



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Caracterización de un alelo mutante por inserción de T-DNA en el gen *U1-70K de Arabidopsis thaliana*

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Diciembre 2018

Autor: Belén Pérez Espinosa

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Dr. Antonio Martínez Laborda

Dra. Encarnación Rodríguez Cazorla

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a Antonio Martínez, por haber hecho posible la realización de este TFG. Además de agradecer su conocimiento y consejos, su incondicional apoyo y sobre todo, el enorme esfuerzo que ha dedicado para que este trabajo saliera de manera exitosa.

A Encarni, por su inestimable ayuda y enseñanza, sin las cuales hubiera sido muy difícil la realización de este trabajo. Ante todas las dificultades que se han presentado, siempre ha estado dispuesta a dedicarme su tiempo y su conocimiento.

A Antonio Vera, por su contribución en la propuesta y realización de mi TFG, y por su disponibilidad y comprensión para cualquier cuestión.

A Antonio Martínez, a Encarni y a Antonio Vera conjuntamente, muchas gracias a los tres por vuestra dedicación, me habéis brindado todas las herramientas necesarias para completar mi trabajo de fin de grado satisfactoriamente. Ha sido un placer trabajar con vosotros.

A Paula, por acompañarme día tras día y por haberme dado todo su apoyo. Siempre ha estado ahí cuando la he necesitado.

Gracias también al resto de personas que han trabajado en el laboratorio: a Samanta, por sus consejos y a Lola, por su colaboración.

Y a toda mi familia, en especial a mis abuelos, a mi madre y a mi hermano. Han sido un apoyo constante, y me lo han dado todo y siguen ayudándome y apoyándome cada día.

Índice

1. Resumen.....	5
2. Antecedentes	6
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo	6
2.2. Genes de actividad HUA-PEP	6
2.3. Eliminación de intrones (<i>splicing</i>)	9
2.4. <i>Telescripting</i>	10
3. Introducción y objetivos	13
4. Materiales y métodos	15
4.1. Organismos utilizados	15
4.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
4.2. Medios de cultivo	16
4.2.1. Medio de germinación de <i>Arabidopsis</i> (Medio GM)	16
4.2.2. Medio mínimo ATM (<i>Arabidopsis thaliana</i> Medium)	16
4.2.3. Sustrato para el cultivo de <i>Arabidopsis</i> en maceta	16
4.3. Disoluciones y tampones	16
4.3.1. Antibióticos	16
4.3.2. Tampón de extracción de DNA.....	17
4.3.3. Disoluciones utilizadas en electroforesis en geles de agarosa.....	17
4.4. Obtención y manipulación de ácidos nucleicos	17
4.4.1. Aislamiento de DNA genómico de <i>Arabidopsis</i>	17
4.4.2. Aislamiento de RNA total de <i>Arabidopsis</i>	17
4.4.3. Análisis cuantitativo y cualitativo del RNA total aislado	18
4.4.4. Electroforesis en gel de agarosa	18
4.5. Realización de cruzamientos	19
4.6. Síntesis de ácidos nucleicos	19

4.6.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	19
4.6.2.	PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	19
4.7.	Genotipados de las estirpes mutantes	20
4.8.	Estudio de las características morfológicas e histológicas.....	20
4.8.1.	Microscopía óptica.....	20
4.8.2.	Microscopia electrónica de barrido (SEM)	20
4.8.3.	Tinción con solución de Alexander	21
4.9.	Análisis estadístico.....	21
4.9.1.	Análisis estadístico de los experimentos de qPCR.....	21
4.10.	Oligonucleótidos utilizados.....	21
5.	Resultados y discusión.....	22
5.1.	Genotipado molecular	22
5.1.1.	Diseño del genotipado molecular.....	22
5.1.1.	Genotipado molecular de la línea GK-213B07	24
5.2.	Estudio de la descendencia de plantas heterocigotas.....	25
5.3.	Cruzamientos del heterocigoto por Col-0. Obtención de plantas F ₁	30
5.4.	Estudio de la descendencia de las plantas F ₁ heterocigotas	32
5.5.	Estudio de la floración	33
5.6.	Análisis de la expresión mediante qPCR	34
6.	Conclusiones	36
7.	Bibliografía	37

1. RESUMEN

Los organismos modelo facilitan el estudio de fenómenos biológicos y la obtención de resultados y conclusiones extrapolables a otras especies. El principal organismo modelo en las plantas es *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis).

La actividad HUA-PEP de Arabidopsis impide la terminación y poliadenilación prematuras en intrones grandes, un fenómeno similar al descrito en animales con el nombre de *telescripting*, del que es responsable la snRNP U1, conocida previamente por su función en el reconocimiento del sitio 5' de *splicing*. En un intento de comprobar si la snRNP U1 también está implicada en el fenómeno observado en las plantas, se plantea inicialmente la caracterización genética del gen *U1-70K* de Arabidopsis, que codifica la proteína de 70 kDa, esencial para la función de la snRNP U1.

Se ha analizado una línea de Arabidopsis con una posible inserción de T-DNA en el gen, determinándose que esta línea contiene una única inserción localizada en el sexto intrón, muy probablemente inactivando completamente la función. La mutación tiene un comportamiento letal y presenta baja transmisión a través del gametofito femenino, indicativo de que la ausencia de la proteína muy probablemente también resulta letal durante la fase haploide.

El alelo mutante se comporta completamente como recesivo, no observándose ningún fenotipo mutante en el heterocigoto, ni siquiera sutiles fenotipos alterados en el tiempo de floración, como sí ocurre en los mutantes simples para la actividad HUA-PEP. También se determinó la expresión relativa del gen, observándose que el heterocigoto tiene niveles de expresión comparables a los del homocigoto silvestre, lo que sugiere que el gen *U1-70K* está sometido a mecanismos de regulación muy estrictos para que sus niveles de expresión sean similares en las dos copias funcionales del homocigoto silvestre en relación con la única copia del heterocigoto.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo

Los organismos modelo son seres vivos ampliamente estudiados que poseen una serie de características que los hacen ideales para obtener conocimientos sobre otros organismos sin necesidad de utilizar a estos últimos. Esto es posible gracias a la relación evolutiva que comparten. En el caso de las plantas, *Arabidopsis thaliana* es el modelo más utilizado por la comunidad científica y el que se emplea en este trabajo de fin de grado.

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. (*Arabidopsis*) es una crucífera o brasicácea, adoptada originalmente como sistema modelo por su sencillez para la experimentación genética, debido a su corto tiempo de generación, pequeño tamaño y una prolífica producción de semillas mediante autopolinización ^{1,2}. Además, posee relativa simplicidad de su genoma ^{3,4}, facilidad de transformación ⁵, así como numerosos recursos tanto de estirpes y clones, como moleculares, técnicos o bioinformáticos disponibles para la comunidad investigadora, lo que la convierte en la especie vegetal más estudiada ².

2.2. Genes de actividad HUA-PEP

La actividad HUA-PEP comprende un conjunto de proteínas con dominios de unión a RNA codificadas por los genes *HUA1*, *HUA2*, *HUA ENHANCER 4* (*HEN4*), *FLOWERING LOCUS WITH KH DOMAINS* (*FLK*) y *PEPPER* (*PEP*). *HUA1* determina un producto proteico con dedo de zinc nuclear de tipo CCCH ⁶; *HUA2* una proteína con el dominio RPR (regulación del pre-mRNA nuclear) ⁷, y los genes *HEN4*, *FLK* y *PEP* proteínas con dominio KH (K-homología) ⁸⁻¹¹. Estos cinco genes participan en programas de desarrollo vitales para la reproducción de las plantas, como son el control del tiempo de floración y de la morfogénesis de las flores ⁸⁻¹³. Además, intervienen en la regulación del desarrollo y la identidad de los óvulos ¹⁴.

Los mutantes de pérdida de función en uno solo de los genes de la actividad HUA-PEP son esencialmente indistinguibles de las plantas silvestres, salvo por alteraciones sutiles en el tiempo de floración ⁹⁻¹¹. Por el contrario, las combinaciones mutantes *hua-pep* de orden superior, dobles y triples mutantes,

presentan defectos en la identidad de los órganos florales y los óvulos, así como en la determinación de los meristemos ^{8,12,14}. Se ha demostrado que estos mutantes múltiples *hua-pep* acumulan transcritos de *AGAMOUS* (*AG*) aberrantes y no funcionales que son poliadenilados prematuramente en el segundo intrón, de gran tamaño, a expensas del mRNA funcional de *AG* ¹².

El gen *AG* codifica un factor de transcripción con dominio MADS (MADS-box) implicado en la identidad de los órganos florales de los verticilos tercero (estambres) y cuarto (carpelos). Por ello, la disminución en la función de este gen da lugar a fallos en la identidad de los órganos, provocando que los estambres se conviertan hacia pétalos y los carpelos hacia sépalos. Otra de las funciones del gen *AG* es lograr la determinación del meristemo floral, es decir, cuando se han producido los órganos en todos los verticilos, se acaba la actividad del meristemo y dejan de producirse más órganos. Como consecuencia, los mutantes fuertes *ag* poseen un meristemo indeterminado y siguen produciendo órganos florales, generando una reiteración de verticilos alternos de sépalos y pétalos, conocido como el fenotipo “flor dentro de flor”, que también puede observarse en los mutantes múltiples que presentan la actividad HUA-PEP seriamente afectada (Figura 1) ^{12,15}.



Figura 1.- Morfogénesis floral alterada en los mutantes múltiples *hua-pep*. A-D) Flores *hua1 hua2 35S::PEP*. E) Flor *hen4 hua1 35S::PEP*. F) Flor *ag*. Todas las flores muestran estambres transformados hacia pétalos, pistilos convertidos total o parcialmente en sépalos y el fenotipo de flor dentro de flor ¹².

Por otro lado, *AG* participa en la identidad de óvulo junto a otros tres genes, parálogos muy cercanos a éste y que, por tanto, también codifican factores de transcripción con MADS-box, los genes *SHATTERPROOF1* (*SHP1*), *SHP2* y *SEEDSTICK* (*STK*), que forman un grupo monofilético con *AG*¹⁶ y, en ausencia de éste, proporcionan identidad carpelar en ciertos contextos genéticos^{17,18}. Los tres genes, al igual que *AG*, tienen un intrón grande susceptible a la terminación prematura por corte y poliadenilación aberrante. La actividad HUA-PEP tendría como función la protección de sitios críticos de terminación de la transcripción para evitar el corte y la poliadenilación aberrantes en los intrones grandes de estos genes (Figura 2)^{12,14}.

