



**UNIVERSITAS**  
*Miguel Hernández*

**Universidad Miguel Hernández de Elche**

**Contribución a la caracterización  
funcional del gen *PHOSPHORYLATED  
ADAPTOR FOR RNA EXPORT (PHAX)*  
de *Arabidopsis thaliana***

**Silvia Martínez Fenoll**

Tutoras:

María Rosa Ponce Molet  
Sara Fontcuberta Cervera

Unidad de Genética  
Instituto de Bioingeniería

Máster Universitario en Biotecnología y Bioingeniería  
Curso académico 2022-2023

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

SARA FONTCUBERTA CERVERA, Investigadora predoctoral de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR:

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



María Rosa Ponce Molet



Sara Fontcuberta Cervera

Elche, 19 de junio de 2023.

# ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS .....	III
ÍNDICE DE TABLAS .....	III
<b>I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....</b>	<b>1</b>
<b>II.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
II.1.- La biogénesis del ribosoma eucariótico citoplásmico .....	2
II.1.1.- El procesamiento del pre-ARNr 45S .....	3
II.1.2.- Los efectos de las alteraciones en la biogénesis del ribosoma .....	3
II.2.- El papel de los snARN en el <i>splicing</i> .....	5
II.3.- El papel de los snoARN en el procesamiento de los pre-ARNr.....	6
II.4.- Las proteínas PHAX de los metazoos .....	7
<b>III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>IV.- MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>11</b>
IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria .....	11
IV.1.1.- Nomenclatura genética.....	11
IV.1.2.- Citas bibliográficas.....	12
IV.2.- Estirpes empleadas en este trabajo.....	12
IV.3.- Condiciones de cultivo de Arabidopsis.....	12
IV.3.1.- Cultivo en placa de Petri .....	12
IV.3.2.- Cultivo en maceta y recolección de semillas .....	14
IV.4.- Cruzamientos .....	15
IV.5.- Condiciones de los cultivos bacterianos .....	15
IV.6.- Disoluciones.....	16
IV.6.1.- Medios de cultivo para Arabidopsis.....	16
IV.6.2.- Medios de cultivo para bacterias .....	17
IV.6.3.- Tampones y otras disoluciones de uso general .....	17
IV.6.3.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico .....	17
IV.6.3.2.- Disoluciones para la electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	18
IV.6.4.- Tampones y disoluciones para los análisis de <i>northern</i> .....	18
IV.6.4.1.- Disoluciones para la electroforesis de ARN en geles de agarosa.....	18
IV.6.4.2.- Disoluciones para la transferencia de ARN del gel a una membrana .....	19
IV.6.4.3.- Disoluciones para la hibridación, los lavados y la detección .....	19
IV.7.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos .....	19
IV.7.1.- Aislamiento de ácidos nucleicos .....	19
IV.7.1.1.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis .....	19
IV.7.1.2.- Aislamiento de ADN plasmídico.....	20
IV.7.1.3.- Aislamiento de ARN total de Arabidopsis .....	20
IV.7.2.- Amplificaciones mediante PCR .....	21
IV.7.3.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....	21

IV.7.4.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN .....	21
IV.7.5.- Electroforesis capilar de ARN total en un bioanalizador .....	23
IV.8.- Análisis de <i>northern</i> .....	23
IV.9.- Obtención de transgenes mediante la tecnología Gateway.....	26
IV.10.- Transformaciones.....	29
IV.10.1.- Transformación de células bacterianas .....	29
IV.10.1.1.- Transformación por choque térmico .....	29
IV.10.1.2.- Transformación por electroporación .....	29
IV.10.2.- Transformación de Arabidopsis .....	29
IV.10.2.1.- Infiltración con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	30
IV.10.2.2.- Selección de transformantes .....	30
IV.11.- Microfotografía y morfometría .....	31
IV.12.- Pruebas estadísticas.....	31
<b>V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
V.1.- Caracterización de líneas insercionales para el gen <i>PHAX</i> .....	32
V.1.1.- Análisis de la conservación del dominio PHAX .....	32
V.1.2.- Obtención de los alelos <i>phax-1</i> y <i>phax-2</i> .....	34
V.1.3.- Análisis de complementación de <i>phax-1</i> con <i>phax-2</i> .....	37
V.1.4.- Análisis de una posible letalidad gametofítica de los mutantes <i>phax</i> .....	38
V.2.- Obtención de transgenes para el estudio funcional del gen <i>PHAX</i> .....	40
V.2.1.- Obtención de los clones de entrada .....	42
V.2.2.- Obtención de los clones de destino y secuenciación de los transgenes.....	42
V.2.3.- Transferencia de las construcciones a <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y obtención de líneas transgénicas de Arabidopsis.....	44
V.3.- Predicción de la localización subcelular y suborganular de PHAX.....	45
V.4.- Estudio del procesamiento del pre-ARNr 45S en los mutantes <i>phax</i> .....	46
V.5.- Análisis de la expresión génica y el <i>splicing</i> en los mutantes <i>phax</i> .....	49
V.6.- Análisis del ARN total de los mutantes <i>phax</i> en un bioanalizador .....	49
V.7.- Análisis de interacciones genéticas .....	51
<b>VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA .....</b>	<b>54</b>
<b>VII.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Esquema del procesamiento del pre-ARNr 45S en Arabidopsis.....	5
<b>Figura 2.-</b> Esquema del procesamiento de los pre-snARN y pre-snoARN en los mamíferos .....	8
<b>Figura 3.-</b> Esquema del montaje para la transferencia de ARN de geles de agarosa desnaturalizantes a membranas de nailon cargadas positivamente .....	25
<b>Figura 4.-</b> Clonación de un inserto en un vector de expresión mediante la tecnología Gateway .....	26
<b>Figura 5.-</b> Mapas de los vectores Gateway empleados en este trabajo. (A) Mapa del vector de entrada pGEM-T Easy221 .....	28
<b>Figura 6.-</b> Alineamiento múltiple de las estructuras primarias de las proteínas PHAX de Arabidopsis, <i>Oryza sativa</i> , <i>Homo sapiens</i> y <i>Drosophila melanogaster</i> .....	33
<b>Figura 7.-</b> Alineamiento múltiple de las estructuras primarias de las proteínas PHAX de Arabidopsis, <i>Physcomitrella patens</i> , <i>Oryza sativa</i> y <i>Amborella trichopoda</i> .....	34
<b>Figura 8.-</b> Estructura del gen <i>PHAX</i> , y caracterización fenotípica y genotipado de sus líneas insercionales .....	36
<b>Figura 9.-</b> Silicuas decoloradas de <i>qrt1-2</i> , <i>PHAX/phax-1</i> , Col-0 y <i>PHAX/phax-2</i> .....	39
<b>Figura 10.-</b> Obtención de los insertos para la generación de las construcciones <i>PHAX<sub>pro</sub>:PHAX:GFP</i> , <i>35S<sub>pro</sub>:PHAX:YFP</i> y <i>35S<sub>pro</sub>:PHAX</i> .....	41
<b>Figura 11.-</b> Genotipado de los clones de entrada .....	42
<b>Figura 12.-</b> Verificación de los transgenes en los clones de destino seleccionados.....	43
<b>Figura 13.-</b> Verificación de los transformantes T <sub>1</sub> .....	45
<b>Figura 14.-</b> Análisis <i>in silico</i> de la localización de PHAX.....	46
<b>Figura 15.-</b> Resultados del estudio mediante análisis de <i>northern</i> del procesamiento del pre-ARNr 45S en los mutantes <i>phax</i> .....	48
<b>Figura 16.-</b> Resultados de la electroforesis capilar de ARN de los mutantes <i>phax</i> en un bioanalizador.....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Estirpes mutantes de Arabidopsis empleadas en este trabajo .....	13
<b>Tabla 2.-</b> Oligonucleótidos empleados como cebadores en este trabajo .....	22
<b>Tabla 3.-</b> Programas de PCR empleados en este trabajo .....	23
<b>Tabla 4.-</b> Análisis de las silicuas y semillas de <i>qrt1-2</i> , <i>PHAX/phax-1</i> , Col-0 y <i>PHAX/phax-2</i> .....	39

**I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE**

## I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

En los metazoos, las proteínas Phosphorylated Adaptor for RNA Export (PHAX) actúan como exportadoras de los precursores de los ARN pequeños nucleares (snARN) y nucleolares (snoARN), que participan en el *splicing* y la biogénesis del ribosoma, respectivamente. En este Trabajo de Fin de Máster se ha iniciado el estudio funcional del gen AT3G20430, que codifica la presunta ortóloga de las PHAX en Arabidopsis, que no se han estudiado en las plantas y muy poco en los animales. Se han caracterizado dos alelos insercionales de *PHAX*, *phax-1* y *phax-2*, cuya homocigosis produce un fenotipo pleiotrópico muy aberrante y poco viable. Se han obtenido tres transgenes para rescatar el fenotipo de los mutantes insercionales, determinar los efectos de la sobreexpresión de *PHAX*, y localizar su producto proteico. Mediante análisis de *northern*, se han detectado defectos en el procesamiento del pre-ARNr 45S en los mutantes *phax*. Se han iniciado análisis transcriptómicos y de interacciones genéticas para encontrar relaciones funcionales entre *PHAX* y genes implicados en la biogénesis del ribosoma o el *splicing*. Nuestros resultados preliminares en Arabidopsis, sugieren la conservación evolutiva de la función de PHAX entre los distintos reinos.

