



Universidad Miguel Hernández de Elche

**ANGULATA7 interacciona con genes  
relacionados con la transcripción  
del plastoma y la señalización retrógrada  
en Arabidopsis**

**Tamara González Costa**

Tutores:

José Luis Micol Molina

Carla Navarro Quiles

Tamara Muñoz Nortes

Unidad de Genética

Departamento de Biología Aplicada

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso académico 2016-2017

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

CARLA NAVARRO QUILES, contratada predoctoral de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

TAMARA MUÑOZ NORTES, contratada predoctoral de la Universidad Miguel Hernández de Elche

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por Tamara González Costa como Trabajo de Fin del Grado en Biotecnología. 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.

Carla Navarro Quiles

Tamara Muñoz Nortes

José Luis Micol Molina

Elche, 29 de junio de 2017.

## ÍNDICE DE MATERIAS

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	III
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	III
<b>I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE</b> .....	1
<b>II.- INTRODUCCIÓN</b> .....	2
II.1.- Disección genética de procesos biológicos en la hoja de Arabidopsis.....	2
II.1.1.- Arabidopsis como organismo modelo en el reino vegetal.....	2
II.1.2.- La hoja de Arabidopsis .....	2
II.2.- Estructura y función del cloroplasto.....	3
II.2.1.- La transcripción del plastoma .....	4
II.2.2.- Señalización anterógrada y retrógrada entre el núcleo y el cloroplasto.....	5
II.3.- Las proteínas DnaJ.....	7
<b>III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b> .....	9
<b>IV.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	12
IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria .....	12
IV.2.- Abreviaturas, acrónimos y fórmulas químicas.....	12
IV.3.- Gramática y terminología.....	13
IV.4.- Nomenclatura genética.....	13
IV.5.- Estirpes empleadas en este trabajo.....	14
IV.6.- Cultivos .....	14
IV.6.1.- Condiciones de cultivo de Arabidopsis .....	14
IV.6.1.1.- Cultivo en placa de Petri.....	14
IV.6.1.2.- Cultivo en maceta .....	15
IV.6.1.3.- Cruzamientos .....	16
IV.6.1.4.- Recolección de semillas.....	16
IV.6.2.- Condiciones de los cultivos microbianos .....	16
IV.7.- Disoluciones.....	17
IV.7.1.- Medios de cultivo para Arabidopsis.....	17
IV.7.1.1.- Medios de cultivo líquidos .....	17
IV.7.1.2.- Medios de cultivo sólidos .....	17
IV.7.2.- Medios de cultivo para microorganismos .....	18
IV.7.2.1.- Medios de cultivo líquidos .....	18
IV.7.2.2.- Medios de cultivo sólidos.....	18
IV.7.2.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos.....	18

IV.7.3.- Tampones y otras disoluciones de uso general .....	19
IV.7.3.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico .....	19
IV.7.3.2.- Disoluciones para electroforesis .....	19
IV.7.3.3.- Disoluciones para la obtención de bacterias quimiocompetentes.....	19
IV.8.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos .....	20
IV.8.1.- Aislamiento de ácidos nucleicos .....	20
IV.8.1.1.- Aislamiento de ADN plasmídico.....	20
IV.8.1.2.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis .....	20
IV.8.1.3.- Aislamiento de ARN de Arabidopsis .....	20
IV.8.2.- Síntesis de ADN .....	20
IV.8.2.1.- Síntesis de oligonucleótidos .....	20
IV.8.2.2.- Amplificaciones mediante PCR.....	22
IV.8.2.3.- Retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa .....	22
IV.8.3.- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	23
IV.8.4.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN .....	23
IV.8.4.1.- Reacciones de secuenciación.....	23
IV.8.4.2.- Electroforesis y lectura automatizada de secuencias .....	24
IV.9.- Obtención de líneas transgénicas mediante la tecnología Gateway.....	25
IV.10.- Transformaciones.....	26
IV.10.1.- Transformación de células bacterianas .....	26
IV.10.1.1.- Obtención de células quimiocompetentes .....	26
IV.10.1.2.- Transformación por choque térmico .....	26
IV.11.- Análisis morfológico e histológico .....	27
IV.11.1.- Observación microscópica y microfotografía .....	27
IV.11.2.- Preparación de muestras para microscopía electrónica.....	28
IV.11.3.- Determinación de pigmentos.....	28
IV.12.- Pruebas estadísticas.....	28
<b>V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
V.1.- Caracterización fenotípica de los mutantes <i>anu7</i> .....	29
V.2.- Interacciones genéticas de <i>ANU7</i> con <i>RPOTp</i> , <i>GUN1</i> , <i>pTAC2</i> y <i>pTAC5</i> .....	31
V.2.1.- Interacción genética entre <i>ANU7</i> y <i>RPOTp</i> .....	31
V.2.2.- Interacción genética entre <i>ANU7</i> y <i>GUN1</i> .....	32
V.2.3.- Interacción genética de <i>ANU7</i> con <i>pTAC2</i> y <i>pTAC5</i> .....	34
V.3.- Obtención del transgén <i>35S<sub>pro</sub>:GFP:ANU7</i> .....	34
<b>VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA .....</b>	<b>36</b>
<b>VII.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>37</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Morfología y anatomía de las hojas de Arabidopsis.....	3
<b>Figura 2.-</b> Estructura del cloroplasto y los tilacoides .....	4
<b>Figura 3.-</b> Señalización anterógrada y retrógrada.....	6
<b>Figura 4.-</b> Clasificación y dominios funcionales de las proteínas DnaJ.....	7
<b>Figura 5.-</b> Estructura de la unidad de transcripción del gen <i>ANU7</i> y naturaleza molecular de sus alelos mutantes.....	9
<b>Figura 6.-</b> Fenotipo foliar de los mutantes <i>anu7</i> .....	10
<b>Figura 7.-</b> Clonación de un inserto en un vector de expresión Gateway.....	26
<b>Figura 8.-</b> Mapa de los vectores Gateway empleados en este trabajo .....	27
<b>Figura 9.-</b> Contenido en clorofilas y carotenoides de los mutantes <i>anu7</i> .....	29
<b>Figura 10.-</b> Ultraestructura de los cloroplastos de <i>anu7-1</i> .....	30
<b>Figura 11.-</b> Fenotipo sinérgico de los dobles mutantes <i>anu7-1 sca3-1</i> y <i>anu7-1 gun1-1</i> .....	32
<b>Figura 12.-</b> Expresión de los genes <i>pTAC2</i> y <i>pTAC14</i> en <i>anu7-1</i> , <i>gun1-1</i> y <i>anu7-1 gun1-1</i> .....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Abreviaturas usadas en este trabajo .....	12
<b>Tabla 2.-</b> Estirpes de Arabidopsis utilizadas en este trabajo .....	14
<b>Tabla 3.-</b> Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	21

**I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE**

## I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

*angulata7-1* (*anu7-1*) es un alelo hipomorfo y viable del gen *ANU7* de *Arabidopsis*; *anu7-2* es letal en ausencia de un carbohidrato metabolizable. Hemos contribuido a la caracterización fenotípica de los mutantes *anu7*, cuyo rasgo más característico es la despigmentación de sus hojas, que son albinas en *anu7-2*. También hemos estudiado la ultraestructura de los cloroplastos de *anu7-1*, en los que hemos observado desapilamiento de los tilacoides. Hemos diseñado y construido un transgén  $35S_{pro}:GFP:ANU7$  que servirá para determinar la localización subcelular de la proteína ANU7. Hemos obtenido combinaciones dobles de alelos de insuficiencia de función de *ANU7* y de genes que participan en la señalización retrógrada y en la transcripción del genoma del cloroplasto, como los que codifican componentes del complejo pTAC (plastid Transcriptionally Active Chromosome). También hemos estudiado los niveles de expresión de estos últimos en los mutantes *anu7*. Concluimos que la proteína ANU7 es necesaria para el correcto funcionamiento de la maquinaria transcripcional del cloroplasto.

**Palabras clave:** ANU7; *Arabidopsis thaliana*; cloroplasto; desarrollo; DnaJ.

*angulata7-1* (*anu7-1*) is an hypomorphic and viable allele of *Arabidopsis ANU7* gene; *anu7-2* is lethal in the absence of a metabolizable carbohydrate. We have contributed to the phenotypic characterization of the *anu7* mutants, which show depigmented leaves, that are albino in *anu7-2*. We have also studied the ultrastructure of *anu7-1* chloroplasts, which exhibited altered thylakoidal stacking. We designed and constructed the  $35S_{pro}:GFP:ANU7$  transgene, which will allow us to determine the subcellular localization of the ANU7 protein. We combined loss of function alleles of *ANU7* and alleles of genes involved in retrograde signaling and chloroplast genome transcription, such as those encoding components of the pTAC (plastid Transcriptionally Active Chromosome) complex. We also studied the expression levels of the latter genes in the *anu7* mutants. We conclude that the ANU7 protein is required for the proper function of the chloroplast transcriptional machinery.

**Keywords:** ANU7; *Arabidopsis thaliana*; chloroplast; development; DnaJ.

## **II.- INTRODUCCIÓN**

## II.- INTRODUCCIÓN

### II.1.- Disección genética de procesos biológicos en la hoja de Arabidopsis

#### II.1.1.- Arabidopsis como organismo modelo en el reino vegetal

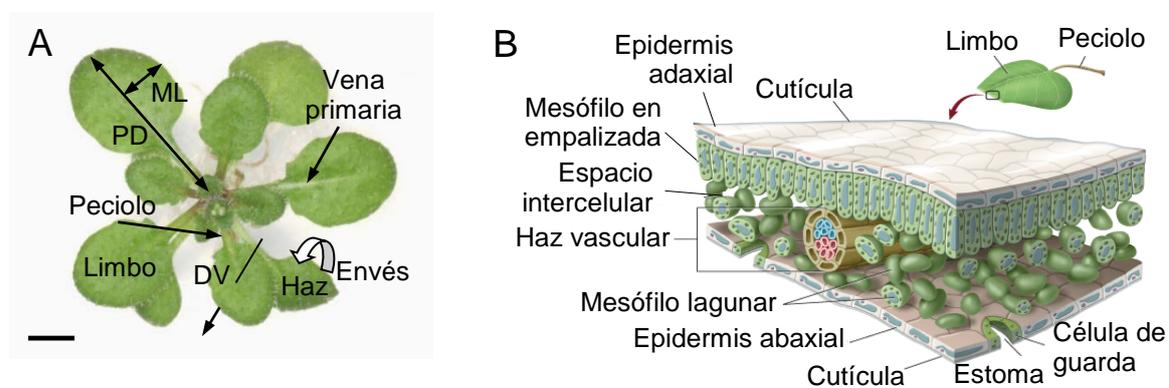
Los estudios de la biología de las plantas se han caracterizado tradicionalmente por la dispersión de esfuerzos: los investigadores se concentraron durante el siglo XIX y buena parte del XX en especies autóctonas o de interés para la agricultura de su país, como el maíz (*Zea mays*), la planta que más beneficio económico produce en Estados Unidos (Micol, 2016). Esta situación cambió a lo largo de la década de los 80 del siglo XX, en la que se extendió rápidamente la idea de que *Arabidopsis thaliana* (en adelante, Arabidopsis) es la mejor especie modelo del reino vegetal (Provart *et al.*, 2016). Esta mala hierba de la familia de las brasicáceas es pequeña y puede rendir ocho generaciones anuales en condiciones de laboratorio; es además autógama, muy prolífica y fácil de cruzar (Meyerowitz, 1987; Meinke *et al.*, 1998). La secuencia de su pequeño genoma está disponible desde 2001 (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Según la base de datos Web of Science, de Thomson Reuters (Clarivate Analytics), en 2016 se publicaron más de 10.000 artículos que contienen la palabra Arabidopsis en su título, resumen o en las palabras clave.

#### II.1.2.- La hoja de Arabidopsis

La fotosíntesis es un proceso esencial para la vida humana. Ocurre fundamentalmente en las hojas de las plantas, órganos especializados en la fijación de la luz solar y el intercambio de gases con el entorno. La supervivencia de la humanidad depende de las hojas, que nos proveen de alimentos de manera directa o indirecta y reducen el contenido en CO<sub>2</sub> e incrementan el de O<sub>2</sub> en la atmósfera (Micol, 2009).

En Arabidopsis se distinguen hojas de dos tipos: las de la roseta o vegetativas, y las caulinares, a lo largo del tallo, en los nudos basales de las inflorescencias secundarias. Las hojas presentan tres ejes de polaridad: el proximodistal, que se extiende desde la base del peciolo hasta el ápice foliar; el mediolateral, desde la vena primaria hasta el margen foliar; y el dorsoventral, desde la cara adaxial (haz) hasta la abaxial (envés; Figura 1A, en la página 3). Entre las epidermis adaxial y abaxial, que son monocapas, se encuentran el mesófilo en empalizada y el lagunar. A través de este último discurren los haces vasculares. El mesófilo en empalizada es un tejido compacto, especializado en la captación de la luz solar, adyacente a la epidermis adaxial. El mesófilo lagunar es abaxial y está formado por

células de formas y tamaños heterogéneos separadas por amplios espacios intercelulares que facilitan el intercambio gaseoso (Figura 1B; Rodríguez *et al.*, 2014).



**Figura 1.-** Morfología y anatomía de las hojas de Arabidopsis. (A) Roseta de la estirpe silvestre Col-0, con indicación de las partes de la hoja y de sus tres ejes de polaridad: el proximodistal (PD), el mediolateral (ML) y el dorsoventral (DV). La barra de escala representa 2 mm. (B) Representación esquemática de la organización tisular de la hoja de una planta C3. Modificada a partir de (A) Mollá Morales (2011) y (B) [http://glencoe.mcgraw-hill.com/sites/0078802849/student\\_view0/unit6/chapter22/section2/self-check\\_quizzes-spanish.html#quest5](http://glencoe.mcgraw-hill.com/sites/0078802849/student_view0/unit6/chapter22/section2/self-check_quizzes-spanish.html#quest5).

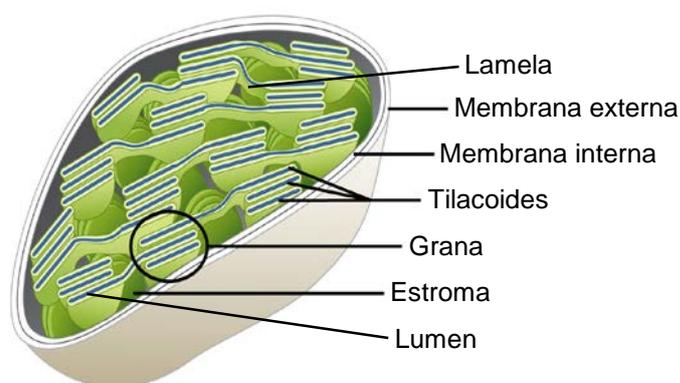
El estudio del desarrollo y la arquitectura de las hojas es importante por varias razones: el conocimiento de la biología de un órgano multicelular sin equivalentes en el reino animal y la identificación de los mecanismos genéticos, hormonales y de adaptación al medio ambiente que determinan su estructura y función finales, que permitirán su manipulación para la mejora de las especies de interés agronómico. Se han obtenido miles de mutantes foliares de Arabidopsis, cuyo estudio está ayudando a comprender los mecanismos genéticos que controlan la morfogénesis de las hojas, y en no pocos casos, del crecimiento de la planta en su conjunto (Micol, 2009).