FLOWERING LOCUS C (*FLC*) también es un gen con MADS-box relacionado estructuralmente con *AG*. Su producto proteico es un potente supresor de la floración y su sobreexpresión está asociada con un retraso en la floración mediante la represión de la expresión de los activadores florales. Este gen también posee un intrón de gran tamaño y está regulado por la actividad HUA-PEP^{13,19}.

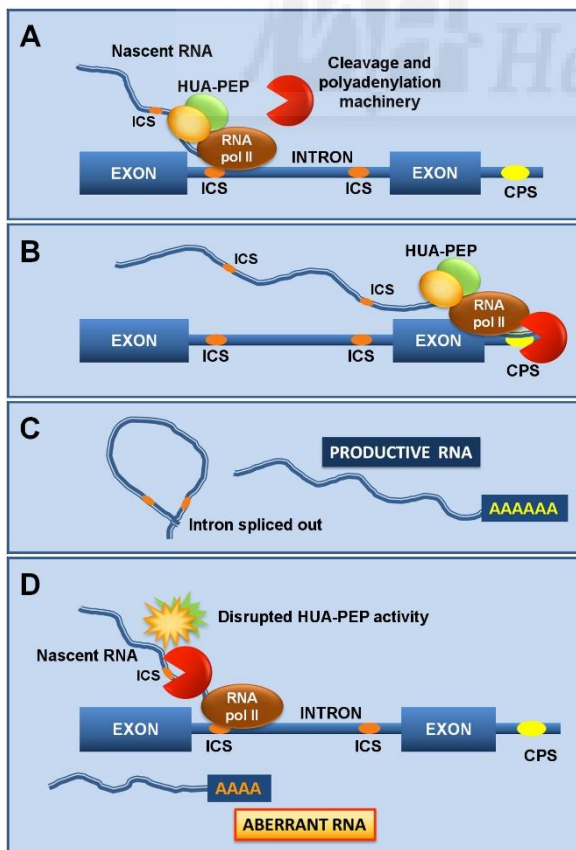


Figura 2.- La actividad HUA-PEP facilita el procesamiento de los pre-mRNA de los genes diana. A) A medida que progresa la actividad de la polimerasa de RNA (RNA pol II), el complejo HUA-PEP recubre el transcrito nascente, con lo que secuestra los sitios críticos intrónicos (ICS) de corte y poliadenilación, y evita que se produzca la terminación prematura del transcrito. B) El complejo de elongación alcanza el sitio terminal distal de corte y poliadenilación (CPS), donde se produce la terminación correcta. C) Tiene lugar la escisión del intrón y la maduración 3' correctas, dando lugar al mRNA maduro. D) Por el contrario, una actividad de HUA-PEP alterada no impide que la maquinaria de procesamiento 3' del RNA acceda a motivos críticos en el transcrito en elongación, produciendo de ese modo un RNA aberrante terminado prematuramente¹².

2.3. Eliminación de intrones (*splicing*)

La mayoría de los genes eucarióticos están interrumpidos, presentando secuencias llamadas exones que están separadas unas de otras por secuencias denominadas intrones. Cada uno de estos genes se transcribe para dar un transcrito primario, o pre-mRNA, que contiene intrones y exones. Los intrones se eliminan del pre-mRNA mediante el mecanismo de eliminación de intrones (*splicing*) para generar un mRNA maduro en el que se conservan únicamente los exones.

La separación entre los intrones y los exones viene determinada por secuencias específicas de nucleótidos en el pre-mRNA, que delimitan dónde se producirá el *splicing*. Los límites exón-intrón en los extremos 5' y 3' del intrón están marcados por los sitios de empalme 5' y 3', respectivamente. Para la eliminación del intrón se necesita también un elemento de secuencia adicional, llamado sitio de ramificación, cerca de su extremo 3'.

El corte y empalme característico del *splicing* consiste en dos reacciones de transesterificación sucesivas en las que se rompen enlaces fosfodiéster en el pre-mRNA y se forman otros nuevos. Como consecuencia, se fusionan los extremos 3' y 5' de dos exones consecutivos y el intrón situado entre ambos se libera en una estructura con forma de lazo. Las reacciones de transesterificación están mediadas por el espliceosoma, un complejo molecular de gran tamaño en el que participan 5 ribonucleoproteínas (RNP) que toman su nombre de los RNA nucleares pequeños (snRNA) que contiene cada una de ellas. Así, el espliceosoma más abundante presenta las snRNP U1, U2, U4, U5 y U6, además de otras proteínas colaboradoras, con la actividad catalítica residiendo principalmente en el componente de RNA.

La snRNP U1 reconoce el sitio de empalme 5' en el pre-mRNA mediante interacción por emparejamiento entre secuencias complementarias de nucleótidos, mientras que la snRNP U2 reconoce el sitio de ramificación. A continuación, se unen las snRNP U4 y U6, junto con la U5. Tras la salida del complejo de las snRNP U1 y U4, las snRNP U2 y U6 interaccionan mediante emparejamiento entre secuencias complementarias de los dos snRNA, dando

lugar a la formación del centro activo. Una vez formado éste, se produce la primera reacción de transesterificación entre el sitio de ramificación y el sitio de empalme 5'. A la segunda reacción, entre los sitios de empalme 5' y 3', contribuye la snRNP U5 que favorece el acercamiento de los dos exones (Figura 3) ²⁰.

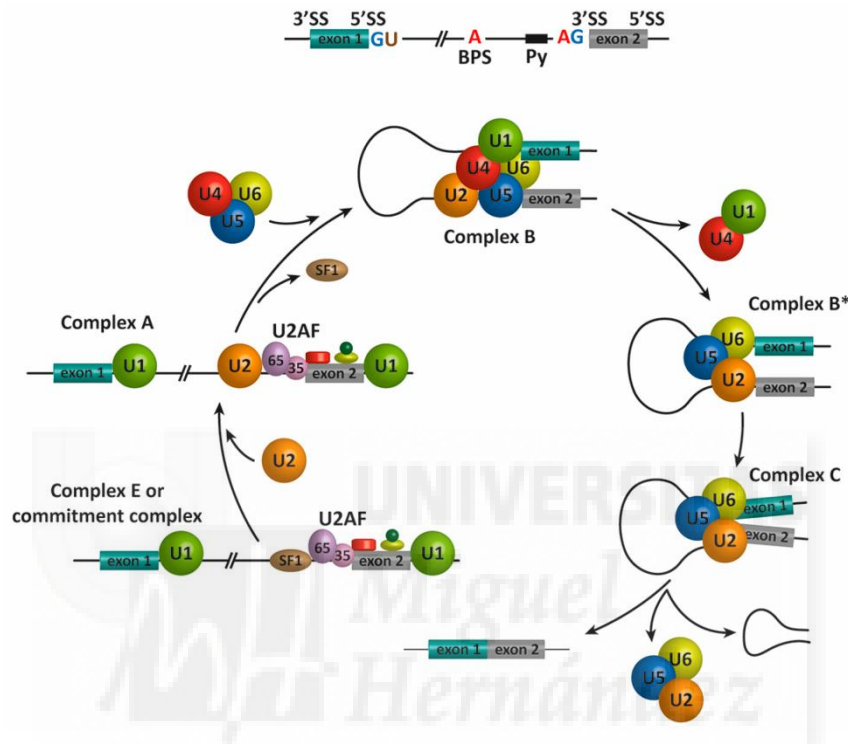


Figura 3.- Ensamblaje del espliceosoma y *splicing* del pre-mRNA. En el primer paso, la snRNP U1 se une al sitio de empalme 5', el factor de *splicing* 1 (SF1) al sitio de ramificación y el factor U2AF al sitio de empalme 3', formando el complejo E. La salida de SF1 y la unión de la snRNP U2 al sitio de ramificación da como resultado el complejo pre-espliceosoma A. En los siguientes pasos, se unen las snRNP U4, U5 y U6, dando lugar al complejo B. El complejo C se ensambla después de reordenamientos que separan las snRNP U1 y U4. Este complejo, que contiene únicamente las snRNP U2, U5 y U6, es responsable de las reacciones de transesterificación. Se producen reordenamientos adicionales en la escisión del intrón y la ligación de los exones. Las snRNPs U2, U5 y U6 se liberan del complejo y se reciclan.

2.4. *Telescripting*

Los mecanismos de *splicing* y de corte y poliadenilación en el 3', junto a la formación de la caperuza 5', son procesos de maduración necesarios para la formación de los mRNA a partir de sus precursores inmaduros. Aunque estos mecanismos se han estudiado como vías bioquímicas independientes, en

realidad, tienen lugar cotranscripcionalmente, es decir, al mismo tiempo que la transcripción, y en estrecha proximidad tanto espacial como temporal, de manera que actúan de forma coordinada en la producción de los transcritos.

Se ha observado que el snRNA U1, que participa en el reconocimiento del sitio de empalme 5' durante la eliminación del intrón, está presente en las células en cantidades mayores a las necesarias únicamente para el *splicing*²¹ y, además, la snRNP U1 es la única partícula ribonucleica de *splicing* que aparece también asociada a genes sin intrones²². Estas observaciones apuntan hacia la existencia de funciones de la snRNP U1 no asociadas a *splicing*.

Durante la presente década, se ha descubierto que el snRNA U1 regula la longitud de los transcritos mediante la inhibición de corte y poliadenilación prematuros a partir de señales de poliadenilación crípticas localizadas preferentemente en intrones de gran tamaño. El proceso, que ha recibido el nombre de *telescripting* tras su estudio en varios organismos animales, incluida nuestra especie, implica la unión del snRNA U1 al sitio de empalme 5' para la protección de los transcritos al corte y poliadenilación en sitios de poliadenilación internos (Figura 4)²³⁻²⁶. Esta función independiente de *splicing* de la snRNP U1, descrita en organismos animales, plantea una atractiva conexión con el mecanismo de la actividad HUA-PEP en la inhibición del corte y poliadenilación prematuros en grandes intrones de varios genes de *Arabidopsis*^{12,14} (2.2).