**Palabras clave:** Arabidopsis, biogénesis del ribosoma, snoARN, snARN, PHAX, mutante insercional.

In metazoans, Phosphorylated Adaptor for RNA Export (PHAX) proteins act as exporters of precursors of small nuclear RNAs (snRNAs) and nucleolar RNAs (snoRNAs) involved in splicing and ribosome biogenesis, respectively. In this Master's Thesis, the functional study of the AT3G20430 gene has been initiated, which encodes the putative ortholog of PHAX in Arabidopsis, which have not been studied in plants and very little in animals. Two insertional alleles of PHAX have been characterized, *phax-1* and *phax-2*, whose homozygosity results in a highly aberrant and barely viable pleiotropic phenotype. Three transgenes have been obtained to rescue the phenotype of the insertional mutants, to determine the effects of *PHAX* overexpression, and to localize its protein product. Gel blot analyses have revealed defects in the processing of pre-rRNA 45S in the *phax* mutants. Transcriptomic and genetic interaction analyses have been initiated to identify functional relationships between *PHAX* and genes involved in ribosome biogenesis or splicing. Our preliminary results in Arabidopsis, suggest cross-kingdom conservation of PHAX function.

**Keywords:** Arabidopsis, ribosome biogenesis, snoRNA, snRNA, PHAX, insertional mutant.

## **II.- INTRODUCCIÓN**



## II.- INTRODUCCIÓN

### II.1.- La biogénesis del ribosoma eucariótico citoplásmico

Los ribosomas constituyen una maquinaria ancestral y evolutivamente conservada, que se encarga de la traducción de los ARN mensajeros (ARNm) a proteínas en todos los organismos vivos. Los eucariotas cuentan con hasta tres tipos de ribosomas distintos: el citoplásmico, el mitocondrial y, en los fotosintéticos como *Arabidopsis*, el del cloroplasto. El ribosoma citoplásmico u 80S (en adelante, el ribosoma) es el responsable de traducir los ARNm de los genes nucleares y está formado por las subunidades menor o 40S y mayor o 60S, ambas constituidas por ARNr y proteínas ribosómicas (PR). La subunidad 40S contiene, en todos los eucariotas, el ARNr 18S y más de 30 PR, mientras que la 60S contiene el ARNr 25S (en las plantas y las levaduras) o 28S (en los metazoos), así como los ARNr 5.8S y 5S, y unas 50 PR (revisado en Weis *et al.*, 2015).

La biogénesis del ribosoma es un proceso muy complejo y conservado en todos los eucariotas, que transcurre en el nucleolo, el nucleoplasma y el citoplasma, y requiere una gran aportación energética, así como la estricta regulación y coordinación de los factores que participan en la síntesis, el ensamblaje y la exportación de todos sus componentes: las tres polimerasas de ARN (ARN pol) eucarióticas, cuatro ARNr, ARN pequeños nucleolares (snoARN), decenas de PR, y cientos de factores denominados conjuntamente factores de la biogénesis del ribosoma (FBR) (revisado en Sáez-Vásquez y Delseny, 2019).

La biogénesis del ribosoma se inicia con la transcripción, por parte de la ARN pol I, del ADNr 45S/35S/47S (en las plantas, las levaduras y los metazoos, respectivamente), cuyas numerosas copias se localizan en las regiones organizadoras nucleolares (NOR, de Nucleolar Organizer Region). Cada copia de ADNr 45S/35S/47S contiene las secuencias de los ARNr 18S, 5.8S y 25S/28S maduros. Estas secuencias se encuentran separadas entre sí por los espaciadores internos ITS1 e ITS2, y flanqueadas en los extremos 5' y 3' por los espaciadores externos 5'-ETS y 3'-ETS, todos los cuales se transcriben y escinden, posteriormente, durante el procesamiento secuencial del transcrito primario policistrónico que se genera, conocido como pre-ARNr 45S/35S/47S. La ARN pol II transcribe los genes que codifican las PR, los FBR y la mayoría de los snoARN que participan en el proceso. Por otro lado, en el nucleoplasma, la ARN pol III se encarga de transcribir el ADNr 5S, cuyo transcrito primario madura en un proceso relativamente simple, y los genes que dan lugar a los ARN transferentes (ARNt) y a otros snoARN. Las partículas prerribosómicas pre-40S y pre-60S se forman secuencialmente, exportándose al citoplasma por los nucleoporos, donde se completa su maduración. Finalmente, las subunidades 40S y 60S se ensamblan para dar lugar al ribosoma maduro (revisado en Sáez-Vásquez y Delseny, 2019).

### II.1.1.- El procesamiento del pre-ARNr 45S

Tal como se ha mencionado en el apartado anterior, el procesamiento del pre-ARNr 45S/35S/47S da lugar a los ARNr 18S, 5.8S y 25S/28S maduros. Es un proceso complejo que incluye la fragmentación y eliminación de los ETS e ITS mediante diversos cortes endo- y exonucleolíticos, así como las modificaciones químicas cotranscripcionales de algunos nucleótidos durante las etapas más tempranas (revisado en Henras *et al.*, 2015).

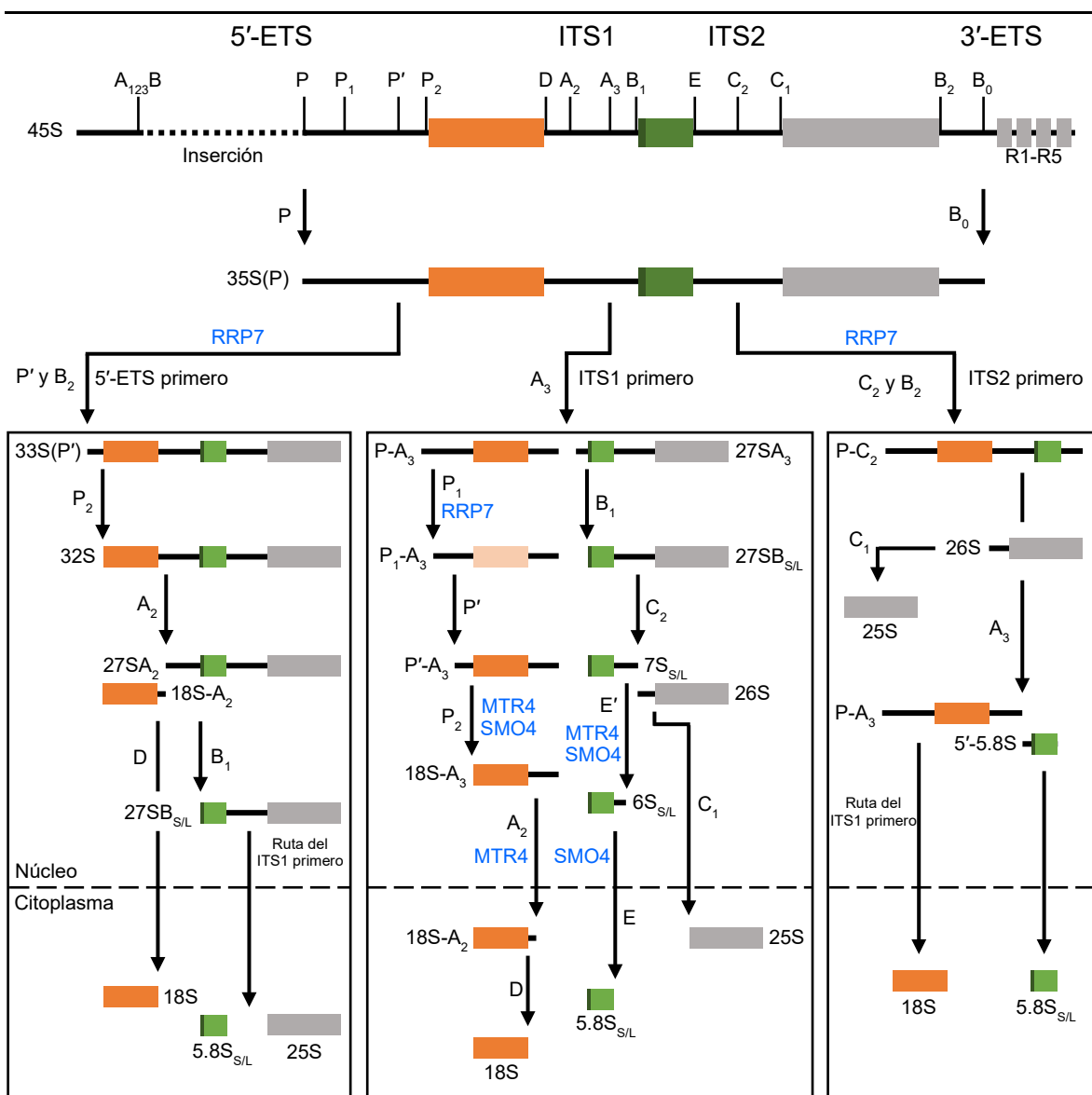
El pre-ARNr 45S en las plantas presenta, como en los animales, varios sitios de corte situados en los ETS e ITS (Figura 1, en la página 5). El procesamiento del pre-ARNr 45S se inicia con los cortes en los sitios P y B<sub>0</sub>, que lo acortan en sus extremos dando lugar al pre-ARNr 35S. A continuación, se inician tres rutas alternativas: la del “5'-ETS primero”, “ITS1 primero” e “ITS2 primero”. Se cree que la coexistencia de estas tres rutas se debe a la importancia de asegurar la producción de una cantidad suficiente de ribosomas, y la estricta regulación de su biogénesis. En la ruta del “5'-ETS primero”, el pre-ARNr 35S sufre cortes en P' y B<sub>2</sub>, que dan lugar al pre-ARNr 33S(P'). Este precursor es escindido en P<sub>2</sub>, A<sub>2</sub> y D o B<sub>1</sub>, rindiendo los pre-ARNr 32S, 27SA<sub>2</sub>, 18S-A<sub>2</sub> y 27SB<sub>S/L</sub> como productos intermedios, y el ARNr 18S maduro como producto final. Por otro lado, en la ruta del “ITS1 primero”, el pre-ARNr 35S se corta en el sitio A<sub>3</sub>, dando lugar a los pre-ARNr P-A<sub>3</sub> y 27SA<sub>3</sub>. El P-A<sub>3</sub> es escindido sucesivamente en P<sub>1</sub>, P', P<sub>2</sub>, A<sub>2</sub> y D, rindiendo los pre-ARNr P<sub>1</sub>-A<sub>3</sub>, P'-A<sub>3</sub>, 18S-A<sub>3</sub> y 18S-A<sub>2</sub>, y el ARNr 18S maduro como producto final. En esta misma ruta, el pre-ARNr 27SA<sub>3</sub> sufre cortes en B<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>1</sub> o E, cuyos productos intermedios son los pre-ARNr 27SB<sub>S/L</sub>, 26S, 7S<sub>S/L</sub> y 6S<sub>S/L</sub>, y los finales, los ARNr 5.8S y 25S maduros. Por último, en la ruta del “ITS2 primero”, el pre-ARNr 35S se corta en los sitios C<sub>2</sub> y B<sub>2</sub>, dando lugar a los pre-ARNr P-C<sub>2</sub> y 26S. El P-C<sub>2</sub> sufre un corte en el sitio A<sub>3</sub>, rindiendo los pre-ARNr P-A<sub>3</sub> y 5'-5.8S como productos intermedios, y el ARNr 5.8S maduro como producto final. En esta misma ruta, el pre-ARNr 26S se corta en C<sub>1</sub>, dando lugar al ARNr 25S maduro (Figura 1, en la página 5; revisado en Weis *et al.*, 2015; Sáez-Vásquez y Delsený, 2019).