## II.2.- Estructura y función del cloroplasto

El cloroplasto es el orgánulo más característico del reino vegetal. Aunque su función fundamental es la fotosíntesis, crítica para la producción primaria en los ecosistemas, también participa en la biosíntesis de metabolitos y hormonas (Pogson y Albrecht, 2011; Bastien *et al.*, 2016). Los cloroplastos son orgánulos de doble membrana, que contienen un medio acuoso denominado estroma en el que están inmersos los tilacoides, estructuras monomembrana especializadas en la captación de la luz. El interior de los tilacoides se denomina lumen. Los tilacoides pueden encontrarse apilados conformando los grana o

libres en el estroma del cloroplasto formando las lamelas estromales que conectan los grana (Figura 2, en la página 4).

Cada célula del mesófilo de las hojas de *Arabidopsis* contiene unos 100 cloroplastos, cada uno de ellos con unas 50 copias de su único cromosoma, también conocido como plastoma. Se denomina nucleoide a la región del cloroplasto en la que se encuentra cada plastoma anclado a la membrana de los tilacoides. El nucleoide contiene toda la maquinaria de la replicación y transcripción del ADN del plastoma, la maduración del ARNm y el ensamblaje de los ribosomas. Dispersos en el estroma del cloroplasto también se observan gránulos de lípidos y almidón, de gran importancia para el almacenamiento de energía (Jarvis y López-Juez, 2013; Jensen y Leister, 2014).



**Figura 2.-** Estructura del cloroplasto y los tilacoides. Representación esquemática de un cloroplasto con indicación de algunos de sus componentes. Modificada a partir de Casanova Sáez (2014), que a su vez se inspiró en <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/ps01.htm>.

La fotosíntesis tiene lugar en la membrana de los tilacoides, en la que los pigmentos de los complejos antena (LHC; Light-Harvesting Complexes), como las clorofilas o los carotenoides, capturan la luz. Estos pigmentos transmiten la energía luminosa a los centros de reacción de los fotosistemas I y II, desencadenando un flujo de electrones que acabará rindiendo ATP y NADPH, que se usarán para la fijación de CO<sub>2</sub> y la síntesis de carbohidratos en el estroma del cloroplasto (Allorent y Petroustos, 2017).

### II.2.1.- La transcripción del plastoma

Dos tipos de polimerasas de ARN transcriben el plastoma, codificadas por genes del propio plastoma (PEP, Plastid-Encoded Polymerase) o nucleares (NEP, Nuclear-Encoded Polymerase). La PEP es similar a la polimerasa bacteriana e incluye cinco subunidades,  $\alpha$  (2),  $\beta$ ,  $\beta'$  y  $\beta''$ , que son productos de los genes *rpoA* (RNA polymerase subunit A), *rpoB*, *rpoC1* y *rpoC2*, respectivamente. El núcleo de la PEP tiene asociado un factor  $\sigma$ , cuya función es reconocer el promotor e iniciar la transcripción de genes del

plastoma. Las plantas superiores cuentan con varios genes nucleares que codifican factores  $\sigma$ , siendo seis en *Arabidopsis* (*SIG1-SIG6*), lo que permite una precisa regulación de la transcripción del plastoma en distintos estadios del desarrollo y en respuesta a distintos factores ambientales (Yagi y Shiina, 2014).

La PEP, al igual que el resto de la maquinaria de transcripción de los cloroplastos, se localiza en el nucleoide (Finster *et al.*, 2013) y ha sido aislada en dos estados: como enzima soluble (sRNAP, soluble RNA polymerase) que contiene los componentes básicos de la polimerasa, que le permiten sintetizar ARN si se añade ADN a la muestra; o como un complejo insoluble denominado pTAC (plastid Transcriptionally Active Chromosome). Además de la PEP, el complejo pTAC contiene ADN, ARN y unas 50 proteínas, algunas de las cuales están asociadas de una manera más estrecha a la PEP, por lo que se denominan PAP (PEP-Associated Proteins). Se ha demostrado que las PAP son esenciales para la transcripción del plastoma y su regulación (Börner *et al.*, 2015).

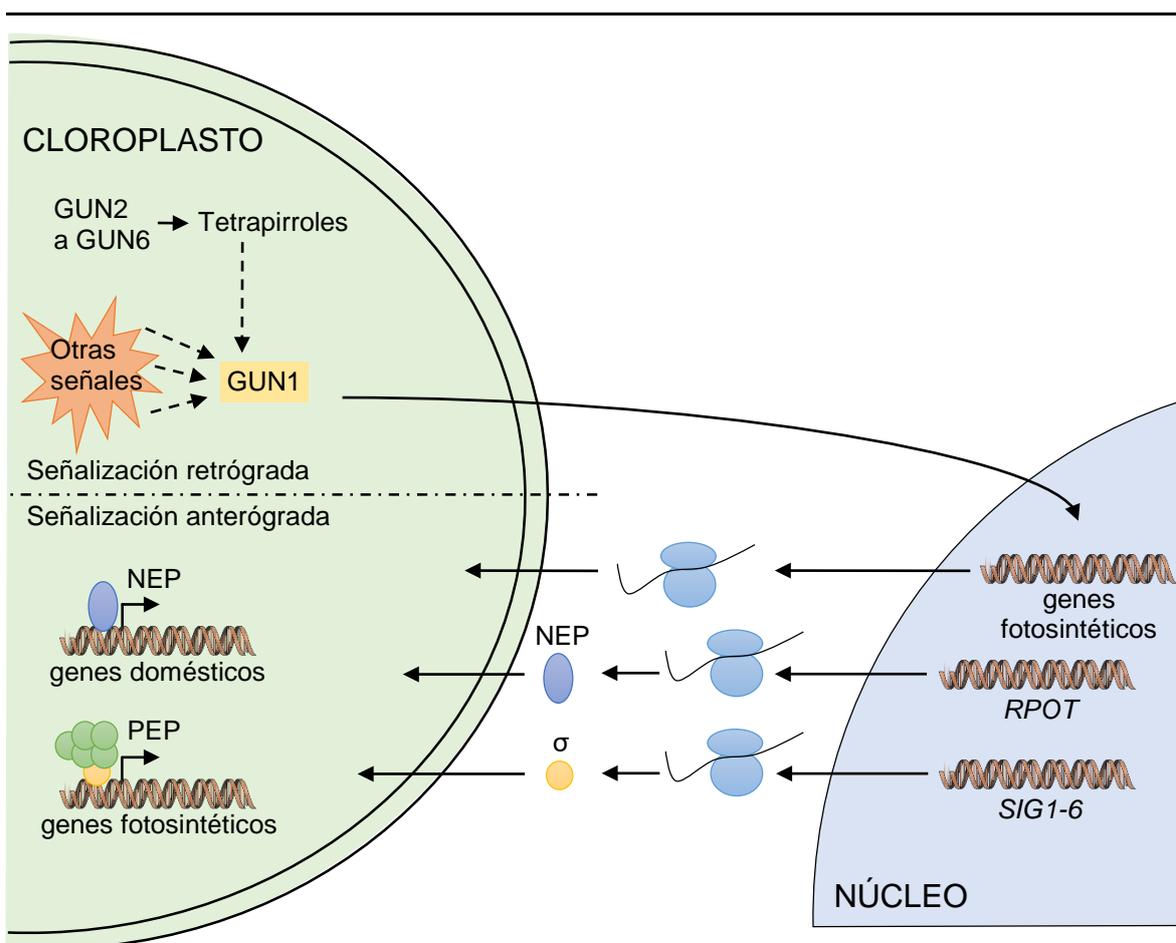
Por su parte, la NEP es monomérica y similar a las polimerasas de ARN de los fagos T3 y T7 (Börner *et al.*, 2015). En *Arabidopsis* existen tres NEP, codificadas por tres genes nucleares *RPOT*. Estas polimerasas se localizan en los cloroplastos (RPOTp), las mitocondrias (RPOTm) o en ambos orgánulos (RPOTmp). En las monocotiledóneas no se han encontrado genes que codifiquen alguna RPOTmp (Yagi y Shiina, 2014).

Los genes del plastoma se clasifican en tres categorías según la polimerasa que los transcriba: la PEP transcribe los de la clase I, cuyos productos suelen participar en la fotosíntesis; la NEP, los de la clase III, que suelen ser genes domésticos, como los de los componentes de la maquinaria de la transcripción, incluidos los *rpo*, y la traducción, y los de la clase II, que son transcritos tanto por la PEP como por la NEP (Yu *et al.*, 2014).

### **II.2.2.- Señalización anterógrada y retrógrada entre el núcleo y el cloroplasto**

El núcleo celular controla en gran medida la expresión del genoma del cloroplasto. En efecto, muchas proteínas imprescindibles para la transcripción del plastoma son productos de genes nucleares, como el factor  $\sigma$  de la PEP, la NEP y las proteínas del complejo pTAC (Börner *et al.*, 2015). Este tipo de control que ejerce el núcleo sobre el cloroplasto se denomina señalización anterógrada (Figura 3, en la página 6; Jarvis y López-Juez, 2013). También existe señalización retrógrada, en la que el cloroplasto controla la expresión de ciertos genes nucleares cuyos productos actúan en el cloroplasto. Las señales retrógradas son de dos tipos: las de control biogénico, relacionadas con el estado de desarrollo del cloroplasto y de la maquinaria fotosintética, y las de control operativo, relacionadas con el funcionamiento del cloroplasto en respuesta a cambios ambientales.

Las señales retrógradas que se originan en el cloroplasto están relacionadas con las rutas de biosíntesis de tetrapirroles, con el estado redox del cloroplasto y con la acumulación de especies reactivas del oxígeno (Kleine y Leister, 2016). Recientemente se ha sugerido que los cambios en las concentraciones de otros metabolitos, como del ácido abscísico, también pueden afectar a la señalización retrógrada (Kleine *et al.*, 2009; Pfannschmidt, 2010).



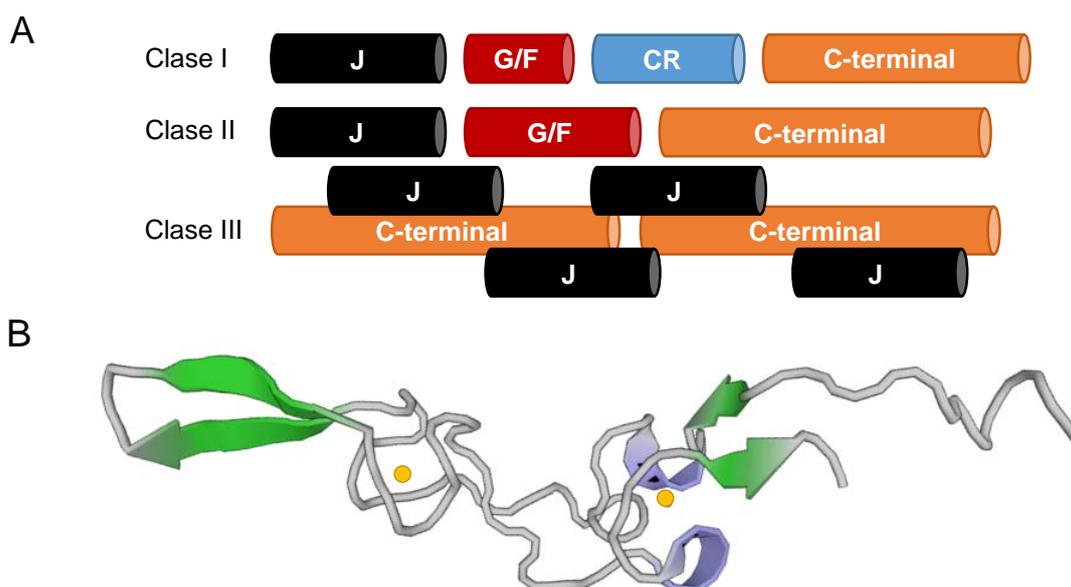
**Figura 3.-** Señalización anterógrada y retrógrada. Se representa esquemáticamente la señalización anterógrada, que controla la transcripción de los genes del cloroplasto desde el núcleo, y la retrógrada, que controla la transcripción de genes nucleares desde el cloroplasto. Las proteínas GUN2 a GUN6 participan en la síntesis de tetrapirroles. GUN1 parece integrar diversas señales del cloroplasto. Las flechas discontinuas indican mecanismos moleculares no demostrados. Modificada a partir de López-Juez y Pyke (2004) y Kleine y Leister (2016).

Los genes nucleares *GENOMES UNCOUPLED1* (*GUN1*), *GUN2*, *GUN3*, *GUN4*, *GUN5* y *GUN6* participan en la señalización retrógrada en *Arabidopsis*. En condiciones de estrés, las plantas disminuyen su tasa fotosintética para evitar daños celulares

irreversibles. En los mutantes *gun*, sin embargo, no se detiene en dichas condiciones la expresión de los genes nucleares relacionados con la fotosíntesis. Las proteínas GUN2 a GUN6 están asociadas a la biosíntesis de los tetrapirroles (Vinti *et al.*, 2000; Strand *et al.*, 2003; Woodson *et al.*, 2011), mientras que GUN1 parece actuar como una proteína integradora de las señales generadas en el cloroplasto que se emitirán al núcleo. El mecanismo molecular por el cual ocurre esta regulación de la señalización anterógrada por GUN1 se conoce solo parcialmente (Barajas-López *et al.*, 2013; Kleine y Leister, 2016).

### II.3.- Las proteínas DnaJ

Las chaperonas controlan el correcto plegamiento de las proteínas y las marcan para su degradación en condiciones de estrés, cuando el plegamiento o la renaturalización no son posibles. La chaperona DnaJ de *Escherichia coli* contiene una secuencia de unos 70 aa que se denominó dominio J (Kampinga y Craig, 2010).



**Figura 4.-** Clasificación y dominios funcionales de las proteínas DnaJ. (A) Esquema de los dominios de las proteínas DnaJ y su clasificación. J: dominio J. G/F: región rica en glicina y fenilalanina. CR: región rica en cisteína. C-terminal: extremo carboxilo. (B) Estructura tridimensional del dominio rico en cisteína, cuyos átomos de zinc coordinados se destacan en amarillo. Modificadas a partir de (A) Sterrenberg *et al.* (2011) y (B) <http://www.rcsb.org/pdb/pv/pv.do?pdbid=1EXK>.