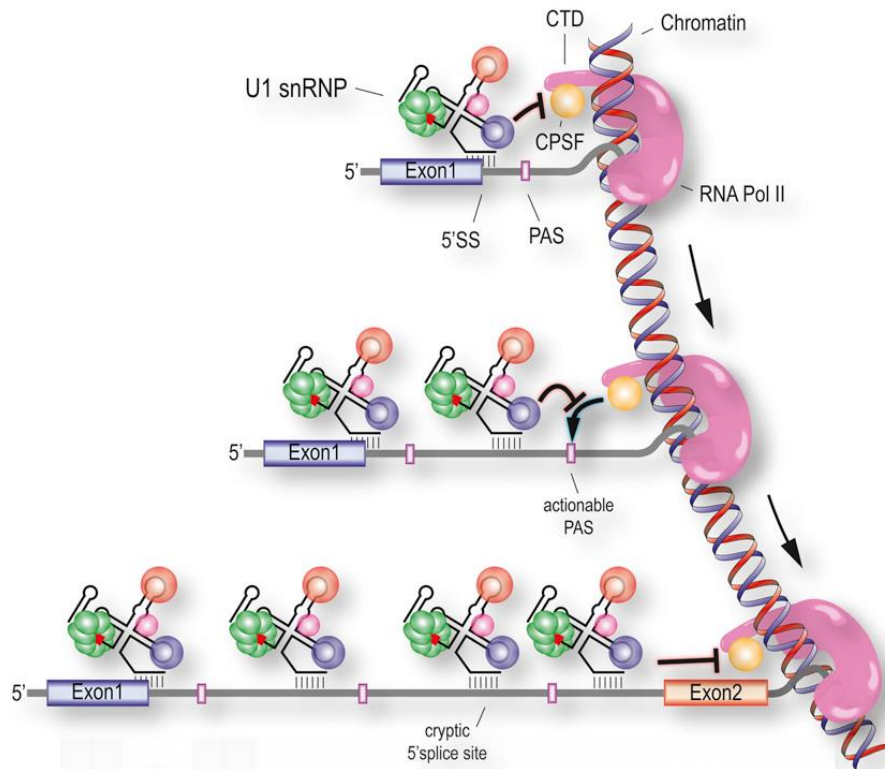


Figura 4.- Modelo de la terminación prematura por escisión y poliadenilación (PCPA) cotranscripcional y su supresión por U1. Los factores de escisión y poliadenilación (CPSF) se asocian con el ciclo de elongación de la transcripción de la RNA polimerasa II (RNA Pol II) y, por lo tanto, están preparados para la escisión del extremo 3' y la poliadenilación, pero también pueden causar una terminación prematura en señales de poliadenilación (PAS) crípticas presentes en los pre-mRNA. U1 es incorporado en las transcripciones nacientes mediante múltiples interacciones, incluido el emparejamiento de bases de su extremo 5' con secuencias de pre-mRNA complementarias (sitios de empalme 5' al inicio del intrón y sitios crípticos de empalme 5' en el interior del intrón) y puede suprimir PCPA mediante la inhibición de los CPSF asociados a la RNA pol II. La escasez de U1 aumenta la probabilidad de que las PAS distales queden desprotegidas.

3. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El fenómeno de *telescripting*, descrito en los metazoos, y la protección frente a corte y poliadenilación prematuros que realiza la actividad HUA-PEP en *Arabidopsis* presentan similitudes evidentes. Es razonable, por tanto, que dada la conservación de los mecanismos moleculares básicos, como el *splicing*, en los eucariotas, ambos procesos pudieran estar interviniendo tanto en los animales como en las plantas para evitar la formación de mRNA aberrantes por corte y poliadenilación prematuros. Para estudiar esta posibilidad en *Arabidopsis*, nos planteamos el aislamiento de mutaciones de pérdida de función en genes que codifican proteínas esenciales de la snRNP U1, implicada en el *telescripting* animal, para que, con posterioridad, se pueda realizar un análisis genético de las posibles interacciones entre estos alelos mutantes y los ya disponibles en los genes de la actividad HUA-PEP.

La snRNP U1, implicada en el reconocimiento del sitio de empalme 5' en *splicing* y *telescripting*, contiene el snRNA U1, cuya secuencia es complementaria a la de dicho sitio de *splicing* 5', así como proteínas compartidas con otras snRNP y tres proteínas específicas. Entre estas últimas, la U1-70kDa es fundamental para el *splicing*, ya que su interacción *in vitro* con otras proteínas desempeña una función esencial en el reconocimiento y unión de la snRNP U1 al sitio de empalme 5' ²⁷. Consistente con la idea de que la proteína U1-70kDa desempeña un papel crucial en el *splicing*, mutaciones nulas en el gen de *Drosophila melanogaster* resultan en letalidad embrionaria cuando están en homocigosis ²⁸, experimentos de interferencia de RNA encaminados a la drástica reducción de los niveles de la proteína demuestran que U1-70kDa es imprescindible para la viabilidad en *Caenorhabditis elegans* ²⁹ y la expresión de una construcción antisentido en *Arabidopsis* con un promotor específico de pétalos y estambres suprime el correcto desarrollo de estos órganos ³⁰.

Un mutágeno muy utilizado en *Arabidopsis* es el T-DNA, un segmento del plásmido Ti de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, que se transfiere a la planta produciendo mutaciones por inserción. El grupo de investigación del

área de Genética en el campus de Sant Joan d'Alacant dispone de una línea de Arabidopsis, la GK-213B07, obtenida de la colección de inserciones de T-DNA del GABI-Kat (Universidad de Bielefeld, Alemania), que aparentemente contiene la inserción de un T-DNA modificado, que confiere resistencia al antibiótico sulfadiazina, interrumpiendo el gen que codifica la proteína U1-70kDa de Arabidopsis ³¹.

Se plantea como objetivo principal la caracterización de la línea GK-213B07, lo que incluye:

- La elaboración de un genotipado molecular para la identificación de la inserción en el gen.
- La determinación del número de inserciones de T-DNA de la línea y, en su caso, la eliminación de las inserciones no relacionadas con el gen.
- La caracterización genética del alelo mutante por inserción.
- El aislamiento de plantas homocigotas para la inserción, en el caso de que sean viables, y el estudio de los posibles fenotipos mutantes. En particular, alteraciones en el tiempo de floración, ya que mutantes simples de la actividad HUA-PEP presentan fenotipos mutantes sutiles en el tiempo de floración.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Organismos utilizados

4.1.1. *Arabidopsis thaliana*

4.1.1.1. Estirpes de *Arabidopsis thaliana*

Las estirpes utilizadas han sido el acceso Col-0 como control silvestre y la línea GK-213B07, obtenida mediante inserción de T-DNA en Col-0³¹.

4.1.1.2. Esterilización de las semillas

Las semillas se esterilizaron con una solución de lejía convencional al 40% (v/v) y tritón X-100 al 0,1% (v/v), durante 8 minutos. A continuación, se realizaron 3 lavados sucesivos de 5 minutos con agua destilada estéril. Este proceso se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar.

4.1.1.3. Cultivos en placas de Petri

Las semillas esterilizadas se depositaron en placas de Petri con medio GM (4.2.1) con una pipeta Pasteur. Para seleccionar líneas transgénicas portadoras de la inserción de T-DNA se utilizaron placas que incluían el antibiótico sulfadiazina como agente selector (4.3.1). Las placas se depositaron 1 día a 4°C, para estratificar las semillas. Posteriormente, se trasladaron a incubadores Sanyo MLR-351 al 60-70% de humedad, iluminación continua (130 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$) y 20-22°C de temperatura.

4.1.1.4. Cultivo en maceta

Tras 2 o 3 semanas de crecimiento en placa, se trasladaron las rosetas a macetas con sustrato (4.2.3) en alveolos de plástico (Pöppelmann) dentro de una bandeja con medio nutritivo ATM (4.2.2). Se cubrieron con film transparente agujereado para evitar el exceso de humedad. Las bandejas se trasladaron a una cámara de cultivo a 20-22°C, 60-70% de humedad y luz continua con intensidad de 130 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$.

Tras varios días, se retiró el film transparente, y se efectuaron riegos con agua una o dos veces por semana. Posteriormente, se colocaron bases y cilindros

de plástico del sistema Aracon (Arasystem, Betatech) para cultivar las plantas de manera individualizada.

4.2. Medios de cultivo

4.2.1. Medio de germinación de Arabidopsis (Medio GM)

Se añadió medio Murashige y Skoog 2,15 g/L; sacarosa 1% (m/v); MES (ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico) 0,5 g/L. Tras ajustar a pH 5,7 con KOH 5 M, se incorporó agar para plantas a una concentración de 0,8% (m/v) y se autoclavó. En la cabina de flujo laminar, se vertió el medio en placas de Petri de 140 mm de diámetro, y se almacenaron en bolsas precintadas a 4°C.

Para la realización de placas con agente selector, el medio fue previamente atemperado en un baño a 50°C y se incorporó el antibiótico sulfadiazina a una concentración final de 7,5 µg/mL (4.3.1).

4.2.2. Medio mínimo ATM (*Arabidopsis thaliana* Medium)

Este medio se usó para regar las plantas en el momento de ser trasplantadas. Su composición es: Ca(NO₃)₂ 2 mM; Fe-Na(EDTA) 51 mM; KH₂PO₄ 2,5 mM; KNO₃ 5 mM; MgSO₄ 2 mM; CoCl₂ 0,01 µM; CuSO₄ 0,5 µM; H₃BO₃ 10 µM; MnCl₂ 14 µM; NaCl 10 µM; NaMoO₄ 0,2 µM; ZnSO₄ 1 µM³².

Las soluciones madre se prepararon diluyendo cada componente en agua destilada, y se esterilizaron mediante filtración. Se conservaron a 4°C.

4.2.3. Sustrato para el cultivo de Arabidopsis en maceta

Se realizó una mezcla de perlita, vermiculita y turba (2:2:1) en bolsas de plástico, y posteriormente se esterilizó en el autoclave.

4.3. Disoluciones y tampones

4.3.1. Antibióticos

La solución stock de sulfadiazina se preparó en la cabina de flujo laminar a una concentración de 7,5 mg/mL en agua destilada previamente autoclavada. Antes de distribuirse en alícuotas, la solución stock se esterilizó por filtración a través

de un filtro de 0,22 μm de tamaño de poro (Millex GP, Millipore). La sulfadiazina se utilizó a una concentración final de 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.3.2. Tampón de extracción de DNA

Tris-HCl 200 mM pH 7,5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM pH 8 y SDS 0,5% (m/v) diluidos en agua destilada estéril. Se conservó a temperatura ambiente (basado en el protocolo *Quick DNA Prep for PCR*³³).