### II.1.2.- Los efectos de las alteraciones en la biogénesis del ribosoma

Las alteraciones en la biogénesis del ribosoma o en la actividad del ribosoma maduro son responsables de un amplio espectro de patologías humanas, con distintos orígenes y manifestaciones clínicas, que se conocen como ribosomopatías. Entre ellas, destacan varios tipos de cáncer, diversos síndromes neurológicos y otros que afectan al linaje hematopoyético (revisado en Lafontaine *et al.*, 2021).

Este tipo de estrés celular estimula diversas rutas de señalización específicas, que inducen la detención del ciclo celular, la senescencia o la apoptosis. Si bien en los últimos

años se han descrito nuevas vías de respuesta al estrés nucleolar en los animales, la ruta canónica y mejor estudiada es la dependiente del factor de transcripción antitumoral p53. En condiciones normales, p53 es regulado negativamente por Murine Double Minute 2 (MDM2), una ligasa de ubiquitina de tipo E3 que lo poliubiquitina para su exportación al citoplasma y posterior degradación por el proteasoma. Sin embargo, en condiciones de estrés nucleolar o ribosómico, se induce la síntesis de PR como RPS7, RPL5, RPL11 o RPL23, que se acumulan libres, pasando del nucleolo al nucleoplasma sin integrarse en los ribosomas, y se unen a MDM2, inhibiendo su actividad. Como resultado, p53 se estabiliza y sus niveles aumentan, conduciendo a la inhibición del ciclo celular o a la inducción de senescencia o apoptosis (revisado en Ohbayashi y Sugiyama, 2018; Sáez-Vásquez y Delseny, 2019).



**Figura 1.-** Esquema del procesamiento del pre-ARNr 45S en Arabidopsis. Los rectángulos de colores representan las secuencias de los ARNr maduros contenidas en el transcrito primario policistrónico del ADNr 45S. Las flechas verticales indican los cortes endonucleolíticos, y las letras, los sitios de corte en los correspondientes pre-ARNr. Se destacan en azul algunos de los FBR que aparecen en este trabajo. La inserción del pre-ARNr 45S no está a escala. Modificado a partir de Cabezas-Fuster *et al.* (2023), quienes se basaron en Sáez-Vásquez y Delseny (2019).

---

En Arabidopsis, las mutaciones en genes que codifican FBR o PR pueden causar letalidad gametofítica, embrionaria y/o postembrionaria, aunque en su mayoría son viables y generan fenotipos pleiotrópicos caracterizados por un crecimiento lento, alteraciones en el momento de la floración, porte reducido, infertilidad, y una menor proliferación celular en las raíces y en las hojas. Estas últimas suelen ser apuntadas y dentadas, y con frecuencia muestran un patrón de venación alterado (Fujikura *et al.*, 2009; revisado en Sáez-Vásquez y Delseny, 2019). A nivel subcelular, se ha demostrado que la insuficiencia de función de algunos FBR afecta negativamente a la estructura del nucleolo, debido a la acumulación excesiva de pre-ARNr, que causan su hipertrofia, y la desorganización y descondensación de la cromatina de los genes de los ADNr (revisado en Ohbayashi y Sugiyama, 2018).

## II.2.- El papel de los snARN en el *splicing*

Los ARN pequeños nucleares (snARN) son ARN no codificantes de menos de 350 nucleótidos que transcribe mayoritariamente la ARN pol II, aunque algunos son transcritos por la ARN pol III, y participan indirectamente en el procesamiento de los precursores de los ARNm (pre-ARNm) o *splicing*. Estos ARN sufren algunas modificaciones químicas, como la metilación del 2'-hidroxilo (2'-O-metilación) de la ribosa o la isomerización de la uridina a pseudouridina (pseudouridilación), en regiones conservadas evolutivamente, que se conocen por su relevancia funcional en el *splicing* (revisado en Kufel y Grzechnik, 2019).

En los eucariotas, los genes que codifican proteínas contienen regiones codificantes y no codificantes, denominadas exones e intrones, respectivamente. Mediante el proceso de *splicing*, la maquinaria celular corta y elimina los intrones de los pre-ARNm, y empalma los exones, dando lugar a los ARNm maduros. Este proceso, necesario para la maduración de los ARNm, es ejecutado por el espliceosoma, que está formado por ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNP) y snARN (revisado en Ohtani, 2017).

El espliceosoma se constituye en varias etapas en las que intervienen los snARN solos o ensamblados en las snRNP. En primer lugar, el snARN U1 se une al pre-ARNm por complementariedad de bases. La unión posterior de la snRNP U2 da lugar al complejo pre-*splicing*. A continuación, se une la tri-snRNP U4/U6.U5, para dar lugar al complejo B1,

que produce una serie de reajustes que conllevan la desestabilización del complejo y la eliminación de las snRNP U1 y U4. Estos cambios conducen a la formación del complejo B2 y a la activación del espliceosoma, iniciándose el *splicing*. Tras la eliminación del intrón del pre-ARNm para dar lugar al ARNm maduro, se produce la liberación de las snRNP, que se reciclan y repiten el proceso nuevamente (revisado en Karijovich y Yu, 2010).

### II.3.- El papel de los snoARN en el procesamiento de los pre-ARNr

Existen otros tipos de snRNP que participan en la regulación de distintos aspectos del metabolismo de los ARN, como el procesamiento de los pre-ARNr. Estas snRNP están formadas por snoARN o ARN pequeños de los cuerpos de Cajal (scaARN), y se conocen como ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares (snoRNP) o de los cuerpos de Cajal (scaRNP), respectivamente. La diferencia entre estas RNP reside en el lugar en el que modifican o procesan los precursores de los ARN (revisado en Ohtani, 2017).

Los snoARN son ARN no codificantes de pequeño tamaño (60-300 nucleótidos) que están presentes en todos los eucariotas. Son transcritos, en su mayoría, por la ARN pol II, aunque algunos los transcribe la ARN pol III, y participan directa o indirectamente en el procesamiento del pre-ARNr 45S/35S/47S. En *Saccharomyces cerevisiae* (en adelante, la levadura) se han identificado 76 snoARN, y se cree que hay unos 550 en el ser humano, y más de 200 en *Arabidopsis* (revisado en Weis *et al.*, 2015; Kufel y Grzechnik, 2019).

Las modificaciones químicas más comunes encontradas en los pre-ARNr son la 2'-O-metilación de la ribosa y la pseudouridilación, que son catalizadas por snoRNP de tipo C/D box y H/ACA box, respectivamente. Las snoRNP están compuestas por un snoARN y varias proteínas, alguna con actividad catalítica. El snoARN se une por complementariedad de bases al pre-ARNr, guiando a la proteína con actividad catalítica al nucleótido que ha de modificar (revisado en Henras *et al.*, 2015).

Por otro lado, existen algunas snoRNP que, además de catalizar la modificación de uno o varios nucleótidos del pre-ARNr, participan directamente en su procesamiento. Un caso especial es el de la snoRNP U3, que no modifica el pre-ARNr, pero desempeña un papel esencial en el ensamblaje y la función del procesoma SSU (de Small SUBunit, la subunidad 40S del ribosoma) (revisado en Kufel y Grzechnik, 2019). Esta partícula prerribosómica, conocida también como 90S, se ha estudiado mejor en la levadura, aunque se tienen evidencias de su conservación en otras especies, como la humana o *Arabidopsis* (Prieto y McStay, 2007; Weis *et al.*, 2015; Martínez Fenoll, 2022). En la levadura, el procesoma SSU está formado por el snoARN U3 y más de 70 proteínas, incluyendo las U-three proteins (Utps), y se constituye cotranscripcionalmente en torno al pre-ARNr 35S,

