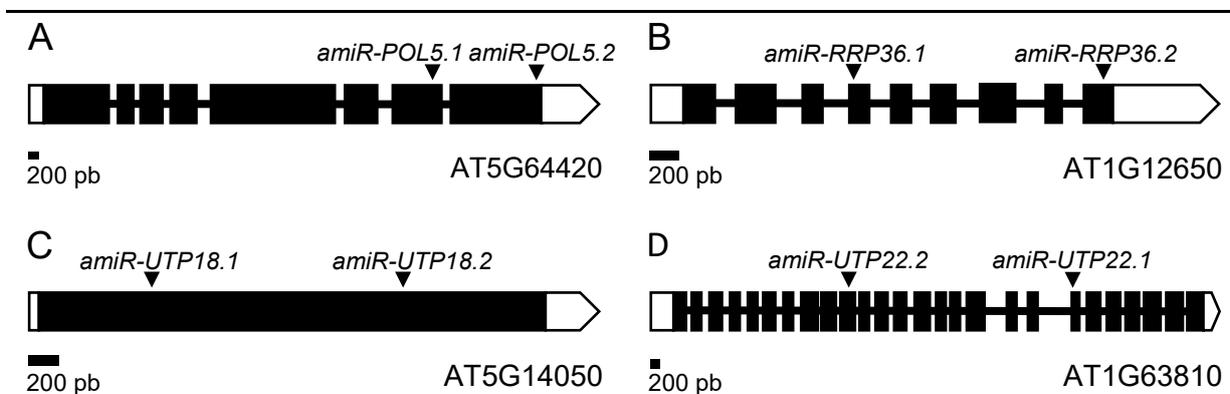


Figura 5.- Representación esquemática de los genes diana de los amiARN. Los triángulos invertidos marcan la región de hibridación de los amiARN en los ARNm. Los rectángulos y líneas negras representan los exones e intrones, respectivamente y los blancos, las regiones 5' y 3'-UTR.

Se transformaron plantas de *Arabidopsis* con construcciones portadoras de cada uno de los genes productores de los amiARN y de un gen de resistencia al antibiótico higromicina, situados ambos en la región del ADN-T del vector que se insertaría en el genoma de las plantas (Martínez Fenoll, 2022). Se recolectaron las semillas T₁ de las plantas transformadas (plantas T₀), que se sembraron en medio con higromicina para seleccionar aquellas

resistentes, es decir, las que poseen la construcción. Dado que el ADN-T se inserta al azar en el genoma de *Arabidopsis*, en cada planta T₁ se encontrará en una posición diferente del genoma, lo que puede afectar a la expresión de los transgenes que porta. Por eso, es necesario obtener distintas plantas T₁ que constituirán líneas independientes, ya que serán genéticamente diferentes entre sí, debido a la posición del ADN-T. La obtención de varias líneas T₁ con un fenotipo parecido, permite confiar en que éste se debe a la expresión del transgén que portan.

Se seleccionaron 4 plantas T₁ portadoras del transgén con el *amiR-POL5.1*, 5 con el del *amiR-POL5.2*, 7 con el del *amiR-RRP36.1*, 7 con el del *amiR-RRP36.2*, 8 con el del *amiR-UTP18.1* y 4 con el de *amiR-UTP22.1* (Tabla 3). Todas las líneas T₁ *amiR-POL5.1* procedían de plantas de la misma maceta, mientras que las otras procedían de plantas transformadas T₀ que estaban en macetas diferentes y en la tabla se distinguen como 1T₀, 2T₀ y 3T₀. Las líneas T₁ que no exhibieron fenotipo mutante se descartaron, por lo que no recibieron denominación.

Tabla 3.- Líneas T₁ seleccionadas

Transgén	Línea T ₁	Denominación de la línea
<i>amiR-POL5.1</i>	1T ₀ 1T ₁	<i>amiR-POL5.1-1</i>
	1T ₀ 3T ₁	<i>amiR-POL5.1-2</i>
	1T ₀ 4T ₁	<i>amiR-POL5.1-3</i>
	1T ₀ 5T ₁	-
<i>amiR-POL5.2</i>	1T ₀ 1T ₁	-
	1T ₀ 2T ₁	-
	1T ₀ 3T ₁	<i>amiR-POL5.2-1</i>
	1T ₀ 4T ₁	-
	2T ₀ 2T ₁	-
<i>amiR-RRP36.1</i>	1T ₀ 1T ₁	-
	1T ₀ 2T ₁	-
	1T ₀ 4T ₁	-
	1T ₀ 6T ₁	<i>amiR-RRP36.1-1</i>
	1T ₀ 7T ₁	-
	1T ₀ 8T ₁	-
	2T ₀ 1T ₁	-

Tabla 3 (continuación).- Líneas T₁ seleccionadas

Transgén	Línea T ₁	Denominación de la línea
<i>amiR-RRP36.2</i>	1T ₀ 1T ₁	<i>amiR-RRP36.2-1</i>
	1T ₀ 2T ₁	-
	1T ₀ 4T ₁	-
	1T ₀ 5T ₁	-
	1T ₀ 6T ₁	-
	1T ₀ 7T ₁	-
	2T ₀ 1T ₁	<i>amiR-RRP36.2-2</i>
<i>amiR-UTP18.1</i>	1T ₀ 1T ₁	-
	1T ₀ 2T ₁	-
	1T ₀ 3T ₁	<i>amiR-UTP18.1-1</i>
	1T ₀ 4T ₁	<i>amiR-UTP18.1-2</i>
	1T ₀ 5T ₁	-
	1T ₀ 6T ₁	-
	3T ₀ 1T ₁	-
3T ₀ 2T ₂	-	
<i>amiR-UTP22.1</i>	1T ₀ 1T ₁	<i>amiR-UTP22.1-1</i>
	1T ₀ 3T ₁	-
	1T ₀ 4T ₁	-
	2T ₀ 1T ₁	<i>amiR-UTP22.1-2</i>

Este TFM comenzó con la recolección de las semillas T₂ y su siembra en placas de Petri, cuyo medio de cultivo se suplementó con higromicina. Debido que la resistencia al antibiótico es dominante y el efecto de los amiARN probablemente semidominante, las plantas T₂ resistentes al antibiótico podrían ser homocigotas o heterocigóticas para la construcción y el fenotipo observado, en su caso, pudiera deberse a la presencia de una dosis o dos del transgén portador del amiARN. Por lo tanto, antes de poder caracterizar el efecto del silenciamiento por los amiARN en las plantas, es conveniente establecer líneas homocigotas, mediante el análisis de la segregación de la resistencia al antibiótico con las semillas T₃. La aparición de plantas sensibles revelaría que la planta T₂ parental era heterocigótica, pudiendo también determinar el número de inserciones por el cociente entre las plantas sensibles y las resistentes. Sólo si todas las plantas T₃ son resistentes al antibiótico, se puede concluir que el parental T₂ contiene el transgén productor del amiARN en homocigosis.

De acuerdo con estas premisas, se trasplantaron a macetas entre 5 y 10 plantas T₂ resistentes de cada línea 21 dde, para obtener sus semillas T₃, que se sembraron de nuevo en medio suplementado con higromicina. De un total de 16 plantas T₂ portadoras del transgén *amiR-POL5.1* y de 33 plantas T₂ con el transgén *amiR-POL5.2*, no se encontraron líneas

homocigotas y las plantas resistentes fueron de fenotipo silvestre, a excepción de las líneas *amiR-POL5.1-1*, *amiR-POL5.1-2* y *amiR-POL5.1-3*, que fueron de fenotipo mutante, pero de severidad variable. Posteriormente se sembraron estas últimas líneas en medio de cultivo sin higromicina para observar su fenotipo sin la influencia del antibiótico, ya que éste pudiera alterar el fenotipo de las plantas (Figura 6).