4.3.3. Disoluciones utilizadas en electroforesis en geles de agarosa

Tampón TAE 50X: Tris-base [Tris(hidroximetil)aminometano] 2 M; ácido acético glacial 5,71% (v/v); Na₂EDTA 50 mM pH 8. pH final: 7,6.

Tampón de carga 6X: glicerol 30% (v/v); azul de bromofenol 25% (m/v); xilencianol 0,25% (m/v).

Bromuro de etidio (10 mg/mL): se diluyó el bromuro de etidio sólido en agua, y se conservó en un frasco protegido de la luz.

4.4. Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

4.4.1. Aislamiento de DNA genómico de Arabidopsis

Se trituró la muestra (hoja vegetativa) dentro de un tubo de eppendorf de 1,5 mL con una varilla de plástico. Posteriormente, se añadió tampón de extracción (4.3.2) durante 15 minutos a 37°C. Tras centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos, se tomó parte del sobrenadante y se añadió isopropanol (1:1, v/v). Se incubó 15 minutos a -20°C para permitir la precipitación del DNA. A continuación, se volvió a centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos. Se sustituyó el isopropanol por etanol 70% para lavar el DNA. Por último, después de otra centrifugación a la misma velocidad y tiempo, se eliminó el etanol y se resuspendió en agua destilada estéril.

4.4.2. Aislamiento de RNA total de Arabidopsis

Se tomaron rosetas antes de la transición floral, utilizando nitrógeno líquido para congelarlas inmediatamente después de su recolección. Este material se pulverizó mediante el uso de un mortero, tomándose 100 mg de cada muestra.

Posteriormente se procedió a la extracción del RNA usando el kit GeneJET Plant RNA Purification (Thermo Scientific), siguiendo el protocolo del fabricante.

A continuación, se realizó una digestión con DNasa I (Thermo Scientific) durante 1 hora a 37°C para la eliminación del DNA genómico. Para concentrar el RNA, se añadieron 2 volúmenes de etanol al 100% y 1/10 de volumen de LiCl 4 M y se incubó a -80°C durante varias horas. Se centrifugó a 14000 rpm y 4°C durante 10 minutos. Tras un lavado con etanol al 70%, se dejó secar la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar trazas de etanol. Para terminar, se resuspendió en 25µL de agua libre de RNasas, almacenándola a -80°C hasta su uso.

Para evitar la degradación del RNA, se utilizó nitrógeno líquido para congelar tanto el material vegetal como el instrumental usado. Además, se trató la superficie de trabajo con etanol para limitar la acción de las RNasas.

4.4.3. Análisis cuantitativo y cualitativo del RNA total aislado

Se determinó el RNA obtenido con el espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer, que permite medir la absorbancia a 260 nm y 280 nm, así como la obtención del cociente, en una dilución de 1/50 de la muestra.

Se realizó una PCR con cebadores de DNA genómico para asegurar la ausencia del mismo. Se visualizaron 0,5 µg de cada muestra en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, para comprobar su integridad. Para evitar la presencia de RNasas, se trató todo el material con NaOH 0,4 M.

4.4.4. Electroforesis en gel de agarosa

Se utilizó la electroforesis para comprobar el tamaño de los fragmentos obtenidos tras una amplificación por PCR.

Los geles se prepararon con TAE 1X (4.3.3) y agarosa de punto medio de electroendósmosis (Ecogen) con una concentración del 1%, dependiendo del tamaño de las moléculas a visualizar, y con bromuro de etidio 0,5 µg/ml (4.3.3). Para cargar las muestras se añadió 1,5 µl de tampón de carga 6X (4.3.3) por

cada 10 µl. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 voltios. Para visualizar el resultado, se utilizó un transiluminador (GeneDoc) con una cámara Canon 1000D acoplada que permite la captura de imágenes de los geles con el programa Eos Utility.

4.5. Realización de cruzamientos

Para realizar cruzamientos entre plantas de distinto genotipo, se retiraron todos los órganos florales, excepto el pistilo, de una flor de la planta aceptora de polen (parental femenino), con ayuda de unas pinzas de disección y una lupa binocular (Leica Zoom 2000). A continuación, se tomó una flor en anthesis de la planta donante de polen (parental masculino), y se pusieron en contacto sus anteras con el pistilo de la flor aceptora. Tras la maduración del fruto resultante, éste se recogió y se conservó a 4°C en un tubo eppendorf.

4.6. Síntesis de ácidos nucleicos

4.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de secuencias específicas de DNA, se realizaron reacciones de PCR. Se añadió 0,2 µM de cada cebador; 0,2 mM de una mezcla equimolar de desoxirribonucleósidos trifosfato; MgCl₂ 1,5 mM; 1 U de Taq DNA polimerasa (EURx); tampón de PCR 10X (EURx) y concentración variable de DNA molde.

La reacción se realizó en un termociclador Bio-Rad T100 Thermal Cycler. Se inició con 2 minutos a 94°C, seguido de 35-40 ciclos de 30 segundos a 94°C para la desnaturalización del DNA, previo a un paso de 30 segundos a 50-60°C (temperatura óptima de hibridación de los cebadores) (4.10), y 1 minuto a 72°C. Por último, se programó una elongación de 7 minutos a 72°C.

4.6.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Después de la retrotranscripción, se midió la expresión a través del sistema LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics) utilizando el kit de amplificación Maxima SYBER Green qPCR Master Mix 2X, siguiendo las indicaciones del fabricante (Thermo Scientific).

Los niveles de expresión se normalizaron con el gen de referencia OTC³⁴, así como con los niveles silvestres correspondientes. Se realizó una réplica intraensayo. Los resultados de expresión finalmente se corrigieron con una curva de calibrado de los cebadores (curva de eficiencia; Pfaffl 2001). Los valores se expresaron en promedios \pm desviación estándar (DE).

4.7. Genotipados de las estirpes mutantes

En la siguiente tabla se describe el genotipado molecular llevado a cabo para identificar los alelos para el gen *U1-70K* presentes en las plantas.

Tabla 1.- Genotipados moleculares

Gen	Cebadores genómicos	Cebador del T-DNA	Tamaño del producto de PCR en pares de bases (pb) silvestre/mutante
<i>U1-70K</i>	SJ1-144 SJ1-145	o8409	934/500

4.8. Estudio de las características morfológicas e histológicas

4.8.1. Microscopía óptica

Las observaciones microscópicas se realizaron con microscopio Nikon Eclipse E800. La captura de imágenes se realizó con cámara Nikon Digital Camera DXM1200F, conectada al microscopio, mediante el programa ACT-1 2.70.

4.8.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las muestras se fijaron en metanol durante 5 minutos a temperatura ambiente y se conservaron en etanol a 4°C. Posteriormente, se sometieron a secado por punto crítico en el equipo EMS 850 (Electron Microscopy Science), intercambiando el etanol por CO₂, y permitiendo el secado del tejido. El tejido se colocó sobre un portaobjetos metálico mediante una cinta de carbono adherente por ambas caras y se recubrió con una película de oro utilizando el metalizador Sputter Coater SCD 004 (Balzers). Por último, se realizaron las observaciones con el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-840, conectado a un ordenador para la toma y almacenamiento de fotografías.

4.8.3. Tinción con solución de Alexander

Esta solución contiene dos colorantes que tiñen la superficie del grano del polen (verde malaquita) y el protoplasma (fucsina ácida) ³⁵. Con unas pinzas de disección se tomaron inflorescencias y se fijaron con la solución de Carnoy ³⁶ durante al menos 2 horas a 4°C. A continuación se depositó la muestra sobre un trozo de papel absorbente para luego sumergirla en una alícuota de la tinción de Alexander e incubarla a 37°C durante 1 o 2 horas. Se tomó una flor de estadio 12 de la muestra, y se diseccionaron los estambres depositándolos en un portaobjetos de vidrio sobre una gota de tinción. Con ayuda de un mechero se aplicó calor al portaobjetos desde abajo, sujetándolo con unas pinzas. Se dejó enfriar y se colocó un cubreobjetos para proteger los estambres. Las muestras fueron visualizadas con un microscopio (4.8.1).

4.9. Análisis estadístico

4.9.1. Análisis estadístico de los experimentos de qPCR

Se realizaron análisis para verificar si los niveles de mRNA de un gen en los distintos fondos mutantes presentan diferencias significativas respecto a los niveles silvestres. Se utilizó la función Prueba t Student del programa Excel como análisis preliminar. Considerando una diferencia estadísticamente significativa un valor de probabilidad menor a 0,05.

4.10. Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados por Invitrogen (Life Technologies) en la escala 25 nmol, y con un grado de purificación moderado.

Tabla 2.- Oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia 5'-3'	Finalidad
SJ1-144	GATGTTTTCGGTAAATTTGGCC	Genotipado
SJ1-145	GTTGTTCCCCAACAATTTCTTC	Genotipado qPCR
o8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC	Genotipado
SJ1-146	GACTGATCAGCTGACCAATAAA	qPCR

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Genotipado molecular

5.1.1. Diseño del genotipado molecular

El proyecto del GABI-Kat dio lugar a la obtención de miles de líneas independientes de *Arabidopsis* mutagenizadas por inserción de un T-DNA modificado que confiere resistencia a sulfadiazina. Para cada una de las líneas, se ha aislado y secuenciado la región genómica adyacente al T-DNA, creándose una base de datos que permite la búsqueda de mutantes en genes concretos³¹. Se empleó esta base de datos para la búsqueda de una línea de *Arabidopsis* que contuviera una inserción de T-DNA interrumpiendo el gen *U1-70K* (código AGI AT3G50670), que codifica la proteína de 70 kDa específica del complejo snRNP U1 del espliceosoma, identificándose la línea GK-213B07, de la que se obtuvieron 12 tubos con semillas T2 procedentes de la planta T1 en la que se identificó originariamente la inserción.

Una línea de inserción puede tener la anotación errónea, no encontrándose la inserción en el gen indicado en la base de datos, o puede contener más de una inserción, por lo que hay que realizar un análisis genético con el objeto de caracterizar la línea. Con este fin, se procedió a diseñar un genotipado molecular para la identificación de la inserción, que permite tanto la detección de su presencia como de su ausencia.