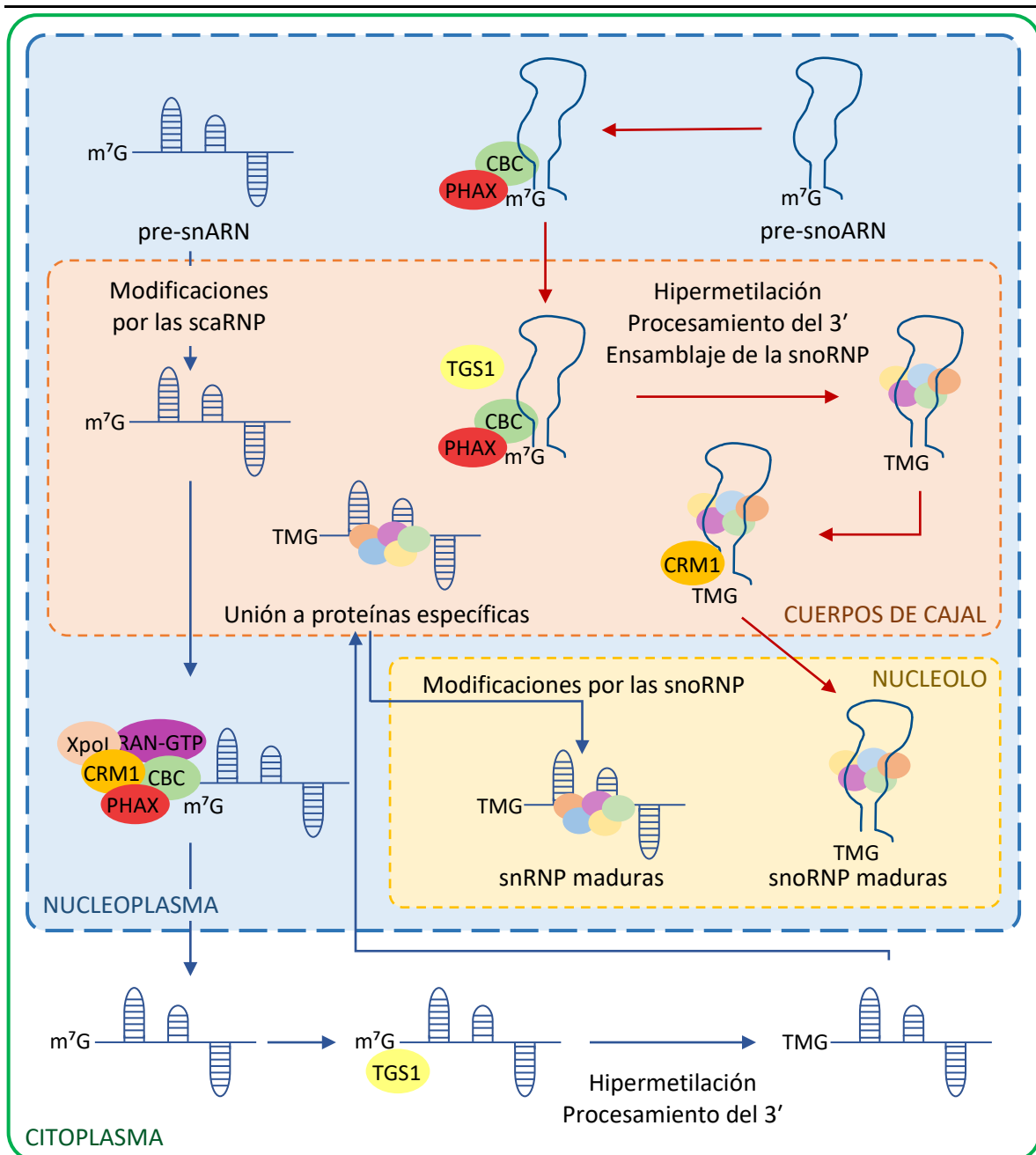
al que pliega, modifica y ensambla con las PR de la subunidad 40S del ribosoma (Phipps *et al.*, 2011). En las plantas brasicáceas, como *Arabidopsis*, la snoRNP U3, que fue estudiada por primera vez como el complejo Nuclear Factor D (NF-D) en la coliflor (Sáez-Vásquez *et al.*, 2004b; a), se une a la región clúster A<sub>123</sub>B situada en el 5'-ETS, y dirige el corte del pre-ARNr 45S en el sitio P, que es esencial para la maduración del ARNr 18S (Figura 1, en la página 5; revisado en Weis *et al.*, 2015; Sáez-Vásquez y Delseny, 2019).

#### II.4.- Las proteínas PHAX de los metazoos

Las proteínas Phosphorylated Adaptor for RNA export (PHAX) de los metazoos son esenciales para el procesamiento de los precursores de los snARN (pre-snARN) y snoARN (pre-snoARN), permitiendo su exportación al citoplasma o su transporte intranuclear desde el nucleoplasma a los cuerpos de Cajal, respectivamente, lugar donde concluye su maduración. La región evolutivamente conservada y funcional de las proteínas PHAX es un dominio de unión a ARN de 16 aminoácidos, de secuencia GG-A<sub>12</sub>-GG, donde A representa cualquier aminoácido, y que no muestra homología estructural con otros dominios conocidos de unión a ARN (Segref *et al.*, 2001).

Las proteínas PHAX se asocian con proteínas implicadas en el transporte de los pre-snARN y pre-snoARN, siendo esta asociación dependiente de la fosforilación de PHAX. Tras su transcripción, los pre-snARN son modificados por las scaRNP en los cuerpos de Cajal, y exportados al citoplasma asociados al complejo Cap Binding Complex (CBC), que a su vez se une a los factores Chromosome Region Maintenance 1/Exportin1 (CRM1/Xpo1) y Ras-Related Nuclear Protein (RAN)-GTP, gracias a la intermediación de PHAX. Una vez en el citoplasma, los pre-snARN son hipermetilados por la proteína Trimethylguanosine Synthase 1 (TGS1), procesados en su extremo 3' y reimportados al núcleo. Finalmente, en los cuerpos de Cajal los pre-snARN se unen a proteínas específicas, formando las snRNP, que son transportadas al nucleolo, donde las snoRNP las modifican, completando su maduración (Figura 2, en la página 8; Ohno *et al.*, 2000; Ohtani, 2017).

Por otro lado, el procesamiento de los pre-snoARN es distinto al de los pre-snARN, ya que ocurre en su totalidad en el núcleo. Se sospecha que algunas de sus etapas tienen lugar en los cuerpos de Cajal, ya que se han detectado pre-snoARN y snoARN en este compartimento nuclear. El transporte de los pre-snoARN del nucleoplasma a los cuerpos de Cajal es mediado por CBC y PHAX, y allí los pre-snoARN completan su maduración y se ensamblan las snoRNP. Estas son transportadas, finalmente, al nucleolo, donde modifican a las snRNP e intervienen en el procesamiento de los pre-ARNr (Figura 2, en la página 8; Watkins *et al.*, 2004; Kiss *et al.*, 2006; Verheggen y Bertrand, 2012).



**Figura 2.-** Esquema del procesamiento de los pre-snaARN y pre-snoARN en los mamíferos. Los pre-snaARN son transportados del nucleoplasma a los cuerpos de Cajal, donde las scaRNP los modifican, para después, ser exportados al citoplasma, gracias a la formación de un complejo de transporte, del cual forma parte PHAX. En el citoplasma, los pre-snaARN sufren una serie de modificaciones adicionales que les permiten regresar a los cuerpos de Cajal. Allí, se unen a proteínas específicas, formando las snRNP, que se procesan finalmente en el nucleolo. Los pre-snoARN son transportados a los cuerpos de Cajal, gracias a la unión de CBC y PHAX. En los cuerpos de Cajal, los pre-snoARN sufren una serie de modificaciones químicas, así como la unión de las proteínas específicas necesarias para la formación de las snoRNP. La interacción de las snoRNP con CRM1 posibilita su transporte al nucleolo, donde completan su maduración.

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



### III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En el laboratorio de J.L. Micol se inició en el año 1993 una búsqueda de mutantes de *Arabidopsis* que presentaran alteraciones en la arquitectura foliar, pero que, al mismo tiempo, fueran viables y fértiles, a fin de llevar a cabo una disección genética del desarrollo de la hoja. Para ello, se sometieron a una mutagénesis con metanosulfonato de etilo (EMS) semillas de la estirpe silvestre Lansberg *erecta*, tras la cual los mutantes resultantes se asignaron a 19 clases fenotípicas distintas en función de su morfología foliar (Berná *et al.*, 1999; Serrano-Cartagena *et al.*, 1999; Robles y Micol, 2001). Una de estas clases estaba compuesta por 41 mutantes, a los que se denominó *incurvata (icu)*, debido a que sus hojas vegetativas se recurvaban hacia el haz. Posteriormente, en el laboratorio de M.R. Ponce (en adelante, el o nuestro laboratorio) se llevó a cabo la clonación posicional de *icu9-1* e *icu9-2*, demostrando que ambos eran alelos hipomorfos del gen *ARGONAUTE1 (AGO1)* y pasando a denominarse, en consecuencia, *ago1-51* y *ago1-52*, respectivamente (Jover-Gil *et al.*, 2012). Las proteínas AGO están muy conservadas, encontrándose tanto en los organismos procariotas como en los eucariotas, y participan en rutas de silenciamiento génico transcripcional y postranscripcional.

Uno de los principales intereses de nuestro laboratorio es el estudio de las rutas de silenciamiento génico postranscripcional mediadas por los microARN (miARN), en las que la proteína AGO1 es la principal efectora en *Arabidopsis*. Los miARN son pequeños ARN monocatenarios que se incorporan a complejos de silenciamiento que contienen la proteína AGO1, la cual se encarga de catalizar el corte endonucleolítico del ARNm diana del miARN o de inhibir la traducción de dicho ARNm, obstaculizando el paso del ribosoma. En el año 2006, con el objetivo de identificar nuevos genes relacionados con la ruta de los miARN, se realizó una mutagénesis de segundos sitios con EMS de semillas del mutante *ago1-52*. Los cientos de dobles mutantes viables aislados en el laboratorio se clasificaron en función de su fenotipo morfológico. Entre ellos, 22 presentaron segundas mutaciones capaces de suprimir, en mayor o menor grado, el fenotipo del mutante *ago1-52*, recibiendo el nombre de *morphology of argonaute1-52 suppressed (mas)*; Micol-Ponce *et al.*, 2014). Mediante análisis de ligamiento a marcadores moleculares se identificó el gen AT4G02720 o *MAS2*, que codifica una proteína nuclear presuntamente ortóloga de la NF-κB activating protein humana (NKAP; Chen *et al.*, 2003), que es esencial y regula negativamente la expresión del ADNr 45S (Sánchez-García *et al.*, 2015).