Las proteínas DnaJ se han agrupado en tres clases, en función de su grado de homología con la de *Escherichia coli* (Figura 4A). Las de la clase I presentan los mismos dominios que la proteína DnaJ de *Escherichia coli*: el dominio J en su extremo amino,

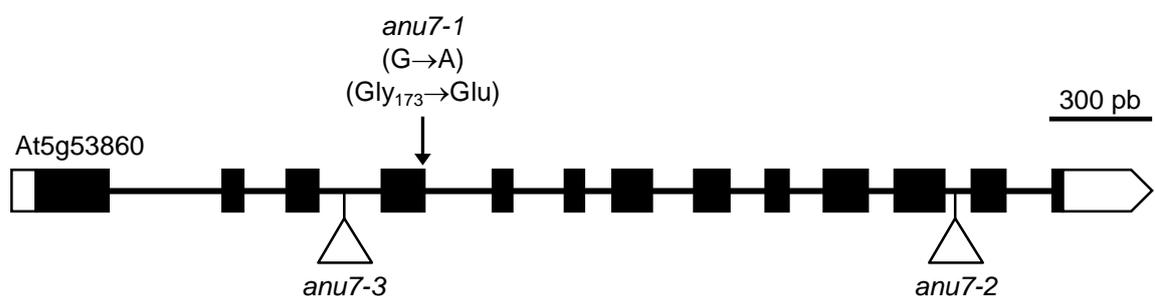
seguido de una región rica en glicina y fenilalanina y cuatro repeticiones del motivo rico en cisteína [CXXCXGXG], capaces de formar dos dedos de zinc, seguido del extremo carboxilo. La clase II presenta los extremos amino y carboxilo y la región rica en glicina y fenilalanina, pero carece del dominio rico en cisteína. En la clase III se incluyen todas las proteínas J que debido a su estructura no se pueden clasificar en las dos anteriores (Kampinga y Craig, 2010). Otros autores restringen la clase III a las proteínas que solo contienen el dominio J (Ohtsuka y Hata, 2000). La región rica en cisteína tiene actividad ditiol/disulfuro isomerasa (Figura 4B), por lo que las proteínas DnaJ catalizan la ruptura y formación de puentes disulfuro en otras proteínas ricas en cisteína para su correcto plegamiento (de Crouy-Chanel *et al.*, 1995).

### **III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**

### III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

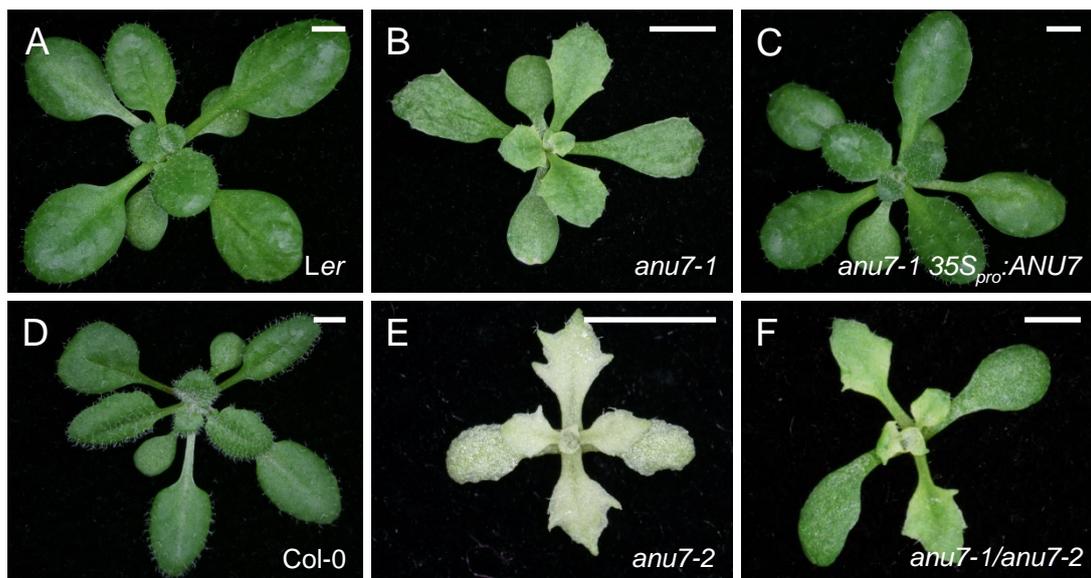
El aislamiento y caracterización genética y molecular de mutantes foliares ha permitido asignar funciones a genes que controlan eventos clave en la ontogenia de las hojas. Con el objetivo de identificar genes implicados en la morfogénesis y el crecimiento de las hojas de *Arabidopsis*, en el laboratorio de José Luis Micol se mutagenizó con metanosulfonato de etilo (EMS) el ecotipo Landsberg *erecta* (*Ler*) para realizar a continuación una búsqueda de mutantes viables, fértiles y con alteraciones visibles en el tamaño, la pigmentación o la forma de la hoja. Los mutantes aislados en esta búsqueda se agruparon en 23 clases fenotípicas (Berná *et al.*, 1999). Una de estas clases fenotípicas es la denominada Angulata (*Anu*), cuyos mutantes presentan hojas pequeñas, pálidas y dentadas. Su despigmentación sugiere una posible disfunción de los cloroplastos. El análisis de complementación de los 18 mutantes *anu* identificados reveló que correspondían a 12 genes distintos (*ANU1-ANU12*). Se han identificado hasta ahora 6 genes *ANU*: *ANU1*, *ANU4*, *ANU7*, *ANU9*, *ANU10* y *ANU12*; los tres últimos codifican proteínas que contienen un péptido de tránsito al cloroplasto en su extremo amino.

El gen *ANU7* fue clonado mediante análisis iterativo del ligamiento a marcadores moleculares, que permitió establecer un intervalo candidato a contener la mutación causante del fenotipo de *anu7-1*. La posterior secuenciación de los genes de dicho intervalo reveló la presencia de una transición G→A en la región codificante del gen At5g53860 (Figura 5; Muñoz-Nortes *et al.*, 2017). Este gen había recibido antes el nombre de *EMBRYO DEFECTIVE 2737* (*EMB2737*) por la letalidad embrionaria de sus alelos recesivos *emb2737-1* y *emb2737-2* (Meinke *et al.*, 2008).



**Figura 5.-** Estructura de la unidad de transcripción del gen *ANU7* y naturaleza molecular de sus alelos mutantes. Los exones e intrones están representados por rectángulos y líneas, respectivamente. Se indican en blanco las regiones 5' y 3' no traducidas. La flecha vertical señala la posición de la mutación *anu7-1*, y los triángulos, las inserciones de ADN-T de los mutantes *anu7-2* y *anu7-3*. Modificada a partir de Muñoz-Nortes *et al.* (2017).

Para confirmar que *ANU7* es At5g53860 se llevaron a cabo cruzamientos de plantas *anu7-1/anu7-1* por *EMB2737/emb2737-1* y *EMB2737/emb2737-2*. La no complementación observada en las correspondientes  $F_1$  confirmó que *anu7-1*, *emb2737-1* (*anu7-2*) y *emb2737-2* (*anu7-3*) son alelos del mismo gen (Figura 6). En las condiciones de cultivo usuales en el laboratorio de J.L. Micol, en placa de Petri con medio GM que contiene sacarosa (apartado IV.7.1.2, en la página 17), las plantas *anu7-2* logran completar su ciclo de vida, aunque su fenotipo es más severo que el de *anu7-1*. La distinta severidad del fenotipo de los alelos *anu7* sugiere que *anu7-1* y *anu7-2* son hipomorfos, mientras que *anu7-3* es nulo, ya que es letal embrionario en ausencia de sacarosa y en plántula en su presencia, y que la insuficiencia de función de *anu7-2* es mayor que la de *anu7-1* (Muñoz-Nortes *et al.*, 2017). El rescate fenotípico de las plantas *anu7-1* portadoras del transgén  $35S_{pro}:ANU7$  confirmó que *ANU7* es At5g53860 (Muñoz-Nortes *et al.*, 2017).



**Figura 6.-** Fenotipo foliar de los mutantes *anu7*. Rosetas de los tipos silvestres (A) *Ler* y (D) *Col-0*, los mutantes simples (B) *anu7-1* y (E) *anu7-2*, el heterocigoto (F) *anu7-1/anu7-2* y (C) una planta mutante y transgénica *anu7-1 35S<sub>pro</sub>:ANU7*. Las fotografías se tomaron 16 días después de la estratificación (dde). Las barras de escala indican 2 mm.

La proteína *ANU7* presenta una región rica en cisteína similar a la de las proteínas *DnaJ* (apartado II.3, en la página 7). A diferencia de la *DnaJ* de *Escherichia coli*, que contiene cuatro repeticiones del motivo [CXXCXGXG], *ANU7* contiene dos, separadas por 50 aa. Se ha propuesto que dos repeticiones de este motivo pueden formar un dedo de

zinc (Hsu *et al.*, 2011). La mutación *anu7-1* afecta concretamente a una de las glicinas de este motivo, sustituyéndola por ácido glutámico (Gly<sub>173</sub>→Glu).

Antes del comienzo de ese Trabajo de Fin de Grado se determinó el patrón de expresión espacial y temporal de *ANU7* en plantas portadoras del transgén *ANU7<sub>pro</sub>:GUS*, en el que el gen de la β-glucuronidasa (*gusA*) de *Escherichia coli* se emplea como testigo bajo el control del promotor de *ANU7*. Se concluyó que *ANU7* se expresa en la mayoría de los tejidos estudiados (Muñoz-Nortes *et al.*, 2017). También se generó el transgén *35S<sub>pro</sub>:ANU7:GFP* para determinar la localización subcelular de la proteína *ANU7*, fusionándola por su extremo carboxilo a la proteína verde fluorescente (GFP). Aunque este transgén produce una proteína funcional que restablece el fenotipo silvestre en plantas *anu7-1 35S<sub>pro</sub>:ANU7:GFP*, no se consiguió visualizar fluorescencia alguna en dichas plantas (Muñoz-Nortes *et al.*, 2017).

El objetivo inicialmente definido para este Trabajo de Fin de Grado fue contribuir a la caracterización genética y molecular del gen *ANU7*. En concreto, nos propusimos estudiar la alteración de los cloroplastos de *anu7-1*, en lo relativo a sus niveles de pigmentos y su ultraestructura. Otro objetivo concreto fue el diseño, construcción y ensayo del transgén *35S<sub>pro</sub>:GFP:ANU7*, en el que la GFP estuviera fusionada al extremo amino de la proteína *ANU7*, en lugar de al carboxilo (*35S<sub>pro</sub>:ANU7:GFP*), ya que este último no había resultado útil. Adicionalmente, nos propusimos estudiar la participación de *ANU7* en la transcripción del genoma del cloroplasto y en la señalización retrógrada del cloroplasto al núcleo mediante la obtención de dobles mutantes entre *anu7-1* y alelos mutantes de genes implicados en estos dos procesos: *rpot*, *gun1-1*, *ptac2*, y *ptac5* (apartados II.2.1 y II.2.2, en las páginas 4 y 5, respectivamente).

## **IV.- MATERIALES Y MÉTODOS**

## IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

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

Para la redacción de esta memoria se han seguido las pautas definidas en varias Tesis previas (Ponce Molet, 1996; Berná Amorós, 1997; Serrano Cartagena, 1998; Quesada Pérez, 1999; Robles Ramos, 1999; Candela Antón, 2001; Pérez Pérez, 2003; Aguilera Díaz, 2009; Ferrández Ayela, 2012; Micol Ponce, 2017), Trabajos de Fin de Máster (Micol Ponce, 2011), y de Fin de Grado (Navarro Quiles, 2015), realizados en los laboratorios de J.L. Micol y M.R. Ponce. En este apartado de Materiales y métodos se reproducen literalmente algunos párrafos procedentes de dichos trabajos anteriores.

### IV.2.- Abreviaturas, acrónimos y fórmulas químicas

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 empleados en este trabajo. No obstante, se ha preferido usar los acrónimos castellanizados ADN y ARN —de uso común en los medios de comunicación españoles—, en lugar de los recomendados por IUPAC, DNA y RNA, para los ácidos desoxirribonucleico y ribonucleico, respectivamente. Esta elección no está basada en ningún argumento que se considere incontestable; ambas opciones son aceptadas por el Diccionario de la lengua española (vigésimotercera edición, 2015) de la Real Academia Española (RAE).

En esta memoria se emplean numerosas abreviaturas y acrónimos, la mayoría de los cuales se definen la primera vez que aparecen en el texto. Además, se han utilizado las abreviaturas de la Tabla 1, correspondientes en su mayoría a las unidades de medida empleadas, que son las del Sistema Internacional.

**Tabla 1.-** Abreviaturas usadas en este trabajo

cm: centímetros.	MΩ: megaohmios.	s: segundos.
<i>et al.</i> : <i>et alii</i> (y otros).	mg: miligramos.	UV: ultravioleta.
g: gramos.	min: minutos.	v/v: volumen/volumen.
h: horas.	ml: mililitros.	V: voltios.
kb: kilobases.	mm: milímetros.	µg: microgramos.
kg: kilogramos.	mM: milimolar.	µl: microlitros.
l: litros.	m/v: masa/volumen.	µM: micromolar.
m: metros.	pb: pares de bases.	µmol: micromoles.
M: molar.	rpm: revoluciones por minuto.	°C: grados centígrados.

### IV.3.- Gramática y terminología

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

### IV.4.- Nomenclatura genética

La nomenclatura que se aplica en esta memoria a genes, mutaciones y fenotipos nuevos 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 de tres letras 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 tres 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 en este trabajo hemos estudiado el mutante *angulata7-1* (*anu7-1*), que es portador de un alelo del gen *ANGULATA7* (*ANU7*), cuyo producto es la proteína *ANGULATA7* (*ANU7*).

No existe una nomenclatura de aceptación general para los genotipos de Arabidopsis. Hemos optado por la más simple, empleando la expresión línea (también planta, individuo, semilla o cualquier órgano) *anu7-1* para referirnos a cualquier homocigoto para esta mutación. Salvo que se indique lo contrario, los individuos que se describen en este trabajo son homocigóticos para la mutación que se menciona en cada caso.

Las fusiones génicas se indican en este trabajo en cursiva, según lo establecido en las instrucciones a los autores de la revista *Plant Cell*: se emplean dos puntos para indicar la fusión entre el promotor de un gen y la región codificante de otro, o entre las regiones codificantes de dos genes. Los promotores se indican con el nombre abreviado de un gen seguido de la sílaba “pro” en subíndice. En consecuencia, la expresión *35S<sub>pro</sub>:GFP:ANU7* se ha utilizado para denotar una construcción en la que la fusión traduccional entre las regiones codificantes del gen de la GFP y el gen *ANU7* están bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.

## IV.5.- Estirpes empleadas en este trabajo

En este trabajo se han empleado las estirpes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. que se recogen en la Tabla 2. Sus semillas se conservaron en tubos *ependorf* a 4°C.