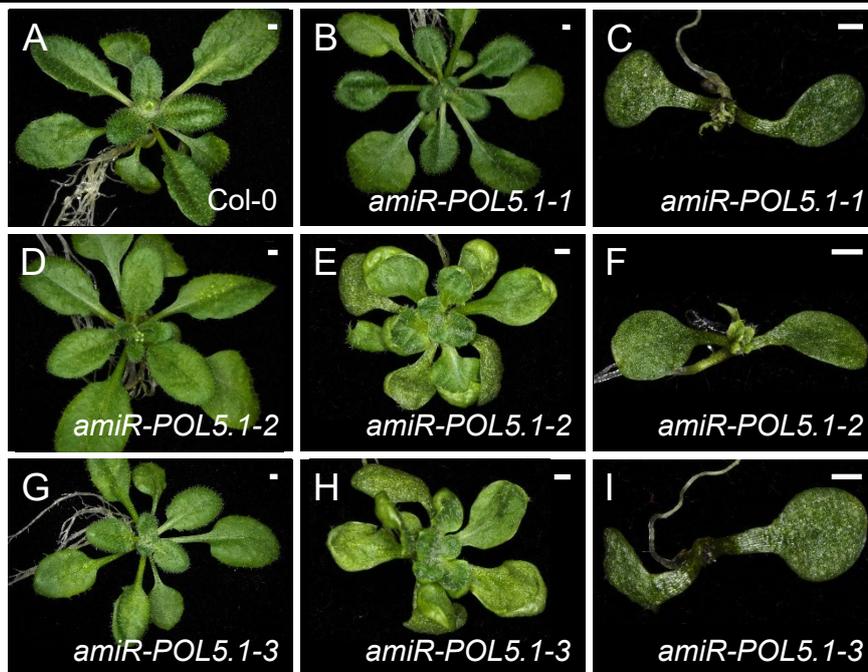


Figura 6.- Fenotipos morfológicos de plantas portadoras del transgén productor del *amiR-POL5.1*. Rosetas de (A) Col-0 y de las líneas (B-C) *amiR-POL5.1-1*, (D-F) *amiR-POL5.1-2* y (G-I) *amiR-POL5.1-3*. Las fotografías se tomaron 21 dde. Las barras de escala indican 1 mm.

Todas las plantas *amiR-POL5.1-1* que exhibían un fenotipo mutante presentaron únicamente los dos cotiledones (Figura 6C), lo que revelaba una interrupción de su desarrollo postembrionario muy temprano, ya que los cotiledones son de origen embrionario. En las líneas *amiR-POL5.1-2* y *amiR-POL5.1-3* se observan plantas con dos tipos de fenotipos mutantes: con rosetas más pequeñas que el silvestre Col-0, con hojas cóncavas y abundantes tricomas (Figura 6E y H); y plantas mucho más pequeñas que las silvestres, que 21 dde no presentan hojas desarrolladas (Figura 6F e I), y que fueron muy similares a las mutantes de la línea *amiR-POL5.1-1* (Figura 6C). Estas observaciones sugieren que las plantas de fenotipo silvestre no son portadoras del transgén, que su homocigosis produce un fenotipo mutante muy severo, que incluye letalidad postembrionaria, y su heterocigosis uno más suave, que no afecta a la viabilidad de la planta. Estos resultados son también congruentes con la letalidad

embrionaria que causan los alelos insercionales del gen *POL5*, que serían muy probablemente nulos (Martínez Fenoll, 2022).

De 21 plantas T₂ portadoras del transgén *amiR-RRP36.1*, se encontraron líneas heterocigóticas y algunas líneas homocigóticas cuyas plantas eran resistentes, pero su fenotipo era silvestre, por lo que fueron descartadas ya que sugería que, si este amiARN se expresaba, no era capaz de silenciar a su diana. De 21 plantas T₂ portadoras del transgén *amiR-RRP36.2* sembradas en higromicina, no se encontraron líneas homocigóticas y las plantas resistentes fueron de fenotipo silvestre, a excepción de las de las líneas *amiR-RRP36.2-1* y *amiR-RRP36.2-2* que produjeron plantas con dos fenotipos mutantes diferentes. Estas dos líneas se sembraron en medio sin higromicina para observar su fenotipo sin la influencia del antibiótico (Figura 7).

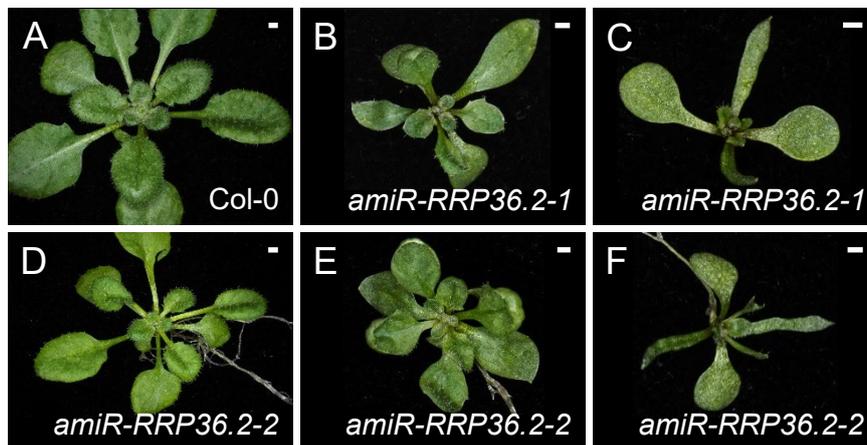


Figura 7.- Fenotipos morfológicos de plantas portadoras del transgén productor del *amiR-RRP36.2*. Rosetas de (A) Col-0 y de las líneas (B-C) *amiR-RRP36.1-1* y (D-F) *amiR-RRP36.1-2*. Las fotografías se tomaron 21 dde. Las barras de escala indican 1 mm.

En ambas líneas se observaron plantas silvestres (Figura 7D) y otras con pocas hojas desarrolladas, apuntadas y filiformes (Figura 7C y F), otras con mayor desarrollo y hojas cóncavas (Figura 7E), que recordaban al fenotipo menos severo de las plantas *amiR-POL5.1-2* y *amiR-POL5.1-3*, y algunas con un fenotipo intermedio entre los dos fenotipos mutantes anteriormente descritos (Figura 7B). Estos resultados sugieren que el *amiR-RRP36.2* silencia la expresión de *RRP36*, en mayor o menor medida, a diferencia del *amiR-RRP36.1* que no parece tener ningún efecto inhibitor. Este resultado sería lo opuesto a lo esperado si sólo se considera el sitio en el que hibridarían ambos amiARN, en el último exón (el noveno), en el caso del *amiR-RRP36.2* y en el cuarto en el del *amiR-RRP36.1* (Figura 5B, en la página 25). Por tanto, no debe ser el lugar de hibridación sino la eficacia con

la que se sintetiza el amiARN en la planta, se incorpora al RISC o hibrida con su ARNm diana, lo que ocasiona estas diferencias.

Se sembraron en medio con higromicina un total de 14 plantas T₂ portadoras del transgén *amiR-UTP18.1* y 10 plantas del *amiR-UTP22.1*. Sin embargo, la selección de líneas homocigotas no pudo realizarse debido a la contaminación de las placas de Petri con hongos. No obstante, se observaron plantas de fenotipo mutante en las líneas *amiR-UTP18.1-1*, *amiR-UTP18.1-2*, *amiR-UTP22.1-1* y *amiR-UTP22.1-2*, por lo que las cuatro líneas se sembraron en medio sin antibiótico para observar su fenotipo (Figura 8).

El fenotipo mutante observado en las plantas de estas líneas fue muy variado, pero todas ellas presentaron un crecimiento ralentizado y el envés de las hojas de color morado, lo que indicaba acumulación de antocianinas y sugería que las plantas estaban constitutivamente estresadas. En cuanto al fenotipo foliar, en las líneas *amiR-UTP18.1-1* y *amiR-UTP18.1-2* se observaron plantas con abundantes tricomas en las hojas, que fueron cóncavas y con indentaciones en los bordes (Figura 8B-G). En las líneas *amiR-UTP22.1-1* y *amiR-UTP22.1-2* las hojas fueron de un color verde más claro y con los bordes indentados (Figura 8H-L), rasgos que también observamos en algunas plantas *amiR-UTP18.1-1* y *amiR-UTP18.1-2* (Figura 8C).