El gen *U1-70K* contiene 9 exones y 8 intrones. La información de la base de datos del GABI-Kat indica que la inserción de la línea GK-213B07 estaría localizada en el sexto intrón del gen *U1-70K*, lo que facilitó el diseño de tres oligonucleótidos que se emplearon como cebadores para realizar el genotipado molecular por PCR (Figura 5). El oligonucleótido o8409 hibrida con una región localizada cerca de uno de los extremos del T-DNA, y los oligonucleótidos SJ1-144 y SJ1-145 hibridan en el DNA genómico, a ambos lados de donde hipotéticamente está localizada la inserción. Este genotipado permite determinar si la inserción está presente o no en el lugar indicado en la base de datos, así como discernir entre el alelo silvestre y el alelo con la inserción de T-

DNA, ya que el primero da un fragmento de amplificación de 934 pb (pares de bases) y el segundo produce un fragmento de unas 500 pb (Figura 5).

```

ctgttcttgtcttgcagAACTACGAATCCTCAGAGAGTAAGATTAAAAGGGAGTTTGAATCTTATGGACC
AATTAAACGGgtaggttattctgagcattcccttgcctgctggttcggttaagaatttgtgtaatggcttccctc
tctagagctccttggctcaatttgttttattttatctacaaaagtcttccaaggtagaatttttcagtcc
cttataaatttgcattcttctgctagaccaaaggccattctacatttgccttggtttgcattgccttct
ttagactgtgtaaagccatcaagtctcttagacctttctcaataactgaatataatagatgcataagtgtc
tctcatataatgacacagctcctctctccatgggtgttggtttgatggttttcggtaaaatttggccctggg
atTTTTatttcccttgccttcagagagcaaatacttttacaatgatataatcatatagtggttataggca
cacggtttacctaataatcattagttgttttctgaatctataatgagctcaactcatcctgctggtaagcaa
cttataaaatattatctgcccataatcccaaagccattcaaatgctttattttcaagcaaccaaggggga
ttatcgaaaacccttctctcttttctctatcttaacatctataatattcagatctgggacttgggctac
tatgaaggtgatctgggtcactttttaatacatttttagttatctaagtttctataaccctggtaaggggt
ggtttattagactcttcaaaaatggtaatttggctgcaatacatccatttttctgccaattcttgatgtg
gggtggtgacattctcggatttggacacaacataaaggttgctgctttagagctgcatgttggtttga
tatgaaacacttttatcttgaatctgatttggttctcacagatttgatttgtaattgtcttcttctgaa
acttctcagGTTCAATTGGTCACTGATCAGCTGACCAATAAACCCAAAGGATATGCTTTCATTGAGTACA
TGCACACCCGTGACATGAAAGgtgccctcacatctcttttcttcaaccctcttttctcctctgagatg
ttgtcttttatactgatgttgattgtgttttgcactcttctctacagCTGCATATAAGCAAGCTGATG
GACAAAAGATTGACGGCAGAAGAGTTTGGTTGATGTGGAGAGAGGTAGAACCGTCCCAAACCTGGCGTCC
ACGCAGGCTTGGTGGTGGACTTGGGACCTCAAGAGTGGGTGGTGGTGAAGAAATTGTTGGGGAACAACAA
CCGCAAGGAAGAACCCTCCAGTCAGAGGAGCCATCGAGACCACGGGAAGAGCGgtaaagatattttcatt

```

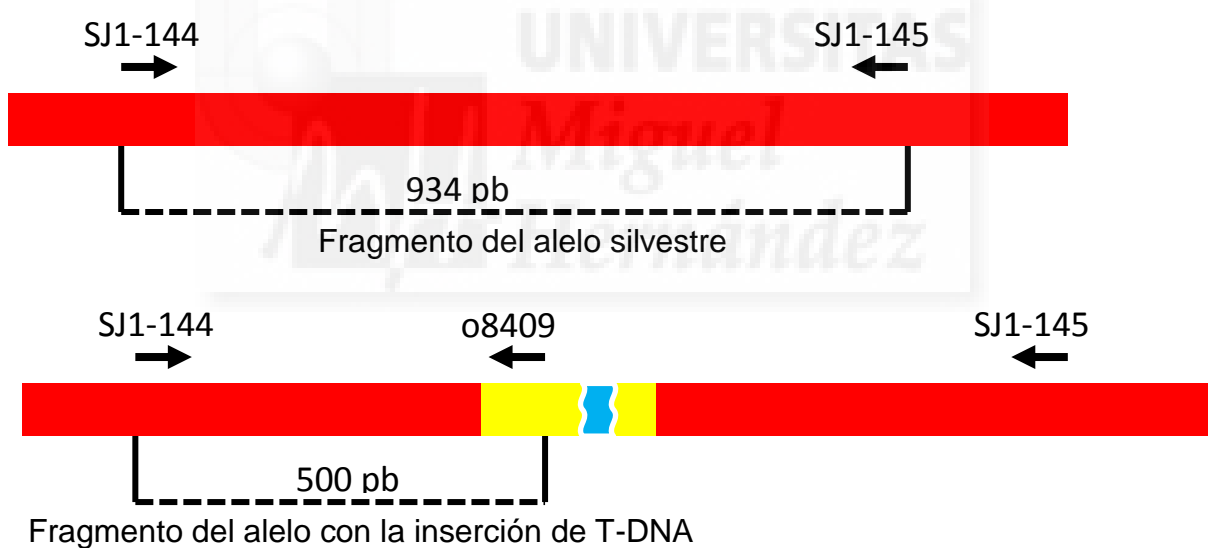


Figura 5.- Esquema parcial del gen *U1-70K*. Las secuencias de los exones 6, 7 y 8 se representan con letras mayúsculas en color naranja, mientras que las secuencias de los intrones 6 y 7 se representan con letras minúsculas en color azul. La inserción de T-DNA está localizada en el sexto intrón (color verde). El oligonucleótido o8409 hibrida con secuencias del T-DNA. La posición del oligonucleótido SJ1-144 se indica en amarillo, el del SJ1-145 en gris y el del SJ1-146 en turquesa. Abajo se representa un esquema explicativo del genotipado molecular, donde el DNA genómico se representa en rojo y en amarillo se muestra la inserción de T-DNA. SJ1-144 y SJ1-145 amplifican un fragmento de PCR de 934pb para el alelo silvestre. SJ1-144 y o8409 producen un fragmento de amplificación de 500pb en el alelo mutante.

5.1.1. Genotipado molecular de la línea GK-213B07

Con intención de confirmar la presencia de la inserción en el gen *U1-70K* y obtener plantas que la contengan, se procedió a la siembra de semillas T2 de los 12 tubos recibidos en placas de medio nutritivo con el antibiótico sulfadiazina, que selecciona las plantas portadoras de la inserción, empleando como control sensible el acceso silvestre Col-0 (Tabla 3).

Tabla 3.- Recuento de plantas T2 en placas con sulfadiazina

Siembra en placa con sulfadiazina		
Línea	Resistentes	Sensibles
1	14	10
2	17	12
3	11	9
4	13	11
5	9	13
6	13	8
7	13	14
8	22	5
9	19	9
10	17	10
11	10	13
12	12	9
TOTAL	170	123

Todas las plantas claramente resistentes a la sulfadiazina mostraron fenotipo silvestre y no presentaron ninguna alteración evidente. El genotipado molecular de 60 de estas plantas resistentes mostró que todas las que se genotiparon resultaron ser heterocigotas para la mutación, no pudiéndose identificar plantas homocigotas (Figura 6).

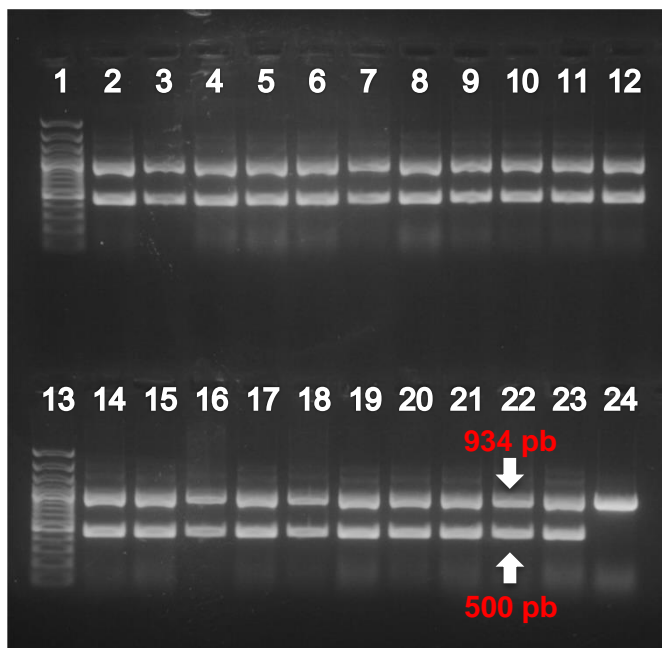


Figura 6.- Genotipado molecular de las plantas T2.

Calles 1 y 13: marcador molecular.

Calle 2 a la 12 y 14 a la 23: genotipado de plantas resistentes a sulfadiazina, que resultaron ser todas heterocigotas.

Calle 24: genotipado del silvestre Col-0.

En color rojo aparecen los tamaños de las bandas de amplificación PCR para el genotipado. Tamaños: 500 pb para el alelo silvestre y 934 pb para el alelo mutante.

El elevado número de plantas heterocigotas para la inserción, sin la detección de ninguna planta homocigota, sugiere que la mutación tiene efectos deletéreos en homocigosis. Además, el hecho de que todas las plantas que sobreviven en el medio con sulfadiazina presenten la inserción en el gen *U1-70K*, tras confirmación con el genotipado molecular, es compatible con que la línea GK-213B07 no contenga otra inserción de T-DNA no relacionada.

Entre las plantas clasificadas inicialmente como sensibles, se observaron 8 que presentaron un desarrollo incipiente, produciendo unas pocas hojas de un verde muy claro antes de morir, siendo reclasificadas finalmente como resistentes. En principio, planteamos la hipótesis de que estas plantas pudieran ser homocigotas que sobreviven sólo en estadios tempranos, aunque no se pueden descartar otras posibilidades, como que se trate de algún artefacto producido por el antibiótico empleado.