**Tabla 2.-** Estirpes de *Arabidopsis* utilizadas en este trabajo

Genotipo	Código del NASC	Fondo genético	Mutágeno y mutación	Gen mutado	Proteína	Origen
Ler	NW20		Tipo silvestre			1
Col-0	N1092		Tipo silvestre			1
<i>anu7-1</i>		Ler	EMS (G→A)	At5g53860	ANU7 (EMB2737)	2
<i>anu7-2</i>	N16187	Col-0	ADN-T	At5g53860	ANU7 (EMB2737)	1
<i>gun1-1</i>		Col-0	EMS (C→T)	At2g31400	GUN1	3
<i>sca3-1</i>		Ler	EMS (G→T)	At2g24120	SCA3	2
<i>ptac2-1</i>	N547483	Col-0	ADN-T	At1g74850	pTAC2	1
<i>ptac2-2</i>	N575736	Col-0	ADN-T	At1g74850	pTAC2	1
<i>ptac5-4</i>	N541586	Col-0	ADN-T	At4g13670	pTAC5	1
<i>ptac5-5</i>	N596411	Col-0	ADN-T	At4g13670	pTAC5	1

<sup>1</sup>Obtenida inicialmente del NASC y replicada varias veces por autofecundación en el laboratorio de J.L. Micol. <sup>2</sup>Berná *et al.* (1999). <sup>3</sup>Cedidas por N. Mochizuki (Mochizuki *et al.*, 2001).

## IV.6.- Cultivos

### IV.6.1.- 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 y se hicieron en placa de Petri o en maceta.

#### IV.6.1.1.- Cultivo en placa de Petri

La mayoría de los cultivos se iniciaron en placas de Petri de 15 cm de diámetro, que contenían unos 100 ml de medio sólido GM. La siembra de las semillas de *Arabidopsis* se llevó a cabo tras su esterilización por inmersión con agitación, durante 8 min, en una disolución acuosa del 40% en lejía comercial (NaClO al 4-5% m/v) y 2 ml/l de Triton X-100 al 1% v/v, realizando a continuación tres lavados sucesivos con agua estéril.

La siembra en placas de Petri se realizó con material estéril, en una cabina de flujo laminar horizontal. Se sembraron de 16 a 100 semillas por placa de Petri, con la ayuda de una pipeta Pasteur. 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 con el exterior.

Las placas de Petri con las semillas se estratificaron durante 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  $75 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$  de luz blanca, suministrada por tubos fluorescentes Sylvania Standard F20W/133-RS Cool White (en cámaras de cultivo Conviron TC16) y Sylvania 160 W F72T12 CW VHO Cool White o Philips F72T12/D/VHO 160 W 1500 SF (en una cámara Conviron TC30).

En algunos casos, 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.6.1.2.- Cultivo en maceta**

Los cultivos en maceta se efectuaron en bandejas de plástico de 28 × 50 cm, con 42 alveolos, cada uno de ellos de 5 × 5 cm (diámetro × altura), introducidas en cubetas de unos 7 cm de profundidad. Se introdujo en cada alveolo, previamente a su relleno con el sustrato, una maceta de rejilla de 5 × 5 cm (diámetro × altura). Las macetas de rejilla impiden que el sustrato se adhiera al alveolo, facilitando la extracción de las plantas. Se empleó como sustrato una mezcla de perlita (granulometría de 1 a 3 mm;  $105\text{-}125 \text{ kg/m}^3$ ), vermiculita (granulometría de 0 a 3 mm;  $80\text{-}100 \text{ kg/m}^3$ ) y turba no fertilizada (turba rubia de musgo *Sphagnum*, de estructura gruesa; Grobmull Neuhaus), en una proporción volumétrica 2:2:1. Cada alveolo se destinó al cultivo de una sola planta, que en la mayoría de los casos fue trasplantada, con ayuda de unas pinzas, desde la placa de Petri en la que había permanecido durante las primeras tres semanas de su ciclo de vida.

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

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

Las bandejas 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 una vez por semana, mediante la adición de medio mínimo ATM. A partir del momento en que la floración se interrumpe, se suspende el riego, propiciándose así el secado de las plantas, que son mantenidas en la cámara de cultivo al menos dos semanas más, para proceder finalmente a la recolección de sus semillas.

#### **IV.6.1.3.- Cruzamientos**

En *Arabidopsis*, las flores se agrupan en los ápices de los tallos inflorescentes, encontrándose los capullos florales más maduros en el exterior, y los más jóvenes, en el centro de la inflorescencia. Hemos seguido el procedimiento de emasculación descrito por Kranz y Kirchheim (1987) para la realización de cruzamientos entre estirpes distintas, que se basa en que el pistilo madura antes que las anteras en *Arabidopsis*.

#### **IV.6.1.4.- Recolección de semillas**

La recolección de todas las semillas de una planta seca, producto de su autofecundación, se hizo presionándola contra un colador sobre un papel de filtro, en el que cayeron las semillas. La mezcla de semillas, fragmentos de silicuas y otras partes secas de la planta que se acumuló sobre el papel de filtro fue cribada a través de un colador adecuado, a fin de eliminar en lo posible todas las partículas cuyo tamaño fue superior al de las semillas. Las semillas de las estirpes mutantes y silvestres de *Arabidopsis* utilizadas en este trabajo se almacenaron en tubos *ependorf* que se conservaron a 4°C.

#### **IV.6.2.- Condiciones de los cultivos microbianos**

Los cultivos líquidos se realizaron en recipientes estériles, cuya capacidad excedía al menos 5 veces el volumen de medio utilizado, garantizando así una aireación suficiente durante la incubación. Se empleó una agitación de 225 rpm en un incubador dotado de una plataforma orbital (NBS Innova 4000 o 4260) que se mantuvo a 37°C para el crecimiento de *Escherichia coli*.

Las placas de Petri se inocularon con 100 µl de precultivo líquido, que fueron depositados sobre la superficie del medio con una micropipeta. Las células fueron esparcidas por la superficie del medio introduciendo en la placa 5-8 perlas de vidrio de 3 mm de diámetro, estériles, y haciéndolas rodar por agitación.

## IV.7.- Disoluciones

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

### IV.7.1.- 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 kg/cm<sup>2</sup> y 121°C durante 20 min. Las sustancias termolábiles fueron esterilizadas mediante filtración forzada por aspiración, a través de filtros Millipore de 0,22 o 0,45  $\mu m$  de diámetro de poro. Su adición a un medio de cultivo esterilizado en autoclave se realizó después de que este último fuera estabilizado a 55°C.

#### IV.7.1.1.- Medios de cultivo líquidos

**Medio mínimo ATM:** KNO<sub>3</sub> 5 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 mM; MgSO<sub>4</sub> 2 mM; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 2 mM; FeNaEDTA 51  $\mu M$ ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 70  $\mu M$ ; MnCl<sub>2</sub> 14  $\mu M$ ; CuSO<sub>4</sub> 0,5  $\mu M$ ; ZnSO<sub>4</sub> 1  $\mu M$ ; NaMoO<sub>4</sub> 0,2  $\mu M$ ; NaCl 10  $\mu M$ , y CoCl<sub>2</sub> 0,01  $\mu M$  (Kranz y Kirchheim, 1987).

Para su preparación, se añadieron, a 900 ml de agua, 5 ml de KNO<sub>3</sub> 1 M; 2,5 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M; 2 ml de MgSO<sub>4</sub> 1 M; 2 ml de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 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<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 70 mM; MnCl<sub>2</sub> 14 mM; CuSO<sub>4</sub> 0,5 mM; ZnSO<sub>4</sub> 1 mM; NaMoO<sub>4</sub> 0,2 mM; NaCl 10 mM y CoCl<sub>2</sub> 0,01 mM. Se preparó añadiendo, a 900 ml de agua, 4,32 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2,77 g de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; 124 mg de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; 287 mg de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 48,7 mg de NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 584,4 mg de NaCl, y 2,38 mg de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O. Finalmente, se añadió agua hasta 1 l.

#### IV.7.1.2.- Medios de cultivo sólidos

Los medios de cultivo sólidos se prepararon por adición de agar para plantas (Plant Agar; Duchefa), a una concentración final del 0,65% 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 media hora en un baño a 55°C antes de su vertido en placas

de Petri, que se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal (Telstar BH 100). Las placas de Petri con medio sólido se conservaron hasta un mes a 4°C, en posición invertida.

**Medio GM:**  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  10,3 mM;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  50,1  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CaCl}_2$  1,5 mM;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,05  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,05  $\mu\text{M}$ ;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  55,4  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MgSO}_4$  0,75 mM;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  50  $\mu\text{M}$ ;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,5  $\mu\text{M}$ ; KI 2,5  $\mu\text{M}$ ;  $\text{KNO}_3$  9,4 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,62 mM;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  15  $\mu\text{M}$ ; sacarosa 29,2 mM; MES [ácido 2-(N-morfolino)-etano sulfónico] 2,3 mM, y 6,5 g/l de agar para plantas.

Para su preparación se añadieron, a 900 ml de agua, 2,2 g de sales de Murashige y Skoog (Duchefa; Murashige y Skoog, 1962), 10 g de sacarosa y 0,5 g de MES (ácido 2-[N-morpholino]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 añaden 6,5 g de agar para plantas. Se esterilizó en autoclave.

## IV.7.2.- Medios de cultivo para microorganismos

### IV.7.2.1.- Medios de cultivo líquidos

**LB (Luria - Bertani):** 1% m/v de bacto-triptona; 0,5% m/v de extracto de levadura; y 1% m/v de NaCl. Para preparar un litro de medio se mezclaron 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl; se añadió 1 l de agua, se ajusta el pH a 7,5 con NaOH 5 N y se esterilizó en autoclave.

### IV.7.2.2.- Medios de cultivo sólidos

Los medios de cultivo sólidos fueron preparados por adición de agar bacteriológico europeo (Pronadisa), tras la disolución del resto de los componentes en agua. La concentración de agar fue de 15 g/l. Una vez finalizada su esterilización en autoclave, los medios de cultivo se mantuvieron durante 30 min en un baño a 55°C antes de su vertido en placas de Petri de 90 mm, que se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar horizontal. Las placas de Petri con medio sólido se conservaron hasta un mes a 4°C, en posición invertida.

### IV.7.2.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos

Algunos de los medios anteriormente descritos se suplementaron con antibióticos, a una concentración final de 100  $\mu\text{g/ml}$  (ampicilina), 50  $\mu\text{g/ml}$  (kanamicina). Se prepararon disoluciones madre a concentraciones 1.000 veces superiores a la de trabajo, disolviéndolas en agua y esterilizándolas por filtración, o en dimetilsulfóxido (DMSO), y se

conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , alicuotadas en tubos *ependorf* de 1,5 ml. Los antibióticos se añaden al medio después de que éste haya sido esterilizado en autoclave.

### **IV.7.3.- Tampones y otras disoluciones de uso general**

#### **IV.7.3.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico**

**Tampón de extracción:** Tris-HCl 100 mM pH 8,0;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  50 mM; NaCl 0,5 M. Se preparó a partir de disoluciones madre Tris-HCl 1 M;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,5 M, y NaCl 5 M. Puede conservarse varios meses a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**SDS al 20%:** Se preparó disolviendo, a  $68^{\circ}\text{C}$ , 100 g de SDS (dodecilo sulfato de sodio) en 500 ml de agua y ajustando el pH a 7,2 con HCl.

#### **IV.7.3.2.- Disoluciones para electroforesis**

**TAE 50x:** Tris-base [Tris-(hidroximetil)aminometano] 2 M; 5,71% v/v de ácido acético glacial; y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  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 ácido acético glacial y 100 ml de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  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  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  10 mM.

**Marcador de peso molecular para electroforesis en geles de agarosa:** se diluyó el marcador (1 kb Plus DNA ladder de Invitrogen;  $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en tampón de carga hasta una concentración de  $0,1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Se utilizaron 6  $\mu\text{l}$  por pocillo de un gel de agarosa convencional. Se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **IV.7.3.3.- Disoluciones para la obtención de bacterias quimiocompetentes**

**TFBI:**  $\text{KCH}_3\text{COO}$  30 mM; RbCl 100 mM;  $\text{CaCl}_2$  10 mM;  $\text{MnCl}_2$  50 mM, y 15% en glicerol. Para preparar 100 ml se mezclaron 20 ml de RbCl 0,5 M; 2 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,5 M; 10 ml de  $\text{MnCl}_2$  0,5 M; 294 mg de  $\text{KCH}_3\text{COO}$ , y 11,9 ml de glicerol puro. Se añadió agua hasta 100 ml, se ajustó el pH a 5,8 con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (ácido acético glacial diluido al 10%) y se esterilizó por filtración. Se conservó a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**TFBII:** MOPS [ácido 3-(N-morfolino)-propano sulfónico] 10 mM;  $\text{CaCl}_2$  75 mM; RbCl 10 mM, y 15% en glicerol. Para preparar 100 ml se mezclaron 5 ml de MOPS 0,5 M; 37,5 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,5 M; 5 ml de RbCl 0,5 M, y 29,7 ml de glicerol puro. Se añadió agua hasta 100 ml, se ajustó el pH a 6,5 con KOH 1 N y se esterilizó por filtración. Se conservó a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## **IV.8.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos**

### **IV.8.1.- Aislamiento de ácidos nucleicos**

#### **IV.8.1.1.- Aislamiento de ADN plasmídico**

Hemos llevado a cabo preparaciones a pequeña escala de ADN o minipreparaciones (*minipreps*), a partir de cultivos bacterianos de 3-5 ml de medio líquido, empleando un Gene Elute Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **IV.8.1.2.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis**

El ADN genómico utilizado como molde en las mezclas de PCR fue purificado mediante el método de Dellaporta *et al.* (1983), con algunas modificaciones. Se introdujo en un tubo *ependorf* una planta o parte de ella y se le añadieron 500 µl de tampón de extracción, macerándola en un macerador automático (Mixermill 300, Qiagen 85120). 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 KCH<sub>3</sub>COO 5 M, incubando en nevera durante 15 min a 4°C, y centrifugando durante 10 min a 13.000 rpm (14.927 g) en una microfuga. El sobrenadante fue transferido a un tubo *ependorf* vacío y precipitado durante 10 min a -20°C con 640 µl de isopropanol y 60 µl de NaCH<sub>3</sub>COO 3 M, y se centrifugó durante otros 10 min a 10.000 rpm. El precipitado fue lavado 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.8.1.3.- Aislamiento de ARN de Arabidopsis**

Las extracciones de ARN se realizaron a partir de rosetas recolectadas 16 dde, que fueron introducidas en tubos *ependorf* sumergidos inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. Las extracciones se llevaron a cabo empleando Trizol (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.8.2.- Síntesis de ADN**

#### **IV.8.2.1.- Síntesis de oligonucleótidos**

Todos los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados por Sigma-Aldrich (Tabla 3, en la página 21).