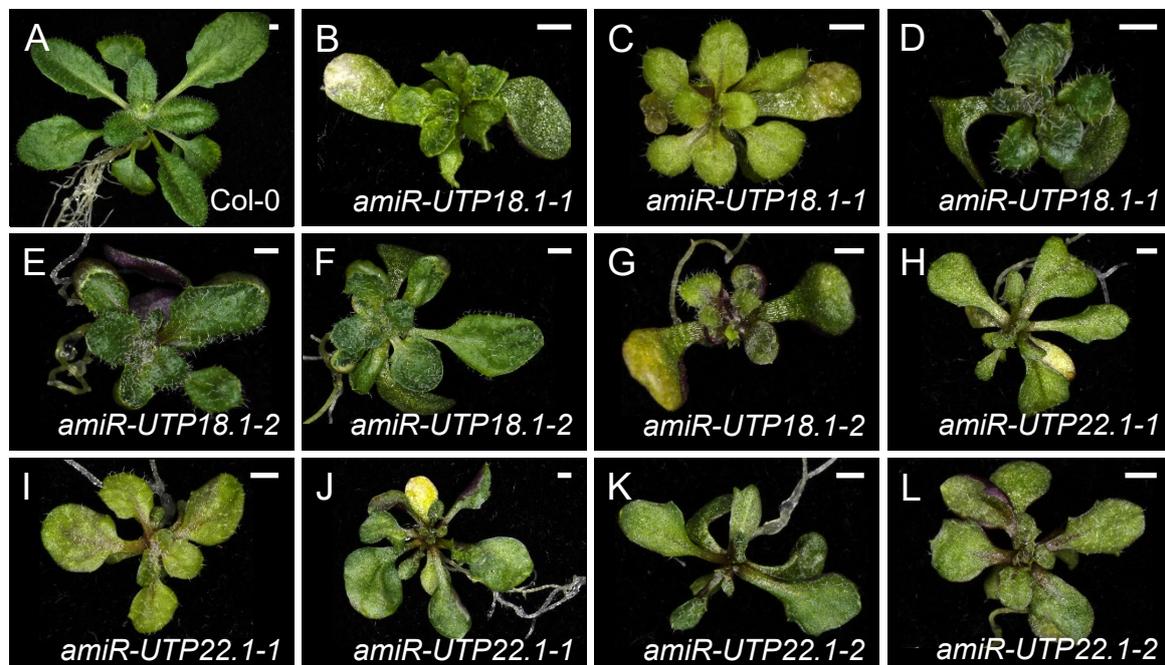


Figura 8.- Fenotipos morfológicos de plantas portadoras de transgenes productores de los *amiR-UTP18.1* y *amiR-UTP22.1*. Rosetas de (A) Col-0 y de las líneas (B-D) *amiR-UTP18.1-1*, (E-G) *amiR-UTP18.1-2*, (H-J) *amiR-UTP22.1-1* y (K-L) *amiR-UTP22.1-2*. Las fotografías se tomaron 21 dde. Las barras de escala indican 1 mm.

V.2.- Análisis del silenciamiento postranscripcional de la expresión de *POL5*, *RRP36*, *UTP18* y *UTP22* en las líneas *amiR*

Para determinar si el fenotipo observado en las líneas anteriormente descritas se debe al silenciamiento de los genes diana de los amiARN, se realizaron ensayos de RT-qPCR con ARN de plantas 15 dde que mostraban un fenotipo mutante (Figura 9). Se utilizó en cada amplificación una pareja de cebadores que flanqueaban la región de hibridación de cada amiARN en el ARNm del gen diana y el gen *ACTIN2* (*ACT2*) como referencia (Tabla 3, en la página 20). Se utilizó el equipo Step-One de PCR en tiempo real de Applied Biosystems y una única réplica biológica, debido a la escasa cantidad de plantas disponibles, y tres réplicas técnicas, como es habitual en este tipo de experimentos. Dado que, en las plantas el mecanismo de silenciamiento génico ejercido por los miARN es fundamentalmente mediante el corte y degradación del ARNm diana, el resultado de estos ensayos reflejarían la cantidad final de ARNm diana en la muestra, que sería el resultado de su transcripción menos su fragmentación por el RISC (Jover-Gil *et al.*, 2005; Jover-Gil *et al.*, 2014).

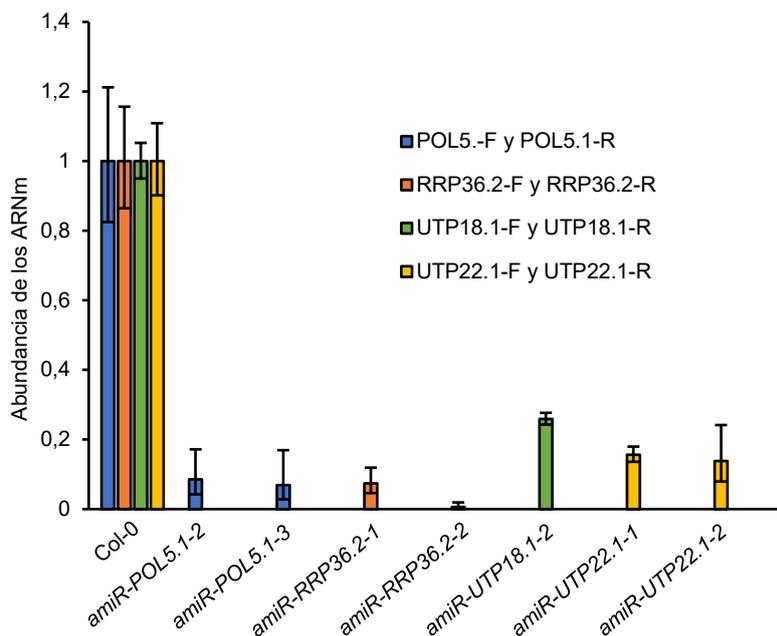


Figura 9.- Silenciamiento génico postranscripcional producido por la presencia de los amiARN ensayados. Análisis de RT-qPCR para la determinación de los niveles de los ARNm de los genes *POL5*, *RRP36*, *UTP18* y *UTP22*. Se utilizó ARN de plantas de Col-0 y de las líneas T₂ portadoras de transgenes productores de los amiARN que mostraron un fenotipo mutante. Los distintos colores representan los ARNm amplificados con la pareja de cebadores empleada en cada uno de los genes a estudio.

La abundancia relativa del ARNm de *POL5* en las plantas *amiR-POL5.1-2* y *amiR-POL5.1-3* fue la quinta parte de la del silvestre Col-0. La de *RRP36* se redujo ostensiblemente en las plantas de las líneas *amiR-RRP36.2-1* y *amiR-RRP36.2-2*, sobre todo en esta última, donde fue diez veces menor que en el silvestre. En las plantas de la línea

amiR-UTP18.1-2 disminuyó también, aunque en menor medida que el resto de las líneas analizadas. La de *UTP22* en las plantas de las líneas *amiR-UTP22.1-1* y *amiR-UTP22.1-2* disminuyó aproximadamente una tercera parte con respecto al silvestre Col-0. Por tanto, los resultados, que consideramos preliminares, indican que los amiARN están silenciando la expresión de sus genes diana y podrían ser los responsables de los fenotipos que exhiben estas plantas.

V.3.- Caracterización del gen *BMS1*

Previamente al inicio de este TFM, en el laboratorio del profesor José Luis Micol se realizó una mutagénesis, sumergiendo semillas del ecotipo Landsberg *erecta* (Ler) en metanosulfonato de etilo (EMS), con el objetivo de identificar mutantes afectados en la morfología foliar (Berná *et al.*, 1999). En el escrutinio, se identificaron 17 mutantes de la clase *denticulata* (*den*), denominada así por la aparición de indentaciones en el margen de sus hojas. Mediante cartografía génica asociada a marcadores moleculares o secuenciación masiva, se identificaron mutaciones puntuales candidatas a ser las causantes del fenotipo morfológico de los mutantes *den* (Navarro Quiles, 2016; Ortega Menaches, 2020).

Se determinó mediante cartografía génica asociada a secuenciación masiva que el mutante *den9* presentaba una transición G→A en el quinto exón del gen AT1G06720 (Figura 11, en la página 34), que genera un cambio de treonina a isoleucina (Thr→Ile) en la posición 209 de la proteína codificada por el gen, que según las bases de datos, es el presunto ortólogo en *Arabidopsis* del gen *Bms1*, uno de los componentes del procesoma SSU en la levadura (Gelperin *et al.*, 2001). Para confirmar si esa mutación es la causante del fenotipo del mutante *den9* (Figura 10B, en la página 33) se obtuvieron dos líneas insercionales que, debido que el ADN-T interrumpía la región codificante del gen AT1G06720, probablemente portarían alelos nulos, pero ninguna de las plantas genotipadas contenían la inserción, ni en homocigosis ni en heterocigosis.

Se concluyó que probablemente las inserciones en homocigosis serían letales, como ocurre con los alelos nulos de su presunto ortólogo de la levadura, y que al tener que propagar plantas heterocigóticas en el NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Center), el centro que distribuye las semillas a los laboratorios de investigación europeos, se había perdido la inserción de ADN-T a lo largo de las sucesivas autofecundaciones. Al comienzo de este TFM, se buscaron otras líneas de ADN-T que pudieran portar alelos hipomorfos y se solicitaron al NASC. Los ADN-T de las líneas SALK_061887 y SAIL_1293_E04 (Tabla 1, en la página 14) se encontrarían en el extremo 3'-UTR del gen AT1G06720 (Figura 11, en la página 34), por lo

que podrían generar una pérdida de función parcial y no letal para la planta. Debido a la ausencia de publicaciones previas sobre la caracterización de este gen de *Arabidopsis*, se decidió denominar *BMh SENSITIVE 1 (BMS1)* al gen AT1G06720 y *bms1-1* y *bms1-2* a los alelos insercionales presentes en las líneas SAIL_1293_E04 y SALK_061887, respectivamente. Hemos mantenido la denominación *den9* para el alelo puntual, respetando el nombre que le asignaron los investigadores que lo identificaron y clonaron en el laboratorio del profesor Micol (Berná *et al.*, 1999; Navarro Quiles, 2016; Ortega Menaches, 2020), como es habitual.