5.2. Estudio de la descendencia de plantas heterocigotas

El estudio de la descendencia T3 de las plantas heterocigotas obtenidas anteriormente se realizó con el objetivo de establecer con mayor precisión el modo de herencia del alelo mutante y si los homocigotos para la inserción son o no viables. Además, se pretende determinar si las plantas resistentes que no se desarrollan aparecen en placas que no contienen sulfadiazina, con lo que

quedaría descartado un efecto causal del antibiótico sobre el fenotipo, y establecer el genotipo de estas plantas. Para ello, se aislaron semillas T3 procedentes de 7 plantas heterocigotas T2 y se sembraron en placas con sulfadiazina y en placas sin el antibiótico.

La segregación esperada en las placas con sulfadiazina es 3:1 en ausencia de letalidad (3 plantas resistentes, homocigota para el alelo mutante y heterocigotas, por cada planta sensible, homocigota para el alelo silvestre) o 2:1 si hay letalidad para la inserción (2 plantas resistentes, heterocigotas, por cada planta sensible, homocigota para el alelo silvestre). Sin embargo, el resultado obtenido se acercó más a una segregación 1:1 (Tabla 4), lo que indica una transmisión del alelo mutante a través de los gametos por debajo de lo esperado, sugiriendo que no sólo hay letalidad cigótica, sino también letalidad gametofítica. Esto no es de extrañar, ya que dada la función esencial que desempeña la proteína U1-70kDa en la snRNP U1, cabe esperar que la ausencia de esta función inhiba el correcto *splicing* de muchos pre-mRNA y la producción de las correspondientes proteínas, resultando en efectos adversos sobre los procesos celulares.

Tabla 4.- Recuento de plantas T3 en placas con sulfadiazina

Siembra en placas con sulfadiazina				
Línea	Resistentes	Resistentes sin desarrollar	Sensibles	Sin germinar
1	25	0	23	4
2	19	1	30	2
3	21	2	20	7
4	21	3	26	2
5	44	0	58	1
6	115	6	95	40
7	20	3	25	3
TOTAL	265	15	277	59

En total, para las 7 líneas de semillas T3, se han contado 280 plantas resistentes (265 + 15) y 277 sensibles, ajustándose a la segregación 1:1 tras la prueba de bondad de ajuste χ^2 con corrección de Yates para un grado de libertad ($p > 0,85$).

Con el fin de obtener más información sobre el efecto letal de la mutación insercional, se observaron frutos de las plantas heterocigotas aclarados con metanol. Se detectaron huecos en los frutos, debidos a semillas abortadas, demostrándose el carácter letal de la mutación en el gen *U1-70K*. Se observa alrededor de un 50% de semillas abortadas, lo que no se puede explicar únicamente por la existencia de letalidad cigótica, que teóricamente sería del 25% de homocigotos para la inserción, por lo que este resultado nuevamente sugiere que hay letalidad gametofítica, al menos en el gametofito femenino (Figura 7).



Figura 7.- Frutos de Col-0 y del heterocigoto. En la imagen de la izquierda observamos frutos del silvestre Col-0, mientras que en la imagen de la derecha podemos observar huecos sin semillas en los frutos del heterocigoto.

A continuación, se sembraron las semillas de las plantas heterocigotas en placas carentes de sulfadiazina, observándose también plantas que no se desarrollaron correctamente y terminaron muriendo. Esto implica que el antibiótico no es el causante de la aparición de estas plantas y sugiere que podrían tratarse de plantas homocigotas para el alelo mutante (Tabla 5, Figura 8).

Tabla 5.- Recuento de plantas T3 en placas sin sulfadiazina

Siembra en placas sin sulfadiazina			
Línea	Vivas	Sin desarrollar	Sin germinar
1	214	14	32
2	182	9	22
3	160	37	7
4	137	5	14
5	130	5	14
6	370	48	44
7	299	44	18
TOTAL	1492	162	151

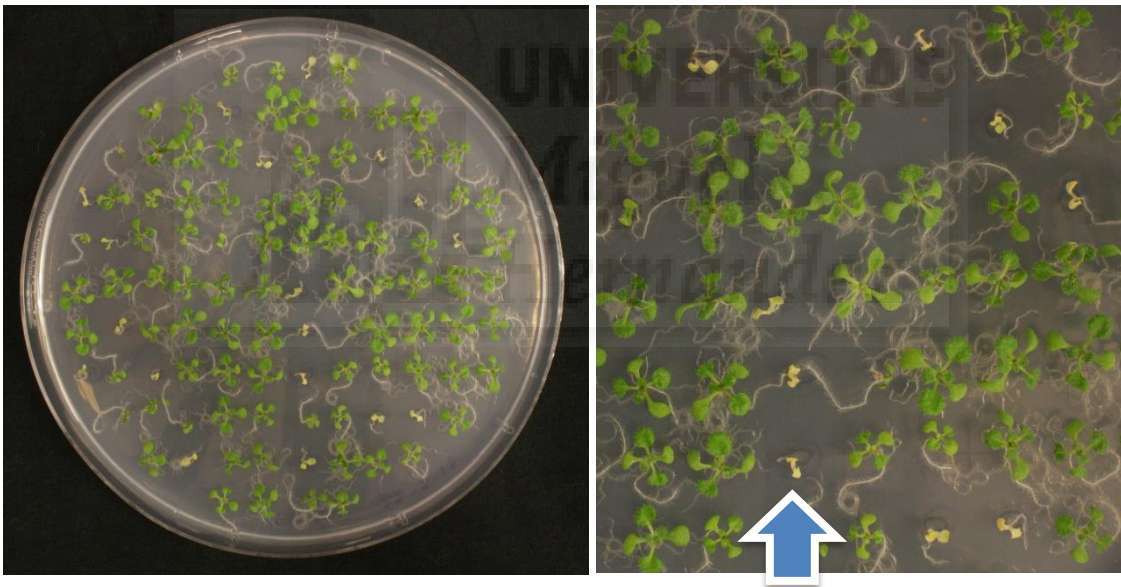


Figura 8.- Placas de Petri con plantas de Arabidopsis. A la izquierda, se observa una placa de Petri con medio sin sulfadiazina. A la derecha, se muestra una ampliación de la placa anterior con plantas blanquecinas que no se desarrollan (flecha azul).

Se genotiparon 12 de las plantas anormales, que mueren sin completar desarrollo, para comprobar si, en efecto, se trataba de plantas homocigotas para la inserción. Sin embargo, todas resultaron ser heterocigotas, por lo que podemos afirmar que ninguna planta homocigota pasa de la fase embrionaria.

Conjuntamente, se genotiparon 9 plantas silvestres que crecieron en las mismas placas (Figura 9).

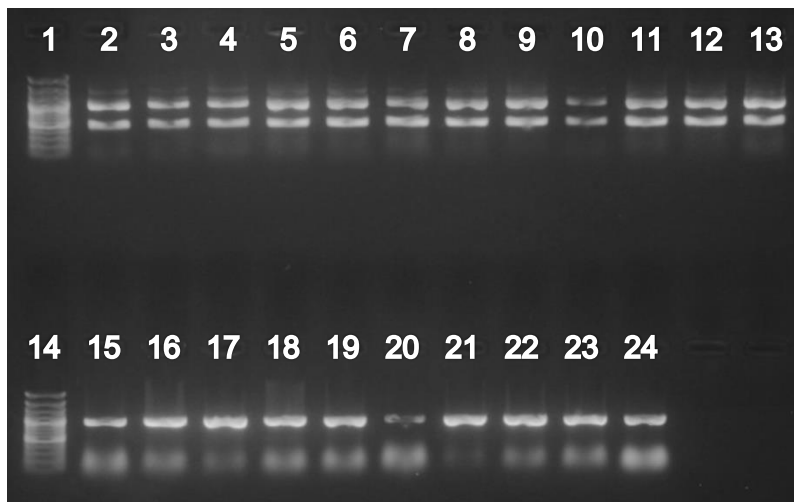


Figura 9.- Genotipado molecular de las plantas anormales que no completan desarrollo.

Calles 1 y 14, marcador molecular. Calles 2 a la 13, plantas T3 heterocigotas que no se desarrollan. Calles 15 a la 23, plantas T3 silvestres. Calle 24, silvestre

La aparición de estas plantas alteradas heterocigóticas parece deberse a un hecho aleatorio, ya que entre diferentes siembras su porcentaje varía entre un 3,7% y un 19%, con la media en 9,8%. De hecho, la hipótesis más razonable es que la completa ausencia de la proteína U1-70kDa es una condición letal celular, con lo que sería letal en las condiciones haploides tanto del gametofito femenino como del masculino. Esto plantea la duda de cómo, siendo letal la ausencia de la proteína en los gametofitos, la mutación puede transmitirse a la descendencia.

En un trabajo previo, se observó que plantas transgénicas con una construcción antisentido para el gen, expresada con un promotor específico de pétalos y estambres, no eliminaban completamente la formación de estos órganos, llegando a formar rudimentos. Esto se explicaba porque las células precursoras de los pétalos y estambres, antes de la activación del promotor de la construcción antisentido, acumulaban proteína U1-70kDa que posteriormente se diluiría en las células hijas descendientes, permitiendo la formación de rudimentos de los órganos hasta que la concentración de la proteína bajaba a niveles en los que se detenía el desarrollo ³⁰. De forma similar, cierto porcentaje de gametofitos haploides portadores del alelo mutante podrían sobrevivir al haber recibido, de forma aleatoria, cantidades suficientes de

proteína de las células precursoras heterocigóticas, y gracias a ello se puede transmitir la mutación a la descendencia. Sin embargo, algunos gametofitos femeninos portadores de la mutación darían lugar a las plantas anormales heterocigotas, debido a que recibirían cantidades limitantes de la proteína U1-70kDa que les permitirían completar una diferenciación anómala que condicionaría severamente las etapas de desarrollo posteriores a la fecundación, y otros no habrían recibido suficiente proteína, resultando directamente en letalidad gametofítica.

5.3. Cruzamientos del heterocigoto por Col-0. Obtención de plantas F₁

Posteriormente, se procedió al estudio de la transmisión del alelo mutante a través de los gametos masculino y femenino, mediante cruces entre plantas heterocigotas y silvestres Col-0. Una transmisión normal de los alelos mutante y silvestre daría lugar a que la mitad de la descendencia fuera homocigota para el alelo silvestre, sensible a sulfadiazina, y la otra mitad heterocigota, resistente a sulfadiazina (segregación 1:1). Cualquier desviación sobre la segregación esperada, implicaría un defecto de transmisión a través de uno o de los dos gametofitos.