**Tabla 3.-** Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Propósito	Nombres	Secuencias de los oligonucleótidos (5'→3')	
		Cebador directo (forward; F)	Cebador inverso (reverse; R)
Genotipado	anu7-1_MUT_F	CTTAAGCTATCCTAGTGATATTC	
	emb2737_1_LP/RP	ATGTAAGATCGCCTATTTGTGG	ACGAATCTGCCAAGTGTCTGC
	gun1-1_F/R	TCGTAATGAGTGCGATAAAGC	GCGTCAATCACAGCATTGTAGG
	ptac2-1_LP/RP	TGGATGGACAATTAACCGAC	TCTCATACCGTCCATTTGAC
	ptac2-2_LP/RP	TCGCCAGTAATACACGGTTTC	CTGAAGTTGGCTCTTTGTTG
	ptac5-4_LP/RP	ATCATGAAGTTGGAGACGACG	TGACAAATACTCGCCTTTGG
	ptac5-5_LP/RP	ATCATGAAGTTGGAGACGACG	TGACAAATACTCGCCTTTGG
	Lb1.3	ATTTTGCCGATTTCCGAAC	
RT-qPCR	q_OTC_F/R	TCCTTGCCAAATCATGGCCG	GCATGCATGCGATTCTCCGC
	q_pTAC2_F/R	ACTTCTGGATGCTTTGTGGTG	AGCCAAACCGATAGTGCTGTA
	q_pTAC10_F/R	GAGGAACCAGGGAGGTACAAG	CATACCACACATTGCCTTTCC
	q_pTAC14_F/R	TGGAAAGATACGGCTTCTCAA	TCGATAACTCGCTGTCATGGT
Clonación	ANU7-cds_F1/R1	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctATGTCGAGAGGACCAGGTCGT <sup>a</sup>	ggggaccactttgtacaagaaagctggGTTTAGAAGAACCACCACTTCCT <sup>b</sup>
Gateway	ANU7-cds_F2/R2	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctCATCTTCTCCAATGTCGAGAG <sup>a</sup>	ggggaccactttgtacaagaaagctggGTAGAAGAACCACCACTTCCTT <sup>b</sup>
	ANU7-cds_F3	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctATCTTCTCCAATGTCGAGAGG <sup>a</sup>	
Genotipado de clones bacterianos	pGEMT221_F/R	GTTGTA AACGACG GCCAGTG	GGAAACAGCTATGACCATGATT
	pMDC83_F	GTAAGGGATGACGCACAATC	
	ANU7_Int200_F/R	GAGACCTTACATCCAAGACTCA	GAGATGAACTCAGGGATGCCA

<sup>a,b</sup>Sus extremos 5' incluyen las secuencias <sup>a</sup>attB1 y <sup>b</sup>attB2, indicadas en minúscula.

#### IV.8.2.2.- Amplificaciones mediante PCR

En este trabajo se han realizado amplificaciones mediante PCR con varios propósitos. Se empleó la polimerasa GoTaq Flexi (Promega) para las amplificaciones a partir de ADN genómico de *Arabidopsis* o ADN plasmídico procedente de bacterias. La GoTaq Flexi es una versión recombinante de la polimerasa *Taq* de *Thermus aquaticus*, que es barata y suficientemente procesiva. En los casos en los que se precisaba una gran fidelidad de copia, como para sintetizar moléculas recombinantes, se empleó la polimerasa Phusion (Finnzymes) cuya tasa de error es 50 veces menor.

Los cebadores y los desoxirribonucleótidos se añadieron a una concentración final de 0,4  $\mu\text{M}$  y 0,2 mM, respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos *ependorf* de pared fina de 0,2 ml, en termocicladores Applied Biosystems 2700 o Bio-Rad T100, en los que se programó un número de ciclos comprendido entre 35 y 40. Los volúmenes de reacción oscilaron entre 5 y 20  $\mu\text{l}$ , dependiendo del uso posterior de los productos de amplificación.

Los programas utilizados incluían una etapa previa de calentamiento a 95°C durante 3 min, seguida de un determinado número de ciclos en los que se repetía una fase de 30 s a 94°C para desnaturalizar los moldes, otra de 30 s a la temperatura de apareamiento deseada para permitir la hibridación de los cebadores y una final a 72°C para la polimerización por parte de la GoTaq Flexi o Phusion, cuya duración depende del tamaño del fragmento a amplificar, asumiéndose que las polimerasas termoestables utilizadas sintetizan ADN a razón de una kilobase por minuto. Por último, una etapa a 72°C durante 10 min permitía el rellenado de las moléculas bicatenarias con colas protuberantes en 5'.

Las temperaturas de apareamiento ( $T_m$ ) se calcularon con la fórmula  $T_m = 4(C + G) + 2(A + T)$ , siendo C, G, A y T el número de las respectivas bases en el oligonucleótido (Suggs et al., 1981). Se programó habitualmente en el termociclador una temperatura entre 5 y 10°C inferior a la calculada. Los oligonucleótidos se diseñaron procurando obtener valores de  $T_m$  similares para los dos miembros de cada pareja de cebadores.

#### IV.8.2.3.- Retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa

La síntesis de ADN complementario a partir de las muestras de ARN extraídas tal como se indica en el apartado IV.8.1.3, en la página 20, se realizó mezclando disoluciones de ARN (12,5  $\mu\text{l}$ ; 160 ng/ $\mu\text{l}$ ), hexanucleótidos aleatorios (1  $\mu\text{l}$ ; 250 ng/ $\mu\text{l}$ ) y desoxinucleótidos (1  $\mu\text{l}$ ; 10 mM de cada uno), junto con 0,5  $\mu\text{l}$  del inhibidor de RNasas Ribolock (Invitrogen), 1  $\mu\text{l}$  de la retrotranscriptasa termoestable Maxima Reverse Transcriptase (10.000 U/ $\mu\text{l}$ ; Invitrogen) y 4  $\mu\text{l}$  del tampón de reacción (RT Buffer 5 $\times$ ). Esta mezcla se incubó durante 60

min a 25°C, y a continuación 5 min a 85°C para inactivar la enzima. Para comprobar la ausencia de ADN genómico en los productos de retrotranscripción, se amplificó mediante PCR un segmento del gen doméstico *ORNITHINE CARBAMOYLTRANSFERASE (OTC)* con la pareja de oligonucleótidos q\_OTC\_F y q\_OTC\_R (Tabla 3, en la página 21), que flanquean uno de sus intrones (Quesada *et al.*, 1999).

Las amplificaciones de PCR cuantitativa (RT-qPCR) se llevaron a cabo en una placa de microtitulación de 96 pocillos, a cada uno de los cuales se añadieron con una micropipeta electrónica 7,5 µl de SYBR Green (Invitrogen), 5 µl de una disolución de los correspondientes cebadores (Tabla 3, en la página 21), cuya concentración final fue 0,4 µM, y 1 µl del producto de retrotranscripción. La placa se cubrió a continuación con un plástico adhesivo transparente. Tras un pulso de 2 s a 3.000 rpm en una centrífuga Sigma 3K12 dotada de un rotor 11222 se introdujo la placa en un termociclador Step One Plus System (Applied Biosystems), que ejecutó el siguiente programa: 50°C, 2 min; 95°C, 10 min; 41 × (95°C, 15 s; 60°C, 1 min); 95°C, 15 s. Se usó el gen *OTC* como control interno para los análisis de los niveles de expresión relativa. Se analizaron tres réplicas biológicas, cada una de las cuales se subdividió en tres técnicas. La cuantificación relativa de los niveles de expresión génica se realizó empleando el método de Livak y Schmittgen (2001).

### **IV.8.3.- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa**

Se han utilizado geles de 1,5 a 2,5% m/v en agarosa, dependiendo de los tamaños de las moléculas de ADN a resolver. Las electroforesis se realizaron en cubetas horizontales, empleando como electrolito TAE 1x. La disolución de la agarosa en el tampón se llevó a cabo 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 (90-120 V), cuyo valor dependió del tamaño de las moléculas de ADN y las dimensiones de la cubeta. La visualización de las moléculas se consiguió iluminando los geles con luz UV de 312 nm, obteniéndose las correspondientes fotografías en un documentador de geles Vilber E-Box VX5.

### **IV.8.4.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN**

#### **IV.8.4.1.- Reacciones de secuenciación**

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo por el procedimiento de la secuenciación cíclica, en un termociclador, usando una polimerasa termoestable. Hemos utilizado en todos los casos la variante de los didesoxinucleótidos terminadores (Sanger *et*

*al.*, 1977) marcados con fluorocromos, que permite realizar las cuatro reacciones de secuenciación en un solo tubo, empleando cebadores sin marcar. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en tubos de pared fina de 0,2 ml, en mezclas de reacción de 5 µl que incluían 2,5 pm del cebador y 2 µl de la disolución incluida en el kit de secuenciación ABI PRISM BigDye Terminator Cycle v2.0 Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems), que contiene los desoxinucleótidos, los didesoxinucleótidos terminadores marcados con fluorocromos, la ADN polimerasa AmpliTaq FS y su tampón de reacción. Como molde de secuenciación se emplearon 1-3 µl de la disolución de un producto de PCR, tratado previamente con una mezcla de las enzimas exonucleasa I y FastAp (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante; la primera de ellas es una nucleasa de cadena sencilla que elimina los cebadores no incorporados; FastAp es una fosfatasa alcalina que desfosforila los nucleótidos no incorporados.

Se empleó un programa de PCR con una etapa inicial de desnaturalización de 2 min a 96°C, seguida de 40 ciclos de 10 s a 96°C, 5 s a 50°C y 4 min a 60°C. Una vez finalizadas las reacciones de secuenciación cíclica se procedió a eliminar los didesoxinucleótidos terminadores no incorporados. Para ello, los productos de las reacciones de secuenciación cíclica fueron precipitados, añadiendo a cada muestra 55 µl de agua y 110 µl de etanol al 95%, e incubando a 4°C durante 15 min. Los tubos fueron centrifugados a continuación en una microfuga, a 13.000 rpm durante 15 min. El precipitado fue finalmente lavado con etanol al 70% y secado al aire, conservándose a -20°C.

#### **IV.8.4.2.- Electroforesis y lectura automatizada de secuencias**

La electroforesis capilar para la obtención de secuencias nucleotídicas se llevó a cabo en un analizador genético ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems). Los productos de las reacciones de secuenciación fueron resuspendidos en 20 µl de formamida desionizada, desnaturalizados a 96°C durante 2 min e introducidos rápidamente en hielo, todo ello antes de su carga en la gradilla del secuenciador.

La emisión de fluorescencia por los terminadores marcados con distintos fluorocromos, tras su excitación por el láser del analizador genético, es recogida por un detector, y su interpretación y análisis son llevadas a cabo de forma automatizada por el programa que controla el equipo. Algunas posiciones ambiguas en las secuencias obtenidas pudieron esclarecerse mediante la magnificación de los electroferogramas, usando el programa FinchTV v1.4.0 (<http://www.geospiza.com>).

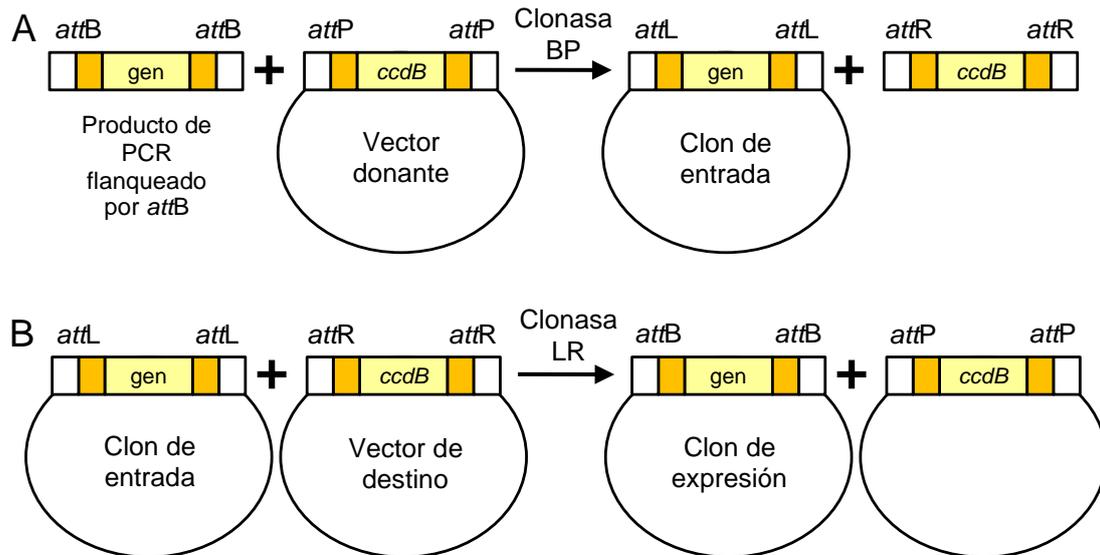
#### IV.9.- Obtención de líneas transgénicas mediante la tecnología Gateway

La tecnología Gateway es un método de clonación basado en la recombinación específica de sitio del bacteriófago  $\lambda$  (Landy, 1989) que se integra en el genoma de *Escherichia coli* mediante la interacción entre el sitio *attB* del cromosoma de la bacteria y el *attP* del fago. La ruptura y unión covalente de los sitios parcialmente homólogos *attB* y *attP* rinde los sitios *attL* y *attR*, que flanquean al lisógeno, que puede liberarse del cromosoma bacteriano mediante una reacción de escisión contraria a la de integración.

Las reacciones de integración de  $\lambda$  en el cromosoma bacteriano y su posterior liberación son catalizadas por enzimas que reconocen los sitios *att*, promoviendo su corte endonucleolítico y unión covalente. Estas enzimas se emplean en la tecnología Gateway (Bushman *et al.*, 1985), que se basa en dos reacciones, una de las cuales es la denominada BP, en la que recombinan los sitios *attP* del vector donante con los *attB* de la molécula de ADN de interés, que queda flanqueada por sitios *attL* en el vector de entrada. La reacción BP es llevada a cabo por la Clonasa BP, una mezcla del Factor de integración del hospedador (IHF; es el producto de un gen de *Escherichia coli*) y la Integrasa (Int) de  $\lambda$ ; Int no puede llevar a cabo la recombinación en ausencia de la proteína IHF. La segunda reacción se denomina LR y sucede entre los sitios *attL* del vector de entrada y los *attR* del de destino, rindiendo un clon de expresión, en el que la molécula de ADN de interés queda flanqueada por sitios *attB*. La Clonasa LR incluye la Escisionasa (Xis) de  $\lambda$  y los IHF e Int de la Clonasa BP; esta mezcla de enzimas cataliza la segunda reacción de recombinación (Figura 7, en la página 26). La reacción BP es similar a la de integración de  $\lambda$  en el cromosoma bacteriano, y la LR, a la de liberación del lisógeno.

Los vectores empleados en la tecnología Gateway suelen contener el gen *ccdB*, flanqueado por sitios *att*, para la selección negativa de los plásmidos que no hayan incorporado un inserto. Este gen codifica una proteína tóxica para la mayoría de las estirpes de laboratorio de *Escherichia coli*, como DH5 $\alpha$ , entre otras, ya que interfiere con la ADN girasa, implicada en la replicación del ADN bacteriano (Figura 7).

Para la obtención de los clones de entrada, se empleó pGEM-T Easy221 (Figura 8A, en la página 27), desarrollado en el laboratorio de B. Scheres, que permite una doble selección de las células de *Escherichia coli* transformantes, ya que contiene los genes *ccdB* y de resistencia a ampicilina. El inserto se subclonó posteriormente en pMDC45 (Figura 8B, en la página 27), en el que quedó bajo el control de dos promotores 35S en tándem. Este vector contiene marcadores seleccionables de resistencia a kanamicina, para su uso en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, e higromicina, en *Arabidopsis*.