Se sembraron semillas de los silvestres *Ler* y *Col-0*, del mutante *den9* (en fondo *Ler*) y de las líneas insercionales SAIL_1293_E04 y SALK_061887 (en fondo *Col-0*) y se observó su fenotipo 21 dde (Figura 10C). El mutante *den9* y, en menor medida, las plantas de la línea SAIL_1293_E04 (presuntamente portadoras del alelo *bms1-1*) presentaron hojas ligeramente más oscuras que sus silvestres, apuntadas y con margen indentado, y un tamaño de roseta menor (Figura 10A-D), fenotipo característico de mutantes en genes implicados en la biogénesis del ribosoma. Las semillas de las plantas SALK_061887, presuntamente portadora del alelo *bms1-2*) presentaron una baja tasa de germinación (germinaron 26 de 99 semillas sembradas) y su fenotipo 14 dde era igual al del silvestre *Col-0*, sin observarse ninguna planta con fenotipo morfológico aparente (Figura 10E).

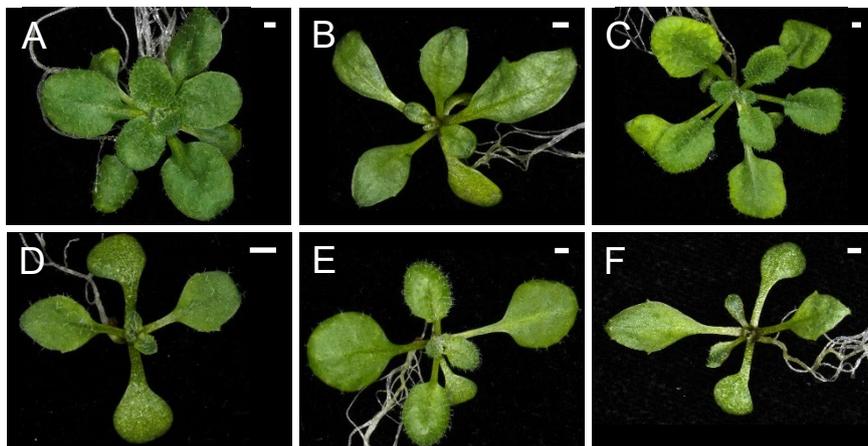


Figura 10.- Fenotipos morfológicos de los mutantes insercionales del gen *BMS1*. Rosetas de (A) *Ler*, (B) una planta homocigótica *den9*, (C) *Col-0*, (D) una planta representativa de la línea insercional SAIL_1293_E04, que fue homocigótica para el alelo insercional que hemos denominado *bms1-1*, (E) una planta representativa de la línea insercional SALK_061887, que fue heterocigótica para el alelo insercional que hemos denominado *bms1-2* y (F) el heterocigoto resultado del cruzamiento de una planta *bms1-1* por el mutante *den9*. Las fotografías se tomaron 21 dde (A-D) y a los 14 dde (E-F). Las barras de escala indican 1 mm.

Se seleccionaron siete plantas de la línea SAIL_1293_E04 de fenotipo mutante y, por tanto, sospechosas de ser homocigotas para el alelo insercional *bms1-1*. Se seleccionaron también 20 plantas de fenotipo silvestre de la línea SALK_061887, que podrían ser de cualquiera de los tres genotipos: *BMS1/BMS1*, *BMS1/bms1-2* o *bms1-2/bms1-2*. Se recogieron muestras de tejido para extraer ADN y genotiparlas por PCR (Figura 11). Debido a la cercanía en la posición de las inserciones de ambas líneas, sus genotipados fueron muy similares. Se realizaron dos reacciones de PCR: una con los cebadores den9-F y den9-R que hibridan en el gen AT1G06720, flanqueando la posición de la inserción, amplificando únicamente los alelos silvestres del gen y que rinde una banda de 1174 pb; y otra con el cebador den9-R y un cebador que hibrida en uno de los extremos de la inserción: el cebador LB1 para el genotipado de la inserción de ADN-T presente en la línea *bms1-1* y el cebador LBb1.3 para el *debms1-2*, que rinden bandas de 555 y 865 pb, respectivamente (Tabla 2, en la página 20; Figura 11A).

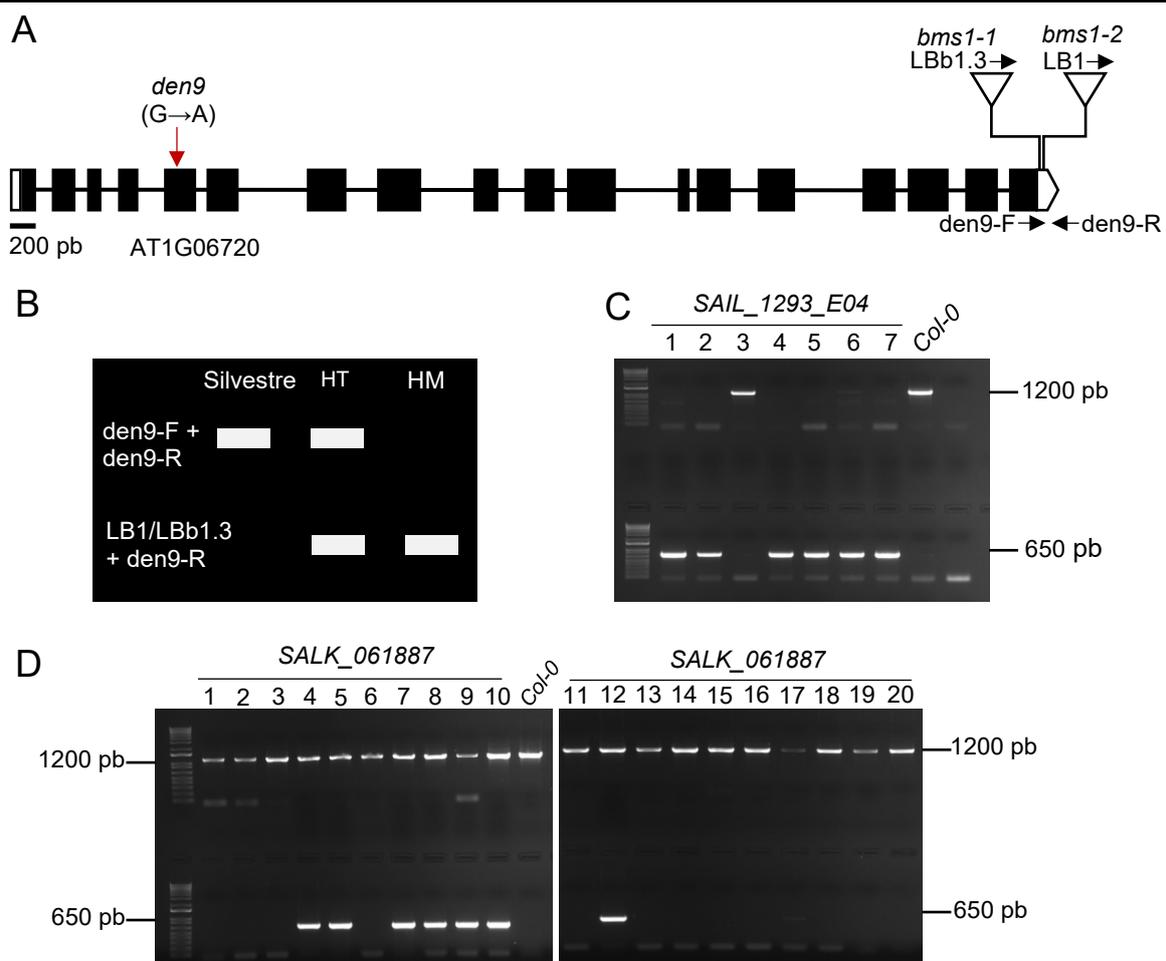


Figura 11.- Esquema del gen *BMS1* y resultados del genotipado de los alelos *bms1* en las líneas SAIL_1293_E04 y SALK_061887. (A) Representación esquemática del gen AT1G06720. La flecha roja indica la posición de la transición en el mutante *den9* y los triángulos blancos invertidos, las

posiciones de las inserciones de ADN-T en ambas líneas. Para el resto de los elementos, se siguen las pautas de la Figura 5 en la página 25. Las flechas negras representan los cebadores empleados en las amplificaciones por PCR, que no están dibujados a escala. (B) Representación de los posibles resultados de las amplificaciones por PCR de una línea insercional. HT y HM indican heterocigosis y homocigosis para el ADN-T, respectivamente. (C y D) Resultado del genotipado de los alelos insercionales (C) *bms1-1* y (D) *bms1-2* en las líneas SAIL_1293_E04 y SALK_061887, respectivamente.