Posteriormente, en un ensayo de doble híbrido de la levadura no dirigido, encargado a la empresa PanBionet (Pohang, Corea del Sur), *MAS2* interactuó con 14 proteínas presuntamente implicadas en el procesamiento del pre-ARNr 45S, la biogénesis y el

ensamblaje del ribosoma, la regulación del *splicing* de los pre-ARNm y la reparación de rupturas de doble cadena en el ADN (Sánchez-García *et al.*, 2015). En nuestro laboratorio se han estudiado funcionalmente algunos de estos interactores, entre ellos, las proteínas RIBOSOMAL RNA PROCESSING7 (RRP7; Micol-Ponce *et al.*, 2018) y SMALL ORGAN4 (SMO4; Zhang *et al.*, 2015; Micol-Ponce *et al.*, 2020). RRP7 es una proteína nucleolar y perinucleolar que, como sus ortólogas Rrp7 de la levadura (Baudin-Baillieu *et al.*, 1997; Krogan *et al.*, 2004) y RRP7A humana (Tafforeau *et al.*, 2013), actúa como un FBR en la maduración del ARNr 18S (Micol-Ponce *et al.*, 2020). SMO4 es un FBR nucleolar y nucleoplásmico que participa en la maduración del ARNr 5.8S (Micol-Ponce *et al.*, 2020), al igual que sus ortólogos Nucleolar protein53 (Nop53) de la levadura (Thomson y Tollervey, 2005) y Glioma tumor-suppressor candidate region gene2 (GLTSCR2) humano (Lee *et al.*, 2012).

En un análisis *in silico*, utilizando la base de datos ATTED-II v11 (<https://atted.jp/>; Obayashi *et al.*, 2022), se comprobó que el gen AT3G20430, que codifica una proteína presuntamente ortóloga de las PHAX de los metazoos (apartado II.4, en la página 7), se coexpresa con los genes AT5G38720 (*RRP7*) y AT2G40430 (*SMO4*).

En este Trabajo de Fin de Máster (TFM) se ha propuesto iniciar la caracterización funcional del gen AT3G20430. Para ello, se ha estudiado la conservación de la estructura primaria de las proteínas PHAX de algunas especies de referencia. Se han analizado las líneas SAIL\_241\_D10 y GK-094D08, portadoras de inserciones que interrumpen el gen a estudio, causando un fenotipo pleiotrópico muy aberrante y poco viable en las plantas homocigotas. Se ha empleado la tecnología Gateway para diseñar, generar y transferir a *Arabidopsis* tres transgenes, cuya expresión permitirá rescatar el fenotipo de los mutantes insercionales, determinar los efectos derivados de la sobreexpresión del gen AT3G20430, y establecer la localización subcelular de su producto proteico, la cual se ha analizado *in silico* de forma preliminar. Mediante análisis de *northern* y electroforesis capilar en un bioanalizador, se ha estudiado el procesamiento del pre-ARNr 45S y la abundancia relativa de los ARNr maduros del citoplasma y el cloroplasto en los mutantes insercionales. Además, se ha encargado a una empresa externa un ensayo de secuenciación masiva de ARNm, y su posterior análisis bioinformático, para estudiar la expresión génica y el *splicing* en los mutantes insercionales. Finalmente, se ha iniciado un análisis de interacciones genéticas, cruzando las plantas heterocigotas de las líneas SAIL\_241\_D10 y GK-094D08 por algunos mutantes de pérdida de función de genes que codifican FBR, PR o factores relacionados con el *splicing*, a fin de establecer si existe alguna relación funcional entre el gen AT3G20430 y los genes afectados en estos mutantes.

## **IV.- MATERIALES Y MÉTODOS**

## IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

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

Para la redacción de esta memoria se han seguido las pautas definidas en varias Tesis doctorales previas, Trabajos de Fin de Grado y Trabajos de Fin de Máster, realizados en los laboratorios de José Luis Micol y María Rosa Ponce, y que pueden consultarse en: <https://genetics.edu.umh.es>. En este apartado de Materiales y métodos se reproducen literalmente algunos párrafos de dichos trabajos, ya que corresponden a protocolos bien establecidos en ambos laboratorios.

Se utilizan numerosas abreviaturas y acrónimos, correspondientes en su mayoría a las unidades de medida del Sistema Internacional, y otras específicamente empleadas en Biología Molecular. Además, se ha procurado obedecer la normativa de la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) en lo referente a la formulación química y a las denominaciones de los compuestos utilizados en este trabajo. No obstante, se ha preferido emplear los acrónimos castellanizados ADN y ARN —de uso común en los medios de comunicación españoles—, en lugar de los recomendados por la IUPAC, DNA y RNA, para los ácidos desoxirribonucleico y ribonucleico, respectivamente.

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

#### IV.1.1.- Nomenclatura genética

Se mantiene la nomenclatura de los genes, proteínas y alelos que ha consagrado la comunidad de científicos de cada organismo, que incluye la regla general de que los genes y alelos se escriban en cursiva y las proteínas en tipografía normal. Por tanto, si la referencia es al gen o la proteína de *Saccharomyces cerevisiae*, aparecerá la primera letra con mayúscula y el resto con minúscula. Si se refiere a genes o proteínas de *Arabidopsis* o humanas el nombre abreviado se escribe con mayúsculas, por ejemplo, *PHAX* y PHAX. Los alelos de un gen se indican con letras mayúsculas para el silvestre (*PHAX*) y con minúsculas para los mutantes, con un guion seguido de un número para distinguir el alelo (*phax-1*, primer alelo mutante descrito del gen *PHAX*).

Los genes de *Arabidopsis* también se identifican con un código de letras y números en la forma ATXGYYYYY, sin cursiva. Las letras AT se corresponden con las iniciales del nombre científico de la especie, *Arabidopsis thaliana*. La X hace referencia al cromosoma al que pertenece el gen. La G indica que es un gen nuclear, mientras que los cinco dígitos

finales, YYYYYY, se corresponden con el orden en que se encuentra en el cromosoma, con relación al telómero superior. El número asignado a un gen suele diferir del anterior y del siguiente en 10 unidades, aunque hay numerosas excepciones. Por ejemplo, al gen *PHAX* le corresponde el código AT3G20430, y lo flanquean los genes AT3G20420 y AT3G20440.

Por otro lado, no existe una nomenclatura de aceptación general para los genotipos de *Arabidopsis*. En este trabajo, los mutantes homocigotos se muestran con el nombre del alelo mutante (por ejemplo, *phax-1*) y solo se especifica el genotipo completo, en el que los alelos en cromosomas homólogos se separan con una barra (por ejemplo, *PHAX/phax-1*), en el caso de los heterocigotos.

#### **IV.1.2.- Citas bibliográficas**

Para no extender la bibliografía, se ha optado por citar las revisiones más recientes, en lugar de los artículos originales, salvo cuando se hace referencia a genes concretos. Se ha usado EndNote (<https://endnote.com/>) para gestionar las citas bibliográficas, que se ordenan cronológicamente, siguiendo un orden alfabético para los autores de los artículos publicados el mismo año. Todos los autores de un artículo se mencionan en la bibliografía, mientras que en el texto solo se hace referencia al primero de ellos, salvo cuando son dos. También se citan como fuentes direcciones de Internet (URL; Uniform Resource Locator), en el formato <https://...>, aun sabiendo que muchas son temporales.

#### **IV.2.- Estirpes empleadas en este trabajo**

En este trabajo se han utilizado las estirpes silvestres de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Columbia-0 (Col-0) y Col-3, y las estirpes mutantes que se indican en la Tabla 1, en la página 13. Las semillas fueron obtenidas del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC; <https://arabidopsis.info/>), replicadas por autofecundación en nuestro laboratorio, y conservadas en tubos *ependorf* a 4°C. También se han usado las estirpes DH5α de *Escherichia coli* y C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens*.

#### **IV.3.- Condiciones de cultivo de Arabidopsis**

##### **IV.3.1.- Cultivo en placa de Petri**

La mayoría de los cultivos se iniciaron en placas de Petri de 15 cm de diámetro, que contenían unos 100 ml de medio sólido GM (apartado IV.6.1, en la página 16). La siembra de las semillas de *Arabidopsis* se realizó tras su esterilización por inmersión con agitación, durante 5 min, en etanol al 70% v/v, y después, durante 10 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, haciendo

al final tres lavados sucesivos con agua estéril. La siembra en placas de Petri se realizó con material estéril, en una cabina de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Se sembraron de 16 a 60 semillas por placa, espaciándolas regularmente sobre la superficie del medio con ayuda de una pipeta Pasteur y una plantilla dispuesta bajo la placa. Tras su siembra, las placas de Petri se precintaron con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, que constituye una barrera efectiva para los aerosoles, sin impedir el intercambio de gases con el exterior. Las placas inoculadas con las semillas se estratificaron durante al menos 24 h en posición invertida, a 4°C y en oscuridad, a fin de sincronizar su germinación, tras lo que fueron cultivadas a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  y 50-60% de humedad relativa, bajo iluminación continua de  $75 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$  de luz blanca, suministrada por tubos LED Sylvania ToLEDo T8 V6 2FT 10W 1000LM 840 RL en cámaras de cultivo Conviron TC16 o TC30, en las que el flujo de aire es permanentemente ascendente.

El crecimiento de las plantas 14-21 días después de la estratificación (dde) es tal que se puede apreciar a simple vista la arquitectura de la roseta y de sus hojas vegetativas, pudiendo distinguir a las mutantes de las silvestres en base a sus diferencias morfológicas. Las plantas de interés fueron después trasplantadas a macetas, en las que completaron su ciclo de vida en las condiciones que se detallan en el apartado siguiente.