**Figura 7.-** Clonación de un inserto en un vector de expresión Gateway. Se representa esquemáticamente el proceso de generación de los clones de (A) entrada y (B) expresión (destino) para un gen que ha sido amplificado mediante PCR con cebadores que incluyen las secuencias *attB* en sus extremos 5'. Modificada a partir de Micol Ponce (2011), que a su vez la modificó del catálogo Gateway Technology de Invitrogen.

## IV.10.- Transformaciones

### IV.10.1.- Transformación de células bacterianas

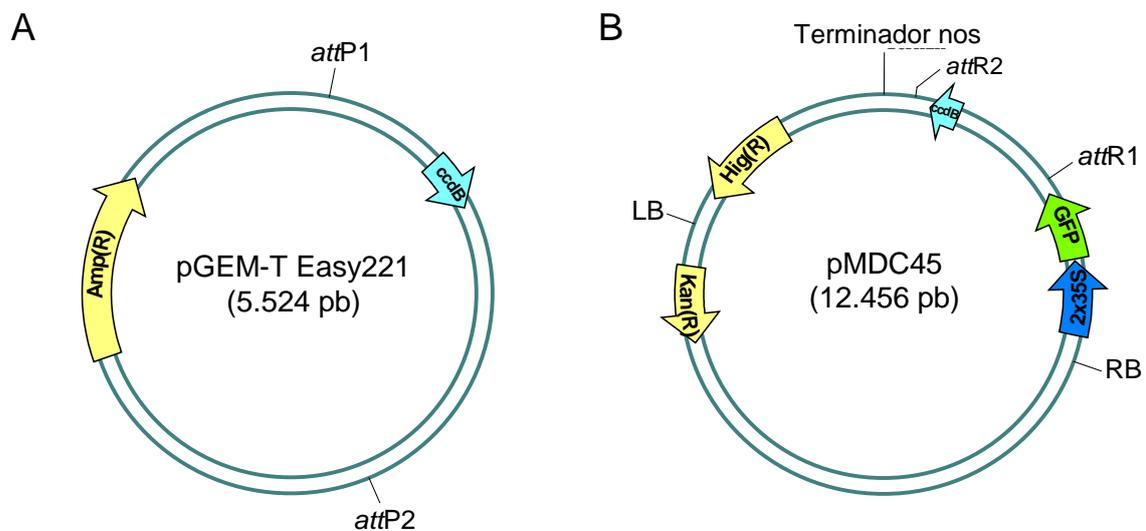
#### IV.10.1.1.- Obtención de células quimiocompetentes

La preparación de células quimiocompetentes se llevó a cabo según se describe en Sambrook y Russell (2001), con las modificaciones que se indican a continuación. Se inocularon cultivos de 200 ml de medio líquido LB con células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , y se incubaron a 37°C y 225 rpm. Una vez que los cultivos alcanzaron una absorbancia ( $A_{600}$ ) de 0,6-0,8, se enfriaron durante 5 min en hielo y se centrifugaron a 4°C y 5.000 rpm (5.445 g) durante 10 min. Tras la eliminación del sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 40 ml de tampón TFB1 (apartado IV.7.3.3, en la página 19). A continuación, se centrifugó a 4°C y 4.000 rpm (3.485 g) durante 5 min, se decantó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 4 ml de TFBII. Las células preparadas de este modo se distribuyeron en alícuotas de 50  $\mu$ l, que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

#### IV.10.1.2.- Transformación por choque térmico

Se añadieron de 2 a 3  $\mu$ l de una disolución de ADN plasmídico obtenida de una minipreparación (apartado IV.8.1.1, en la página 20) a un tubo *ependorf* que contenía 50  $\mu$ l de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , y se mantuvo la suspensión en

hielo durante 20 min. El tubo se sometió a continuación a un choque térmico durante 90 s en un baño termostatzado a 42°C, depositándolo después en hielo. Se añadió a continuación 1 ml de medio líquido LB, incubando a 225 rpm y 37°C durante al menos una hora. Finalmente, se centrifugaron los tubos *ependorf* durante 2 min a 3.000 rpm en una microfuga, se eliminó la mayor parte del sobrenadante y se resuspendieron las células en el medio remanente, esparciéndose la suspensión sobre el medio de cultivo sólido suplementado con antibiótico. Las placas de Petri se incubaron durante 24 h a 37°C.



**Figura 8.-** Mapa de los vectores Gateway empleados en este trabajo. (A) pGEM-T Easy221 (vector de entrada) y (B) pMDC45 (vector de destino). Se destacan las posiciones de las secuencias *attP1*, *attP2*, *attR1*, y *attR2*, los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) del ADN-T y la secuencia del terminador de la transcripción del gen de la nopalina sintetasa (Terminador nos). Se destacan en color las secuencias de los genes de resistencia a ampicilina *Amp<sup>R</sup>*, kanamicina *Kan<sup>R</sup>* e higromicina *Hig<sup>R</sup>*, los dos promotores 35S dispuestos en tándem, el gen tóxico *ccdB* y el gen de la GFP (en verde). Las flechas indican el sentido de la transcripción. Los mapas se dibujaron con el programa pDRAW32. (A) Modificado a partir de Navarro Quiles (2015), que lo dibujó a partir de la información aportada por B. Scheres y (B) dibujado a partir de Curtis y Grossniklaus (2003).

## IV.11.- Análisis morfológico e histológico

### IV.11.1.- Observación microscópica y microfotografía

Los cruzamientos y las observaciones de rutina de las plantas se llevaron a cabo con una lupa binocular Olympus SZ30 60TR. Las fotografías de plantas en placa de Petri se tomaron con una lupa Nikon SMZ1500, dotada de una cámara Nikon DXM 1200F, con iluminación anular de fibra óptica, provista por una fuente de luz Volpi Intralux 6000-1. Las microfotografías de hojas decoloradas para visualizar su venación se tomaron con un

microscopio Leica DMRB dotado de una cámara Nikon DXM 1200F. Las microfotografías de la ultraestructura de los cloroplastos se tomaron a 80 kV con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1011 equipado con una cámara digital Gatan Orius SC200.

#### **IV.11.2.- Preparación de muestras para microscopía electrónica**

Para la visualización de muestras mediante microscopía electrónica de transmisión se obtuvieron muestras de tejido de 3 × 3 mm a partir de hojas del tercer nudo que fueron introducidas en la disolución de fijación de McDowell (McDowell y Trump, 1976). Posteriormente fueron procesadas por el Servicio de Microscopía de la Universidad de Murcia.

#### **IV.11.3.- Determinación de pigmentos**

Para la determinación de clorofilas y carotenoides se tomaron 5 muestras de 100 mg de hojas vegetativas (sin raíz), y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Se homogeneizó el tejido con 1,5 ml de acetona al 80% fría (a -20°C), y se centrifugó durante 10 min a 5.000 rpm en una microfuga. Se diluyeron las muestras 1:4 en 1 ml de volumen total y se midieron sus absorbancias a 470, 646 y 663 nm, según se describe en Wellburn (1994). Para el cálculo de las concentraciones de pigmentos se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$[\text{clorofila a}] = 12,25 \cdot A_{663} - 2,79 \cdot A_{646}$$

$$[\text{clorofila b}] = 21,50 \cdot A_{646} - 5,10 \cdot A_{663}$$

$$[\text{carotenoides}] = (1000 \cdot A_{470} - 1,82 \cdot [\text{clorofila a}] - 85,02 \cdot [\text{clorofila b}]) / 198$$

#### **IV.12.- Pruebas estadísticas**

Para el contraste de medias de los valores de  $C_T$  de los niveles de expresión génica determinados mediante RT-qPCR, y para el análisis estadístico de las medidas de los niveles de pigmentos nos hemos basado en el estadístico  $U$  de Mann-Whitney.

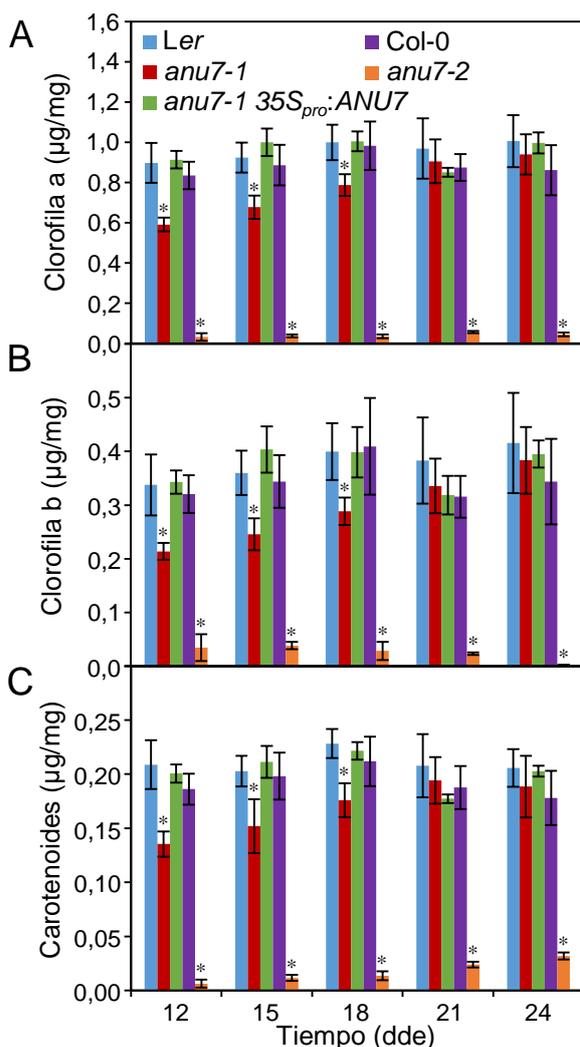
## **V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1.- Caracterización fenotípica de los mutantes *anu7*

En este trabajo hemos contribuido a la caracterización del mutante *anu7-1*, portador de un alelo hipomorfo y viable del gen *ANU7* (At5g53860), del que solamente se habían descrito hasta ahora los alelos insercionales y letales *emb2737-1* y *emb2737-2*, a los que hemos denominado *anu7-2* y *anu7-3*, respectivamente (apartado III, en la página 9). Las hojas del mutante *anu7-1* son pequeñas, pálidas y dentadas; las de *anu7-2* son además albinas si se cultiva en presencia de sacarosa (Figura 6, en la página 10), condición en la que este mutante sobrevive.

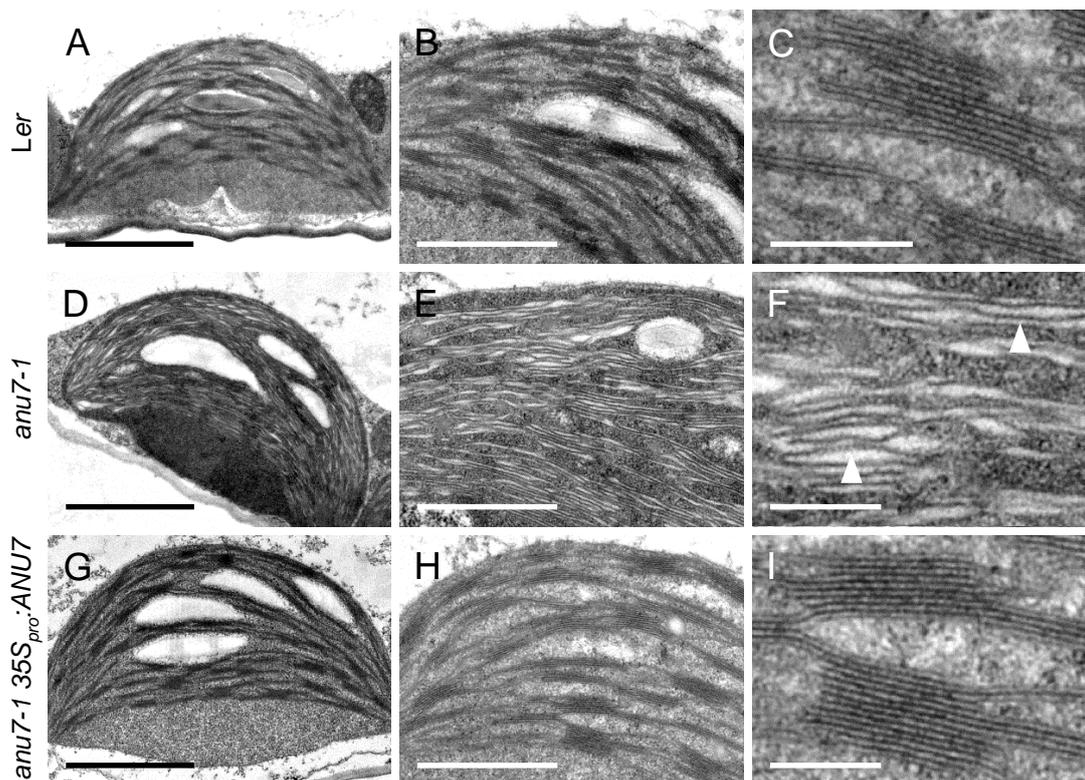
Hemos estudiado la variación de la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofilas a y b y carotenoides; Figura 9) con el tiempo en la roseta de los mutantes *anu7-1* y *anu7-2* y en la línea mutante y transgénica *anu7-1 35S<sub>pro</sub>:ANU7*.



**Figura 9.-** Contenido en clorofilas y carotenoides de los mutantes *anu7*. Se representa la concentración, expresada en microgramos de pigmento por miligramo de tejido, de (A) la clorofila a, (B) la clorofila b, y (C) los carotenoides, en los tipos silvestres *Ler* y *Col-0*, los mutantes *anu7-1* y *anu7-2* y la línea mutante y transgénica *anu7-1 35S<sub>pro</sub>:ANU7*. Las plantas se recolectaron 12, 15, 18, 21 y 24 dde. Las barras de error representan la desviación estándar. Los asteriscos indican valores significativamente distintos de los del correspondiente tipo silvestre en un test de la *U* de Mann-Whitney ( $*p < 0,01$ ;  $n = 6$ ).

Ambos mutantes manifiestan una reducción en la concentración de los tres pigmentos en todas las edades en las que se analizaron (12, 15, 18, 21 y 24 dde), salvo *anu7-1*, en cuyas muestras recolectadas 21 y 24 dde se reducen las diferencias con el tipo silvestre (Figura 9, en la página 29). En *anu7-2* los niveles de los tres pigmentos son extremadamente bajos, lo que concuerda con su albinismo. El transgén  $35S_{pro}:ANU7$  restablece el fenotipo silvestre, alcanzando concentraciones de estos pigmentos similares a las de *Ler*, confirmando una vez más que *anu7-1* es un alelo de *EMB2737* (At5g53860).

La disminución en la concentración de pigmentos que observamos en los mutantes *anu7* podría deberse a alteraciones en la estructura y/o la organización de los cloroplastos. Para estudiar estas posibles alteraciones, analizamos la ultraestructura de los cloroplastos (apartado II.1.2, en la página 2) de *anu7-1* y *anu7-1 35S<sub>pro</sub>:ANU7* mediante microscopía electrónica de transmisión (apartado IV.11.2, en la página 28; Figura 10).