Seis de las siete plantas de la línea SAIL_1293_E04 genotipadas fueron homocigotas para el alelo insercional *bms1-1* (Figura 11C, en la página 34). En cambio, de las 20 plantas genotipadas de la línea SALK_061887, siete fueron heterocigotas para la inserción, mientras que el resto eran silvestres (Figura 11D, en la página 34). El fenotipo silvestre de todas las plantas de la línea SALK_061887 y la ausencia de plantas homocigóticas *bms1-2* sugiere que este alelo es letal embrionario y el gen *BMS1* esencial para la supervivencia de la planta. La baja tasa de germinación de las semillas sembradas (26 de 99), que no coincide con la segregación esperada de $\frac{1}{4}$ de semillas homocigóticas, podría deberse a una inadecuada maduración de las semillas en el NASC, que hemos encontrado en otras ocasiones. La siembra de semillas de plantas *BMS1/bms1-2* (heterocigóticas para el ADN-T) recolectadas en nuestro laboratorio, permitirá determinar si esta suposición es cierta.

Se realizó un análisis de complementación con plantas homocigóticas *bms1-1* y *den9* para determinar si el fenotipo de *den9* se debe a la mutación puntual identificada en el gen *BMS1*, ya que las plantas mutagenizadas con EMS contienen otras muchas mutaciones. Se realizaron cruzamientos, empleando en todos ellos mutantes *den9* como parental femenino y polen de tres diferentes plantas *bms1-1*, cuya homocigosis se había comprobado previamente (Figura 11C, en la página 34).

Las 22 plantas F₁ obtenidas en los tres cruzamientos tuvieron hojas apuntadas con márgenes indentados, lo que indicaba que ambas mutaciones son alélicas (Figura 10F, en la página 33). Para descartar la autofecundación y confirmar que el fenotipo se debe a la no complementación de los alelos presentes en ambos mutantes, *den9* y *bms1-1*, se genotiparon las 22 plantas F₁, siguiendo el mismo procedimiento y cebadores empleados para genotipar la línea insercional *bms1-1* (Figura 12, en la página 36).

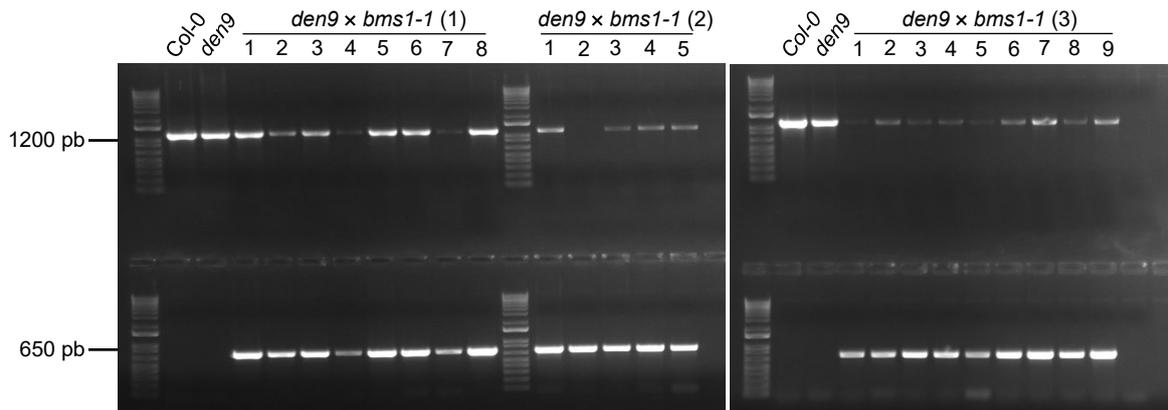


Figura 12.- Genotipado de las plantas F₁ derivadas de los cruzamientos *den9* × *bms1-1*. Visualización de los productos de amplificación por PCR del ADN genómico de plantas F₁ de los tres cruzamientos de *den9* por *bms1-1*. Se utilizaron los cebadores *den9-F* y *den9-R*, que hibridan en el gen *BMS1*, flanqueando la posición de la inserción; y los cebadores *LB1* y *den9-R* para el genotipado de la inserción de ADN-T presente el alelo *bms1-1*.

La heterocigosis para la inserción presente en las plantas *bms1-1* descartó la autofecundación y confirmó la no complementación entre los dos alelos mutantes de *BMS1*, presentes en las plantas heterocigóticas F₁ *den9/bms1-1*. También se cruzaron los mutantes *den9* con plantas *bms1-2* heterocigotas para la inserción, utilizando el polen de *den9*. Sin embargo, ninguno de los 20 cruzamientos realizados desarrolló silicuas, lo que hasta el momento no logramos explicar.

A pesar de la cercanía de ambas inserciones y de encontrarse ambas en el extremo 3'-UTR del gen AT1G06720, su efecto fenotípico es muy diferente. En el futuro se deberán secuenciar por el método de Sanger las dos líneas insercionales para determinar la posición exacta de cada inserción y tratar de explicar el efecto molecular que causa probablemente letalidad embrionaria en la línea *bms1-2* pero no en las plantas *bms1-1*.

V.4.- Análisis del procesamiento del pre-ARNr 45S

V.4.1.- Procesamiento del pre-ARNr 45S en las líneas *amiR-POL5*, *amiR-RRP36*, *amiR-UTP18* y *amiR-UTP22*

En la levadura, la pérdida de función de genes que codifican proteínas del procesoma SSU provoca alteraciones en la maduración temprana del pre-ARNr 35S, que afecta principalmente al procesamiento del 5'-ETS, como es el caso de *Rrp36* o *Utp18*. La alteración se evidencia por la acumulación del pre-ARNr 35S y la disminución de los precursores

posteriores, lo que desemboca en una pérdida o reducción de los niveles de ARNr 18S maduro y de la abundancia de subunidades 40S (Gérus *et al.*, 2010; Thoms *et al.*, 2015).

Con el objetivo de analizar la maduración de los ARNr en las líneas *amiR* cuyos individuos presentaban un fenotipo mutante, se llevaron a cabo análisis de tipo *northern*, que permiten detectar, mediante el uso de sondas específicas, los diferentes precursores que se generan durante las múltiples etapas de maduración de los ARNr 25S, 18S y 5,8S. Se emplearon las sondas S7 y S2, que son complementarias a una parte de la región ITS1 y del 5' ETS, respectivamente. Con la sonda S7 se detectan los precursores 35S_{A123B}, 33S 32S, P-A₃, P'-A₃, 18S-A₃ y 18S-A₂, mientras que con la S2 los pre-ARNr 35S_{A123B}, 33S y P-A₃, y el fragmento P-P', un subproducto de la maduración del ARNr 18S que es degradado por el exosoma (Lange *et al.*, 2011; Kilchert *et al.*, 2016 ; Figura 13).

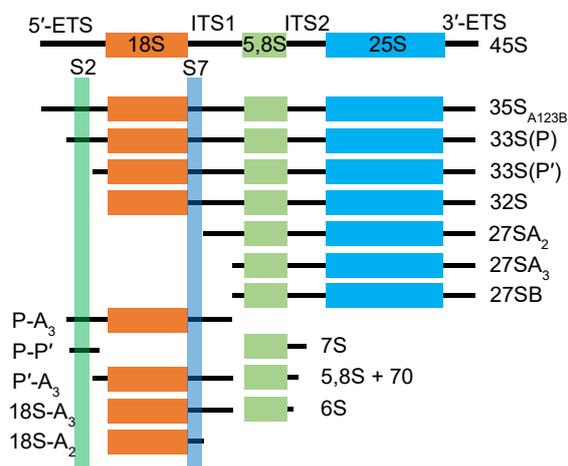


Figura 13.- Esquema de los precursores de los ARNr 18S, 5,8S y 25S originados durante el procesamiento del pre-ARNr 45S en Arabidopsis. Se han representado las zonas de hibridación de las sondas S2 y S7 con rectángulos verticales verde y azul, respectivamente. Figura adaptada de Hang *et al.* (2014).