**Tabla 1.-** Estirpes mutantes de *Arabidopsis* empleadas en este trabajo

Línea	Fondo	Alelo	Gen	Proteína	Mutágeno, mutación	Efecto en la proteína
<i>qrt1-2</i> <sup>a</sup>	Col-3	<i>qrt1-2</i>	AT5G55590	QRT1	Neutrones, puntual	Truncamiento
SAIL_241_D10 <sup>b</sup>	<i>qrt1-2</i>	<i>phax-1</i>	AT3G20430	PHAX	ADN-T, inserción	Truncamiento
GK-094D08 <sup>c</sup>	Col-0	<i>phax-2</i>	AT3G20430	PHAX	ADN-T, inserción	Truncamiento
SAIL_245_H11 <sup>b</sup>	<i>qrt1-2</i>	<i>abs-1</i>	AT5G51280	ABS	ADN-T, inserción	Truncamiento
SAIL_50_C11 <sup>b,d</sup>	<i>qrt1-2</i>	<i>mtr4-2</i>	AT1G59760	MTR4	ADN-T, inserción	Truncamiento
SALK_071764 <sup>e,f</sup>	Col-0	<i>smo4-3</i>	AT2G40430	SMO4	ADN-T, inserción	Truncamiento
<i>amiR-MAS2</i> <sup>g</sup>	Col-0		AT4G02720	MAS2	ADN-T, inserción <sup>l</sup>	Disminución
SALK_002764 <sup>e,h</sup>	Col-0	<i>par11-2</i>	AT1G48920	PARL1	ADN-T, inserción	Truncamiento
SALK_000766 <sup>e,i</sup>	Col-0	<i>rps24b-2</i>	AT5G28060	RPS24B	ADN-T, inserción	Truncamiento
SALK_044245 <sup>e</sup>	Col-0	<i>cxip4-2</i>	AT2G28910	CXIP4	ADN-T, inserción	Truncamiento
SAIL_628_F08 <sup>j</sup>	Col-0	<i>rrp7-1</i>	AT5G38720	RRP7	ADN-T, inserción	Truncamiento
<i>prp8-7</i> <sup>k</sup>	Col-0	<i>prp8-7</i>	AT1G80070	PRP8	EMS, puntual	G1820E

<sup>a</sup>Preuss *et al.*, 1994; Copenhaver *et al.*, 1998; Francis *et al.*, 2006. <sup>b</sup>Sessions *et al.*, 2002. <sup>c</sup>Rosso *et al.*, 2003. <sup>d</sup>Lange *et al.*, 2011. <sup>e</sup>Alonso *et al.*, 2003. <sup>f</sup>Micol-Ponce *et al.*, 2020. <sup>g</sup>Sánchez-García *et al.*, 2015. <sup>h</sup>Petricka y Nelson, 2007. <sup>i</sup>Horiguchi *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2018; Cabezas-Fuster *et al.*, 2023. <sup>j</sup>McElver *et al.*, 2001. Micol-Ponce *et al.*, 2018. <sup>k</sup>Sasaki *et al.*, 2012; Sasaki *et al.*, 2015. <sup>l</sup>En las plantas *amiR-MAS2*, la inserción de ADN-T contiene la secuencia de un gen que da lugar a un microARN artificial que silencia parcialmente el gen AT4G02720.

### IV.3.2.- Cultivo en maceta y recolección de semillas

Los cultivos en maceta se efectuaron en bandejas de plástico de 28 × 50 cm, con 42 alveolos, cada uno de 5 × 5 cm (diámetro × altura), colocadas en cubetas de 7 cm de profundidad. En cada alveolo se introdujo una maceta de rejilla de 5 × 5 cm (diámetro × altura), previamente rellena con el sustrato. Estas macetas impiden que el sustrato se adhiera al alveolo, y facilitan la extracción de las plantas para la realización de cruzamientos o la recolección de semillas. Se usó como sustrato una mezcla de perlita (granulometría de 1 a 3 mm; 105-125 kg/m<sup>3</sup>), vermiculita (granulometría de 1 a 3 mm; 80-100 kg/m<sup>3</sup>) y turba no fertilizada (turba rubia de musgo *Sphagnum*, de estructura gruesa; Grobmul Neuhaus), en una proporción volumétrica 2:2:1. Cada alveolo se destinó al cultivo de una sola planta, que 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.

Durante tres días, los cultivos permanecieron cubiertos con un plástico transparente perforado, a fin de evitar una excesiva condensación de agua. Cuando se produjo el alzado y la elongación de los entrenudos al término de la etapa vegetativa, se aisló a las plantas en cilindros de plástico transparente, denominados aracones (aracons; Beta Tech), que impiden el contacto entre individuos adyacentes y facilitan la recolección de las semillas.

Para la transformación de sus órganos florales por infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*, se trasplantaron 9-16 plantas a macetas de polietileno rígido de 10 × 10 × 10 cm (largo × ancho × alto), colocadas en cubetas de 7 cm de profundidad, que se cubrieron con un plástico transparente. Este último fue retirado tres días después, a fin de que las plantas creciesen hasta alcanzar el tamaño óptimo para su transformación.

Todos los cultivos se mantuvieron en una cámara climatizada visitable, a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  y 50-60% de humedad relativa, bajo iluminación continua de 75  $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$  de luz blanca, suministrada por tubos LED Sylvania ToLEDo T8 V7 4FT 2000LM 840 RL.

Las bandejas permanecieron subirrigadas, manteniéndose un nivel de unos 2-3 cm de agua en el fondo de las cubetas. El aporte de nutrientes se hizo dos veces por semana, mediante la adición de una cantidad saturante de medio mínimo ATM (apartado IV.6.1, en la página 16). Cuando la floración se interrumpió, se suspendió el riego, propiciándose el secado de las plantas, que se mantuvieron en la cámara de cultivo al menos dos semanas más, para proceder finalmente a la recolección de sus semillas.

Para la recolección de las semillas de una planta seca, fruto de su autofecundación, esta se presionó contra un colador, el cual se sujetó sobre un papel de filtro sobre 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, fue cribada a través de un colador adecuado,

para eliminar en lo posible todas las partículas con un tamaño superior al de las semillas. Estas últimas se almacenaron en tubos *ependorf*, que se conservaron a 4°C.

#### **IV.4.- Cruzamientos**

Seguimos el procedimiento de emasculación descrito por Kranz y Kirchheim (1987) para el cruzamiento entre estirpes, una de las cuales se utilizó como donante (parental masculino), y la otra, como receptora de polen (parental femenino).

Para hacer el cruzamiento, se eligió un grupo de capullos florales en el ápice de un tallo inflorescente de la planta que se usó como parental femenino, eliminando las flores maduras, presuntamente autofecundadas, y los capullos, a excepción de aquellos cuyos pétalos fueron apenas visibles. A estos se les extirparon los sépalos, pétalos y estambres inmaduros, obteniendo flores con un pistilo no fecundado como única estructura funcional. Estas manipulaciones se realizaron con pinzas de microcirugía esterilizadas por inmersión en etanol al 95% v/v y secadas al aire, para destruir cualquier traza de polen contaminante que pudiera haber. De la planta donante de polen se extirpó una flor madura, presionándola con las pinzas a la altura de los sépalos, a fin de poner en contacto varias de sus anteras con el pistilo de la flor receptora del polen. El cruzamiento se señaló adheriendo al tallo, junto a la flor fecundada, una etiqueta en la que se indicó el genotipo del parental masculino empleado para la polinización. Finalmente, la planta fecundada por este procedimiento fue devuelta a la cámara de cultivo, en la que permaneció hasta la formación y maduración de la silicua, que fue recogida y depositada en un tubo *ependorf* adecuadamente rotulado.

#### **IV.5.- Condiciones de los cultivos bacterianos**

Los cultivos en medio líquido se realizaron en recipientes estériles, cuya capacidad excedía al menos dos veces el volumen de medio utilizado, garantizando así una aireación suficiente durante el período de incubación. Se usó un incubador dotado de una plataforma orbital (NBS Innova 44, 4000 o 4260), con una agitación de 225 rpm, y una temperatura de 37°C para el cultivo de *Escherichia coli*, o de 28°C para el de *Agrobacterium tumefaciens*.

Los cultivos en placas de Petri de 9 cm de diámetro se inocularon con 250-500 µl de precultivo líquido, que fue esparcido por el medio haciendo que rodaran sobre su superficie seis perlas de vidrio estériles, de 3 mm de diámetro. Las placas inoculadas con las bacterias se incubaron en posición invertida, durante 24 h a 37°C para el cultivo de *Escherichia coli*, o durante 48 h a 28°C para el de *Agrobacterium tumefaciens*.



## IV.6.- Disoluciones

Todas las disoluciones que se mencionan en este apartado se prepararon utilizando agua desionizada, con una resistividad media de  $15 \text{ M}\Omega/\text{mm}^2\cdot\text{m}$ . Además, se conservaron a temperatura ambiente, salvo aquellas para las que se indica una temperatura diferente. Las esterilizaciones en autoclave se efectuaron a  $1 \text{ kg}/\text{cm}^2$  y  $121^\circ\text{C}$  durante 20 min. Las sustancias termolábiles fueron esterilizadas mediante filtración forzada por aspiración, a través de filtros Millipore de  $0,22$  o  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

### IV.6.1.- Medios de cultivo para Arabidopsis

**Medio mínimo ATM (líquido):**  $\text{KNO}_3$  5 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,5 mM;  $\text{MgSO}_4$  2 mM;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2 mM;  $\text{FeNaEDTA}$  51  $\mu\text{M}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  70  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MnCl}_2$  14  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CuSO}_4$  0,5  $\mu\text{M}$ ;  $\text{ZnSO}_4$  1  $\mu\text{M}$ ;  $\text{NaMoO}_4$  0,2  $\mu\text{M}$ ;  $\text{NaCl}$  10  $\mu\text{M}$ , y  $\text{CoCl}_2$  0,01  $\mu\text{M}$  (Kranz y Kirchheim, 1987).

Para su preparación se añadieron, a 900 ml de agua, 5 ml de  $\text{KNO}_3$  1 M; 2,5 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 M; 2 ml de  $\text{MgSO}_4$  1 M; 2 ml de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  1 M; 2 ml de  $\text{FeNaEDTA}$  20 mM, y 1 ml de la disolución de micronutrientes, ajustando el volumen final a 1 l. Las disoluciones madre se prepararon en las concentraciones indicadas y se esterilizaron por filtración. Las disoluciones madre de las sales se añadieron 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:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  70 mM;  $\text{MnCl}_2$  14 mM;  $\text{CuSO}_4$  0,5 mM;  $\text{ZnSO}_4$  1 mM;  $\text{NaMoO}_4$  0,2 mM;  $\text{NaCl}$  10 mM, y  $\text{CoCl}_2$  0,01 mM. Esta se preparó añadiendo, a 900 ml de agua, 4,32 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 2,77 g de  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 124 mg de  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 287 mg de  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 48,7 mg de  $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 584,4 mg de  $\text{NaCl}$ , y 2,38 mg de  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Por último, se añadió agua hasta 1 l.