**Figura 10.-** Ultraestructura de los cloroplastos de *anu7-1*. Microfotografías electrónicas de transmisión de los cloroplastos de células del mesófilo en empalizada de hojas del tercer nudo de (A-C) *Ler*, (D-F) *anu7-1*, y (G-I) *anu7-1 35S<sub>pro</sub>:ANU7*. Las fotografías se tomaron 21 dde. Las barras de escala representan (A, D, G) 2  $\mu\text{m}$ , (B, E, H) 1  $\mu\text{m}$  y (C, F, I) 0,25  $\mu\text{m}$ . Las puntas de flecha en F indican desafilamientos locales de los tilacoides de *anu7-1*.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión muestran la presencia de grana compactos en los cloroplastos silvestres, mientras que en *anu7-1* se observan tilacoides mal apilados en algunas regiones, con un incremento local del espacio estromal. El transgén *35S<sub>pro</sub>:ANU7* también en este caso restablece el fenotipo silvestre, ya que los grana *anu7-1 35S<sub>pro</sub>:ANU7* son indistinguibles de los silvestres. Otras características de los cloroplastos que se pueden observar en las microfotografías, como el tamaño de los gránulos de almidón o la abundancia de tilacoides, no resultaron distintas entre *anu7-1* y *Ler*.

El bajo contenido en pigmentos de los mutantes *anu7-1* y *anu7-2* y la alteración en la estructura de los cloroplastos de *anu7-1* sugieren una alteración en la fotosíntesis de estos mutantes. Tras la finalización de este trabajo, se comprobó en el laboratorio de J.L. Micol que *anu7-1* tiene una eficiencia fotosintética similar a la de *Ler*, mientras que la de *anu7-2* es mucho menor que la de *Col-0*, lo que indica que la pérdida de función del gen *ANU7* en el mutante *anu7-1* no es tan acusada como para alterar significativamente este parámetro (Muñoz-Nortes *et al.*, 2017).

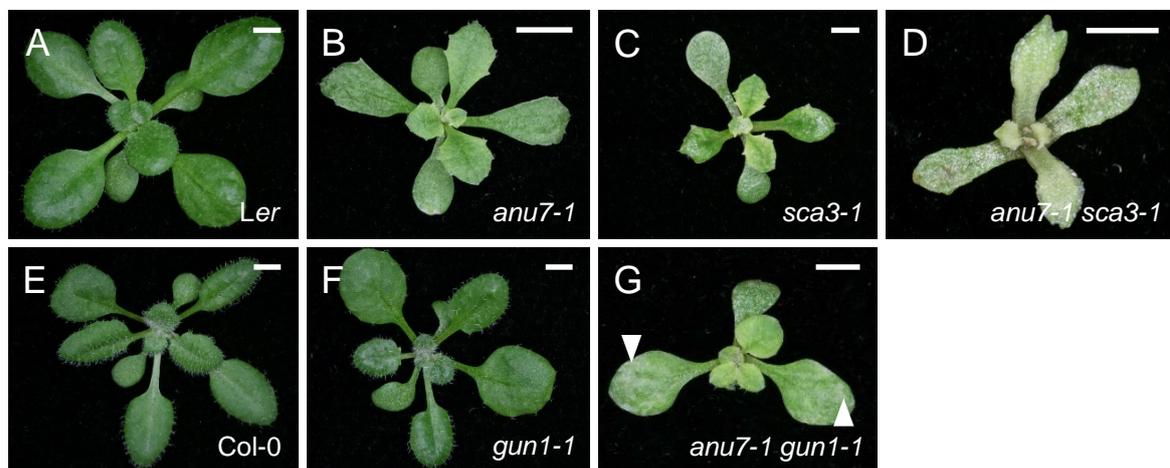
## **V.2.- Interacciones genéticas de ANU7 con RPOTp, GUN1, pTAC2 y pTAC5**

Dadas las alteraciones morfológicas observadas en los cloroplastos de *anu7-1* y habida cuenta de que se ha establecido que la proteína ANU7 forma parte del proteoma de este orgánulo (Zybailov *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2013), nos propusimos estudiar sus funciones en el cloroplasto. Hemos prestado atención a la transcripción del plastoma y la señalización retrógrada, mediante la obtención y estudio de combinaciones dobles de *anu7-1* con alelos de los genes nucleares *RPOTp*, *pTAC2*, *pTAC5* y *GUN1* (apartados II.2.1 y II.2.2, en las páginas 4 y 5, respectivamente).

### **V.2.1.- Interacción genética entre ANU7 y RPOTp**

Antes del inicio de este TFG se realizó en el laboratorio de J.L. Micol un análisis transcriptómico del mutante *anu7-1*, constatándose la sobreexpresión de genes plastídicos transcritos específicamente por la NEP (Muñoz-Nortes *et al.*, 2017). También se observó la sobreexpresión de genes nucleares cuyos productos proteicos forman parte del complejo pTAC, que incluye a la PEP, que transcribe parte de los genes del plastoma (apartado II.2.1, en la página 4). El funcionamiento aberrante de los cloroplastos *anu7-1* parece desencadenar una respuesta compensatoria que consiste en la sobreexpresión conjunta de estos dos grupos de genes. Estas observaciones sugieren que ANU7 participa en el ensamblaje y/o el funcionamiento de la PEP o el complejo pTAC en su conjunto.

*scabra3-1* (*sca3-1*) es un alelo del gen *RPOTp* aislado en el laboratorio de J.L. Micol (Hricová *et al.*, 2006), que causa un fenotipo similar al de *anu7-1*. Los mutantes *sca3-1* y *anu7-1* presentan hojas pálidas con márgenes foliares irregulares (Figura 11B, C). Para establecer la existencia de una eventual relación entre *ANU7* y *RPOTp* se cruzaron plantas *anu7-1* y *sca3-1*. El fenotipo vegetativo de los dobles mutantes *anu7-1 sca3-1* resultó ser sinérgico: sus rosetas presentan un tamaño menor y una despigmentación mayor que las de los mutantes simples. Además, destaca la forma aberrante de sus hojas, en las que se observa una disminución del tamaño del limbo con respecto al del peciolo, que también parece ser más corto (Figura 11D). Ambas mutaciones se confirmaron mediante secuenciación en los dobles mutantes (apartado IV.8.4, en la página 23).



**Figura 11.-** Fenotipo sinérgico de los dobles mutantes *anu7-1 sca3-1* y *anu7-1 gun1-1*. Rosetas de las estirpes silvestres (A) *Ler* y (E) *Col-0*, los mutantes simples (B) *anu7-1*, (C) *sca3-1* y (F) *gun1-1* y los dobles mutantes (D) *anu7-1 sca3-1* y (G) *anu7-1 gun1-1*. Las fotografías se tomaron 16 dde. Las barras de escala indican 2 mm. Las puntas de flecha en G señalan sectores despigmentados en las hojas de *anu7-1 gun1-1*.

La interacción genética observada entre *ANU7* y *RPOTp* sugiere que *ANU7* participa en el correcto plegamiento o ensamblaje de las proteínas que componen la maquinaria transcripcional de la PEP y/o en el funcionamiento de dicha maquinaria.

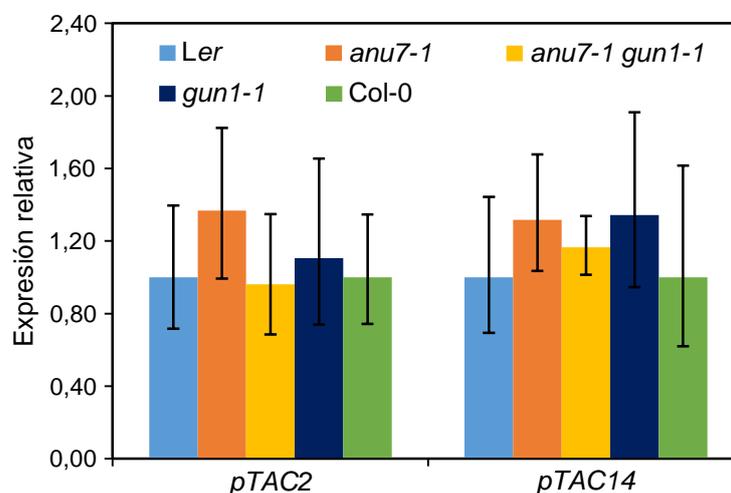
### V.2.2.- Interacción genética entre *ANU7* y *GUN1*

El estudio del transcriptoma del mutante *anu7-1* mediante un análisis de micromatrices, realizado antes del comienzo de este trabajo reveló un aumento en la expresión de ciertos genes nucleares relacionados con la transcripción del plastoma, quizá

debido a una respuesta compensatoria a los defectos en sus cloroplastos (Muñoz-Nortes *et al.*, 2017). Este resultado sugiere la existencia de una señal retrógrada que informa al núcleo de los defectos del cloroplasto en *anu7-1*.

Para estudiar si esta señal retrógrada está mediada por GUN1 se obtuvo el doble mutante *anu7-1 gun1-1* (Muñoz-Nortes *et al.*, 2017). El mutante *gun1-1* tiene alterada la señalización retrógrada (apartado II.2.2, en la página 5; Cottage *et al.*, 2010). Su fenotipo, no obstante, es muy similar al silvestre (Figura 11F, en la página 32). En el doble mutante *anu7-1 gun1-1* se observa un fenotipo sinérgico que consiste en la supresión parcial de las indentaciones características del mutante simple *anu7-1*, formándose un margen foliar más liso. Además, en las hojas *anu7-1 gun1-1* aparecen sectores con distintos grados de despigmentación, que no se observan en ninguno de los mutantes simples parentales (Figura 11G).

Para comprender mejor la relación entre *ANU7* y *GUN1*, intentamos establecer si en el doble mutante *anu7-1 gun1-1* se restablecen, como consecuencia de la alteración de la comunicación entre el cloroplasto y el núcleo, los niveles de expresión silvestres de genes del complejo pTAC que están incrementados en *anu7-1*. Se analizaron mediante RT-qPCR (apartado IV.8.2.3, en la página 22; Figura 12), los niveles de expresión de



**Figura 12.-** Expresión de los genes *pTAC2* y *pTAC14* en *anu7-1*, *gun1-1* y *anu7-1 gun1-1*. Se representa la expresión relativa de los genes nucleares *pTAC2* y *pTAC14* en *Ler* (azul), *anu7-1* (naranja), *anu7-1 gun1-1* (amarillo), *gun1-1* (azul oscuro) y *Col-0* (verde) recolectadas 16 dde. Los datos de expresión de los mutantes simples *anu7-1* y *gun1-1* se han comparado con los de sus tipos silvestres *Ler* y *Col-0*, respectivamente. Los valores de *anu7-1 gun1-1* se compararon con los de *Ler*, pues los niveles de expresión de *pTAC2* y *pTAC14* en los dos tipos silvestres son similares. Las barras de error indican  $2^{-(\Delta\Delta C_T \pm \text{desviación estándar})}$ . Se utilizaron 3 réplicas biológicas y 3 técnicas por genotipo en ambos casos.

*pTAC2* y *pTAC14* (apartado II.2.2, en la página 5) en el doble mutante *anu7-1 gun1-1* y en los mutantes simples *anu7-1* y *gun1-1*. Sin embargo, las diferencias en la expresión de los genes *pTAC2* y *pTAC14* entre los mutantes simples y el doble mutante no fueron significativos. Sería conveniente repetir este experimento más adelante, con una mayor cantidad de material vegetal.

### V.2.3.- Interacción genética de *ANU7* con *pTAC2* y *pTAC5*

Tal como se ha mencionado en el apartado V.2.1, en la página 31, es razonable suponer que *ANU7* participe en el ensamblaje y/o funcionamiento del complejo pTAC o del núcleo de la PEP, en el nucleoide del cloroplasto. La proteína pTAC5 es una DnaJ, como *ANU7* (apartado III, en la página 9), mientras que pTAC2 presenta repeticiones del motivo pentatricopéptido (PPR), y es muy similar a *GUN1* (ambas son ricas en cisteína; Zhong *et al.*, 2013). Por otra parte, *GUN1* coimmunoprecipita con pTAC2 y pTAC5 (Tadini *et al.*, 2016). Dada la actividad ditiol/disulfuro isomerasa que se les supone, al tratarse de proteínas DnaJ, pTAC5 y *ANU7* podrían compartir dianas como pTAC2 y *GUN1*.

Con el fin de estudiar la relación funcional entre *ANU7* y los genes *pTAC2* y *pTAC5*, hicimos una búsqueda de alelos insercionales de estos dos últimos en colecciones de dominio público. Encontramos en la colección SALK (Alonso *et al.*, 2003) dos líneas con inserciones de ADN-T en *pTAC2* y otras dos en *pTAC5*. Tras la recepción y la siembra de las correspondientes semillas, el genotipado de las plantas de estas dos últimas líneas insercionales nos permitió identificar plantas homocigóticas para los alelos mutantes que hemos llamado *ptac5-4* y *ptac5-5*. Sin embargo, no encontramos plantas homocigóticas ni heterocigóticas para los alelos mutantes de *pTAC2*. Esto último puede deberse a que dichos alelos son letales en homocigosis a la vez que existe alguna desventaja del heterocigoto respecto al homocigoto silvestre. Dado que se ha propuesto que pTAC2 es una PAP (Steiner *et al.*, 2011), podría en tal caso ser esencial para la transcripción del genoma del cloroplasto, lo que justificaría la letalidad de sus alelos recesivos de insuficiencia de función. Para la obtención de los dobles mutantes, se realizaron los cruzamientos *anu7-1* × *ptac5-4* y *anu7-1* × *ptac5-5*, cuya descendencia F<sub>2</sub> todavía no está disponible y será estudiada más adelante.

### V.3 .- Obtención del transgén 35S<sub>pro</sub>:GFP:ANU7

Antes del inicio de este trabajo se generó un transgén 35S<sub>pro</sub>:*ANU7*:GFP para determinar la localización subcelular de la proteína *ANU7*. En la proteína de fusión

ANU7:GFP, la GFP quedaba unida al extremo carboxilo de ANU7. A pesar de que las plantas *anu7-1* portadoras del transgén  $35S_{pro}:ANU7:GFP$  presentaron fenotipo silvestre —lo que indica que la proteína de fusión es funcional—, no se detectó la fluorescencia de la GFP (Muñoz-Nortes *et al.*, 2017). Son hipótesis verosímiles que lo explican un plegamiento de la proteína de fusión incompatible con la emisión de fluorescencia por la GFP o el procesamiento postraduccional de esta última. En este Trabajo de Fin de Grado hemos generado una construcción en la que la GFP se encuentra fusionada al extremo amino de ANU7 (apartado IV.9, en la página 25).