Se utilizaron como controles los mutantes de pérdida de función *mtr4-2* y *rps24b-2*. Como se comentó en la introducción, MTR4 es una helicasa de ARN que recluta al exosoma para la degradación de parte del 5'-ETS y algunos de sus subproductos, como el fragmento P-P', que se acumula en los mutantes de pérdida de función, como *mtr4-2* (Lange *et al.*, 2011). RPS24B es una proteína ribosómica que se ha estudiado funcionalmente en el laboratorio y que forma parte de la subunidad pequeña del ribosoma (Choesmel *et al.*, 2008), y además actúa como un factor de la biogénesis del ribosoma en el procesamiento del ARNr 18S. Sus mutantes de pérdida de función, como *rps24b-2*, acumulan los pre-ARNr 35S_{A123B} y P-A₃ (Cabezas-Fuster *et al.*, 2023).

La hibridación con la sonda S7 reveló alteraciones en el procesamiento en la mayoría de las líneas analizadas (Figura 14, en la página 38). En las plantas de las líneas *amiR-UPT22.1-1* y *amiR-UTP22.1-2* se observó una gran acumulación del pre-ARNr 35S_{A123B}

y una disminución de los precursores de las siguientes etapas, los pre-ARNr 33S y 32S. Estas mismas líneas también presentan una fuerte acumulación de P-A₃, un precursor del ARNr 18S. Las plantas de las líneas *amiR-POL5.2-1*, *amiR-RRP36.2-1* y *amiR-RRP36.2-2* también presentan acumulación de P-A₃. En cambio, en las de las líneas *amiR-POL5.1-2*, *amiR-POL5.1-3*, *amiR-UPT18.1-1*, *amiR-UTP18.1-2* y *amiR-RRP36.1-1* no se observaron alteraciones en el procesamiento.

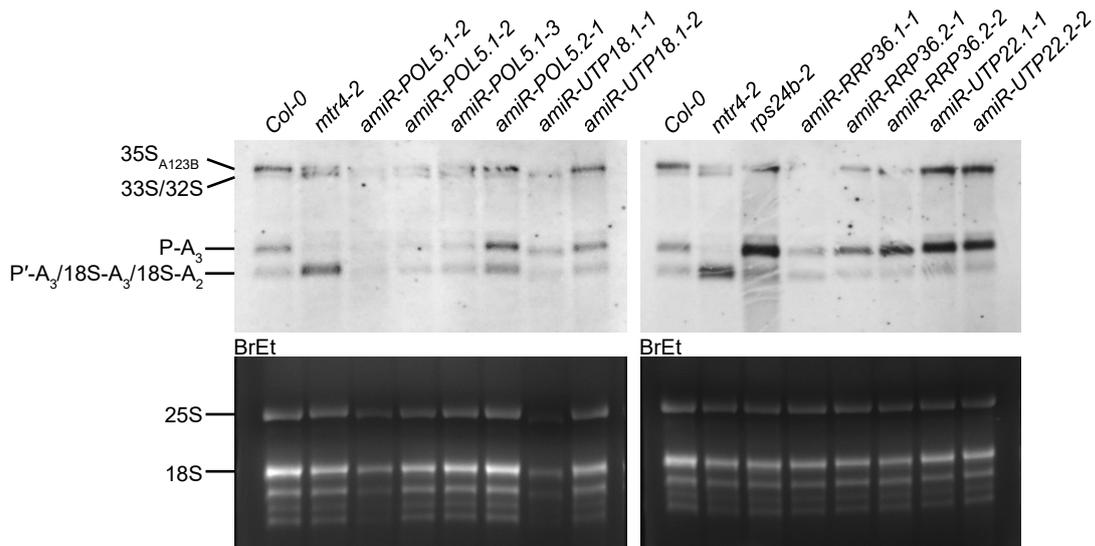


Figura 14.- Análisis de *northern* con la sonda S7 en las líneas *amiR-POL5*, *amiR-RRP36*, *amiR-UTP18* y *amiR-UTP22* con fenotipo mutante. En el lateral se indican los fragmentos correspondientes a cada banda. En la parte inferior se muestran los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (BrEt) empleados para la transferencia de ARN, y que se emplean como control de carga.

En la hibridación con la sonda S2 hemos confirmado la acumulación del precursor P-A₃ en las mismas líneas que la habíamos observado previamente con la sonda S7 (Figura 15, en la página 39). Además, ninguna de las líneas analizadas acumula el fragmento P-P'. Ambos resultados, aunque preliminares, sugieren la existencia del procesoma SSU en *Arabidopsis* y la participación en él de al menos, RRP36 y UTP22.

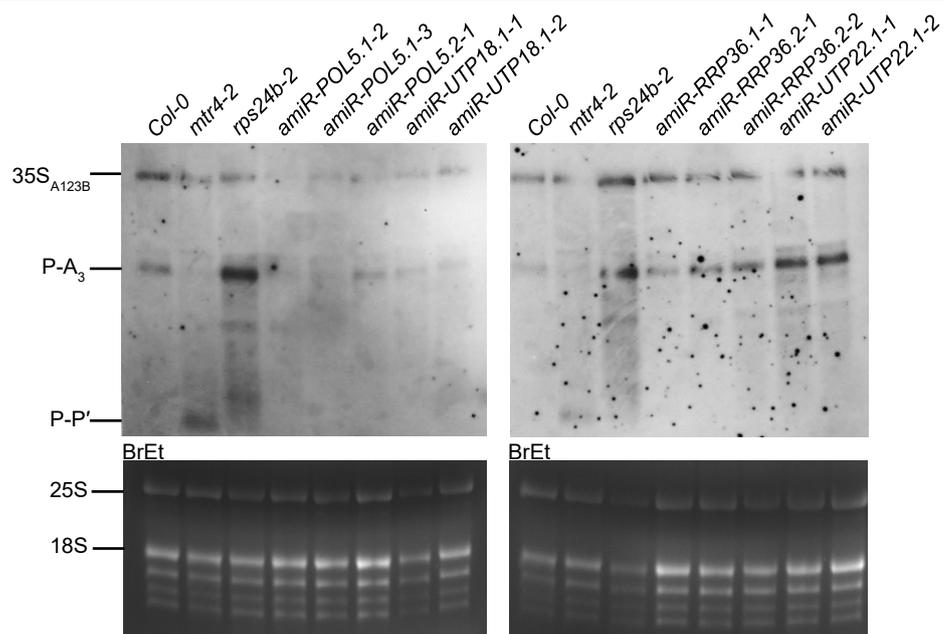


Figura 15.- Análisis de *northern* con la sonda S2 con ARN de individuos de las líneas *amiR-POL5*, *amiR-RRP36*, *amiR-UTP18* y *amiR-UTP22* con fenotipo mutante. Se siguen las pautas de la Figura 14 en la página 38.

V.4.2.- Análisis del procesamiento del pre-ARN 45S en el mutante *den9*

Para determinar si el procesamiento de los pre-ARNr en el mutante *den9* está también alterado, se realizó un análisis de *northern* con la sonda S7 (Figura 16).

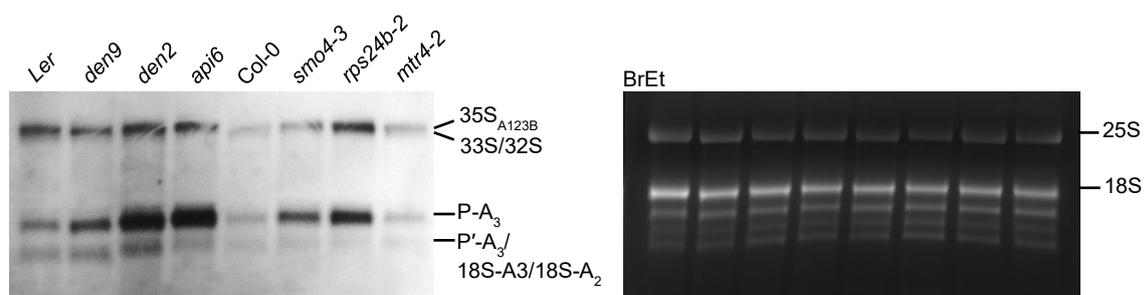


Figura 16.- Análisis de *northern* con la sonda S7 con ARN del mutante *den9*. Se siguen las pautas de la Figura 14 en la página 38.

Para este ensayo se incluyeron como controles los mutantes que se utilizaron en los ensayos de tipo *northern* descritos en el apartado V.4.1 y otros puntuales como *den2* y *api6*, que derivan de la misma mutagénesis de semillas de *Ler* con EMS en la que se obtuvo *den9* (Berná *et al.*, 1999). Los mutantes *den2* y *smo4-3* son alélicos (Micol-Ponce *et al.*, 2020), como también lo son *api6* y *rps24b-2* (Cabezas-Fuster *et al.*, 2023) y todos ellos acumulan

P-A₃. El resultado del análisis reveló que el mutante *den9* también acumula P-A₃ respecto al silvestre *Ler*, aunque en menor medida que los mutantes *den2* y *api6*. Este resultado es coherente si BMS1 formase parte del procesoma SSU, pero habría que confirmarlo con un mayor número de réplicas.

VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

En este TFM se ha contribuido al análisis funcional de los genes *POL5*, *RRP36*, *UTP18* y *UTP22*, cuyos ortólogos de la levadura forman parte del procesoma SSU y cuyos alelos nulos en *Arabidopsis* son letales, según se determinó previamente en el laboratorio. Como alternativa a la letalidad, se obtuvieron plantas portadoras de genes productores de amiARN, para silenciarlos parcialmente. En este TFM hemos aislado y estudiado múltiples líneas portadoras de estas construcciones y hemos encontrado en algunas de ellas plantas que fenocopian el fenotipo de mutantes nulos o hipomorfos de genes que codifican FBR o PR: rosetas de pequeño tamaño, con hojas apuntadas y márgenes indentados. Estos resultados sugerían que los amiARN estaban silenciando sus respectivos genes diana. Para comprobarlo, se realizaron análisis de RT-qPCR, que reveló que la expresión de los genes *POL5*, *RRP36*, *UTP18* y *UTP22* estaba parcialmente silenciada en las líneas analizadas.

Para determinar si la función en el procesamiento de los pre-ARNr que poseen sus ortólogos en la levadura se conserva en *Arabidopsis*, se realizaron hibridaciones de *northern* que revelaron acumulación de precursores de la ruta del ITS1 primero del procesamiento del pre-ARNr 45S, que sería compatible con su función como componentes del procesoma SSU.

La viabilidad de las líneas *amiR* que hemos aislado y su fenotipo mutante, nos han permitido estudiar la función de los genes silenciados en la biogénesis del ribosoma, lo que no es posible realizar con sus alelos nulos, ya que son letales embrionarios. En el futuro, se intentará obtener al menos una línea homocigótica para cada transgén productor de un amiARN, para continuar su caracterización funcional, independientemente de variaciones en la dosis del transgén, y por tanto, en el silenciamiento ejercido sobre su ARNm diana.

Nuestros resultados ponen de manifiesto la idoneidad de los amiARN para obtener fenocopias de alelos hipomorfos, cuando los nulos causan letalidad. La estrategia alternativa de mutagénesis dirigida, mediante técnicas de edición génica *CRISPR-cas*, genera muchas incertidumbres sobre la eficacia de los resultados, al no poder predecir el efecto que tendrían mutaciones en las distintas regiones de un gen, que podría ser la anulación total de la función, causando letalidad, o la ausencia de efecto alguno. Si embargo, los amiARN reducen la función en mayor o menor medida, y se pueden obtener, como se ha constatado en este TFM, efectos fenotípicos y moleculares más o menos drásticos sobre la expresión del gen diana, dependiendo de la presencia del transgén productor en homocigosis o heterocigosis, como suponemos que ocurre en las plantas con fenotipos más severo o menos, respectivamente.

Colateralmente, también se ha contribuido en este TFM al análisis funcional del gen *BMS1* de *Arabidopsis*, no descrito hasta ahora, y cuyo ortólogo en la levadura codifica un componente del procesoma SSU y, por tanto, está implicado en la biogénesis de la subunidad

40S, la menor del ribosoma. Hemos partido en este estudio del mutante *den9*, aislado en el laboratorio del Prof. Micol, portador de una transición G→A en la región codificante del gen *BMS1* que causa un cambio de sentido en la proteína. Hemos estudiado dos líneas insercionales de dominio público cuyos ADN-T interrumpen el gen *BMS1* en su región 3'-UTR, denominando a los alelos que portan *bms1-1* y *bms1-2*. Hemos encontrado que, como las plantas *den9*, los homocigotos *bms1-1* presentan hojas apuntadas con indentaciones en sus márgenes. Mediante análisis de complementación, hemos establecido que *bms1-1* y *den9* son alélicos, y que, por tanto, aunque el genoma de *den9* debe contener varios cientos de mutaciones resultado de la mutagénesis con EMS, hemos demostrado que su fenotipo se debe a la mutación puntual identificada como mejor candidata en el laboratorio del Prof. Micol, en el gen *BMS1*.

Hemos realizado análisis de *northern* con los mutantes *den9*, y aunque los resultados son preliminares, a falta de un mayor número de réplicas, hemos constatado que acumulan el pre-ARNr P-A₃, un precursor del ARNr 18S. Por tanto, en este TFM hemos confirmado a *BMS1* como un nuevo factor de la biogénesis del ribosoma en *Arabidopsis*, con una función conservada con respecto al de su presunto ortólogo de la levadura.

No hemos encontrado plantas homocigóticas *bms1-2*, a pesar de haber genotipado un gran número de individuos de la línea insercional SALK_061887, que porta este tercer alelo del gen *BMS1*. La ausencia de plantas homocigóticas *bms1-2* sugiere que son letales, aunque no lo hemos demostrado por falta de tiempo, y se realizará en un futuro en el laboratorio. Para ello, se diseccionarán silicuas de plantas heterocigóticas *BMS1/bms1-2*, buscando en ellas evidencias de letalidad embrionaria o gametofítica, que es lo que sospechamos que ocurre con los individuos homocigóticos. Si se confirma la letalidad de la homocigosis de *bms1-2*, concluiremos que *den9* y *bms1-1* son alelos hipomorfos y *bms1-2*, probablemente nulo. En este caso, también se deberá determinar con precisión el lugar de la inserción del ADN-T en ambos alelos *bms1-1* y *bms1-2*, para tratar de explicar sus diferentes efectos fenotípicos, ya que se encuentran muy próximos en ambas líneas y no afectan a la región codificante, por lo que es difícil suponer por qué las plantas homocigotas *bms1-1* son completamente viables y fértiles y las *bms1-2* son letales.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Albert, B., Knight, B., Merwin, J., Martin, V., Ottoz, D., Gloor, Y., Bruzzone, M.J., Rudner, A., y Shore, D. (2016). A molecular titration system coordinates ribosomal protein gene transcription with ribosomal RNA synthesis. *Molecular Cell* **64**, 720-733.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Barneche, F., Gaspin, C., Guyot, R., y Echeverria, M. (2001). Identification of 66 box C/D snoRNAs in *Arabidopsis thaliana*: extensive gene duplications generated multiple isoforms predicting new ribosomal RNA 2'-O-methylation sites. *Journal of Molecular Biology* **311**, 57-73.
- Berná, G., Robles, P., y Micol, J.L. (1999). A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **152**, 729-742.
- Bernstein, K.A., Gallagher, J.E., Mitchell, B.M., Granneman, S., y Baserga, S.J. (2004). The small-subunit processome is a ribosome assembly intermediate. *Eukaryotic Cell* **3**, 1619-1626.
- Billy, E. (2000). Rcl1p, the yeast protein similar to the RNA 3'-phosphate cyclase, associates with U3 snoRNP and is required for 18S rRNA biogenesis. *The EMBO Journal* **19**, 2115-2126.
- Bologna, N.G., y Voynet, O. (2014). The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology* **65**, 473-503.
- Cabezas-Fuster, A., Micol-Ponce, R., Sarmiento-Mañús, R., y Ponce, M.R. (2023). Cross-kingdom conservation of Arabidopsis RPS24 function in 18S rRNA maturation. *bioRxiv* 2023.2004.2021.537868.
- Campell, B.R., Song, Y., Posch, T.E., Cullis, C.A., y Town, C.D. (1992). Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **112**, 225-228.
- Copenhaver, G.P., y Pikaard, C.S. (1996). RFLP and physical mapping with an rDNA-specific endonuclease reveals that nucleolus organizer regions of *Arabidopsis thaliana* adjoin the telomeres on chromosomes 2 and 4. *Plant Journal* **9**, 259-272.
- Chandrasekhara, C., Mohannath, G., Blevins, T., Pontvianne, F., y Pikaard, C.S. (2016). Chromosome-specific NOR inactivation explains selective rRNA gene silencing and dosage control in Arabidopsis. *Genes & Development* **30**, 177-190.
- Choismel, V., Fribourg, S., Aguisa-Toure, A.H., Pinaud, N., Legrand, P., Gazda, H.T., y Gleizes, P.E. (2008). Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. *Human Molecular Genetics* **17**, 1253-1263.
- Delprato, A., Al Kadri, Y., Pérébasquine, N., Monfoulet, C., Henry, Y., Henras, A.K., y Fribourg, S. (2014). Crucial role of the Rcl1p-Bms1p interaction for yeast pre-ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Research* **42**, 10161-10172.
- Dragon, F., Gallagher, J.E., Compagnone-Post, P.A., Mitchell, B.M., Porwancher, K.A., Wehner, K.A., Wormsley, S., Settlege, R.E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., Beyer, A.L., Hunt, D.F., y Baserga, S.J. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* **417**, 967-970.
- Dunbar, D.A., Wormsley, S., Agentis, T.M., y Baserga, S.J. (1997). Mpp10p, a U3 small nucleolar ribonucleoprotein component required for pre-18S rRNA processing in yeast. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 5803-5812.
- Eamens, A.L., Agius, C., Smith, N.A., Waterhouse, P.M., y Wang, M.-B. (2011). Efficient silencing of endogenous microRNAs using artificial microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **4**, 157-170.
- Gallagher, J.E.G. (2019). Proteins and RNA sequences required for the transition of the t-Utp complex into the SSU processome. *FEMS Yeast Research* **19**, 1-14.
- Gelperin, D., Horton, L., Beckman, J., Hensold, J., y Lemmon, S.K. (2001). Bms1p, a novel GTP-binding protein, and the related Tsr1p are required for distinct steps of 40S ribosome biogenesis in yeast. *RNA* **7**, 1268-1283.