**Medio GM (Germination Medium; sólido):**  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  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  $\mu\text{M}$ ;  $\text{KI}$  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 0,6% m/v de Gelrite.

Para su preparación se añadieron, a 900 ml de agua, 2,2 g de sales de Murashige y Skoog (Duchefa Biochemie; Murashige y Skoog, 1962), 10 g de sacarosa y 0,5 g de MES. Se agitó la suspensión en un agitador magnético hasta la disolución de todos sus componentes y se ajustó el pH a 5,7 con  $\text{KOH}$  5 M y  $\text{KOH}$  1 M (este último sirvió para aproximar el pH lo máximo posible). Posteriormente, se ajustó el volumen final a 1 l, se añadieron 6 g de Gelrite (Duchefa Biochemie), y se esterilizó en autoclave. Tras su esterilización, se mantuvo durante 30 min en un baño a  $55^\circ\text{C}$  antes de su vertido en placas

de Petri de 15 cm de diámetro, que se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Las placas de Petri con medio sólido GM se conservaron hasta un mes a 4°C, en posición invertida y bien precintadas.

#### **IV.6.2.- Medios de cultivo para bacterias**

**LB (Luria - Bertani) líquido:** 1% m/v de bacto-triptona; 0,5% m/v de extracto de levadura, y 1% m/v de NaCl. Para su preparación se añadieron, a 800 ml de agua, 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Se agitó la suspensión en un agitador magnético hasta la disolución de todos sus componentes y se ajustó el pH a 7,5 con NaOH 5 M. Por último, se ajustó el volumen final a 1 l y se esterilizó en autoclave.

**LB sólido:** 1% m/v de bacto-triptona; 0,5% m/v de extracto de levadura; 1% m/v de NaCl, y 1,5% m/v de agar bacteriológico ultrapuro (Thermo Scientific). Para su preparación se añadieron 15 g de agar bacteriológico ultrapuro al medio LB líquido antes de esterilizarlo en autoclave. Tras su esterilización, se mantuvo durante 30 min en un baño a 55°C antes de su vertido en placas de Petri de 9 cm de diámetro, que se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal. Las placas de Petri con medio LB sólido se conservaron hasta un mes a 4°C, en posición invertida y bien precintadas.

Algunos de estos medios de cultivo fueron suplementados con antibióticos, a una concentración final de 100 mg/l en el caso de la ampicilina, 50 mg/l para la kanamicina y 25 mg/l para la rifampicina, disolviendo los antibióticos en agua (a partir de disoluciones madre 1.000 veces más concentradas que las de trabajo), y esterilizando las disoluciones resultantes por filtración, que se conservaron a -20°C alicuotadas en tubos *ependorf*. Los antibióticos se añadieron al medio de cultivo después de la esterilización en autoclave de este último, y tras mantenerlo durante 30 min en un baño a 55°C.

#### **IV.6.3.- Tampones y otras disoluciones de uso general**

##### **IV.6.3.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico**

**Tampón de extracción:** Tris-HCl 100 mM pH 8; Na<sub>2</sub>EDTA 50 mM, y NaCl 0,5 M. Se preparó a partir de las disoluciones madre Tris-HCl 1 M pH 8; Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 M pH 8, y NaCl 5 M. Se conservó hasta un mes a 4°C.

**SDS al 20% m/v:** Se preparó disolviendo, a una temperatura de 68°C, 100 g de SDS (dodecil sulfato de sodio) en 500 ml de agua, y ajustando el pH a 7,2 con HCl 1 N.

**Acetato de potasio 5 M pH 7,5:** Se preparó disolviendo 49,1 g de acetato de potasio (KCH<sub>3</sub>COO) en 100 ml de agua, y ajustando el pH a 7,5 con ácido acético glacial en una campana extractora de gases.

**Acetato de sodio 3 M pH 5,2:** Se preparó disolviendo 12,3 g de acetato de sodio ( $\text{NaCH}_3\text{COO}$ ) en 50 ml de agua, y ajustando el pH a 5,2 con ácido acético glacial en una campana extractora de gases. Por último, se esterilizó en autoclave.

#### IV.6.3.2.- Disoluciones para la electroforesis de ADN en geles de agarosa

**Tampón 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. Para preparar 1 l de tampón 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.

**Tampón de carga 6x:** 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:** Se diluyó el marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder de Invitrogen; 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en el tampón de carga hasta una concentración de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Se usaron 10  $\mu\text{l}$  por pocillo de un gel de agarosa convencional. Se conservó a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### IV.6.4.- Tampones y disoluciones para los análisis de *northern*

En todas las disoluciones se utilizó agua desionizada tratada con 0,1% v/v de DEPC (dietil pirocarbonato), para inactivar las ARNasas. Para prepararla, se añadió 1 ml de DEPC a 1 l de agua, en una campana extractora de gases, agitando la solución hasta resuspender por completo el DEPC, que es poco soluble en agua. Se mantuvo a temperatura ambiente y protegida de la luz durante al menos 16 h, y se esterilizó en autoclave.

##### IV.6.4.1.- Disoluciones para la electroforesis de ARN en geles de agarosa

**Tampón MOPS 10x pH 7:** MOPS [ácido 3-(N-morfolino)-propano sulfónico] 0,2 M;  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  50 mM, y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  10 mM. Para preparar 1 l de tampón se disolvieron 41,2 g de MOPS, 6,57 g de  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  y 3,7 g de EDTA en 800 ml de agua, y se ajustó el pH a 7 con  $\text{NaOH}$  5 M. Por último, se ajustó el volumen a 1 l y se mantuvo protegido de la luz.

**Tampón de carga 6x:** 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.

**Mezcla de carga:** Para preparar el volumen necesario para una muestra de ARN o de marcador de peso molecular, se mezclaron 12  $\mu\text{l}$  de formamida desionizada; 4,44  $\mu\text{l}$  de formaldehído al 37% v/v; 1,2  $\mu\text{l}$  de tampón MOPS 10x pH 7; 2,4  $\mu\text{l}$  de tampón de carga 6x y 0,18  $\mu\text{l}$  de bromuro de etidio al 10% m/v.

**Marcador de peso molecular:** Se diluyó el marcador de peso molecular (0.3-6.9 kb RNA molecular weight marker I DIG-labeled de Roche; 20  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) en 2  $\mu\text{l}$  de agua y 20,22  $\mu\text{l}$  de la mezcla de carga hasta una concentración de 3,05  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .

#### **IV.6.4.2.- Disoluciones para la transferencia de ARN del gel a una membrana**

**Tampón SSC 20× pH 7:** NaCl 3 M, y citrato de sodio 0,3 M. Para preparar 1 l se disolvieron 175,3 g de NaCl y 88,2 g de citrato de sodio en 700 ml de agua, y se ajustó el pH a 7 con HCl 1 M. Por último, se ajustó el volumen final a 1 l y se esterilizó en autoclave.

#### **IV.6.4.3.- Disoluciones para la hibridación, los lavados y la detección**

**Disolución de prehibridación:** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 M pH 7,2; Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, y 7% m/v de SDS. Para preparar 100 ml se disolvieron 13,4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O en 55 ml de agua. A continuación, en una campana extractora de gases se añadieron 0,4 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85% v/v y 2 ml de Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 M pH 8, y se esterilizó en autoclave. Por último, se añadieron 35 ml de SDS al 20% v/v, y se ajustó el volumen final a 100 ml.

**Disoluciones de lavado 1 y 2:** SSC 2× (1) o SSC 0,2× (2), y 0,1% v/v de SDS. Se prepararon a partir de las disoluciones madre SSC 20× pH 7, y SDS al 20% v/v.

**Disoluciones de detección 1 y 2 pH 8:** ácido maleico 100 mM; NaCl 0,15 M; 3% v/v de Tween 20, y 0,5% m/v de agente bloqueante (este último solo es un componente de la disolución de detección 2). Para preparar 1 l de estas dos disoluciones se disolvieron 11,68 g de ácido maleico y 8,76 g de NaCl en 700 ml de agua, y se ajustó el pH a 8 con lentejas de NaOH y NaOH 5 M (este último solo se usó para ajustar el pH cuando estuvo próximo a 8). Se ajustó el volumen de las disoluciones a 997 ml, y ambas se esterizaron en autoclave. Finalmente, a la disolución de detección 1 se le añadieron 3 ml de Tween 20, mientras que a la 2 se le añadieron 5 g de agente bloqueante (Roche), que se disolvieron en un microondas, y tras enfriarse, se le añadieron 3 ml de Tween 20.

**Disolución de detección 3 pH 9,5:** Tris-HCl 100 mM pH 8, y NaCl 100 mM. Se preparó a partir de las disoluciones madre Tris-HCl 1 M pH 8, y NaCl 1 M, y se ajustó el pH a 9,5 con NaOH 5 M.