Para la obtención del transgén  $35S_{pro}:GFP:ANU7$  se amplificó mediante PCR la región codificante del gen At5g53560 de Col-0 (1.251 pb), utilizando los cebadores ANU7-cds\_F3 y ANU7-cds\_R1, que incluyen en sus extremos 5' los sitios *attB1* y *attB2*, respectivamente (Tabla 3, en la página 21). Los cebadores se diseñaron de manera que el producto de PCR resultante incluyese los codones de inicio y terminación de la traducción del gen ANU7. El producto así obtenido se insertó en el vector de entrada pGEM-T Easy221 (Figura 8A, en la página 27) mediante una reacción BP (apartado IV.9). Se transformaron células DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* con la mezcla de la reacción BP, seleccionando transformantes Amp<sup>R</sup>, en 2 de los cuales se comprobó la integridad estructural de los insertos mediante secuenciación por el método de Sanger (apartado IV.8.4.1, en la página 23). Se subclonaron los insertos de 2 transformantes en el vector de destino pMDC45 (Figura 8B) mediante una reacción LR (apartado IV.9). Para la correcta traducción de la proteína GFP:ANU7, la unidad de transcripción de la GFP que contiene el vector pMDC45 carece de codón de terminación. Se comprobaron el tamaño, la secuencia y la fase de los insertos de los clones de expresión obtenidos, mediante PCR y secuenciación por el método de Sanger.

Tras la finalización de este trabajo, el producto de la reacción LR se usó para transformar células C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens*, que fueron seleccionados en medio LB suplementado con kanamicina. Se obtuvieron así colonias portadoras del transgén  $35S_{pro}:GFP:ANU7$ , que se utilizaron para transformar plantas Ler. Tras la recolección de las semillas T<sub>1</sub>, se sembraron en medio suplementado con higromicina. Las plantas Hig<sup>R</sup> no mostraron fluorescencia alguna tras su observación en el microscopio. Será necesario comprobar más adelante si en plantas T<sub>2</sub> portadoras de este transgén se consigue visualizar la fluorescencia de la proteína de fusión GFP:ANU7. Adicionalmente, se transformarán plantas *anu7-1* en las que se podrá comprobar si se restablece el fenotipo silvestre y por tanto si el transgén es funcional.

## **VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA**

## VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

En este Trabajo de Fin de Grado hemos contribuido a la caracterización fenotípica de los mutantes *anu7-1* y *anu7-2*, portadores de alelos de insuficiencia de función del gen *ANU7* (*EMB2737*). *anu7-1* es hipomorfo y viable en las condiciones de cultivo habituales, mientras que *anu7-2* es nulo y requiere un carbohidrato metabolizable para sobrevivir, como la sacarosa. Estos mutantes son más pequeños que sus correspondientes tipos silvestres y presentan hojas dentadas y pálidas (*anu7-1*) o albinas (*anu7-2*).

El fenotipo morfológico de los mutantes *anu7-1* y *anu7-2* sugiere que su fotosíntesis está alterada. Para confirmar esta hipótesis, se determinó el contenido en pigmentos fotosintéticos de ambos mutantes, que resultó ser inferior al silvestre. También se estudió mediante microscopía electrónica de transmisión la ultraestructura de los cloroplastos de *anu7-1*, que manifestaron desapilamientos locales de sus tilacoides.

Hemos diseñado y construido el transgén  $35S_{pro}:GFP:ANU7$ , que se empleará más adelante para estudiar la localización subcelular de ANU7. La proteína de fusión GFP:ANU7, en la que la GFP está unida al extremo amino de ANU7, es una alternativa a la previamente obtenida, ANU7:GFP, que conservaba la función silvestre de ANU7 pero no emitió fluorescencia alguna.

Hemos combinado *anu7-1* con *sca3-1*, un alelo del gen nuclear *RPOTp*, que codifica una de las polimerasas de ARN que transcriben los genes del cloroplasto. El fenotipo del doble mutante *anu7-1 sca3-1* es sinérgico y sugiere la implicación de la proteína ANU7 en la transcripción del plastoma. También hemos obtenido el doble mutante *anu7-1 gun1-1*, cuyo fenotipo también es sinérgico. Dado que la proteína GUN1 está implicada en la señalización retrógrada del cloroplasto al núcleo, el fenotipo del doble mutante *anu7-1 gun1-1* sugiere que la sobreexpresión de genes nucleares en el mutante simple *anu7-1* se debe a la señalización retrógrada mediada por GUN1, que informa al núcleo de la disfunción del cloroplasto y desencadena una respuesta compensatoria para minimizarla.

Debido a la sobreexpresión en *anu7-1* de proteínas del complejo pTAC, nos propusimos estudiar la eventual relación entre ANU7 y los genes *pTAC2* y *pTAC5*, por su similitud con los genes *GUN1* y *ANU7*, respectivamente. Dado que *pTAC5* codifica una proteína DnaJ, seleccionamos dos líneas insercionales portadoras de alelos del gen *pTAC5*, que fueron cruzadas por *anu7-1*. La obtención de dobles mutantes *anu7-1 ptac5* en la progenie F<sub>2</sub> de estos cruzamientos permitirá obtener información acerca de la relación funcional entre ANU7 y *pTAC5*.

## **VI.- BIBLIOGRAFÍA**

## VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera Díaz, V. (2009). Búsqueda de modificadores del fenotipo morfológico de un mutante *argonaute1* viable. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., y Ecker, J.R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Allorent, G., y Petroustos, D. (2017). Photoreceptor-dependent regulation of photoprotection. *Current Opinion in Plant Biology* **37**, 102-108.
- Barajas-López, J.d.D., Blanco, N.E., y Strand, A. (2013). Plastid-to-nucleus communication, signals controlling the running of the plant cell. *Biochimica et Biophysica Acta* **1833**, 425-437.
- Bastien, O., Botella, C., Chevalier, F., Block, M.A., Jouhet, J., Breton, C., Girard-Egrot, A., y Maréchal, E. (2016). New insights on thylakoid biogenesis in plant cells. *International Review of Cell and Molecular Biology* **323**, 1-30.
- Berná Amorós, G. (1997). Disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*: aislamiento y caracterización de mutantes inducidos mediante metanosulfonato de etilo. Tesis doctoral. Universidad de Alicante.
- Berná, G., Robles, P., y Micol, J.L. (1999). A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **152**, 729-742.
- Börner, T., Aleynikova, A.Y., Zubo, Y.O., y Kusnetsov, V.V. (2015). Chloroplast RNA polymerases: Role in chloroplast biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1847**, 761-769.
- Bushman, W., Thompson, J.F., Vargas, L., y Landy, A. (1985). Control of directionality in lambda site specific recombination. *Science* **230**, 906-911.
- Candela Antón, H. (2001). Análisis genético de la formación del patrón de venación de la hoja en *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Casanova Sáez, R. (2014). Contribución de los genes *ANGULATA10* y *APICULATA2* a la morfogénesis foliar en *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Cottage, A., Mott, E.K., Kempster, J.A., y Gray, J.C. (2010). The *Arabidopsis* plastid-signalling mutant *gun1* (*genomes uncoupled1*) shows altered sensitivity to sucrose and abscisic acid and alterations in early seedling development. *Journal of Experimental Botany* **61**, 3773-3786.
- Curtis, M.D., y Grossniklaus, U. (2003). A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in plants. *Plant Physiology* **133**, 462-469.
- de Crouy-Chanel, A., Kohiyama, M., y Richarme, G. (1995). A novel function of *Escherichia coli* chaperone DnaJ. Protein-disulfide isomerase. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 22669-22672.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B. (1983). A plant miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **4**, 19-21.
- Ferrández Ayela, A. (2012). Caracterización genética y molecular de los mutantes *transcurvata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Finster, S., Eggert, E., Zoschke, R., Weihe, A., y Schmitz-Linneweber, C. (2013). Light-dependent, plastome-wide association of the plastid-encoded RNA polymerase with chloroplast DNA. *Plant Journal* **76**, 849-860.
- Hricová, A., Quesada, V., y Micol, J.L. (2006). The *SCABRA3* nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **141**, 942-956.

- Hsu, C.M., Chen, C.Y., y Liu, B.J. (2011). WildSpan: mining structured motifs from protein sequences. *Algorithms for Molecular Biology* **6**, 6.
- Huang, M., Friso, G., Nishimura, K., Qu, X., Olinares, P.D., Majeran, W., Sun, Q., y van Wijk, K.J. (2013). Construction of plastid reference proteomes for maize and *Arabidopsis* and evaluation of their orthologous relationships; the concept of orthoproteomics. *Journal of Proteome Research* **12**, 491-504.
- Jarvis, P., y López-Juez, E. (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**, 787-802.
- Jensen, P.E., y Leister, D. (2014). Chloroplast evolution, structure and functions. *F1000Prime Reports* **6**, 6-40.
- Kampinga, H.H., y Craig, E.A. (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 579-592.
- Kleine, T., Voigt, C., y Leister, D. (2009). Plastid signalling to the nucleus: messengers still lost in the mists? *Trends in Genetics* **25**, 185-192.
- Kleine, T., y Leister, D. (2016). Retrograde signaling: Organelles go networking. *Biochimica et Biophysica Acta* **1857**, 1313-1325.
- Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1987). Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service* **24**.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry* **58**, 913-949.
- Livak, K.J., y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* **25**, 402-408.
- López-Juez, E., y Pyke, K.A. (2004). Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *International Journal of Developmental Biology* **49**, 557-577.
- McDowell, E.M., y Trump, B.F. (1976). Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* **100**, 405-414.
- Meinke, D., y Koornneef, M. (1997). Community standards for *Arabidopsis* genetics. *Plant Journal* **12**, 247-253.
- Meinke, D., Muralla, R., Sweeney, C., y Dickerman, A. (2008). Identifying essential genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science* **13**, 483-491.
- 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**, 679-682.
- Meyerowitz, E.M. (1987). *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Genetics* **21**, 93-111.
- Micol, J.L. (2009). Leaf development: time to turn over a new leaf? *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 9-16.
- Micol, J.L. (2016). La heterosis, esa importante desconocida. *Revista de la SEBBM* **188**, 13-16.
- Micol Ponce, R. (2011). Aislamiento y caracterización de nuevas mutaciones supresoras del fenotipo de *argonaute1-52*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández.
- Micol Ponce, R. (2017). Análisis de la contribución de los genes *MAS2*, *SMO4* y *RRP7* al metabolismo del ARN ribosómico en *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Mochizuki, N., Brusslan, J.A., Larkin, R., Nagatani, A., y Chory, J. (2001). *Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5)* mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**, 2053-2058.
- Mollá Morales, A. (2011). Caracterización genética y molecular de los mutantes *venosa* y *denticulata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Muñoz-Nortes, T., Pérez-Pérez, J.M., Ponce, M.R., Candela, H., y Micol, J.L. (2017). The *ANGULATA7* gene encodes a DnaJ-like zinc finger-domain protein involved in chloroplast function and leaf development in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **89**, 870-884.

- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Navarro Quiles, C. (2015). Obtención de transgenes para el análisis funcional de los genes *DEN3*, *DEN7* y *DEN9* en *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Ohtsuka, K., y Hata, M. (2000). Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40-a review. *International Journal of Hyperthermia* **16**, 231-245.
- Pérez Pérez, J.M. (2003). Caracterización genética y molecular de los mutantes *ultracurvata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Pfannschmidt, T. (2010). Plastidial retrograde signalling - a true "plastid factor" or just metabolite signatures? *Trends in Plant Science* **15**, 427-435.
- Pogson, B.J., y Albrecht, V. (2011). Genetic dissection of chloroplast biogenesis and development: an overview. *Plant Physiology* **155**, 1545-1551.
- Ponce Molet, M.R. (1996). Aislamiento y caracterización molecular de genes de la superfamilia del TGF- $\beta$  que se expresan en el embrión de *Strongylocentrotus purpuratus*. Tesis doctoral. Universidad de Alicante.
- Provart, N.J., Alonso, J., Assmann, S.M., Bergmann, D., Brady, S.M., Brkljacic, J., Browse, J., Chapple, C., Colot, V., Cutler, S., Dangel, J., Ehrhardt, D., Friesner, J.D., Frommer, W.B., Grotewold, E., Meyerowitz, E., Nemhauser, J., Nordborg, M., Pikaard, C., Shanklin, J., Somerville, C., Stitt, M., Torii, K.U., Waese, J., Wagner, D., y McCourt, P. (2016). 50 years of *Arabidopsis* research: highlights and future directions. *New Phytologist* **209**, 921-944.
- Quesada Pérez, V.M. (1999). Aislamiento y caracterización molecular de mutantes halotolerantes en *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Quesada, V., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (1999). *OTC* and *AUL1*, two convergent and overlapping genes in the nuclear genome of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **461**, 101-106.
- Robles Ramos, P. (1999). Análisis genético de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología de la hoja. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Rodríguez, R.E., Debernardi, J.M., y Palatnik, J.F. (2014). Morphogenesis of simple leaves: regulation of leaf size and shape. *Wiley Interdisciplinary Reviews Developmental Biology* **3**, 41-57.
- Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **74**, 5463-5467.
- Serrano Cartagena, J. (1998). Disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*: estudio de ecotipos y estirpes mutantes de la colección del *Arabidopsis* Information Service. Tesis doctoral. Universidad de Alicante.
- Steiner, S., Schroter, Y., Pfalz, J., y Pfannschmidt, T. (2011). Identification of essential subunits in the plastid-encoded RNA polymerase complex reveals building blocks for proper plastid development. *Plant Physiology* **157**, 1043-1055.
- Sterrenberg, J.N., Blatch, G.L., y Edkins, A.L. (2011). Human DNAJ in cancer and stem cells. *Cancer Letters* **312**, 129-142.
- Strand, A., Asami, T., Alonso, J., Ecker, J.R., y Chory, J. (2003). Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature* **421**, 79-83.
- Suggs, S.V., Wallace, R.B., Hirose, T., Kawashima, E.H., y Itakura, K. (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **78**, 6613-6617.
- Tadini, L., Pesaresi, P., Kleine, T., Rossi, F., Guljamow, A., Sommer, F., Muhlhaus, T., Schroda, M., Masiero, S., Pribil, M., Rothbart, M., Hedtke, B., Grimm, B., y Leister, D. (2016). GUN1 controls accumulation of the plastid ribosomal protein S1 at the protein level and interacts with proteins involved in plastid protein homeostasis. *Plant Physiology* **170**, 1817-1830.

- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Vinti, G., Hills, A., Campbell, S., Bowyer, J.R., Mochizuki, N., Chory, J., y Lopez-Juez, E. (2000). Interactions between *hyl* and *gun* mutants of *Arabidopsis*, and their implications for plastid/nuclear signalling. *Plant Journal* **24**, 883-894.
- Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* **144**, 307-313.
- Woodson, J.D., Pérez-Ruiz, J.M., y Chory, J. (2011). Heme synthesis by plastid ferrochelatase I regulates nuclear gene expression in plants. *Current Biology* **21**, 897-903.
- Yagi, Y., y Shiina, T. (2014). Recent advances in the study of chloroplast gene expression and its evolution. *Frontiers in Plant Science* **5**, 61.
- Yu, Q.B., Huang, C., y Yang, Z.N. (2014). Nuclear-encoded factors associated with the chloroplast transcription machinery of higher plants. *Frontiers in Plant Science* **5**, 316.
- Zhong, L., Zhou, W., Wang, H., Ding, S., Lu, Q., Wen, X., Peng, L., Zhang, L., y Lu, C. (2013). Chloroplast small heat shock protein HSP21 interacts with plastid nucleoid protein pTAC5 and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis* under heat stress. *Plant Cell* **25**, 2925-2943.
- Zybailov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q., y van Wijk, K.J. (2008). Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS One* **3**, e1994.