- Gérus, M., Bonnart, C., Caizergues-Ferrer, M.I., Henry, Y., y Henras, A.K. (2010). Evolutionarily conserved function of RRP36 in early cleavages of the pre-rRNA and production of the 40S ribosomal subunit. *Molecular and Cellular Biology* **30**, 1130-1144.
- Greber, B.J., y Ban, N. (2016). Structure and function of the mitochondrial ribosome. *Annual Review of Biochemistry* **85**, 103-132.
- Henras, A.K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.-F., Chakraborty, A., y Gleizes, P.-E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **6**, 225-242.
- Horn, D.M., Mason, S.L., y Karbstein, K. (2011). Rcl1 protein, a novel nuclease for 18 S ribosomal RNA production. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 34082-34087.
- Jover-Gil, S., Candela, H., y Ponce, M.-R. (2005). Plant microRNAs and development. *The International Journal of Developmental Biology* **49**, 733-744.
- Jover-Gil, S., Paz-Ares, J., Micol, J.L., y Ponce, M.R. (2014). Multi-gene silencing in Arabidopsis: a collection of artificial microRNAs targeting groups of paralogs encoding transcription factors. *Plant Journal* **80**, 149-160.
- Kilchert, C., Wittmann, S., y Vasiljeva, L. (2016). The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **17**, 227-239.
- Koornneef, M., y Meinke, D. (2010). The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant Journal* **61**, 909-921.
- Lange, H., Sement, F.M., y Gagliardi, D. (2011). MTR4, a putative RNA helicase and exosome co-factor, is required for proper rRNA biogenesis and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **68**, 51-63.
- Lee, S.J., y Baserga, S.J. (1999). Imp3p and Imp4p, two specific Components of the U3 small nucleolar ribonucleoprotein that are essential for pre-18S rRNA Processing. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 5441-5452.
- Liu, S.R., Zhou, J.J., Hu, C.G., Wei, C.L., y Zhang, J.Z. (2017). MicroRNA-mediated gene silencing in plant defense and viral counter-defense. *Frontiers in Microbiology* **8**, 1-11.
- Maekawa, S., Ishida, T., y Yanagisawa, S. (2018). Reduced expression of APUM24, encoding a novel rRNA processing factor, induces sugar-dependent nucleolar stress and altered sugar responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **30**, 209-227.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Alkhnbashi, O.S., Costa, F., Shah, S.A., Saunders, S.J., Barrangou, R., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Haft, D.H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Terns, R.M., Terns, M.P., White, M.F., Yakunin, A.F., Garrett, R.A., van der Oost, J., Backofen, R., y Koonin, E.V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* **13**, 722-736.
- Martínez Fenoll, S. (2022). Análisis de la pérdida de función de los genes *POL5*, *UTP18*, *UTP22* y *RRP36* de *Arabidopsis thaliana*. *Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández*.
- Matsumura, Y., Ohbayashi, I., Takahashi, H., Kojima, S., Ishibashi, N., Keta, S., Nakagawa, A., Hayashi, R., Saéz-Vásquez, J., Echeverría, M., Sugiyama, M., Nakamura, K., Machida, C., y Machida, Y. (2016). A genetic link between epigenetic repressor AS1-AS2 and a putative small subunit processome in leaf polarity establishment of Arabidopsis. *Biology Open* **5**, 942-954.
- Meinke, D., y Koornneef, M. (1997). Community standards for Arabidopsis genetics. *Plant Journal* **12**, 247-253.
- 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**, 662-682.
- Micol-Ponce, R., Sarmiento-Mañús, R., Ruiz-Bayón, A., Montacié, C., Sáez-Vasquez, J., y Ponce, M.R. (2018). Arabidopsis RIBOSOMAL RNA PROCESSING7 is required for 18S rRNA maturation. *Plant Cell* **30**, 2855-2872.

- Micol-Ponce, R., Sarmiento-Mañús, R., Fontcuberta-Cervera, S., Cabezas-Fuster, A., de Bures, A., Sáez-Vásquez, J., y Ponce, M.R. (2020). SMALL ORGAN4 is a ribosome biogenesis factor involved in 5.8S ribosomal RNA maturation. *Plant Physiology* **184**, 2022-2039.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Murata, M., Heslop-Harrison, J.S., y Motoyoshi, F. (1997). Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence in situ hybridization with cosmid clones. *Plant Journal* **12**, 31-37.
- Navarro Quiles, C. (2016). El gen *APICULATA7* contribuye a la dorsoventralidad foliar en *Arabidopsis*. *Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández*. .
- Ortega Menaches, À. (2020). Identificación y caracterización de nuevos genes *DENTICULATA* en *Arabidopsis*. *Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández*. .
- Pérez-Fernández, J., Román, A.n., De Las Rivas, J., Bustelo, X.R., y Dosil, M. (2007). The 90S preribosome is a multimodular structure that is assembled through a hierarchical mechanism. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 5414-5429.
- Phipps, K.R., Charette, J.M., y Baserga, S.J. (2011). The small subunit processome in ribosome biogenesis-progress and prospects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **2**, 1-21.
- Ramos-Sáenz, A., González-Álvarez, D., Rodríguez-Galán, O., Rodríguez-Gil, A., Gaspar, S.G., Villalobo, E., Dosil, M., y de la Cruz, J. (2019). Pol5 is an essential ribosome biogenesis factor required for 60S ribosomal subunit maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **25**, 1561-1575.
- Rudra, D., Mallick, J., Zhao, Y., y Warner, J.R. (2007). Potential interface between ribosomal protein production and pre-rRNA processing. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 4815-4824.
- Sáez-Vásquez, J., y Delseny, M. (2019). Ribosome biogenesis in plants: from functional 45S ribosomal DNA organization to ribosome assembly factors. *Plant Cell* **31**, 1945-1967.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., y Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1121-1133.
- Shimizu, K., Kawasaki, Y., Hiraga, S.-I., Tawaramoto, M., Nakashima, N., y Sugino, A. (2002). The fifth essential DNA polymerase ϕ in *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the nucleolus and plays an important role in synthesis of rRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**, 9133-9138.
- Simon, L., Rabanal, F.A., Dubos, T., Oliver, C., Lauber, D., Poulet, A., Vogt, A., Mandlbauer, A., Le Goff, S., Sommer, A., Duborjal, H., Tatout, C., y Probst, A.V. (2018). Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* **46**, 3019-3033.
- Sloan, K.E., Bohnsack, M.T., Schneider, C., y Watkins, N.J. (2014). The roles of SSU processome components and surveillance factors in the initial processing of human ribosomal RNA. *RNA* **20**, 540-550.
- Thoms, M., Thomson, E., Baßler, J., Gnädig, M., Griesel, S., y Hurt, E. (2015). The exosome is recruited to RNA substrates through specific adaptor proteins. *Cell* **162**, 1029-1038.
- Vandenbol, M., y Portetelle, D. (1999). Disruption of six ORFs on *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X: the YJL069c gene of unknown function is essential to cell viability. *Yeast* **15**, 1411-1417.
- Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* **136**, 669-687.
- Wegierski, T., Billy, E., Nasr, F., y Filipowicz, W. (2001). Bms1p, a G-domain-containing protein, associates with Rcl1p and is required for 18S rRNA biogenesis in yeast. *RNA* **7**, 1254-1267.
- Wilson, D.N., y Doudna, C. (2012). The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **4**, 1-17.