En primer lugar, se realizaron cruces utilizando pistilos del heterocigoto (*u1-70k+*) y polen de Col-0 (4.5). Un hecho reseñable es que el heterocigoto funciona mal como receptor de polen, obteniéndose pocas semillas en el cruce. Esto sugiere defectos en el pistilo (que no se observan, ya que tiene una morfología normal) o en algunos de los óvulos (que podría darse como consecuencia de letalidad gametofítica). El resultado, aun cuando hubo pocas semillas resultantes del cruce, indica que el alelo mutante se transmite peor que el silvestre a través del gametofito femenino, ya que se obtuvo aproximadamente el doble de descendencia silvestre, sensible a sulfadiazina, que heterocigota, resistente al antibiótico (Tabla 6). Por tanto, deducimos que hay letalidad parcial de la mutación a través del gametofito femenino, corroborando el resultado observado previamente al aclarar frutos de plantas heterocigotas con metanol.

Tabla 6.- Resultados primer cruzamiento

Cruzamiento 1			
Línea	Resistentes	Sensibles	Sin germinar
F ₁ u1-70k/+ x Col-0 (+/+) 1	6	10	2
F ₁ u1-70k/+ x Col-0 (+/+) 2	0	2	1
TOTAL	6	12	3

A continuación, se realizó el cruzamiento recíproco al anterior, empleándose Col-0 como parental femenino y el heterocigoto como parental masculino. En este caso, se observó el mismo número aproximado de plantas silvestres y de plantas heterocigotas (segregación 1:1), resultado que cabría esperar de no existir letalidad a través del gametofito masculino (Tabla 7).

Tabla 7.- Resultados segundo cruzamiento

Cruzamiento 2			
Línea	Resistentes	Sensibles	Sin germinar
F ₁ Col-0 (+/+) x u1-70k/+ 1	17	17	2
F ₁ Col-0 (+/+) x u1-70k/+ 2	13	17	2
F ₁ Col-0 (+/+) x u1-70k/+ 3	28	20	0
TOTAL	58	54	4

No obstante el resultado anterior, para confirmar si hay o no letalidad a través del gametofito masculino, se procedió a realizar la tinción con solución de Alexander, que tiñe diferencialmente el polen viable. Se observó la presencia de polen no viable en las anteras del heterocigoto y no en las del silvestre (Figura 10), lo que indica que también hay letalidad parcial a través del gametofito masculino, aunque ésta no fue detectada en el cruce genético, posiblemente debido a que la letalidad en este gametofito es mucho más reducida que en el femenino.

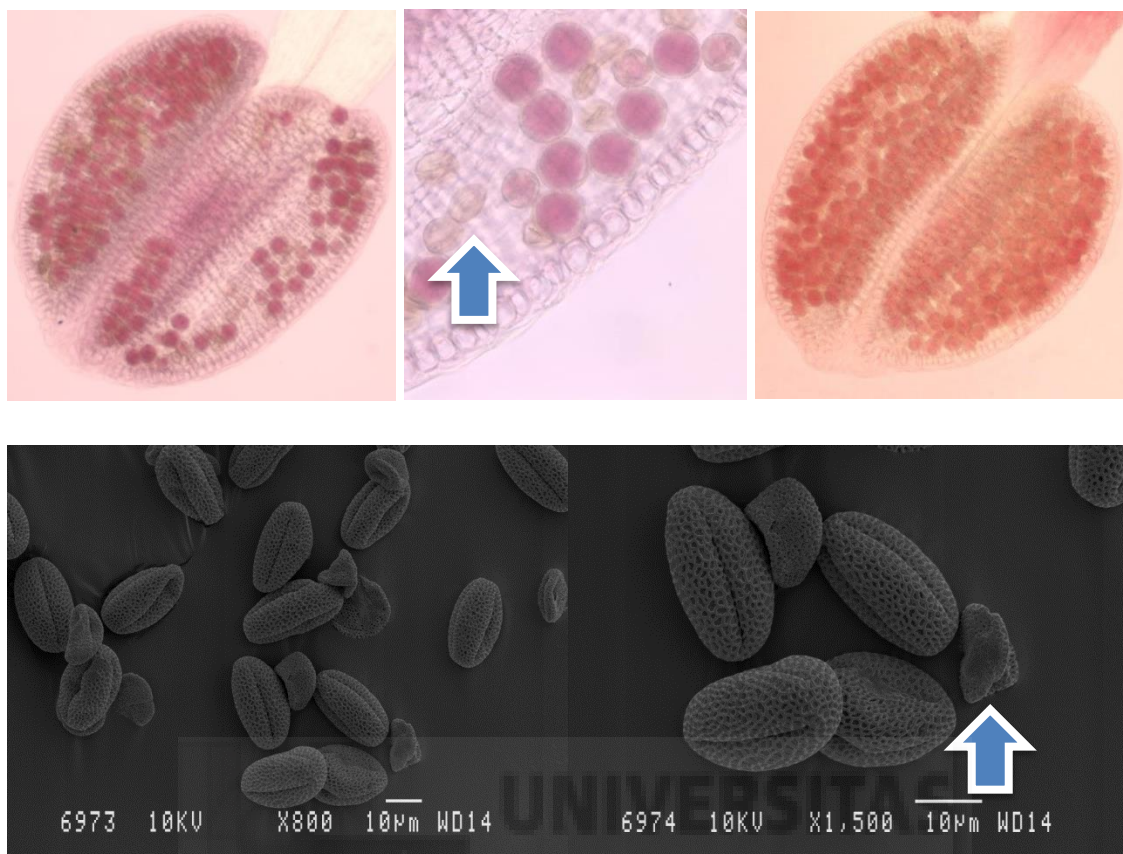


Figura 10.- Polen de plantas heterocigotas y silvestres. Arriba a la izquierda, se observa la antera de una planta heterocigota y en la imagen del centro una magnificación de esta antera en la que se observa polen no viable (flecha azul). La fotografía de la derecha muestra la antera de una planta Col-0. Abajo, se muestra a la izquierda una fotografía de microscopía electrónica de barrido de polen de una planta heterocigota y una magnificación de ésta a la derecha en la que se observa polen no viable (flecha azul).

5.4. Estudio de la descendencia de las plantas F₁ heterocigotas

Con el objetivo de confirmar las segregaciones observadas anteriormente, se sembró la descendencia de 10 plantas F₁ resistentes a sulfadiazina obtenidas en el apartado 5.3. Además, esto nos permite descartar por completo la existencia de otra inserción, ya que si hubiera otra inserción, la segregación al azar de las dos llevaría a que alguna de las plantas F₁ hubiera recibido únicamente la inserción no relacionada con el gen *U1-70K* y su descendencia daría una segregación normal 3:1 en placas de sulfadiazina (tres plantas resistentes por cada planta sensible). El resultado de los recuentos confirma la segregación 1:1 observada en la descendencia de las plantas T2, indicativa de

letalidad gametofítica, y descarta que haya otra inserción independiente no ligada al gen *U1-70K* (Tabla 8).

Tabla 8.- Recuento de la descendencia de plantas F₁ en placas con sulfadiazina

Siembra en placas con sulfadiazina			
Línea	Resistentes	Sensibles	Sin germinar
1	19	33	0
2	30	24	0
3	21	31	0
4	27	24	0
5	28	24	0
6	17	35	0
7	26	25	0
8	26	24	0
9	25	27	0
10	26	25	0
TOTAL	245	272	0

5.5. Estudio de la floración

Para estudiar posibles fenotipos mutantes, se realizó un estudio de la floración, ya que los únicos fenotipos mutantes observados en los mutantes simples de la actividad HUA-PEP afectan levemente al tiempo de floración.

Se midió el tiempo de floración de plantas heterocigotas *u1-70k/+* y se comparó con el del acceso silvestre Col-0. Para ello, se sembraron plantas heterocigotas y silvestres, y se contaron los días que transcurrieron hasta que florecieron (alzado del tallo o inflorescencia principal). Además, se contabilizó el número de hojas vegetativas que tenían en el momento de la floración. No se detectaron diferencias en el tiempo de floración ni en el número de hojas vegetativas, no observándose ningún fenotipo mutante para la floración en el heterocigoto (Figura 12).

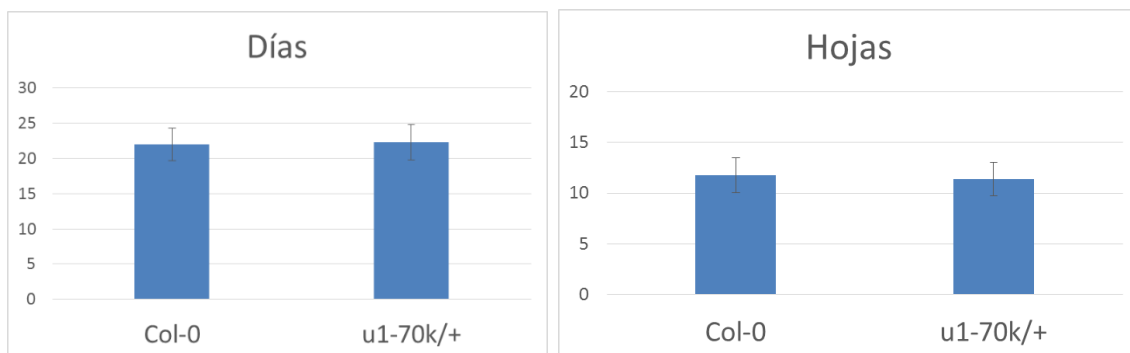


Figura 12.- Tiempo de floración y número de hojas

5.6. Análisis de la expresión mediante qPCR

Aunque es relativamente común que heterocigotos para un alelo nulo presenten niveles de expresión que son aproximadamente la mitad que las dos copias funcionales del gen que posee el silvestre, debido a que no se encontraron diferencias fenotípicas con respecto a la floración, se procedió a un análisis para verificar si los niveles de mRNA del gen *U1-70K* en el heterocigoto presentan diferencias significativas respecto a los niveles del acceso silvestre Col-0.

La diferencia de expresión, menor en el heterocigoto que en el silvestre, es estadísticamente significativa ($p = 0,011695964$), ya que queda por debajo del límite de significación comúnmente escogido ($*p < 0,05$) (Figura 13). Sin embargo, al ser mínima esta diferencia y estar basada en una única réplica intraensayo, sería preciso realizar un mayor número de réplicas biológicas para confirmar este resultado, y se puede asumir, en principio, que muy probablemente no tiene efecto biológico o lo tiene muy escaso, de ahí que no se observara fenotipo mutante alguno en el heterocigoto. No obstante, no se puede descartar, de confirmarse la leve disminución de expresión del gen en el heterocigoto en comparación con el silvestre Col-0, que pudiera darse un efecto sinérgico en combinaciones de la heterocigosis para la inserción en *U1-70K* con mutaciones en genes de la actividad HUA-PEP.

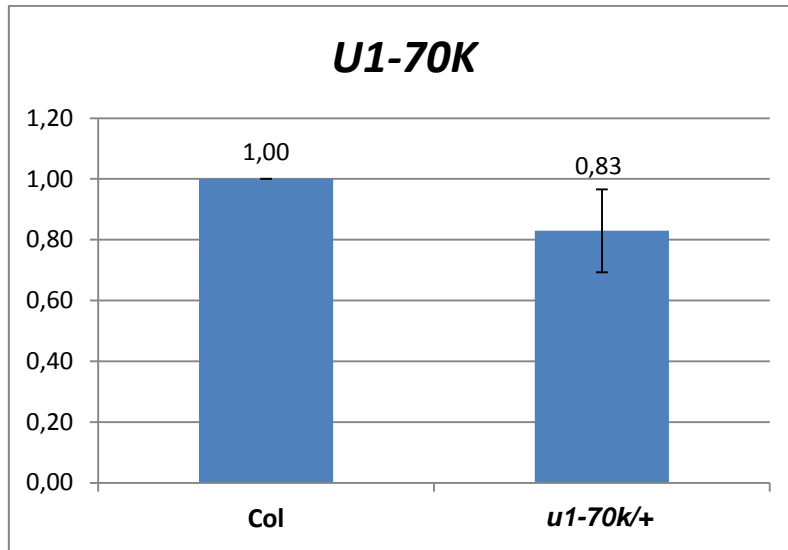


Figura 13.- Medidas de expresión relativa del gen *U1-70K* mediante qPCR. * $p < 0,05$. Barra de error: DE (desviación estándar).



6. CONCLUSIONES

1. Hemos identificado en la línea GK-213B07 del GABI-Kat una única inserción de T-DNA localizada en el sexto intrón de gen *U1-70K* que probablemente inactiva completamente la función del gen.
2. El alelo mutante es letal embrionario en homocigosis.
3. La mutación confiere letalidad parcial en el gametofito femenino, observándose una baja transmisión del alelo mutante cuando se emplean pistilos del heterocigoto como aceptores de polen silvestre.
4. Aunque hay polen no viable en los heterocigotos, se observa una transmisión aparentemente normal del alelo mutante a través del gametofito masculino cuando se emplean pistilos silvestres como aceptores de polen del heterocigoto, posiblemente debido a que la letalidad en el gametofito masculino es más reducida que en el femenino.
5. El alelo mutante se comporta como recesivo frente al alelo silvestre, no observándose fenotipos mutantes en el heterocigoto.
6. Los niveles de expresión del gen en el heterocigoto son similares a los del silvestre, por lo que debe haber un mecanismo de regulación fina que asegure que se producen cantidades suficientes de la proteína, aún con una única copia funcional del gen, para cumplir con los requerimientos estequiométricos en los complejos en los que participa.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Somerville C, Koornneef M. A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant. *Nat Rev Genet*. 2002 Nov 1;3(11):883–9.
2. Koornneef M, Meinke D. The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant J*. 2010 Mar;61(6):909–21.
3. Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M. Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. *Science*. 1998 Oct 23;282(5389):662, 679–82.
4. Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*. 2000 Dec 14;408(6814):796–815.
5. Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J*. 1998 Dec;16(6):735–43.
6. Li J, Jia D, Chen X. HUA1, a regulator of stamen and carpel identities in Arabidopsis, codes for a nuclear RNA binding protein. *Plant Cell*. 2001 Oct;13(10):2269–81.
7. Chen X, Meyerowitz EM. HUA1 and HUA2 are two members of the floral homeotic AGAMOUS pathway. *Mol Cell*. 1999 Mar;3(3):349–60.
8. Cheng Y, Kato N, Wang W, Li J, Chen X. Two RNA binding proteins, HEN4 and HUA1, act in the processing of AGAMOUS pre-mRNA in Arabidopsis thaliana. *Dev Cell*. 2003 Jan;4(1):53–66.
9. Lim M-H, Kim J, Kim Y-S, Chung K-S, Seo Y-H, Lee I, et al. A New Arabidopsis Gene, FLK, Encodes an RNA Binding Protein with K Homology Motifs and Regulates Flowering Time via FLOWERING LOCUS C. *PLANT CELL ONLINE*. 2004 Mar 1;16(3):731–40.
10. Mockler TC, Yu X, Shalitin D, Parikh D, Michael TP, Liou J, et al. Regulation of flowering time in Arabidopsis by K homology domain

- proteins. *Proc Natl Acad Sci*. 2004 Aug 24;101(34):12759–64.
11. José Ripoll J, Ferrándiz C, Martínez-Laborda A, Vera A. PEPPER, a novel K-homology domain gene, regulates vegetative and gynoecium development in *Arabidopsis*. *Dev Biol*. 2006 Jan 15;289(2):346–59.
 12. Rodríguez-Cazorla E, Ripoll JJ, Andújar A, Bailey LJ, Martínez-Laborda A, Yanofsky MF, et al. K-homology Nuclear Ribonucleoproteins Regulate Floral Organ Identity and Determinacy in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*. 2015;11(2):1–28.
 13. Ripoll JJ, Rodríguez-Cazorla E, González-Reig S, Andújar A, Alonso-Cantabrana H, Perez-Amador MA, et al. Antagonistic interactions between *Arabidopsis* K-homology domain genes uncover PEPPER as a positive regulator of the central floral repressor FLOWERING LOCUS C. *Dev Biol*. 2009 Sep 15;333(2):251–62.
 14. Rodríguez-Cazorla E, Ortuño-Miquel S, Candela H, Bailey-Steinitz LJ, Yanofsky MF, Martínez-Laborda A, et al. Ovule identity mediated by pre-mRNA processing in *Arabidopsis*. Hake S, editor. *PLOS Genet*. 2018 Jan 12;14(1):e1007182.
 15. Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldmann KA, Meyerowitz EM. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*. 1990 Jul 5;346(6279):35–9.
 16. Parenicová L, de Folter S, Kieffer M, Horner DS, Favalli C, Busscher J, et al. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *Plant Cell*. 2003 Jul;15(7):1538–51.
 17. Favaro R, Pinyopich A, Battaglia R, Kooiker M, Borghi L, Ditta G, et al. MADS-Box Protein Complexes Control Carpel and Ovule Development in *Arabidopsis*. *PLANT CELL ONLINE*. 2003 Oct 10;15(11):2603–11.
 18. Pinyopich A, Ditta GS, Savidge B, Liljegren SJ, Baumann E, Wisman E,

- et al. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature*. 2003 Jul 3;424(6944):85–8.
19. Amasino R. Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant J*. 2010 Mar;61(6):1001–13.
 20. Watson JD. *Biología molecular del gen*. Editorial Médica Paramericana; 2016.
 21. Baserga SJ, Steitz JA. *The Diverse World of Small Ribonucleoproteins*. 1993.
 22. Brody Y, Neufeld N, Bieberstein N, Causse SZ, Böhnlein E-M, Neugebauer KM, et al. The In Vivo Kinetics of RNA Polymerase II Elongation during Co-Transcriptional Splicing. Misteli T, editor. *PLoS Biol*. 2011 Jan 11;9(1):e1000573.
 23. Berg MG, Singh LN, Younis I, Liu Q, Pinto AM, Kaida D, et al. U1 snRNP determines mRNA length and regulates isoform expression. *Cell*. 2012 Jul 6;150(1):53–64.
 24. Merkhofer EC, Johnson TL. U1 snRNA rewrites the “Script”. *Cell*. 2012 Jul 6;150(1):9–11.
 25. Oh J-M, Di C, Venters CC, Guo J, Arai C, So BR, et al. U1 snRNP telescripting regulates a size–function-stratified human genome. *Nat Struct Mol Biol*. 2017 Oct 2;24(11):993–9.
 26. Kaida D, Berg MG, Younis I, Kasim M, Singh LN, Wan L, et al. U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature*. 2010 Dec 29;468(7324):664–8.
 27. Kohtz JD, Jamison SF, Will CL, Zuo P, Lührmann R, Garcia-Blanco MA, et al. Protein–protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature*. 1994 Mar 10;368(6467):119–24.
 28. Salz HK, Mancebo RSY, Nagengast AA, Speck O, Psocka M, Mount SM.

- The *Drosophila* U1-70K Protein Is Required for Viability, but Its Arginine-Rich Domain Is Dispensable. *Genetics*. 2004 Dec;168(4):2059–65.
29. MacMorris M, Brocker C, Blumenthal T. UAP56 levels affect viability and mRNA export in *Caenorhabditis elegans*. *RNA*. 2003 Jul;9(7):847–57.
 30. Golovkin M, Reddy ASN. Expression of U1 small nuclear ribonucleoprotein 70K antisense transcript using APETALA3 promoter suppresses the development of sepals and petals. *Plant Physiol*. 2003 Aug 1;132(4):1884–91.
 31. Kleinboelting N, Huet G, Kloetgen A, Viehoveer P, Weisshaar B. GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jan;40(Database issue):D1211-5.
 32. Kranz AR, Kirchheim B. Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arabidopsis information service*. 1987.
 33. Weigel D, Glazebrook J. *Arabidopsis : a laboratory manual*. Published in 2002 in Cold Spring Harbor (N.Y.) by Cold Spring Harbor laboratory press. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2002. 354 p.
 34. Pérez-Pérez JM, Ponce MR, Micol JL. The ULTRACURVATA2 gene of *Arabidopsis* encodes an FK506-binding protein involved in auxin and brassinosteroid signaling. *Plant Physiol*. 2004 Jan;134(1):101–17.
 35. Alexander MP. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol*. 1969 May;44(3):117–22.
 36. Peterson R, Slovin JP, Chen C. A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *Int J Plant Biol*. 2010 Jul 23;1(2):13.