### **IV.7.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos**

#### **IV.7.1.- Aislamiento de ácidos nucleicos**

##### **IV.7.1.1.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis**

El ADN genómico usado como molde en las amplificaciones por PCR (Mullis *et al.*, 1986) se purificó utilizando una versión simplificada del método de Dellaporta *et al.* (1983). Para ello, se introdujo en un tubo *ependorf* el material vegetal, una hoja o cotiledón de la roseta de plantas 14 o 21 dde, y después se añadieron 500 µl de tampón de extracción y 3 perlas de vidrio de 3 mm de diámetro, esterilizadas en autoclave. La muestra se maceró a 30 Hz durante 3 min en un macerador automático (MM400; Retsch). A continuación, se

añadieron 35 µl de SDS al 20% v/v, y se incubó la muestra durante 5 min a 65°C. Después, se añadieron 130 µl de KCH<sub>3</sub>COO 5 M, incubando la muestra 8 min a 4°C, y centrifugándola durante 10 min a 13.500 rpm en una microfuga. El sobrenadante se transfirió a otro tubo *ependorf*, y se precipitó el ADN, incubando la muestra con 640 µl de isopropanol y 60 µl de NaCH<sub>3</sub>COO 3 M durante 20 min a -20°C. Seguidamente, se centrifugó durante 10 min a 12.500 rpm, eliminando el sobrenadante por decantación y lavando el precipitado con 300 µl de etanol al 70% v/v. Se centrifugó otra vez durante 5 min a 13.500 rpm, se retiró el sobrenadante, y se dejó secar el precipitado. Finalmente, se resuspendió el ADN genómico en 50-100 µl de agua (según el material vegetal de partida), y se conservó a -20°C.

#### **IV.7.1.2.- Aislamiento de ADN plasmídico**

Se hicieron minipreparaciones (*minipreps*), o preparaciones a pequeña escala de ADN plasmídico, a partir de cultivos bacterianos de 3 ml de medio LB líquido (apartado IV.6.2, en la página 17), empleando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se eluyó el ADN plasmídico en 50 µl de agua, se determinó su concentración y pureza con un espectrofotómetro, y se conservó a -20°C.

#### **IV.7.1.3.- Aislamiento de ARN total de Arabidopsis**

El ARN total usado en los análisis de *northern*, y enviado a secuenciar masivamente a la empresa Novogene (Cambridge, Reino Unido), se extrajo con TRIzol (Invitrogen), una mezcla comercial que contiene 30-60% m/v de fenol, 25-40% m/v de tiocianato de guanidinio, y 7-13% m/v de tiocianato de amonio. Debido a la toxicidad del TRIzol, las extracciones se realizaron en una campana extractora de gases, y todas las centrifugaciones se hicieron en una microfuga refrigerada, a 4°C. En primer lugar, se introdujeron en un tubo *ependorf* libre de ARNasas entre 3 y 17 rosetas sin la raíz de plantas 21 dde, que se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. La extracción de ARN total se inició añadiendo nitrógeno líquido a la muestra congelada, para después macerarla con un palillo de plástico libre de ARNasas. Tras evaporarse el nitrógeno, se añadieron 400 µl de TRIzol y se siguió macerando el tejido, manteniendo la muestra en hielo. A continuación, se añadieron 600 µl más de TRIzol, para después homogeneizar la muestra durante 10 s en un agitador *vortex*, e incubarla 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifugó durante 15 min a 14.000 rpm, tras lo cual se transfirieron 900 µl del sobrenadante a un tubo *ependorf* libre de ARNasas con 200 µl de cloroformo. Para asegurar la mezcla, se agitó vigorosamente, y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Después, se centrifugó durante 15 min a 14.000 rpm, tras lo cual se transfirió la fase acuosa (ARN) a un tubo *ependorf* libre de

ARNasas con 500  $\mu$ l de isopropanol, procurando no tocar con la punta de la pipeta la fase orgánica (proteínas), ni la interfase (ADN). Se mezcló la muestra por inversión, antes de incubarla durante 10 min a temperatura ambiente, y centrifugarla 10 min a 14.000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 75% v/v. Se centrifugó otra vez 5 min a 8.000 rpm, se retiró el sobrenadante, y durante 10 min se dejó secar el precipitado. Finalmente, se resuspendió el ARN total en 40  $\mu$ l de agua desionizada tratada con 0,1% v/v de DEPC, incubando la muestra durante 40 min a 60°C y 300 rpm, para después conservarla a -80°C.

#### **IV.7.2.- Amplificaciones mediante PCR**

Se realizaron amplificaciones mediante PCR con varios propósitos, a partir de ADN genómico de *Arabidopsis* o ADN plasmídico de bacterias. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 o 20  $\mu$ l, en tubos *ependorf* de pared fina de 0,2 ml, y en termocicladores Bio-Rad T100. De forma rutinaria, se usó la polimerasa de ADN GoTaq G2 Flexi (Promega) a una concentración final de 0,04 U/ $\mu$ l, salvo cuando se precisó una gran fidelidad de copia y se utilizó la polimerasa de ADN Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific) a una concentración final de 0,02 U/ $\mu$ l. Los oligonucleótidos empleados como cebadores (Tabla 2, en la página 22), y los desoxirribonucleótidos se añadieron a una concentración final de 0,4  $\mu$ M y 0,2 mM, respectivamente. Los programas de PCR utilizados se detallan en la Tabla 3, en la página 23.

#### **IV.7.3.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

Se emplearon geles de agarosa al 1% m/v, y como electrolito, TAE 1 $\times$ , que se preparó a partir de tampón TAE 50 $\times$  (apartado IV.6.3.2, en la página 18). Se disolvió la agarosa en TAE 1 $\times$  por calentamiento en un microondas, y una vez enfriada la disolución a 55°C, se añadió bromuro de etidio a una concentración de 0,5  $\mu$ g/ml. Las electroforesis se hicieron en cubetas horizontales, a voltaje constante de 100 V, y durante 30-40 min. Para visualizar las moléculas de ADN, se iluminaron los geles con luz UV de 312 nm, y se tomaron fotografías en un documentador de geles Vilber E-Box VX5.

#### **IV.7.4.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN**

Se empleó la variante del método de Sanger semiautomatizada, que se basa en el uso de didesoxinucleótidos terminadores marcados con fluorocromos (Smith *et al.*, 1986). Las secuencias fueron obtenidas por la empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal), a la que se enviaron muestras de 20  $\mu$ l, que contenían al menos 2  $\mu$ g de ADN plasmídico obtenido

de una minipreparación (apartado IV.7.1.2, en la página 20), o bien, productos de PCR previamente tratados con 1,5 µl de Exonucleasa I (Exo I; 1 U/µl) y 1 µl de FastAp (1 U/µl), ambas de Invitrogen, para la eliminación de los cebadores y los desoxirribonucleótidos no incorporados durante las amplificaciones. También se enviaron a STAB VIDA alícuotas de 5 µl de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de secuenciación (Tabla 2), a una concentración de 10 µM. Algunas posiciones ambiguas en las secuencias obtenidas por STAB VIDA se esclarecieron en el laboratorio mediante la magnificación de los electroferogramas con el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v10.2.6 (<https://www.megasoftware.net>).

**Tabla 2.-** Oligonucleótidos empleados como cebadores en este trabajo

Propósito	Nombre	Secuencia (5'→3')
Genotipado y secuenciación	AT3G20430-F1 <sup>a,e</sup>	TTCCCTTCTCTTGTGCACATC
	AT3G20430-R1 <sup>a</sup>	AGACCAATTCATCTCGTGGTG
	LB_SAIL <sup>b</sup>	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
	LB_GK <sup>c</sup>	ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT
	AT5G55590-F <sup>d</sup>	GATGATGGTAATGTTTATGTTTGAGG
	AT5G55590-R <sup>d</sup>	CAAACACGGTTTATGTCTTAAATC
	AT5G51280-F <sup>a</sup>	TATTGCATGATGTCATGCACC
	AT5G51280-R <sup>a</sup>	CTTCCAATTCCGAAGCTTTTC
Amplificación de los insertos	attB1-PHAX <sup>prof</sup>	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttt ATAGGTAATTTGAGATTGCTAAACC
	attB1-PHAX <sup>e,f</sup>	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttt ATGGAGGGAGAAGAGAGTTT
	attB2-PHAX(-TAA) <sup>g</sup>	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtg AGCAGAAGGATGATGTGCTA
	attB2-PHAX(+TAA) <sup>g</sup>	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtg TTAAGCAGAAGGATGATGTGC
Verificación de los transgenes	AT3G20430-F2 <sup>a</sup>	GCTATGGTTGAAACGTTGCTC
	AT3G20430-R2 <sup>a</sup>	CAGATTTCTTTCTTTTCCG
	pMDC107-F	CTGCAAGGCGATTAAGTTG
	attB1-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAG
	GFP-R	CCATGCCTGAGGGATACGTG
	YFP-R	GCATGGACGAGCTGTACAAG
	M13-R	AATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG
	35S <sub>pro</sub> -F	CTATCCTTCGCAAGACCCTTC

<sup>a-d</sup>Las secuencias de estos cebadores se obtuvieron de <sup>a</sup><http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>,

<sup>b</sup>Sessions *et al.* (2002), <sup>c</sup>Kleinboelting *et al.* (2012), y <sup>d</sup>Francis *et al.* (2006). <sup>e</sup>Estos cebadores también se han usado para la verificación de los transgenes. <sup>f,g</sup>Los extremos 5' de estos cebadores incluyen las secuencias <sup>f</sup>attB1 y <sup>g</sup>attB2, que se indican con letras minúsculas.

**Tabla 3.- Programas de PCR empleados en este trabajo**

Polimerasa	Programa
GoTaq	94°C, 3 min <sup>a</sup> ; 35 o 40 x (94°C, 30 s; 55-60°C, 30 s; 72°C, 1 min/kb) <sup>b</sup> ; 72°C, 5 min <sup>c</sup>
Phusion	98°C, 30 s <sup>a</sup> ; 35 x (98°C, 10 s; 60°C, 30 s; 72°C, 30 s/kb) <sup>b</sup> ; 72°C, 7 min <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Etapa inicial de desnaturalización del ADN usado como molde. <sup>b</sup>Etapa intermedia de 35 o 40 ciclos en los que se repitió una primera fase de desnaturalización del ADN molde, otra a la temperatura de apareamiento para la hibridación de los cebadores, y una tercera fase a 72°C para la polimerización, de duración variable según el tamaño del fragmento a amplificar y la polimerasa de ADN utilizada. <sup>c</sup>Etapa final a 72°C para el rellenado de las moléculas bicatenarias con colas protuberantes en 5'.

#### IV.7.5.- Electroforesis capilar de ARN total en un bioanalizador

La integridad del ARN total extraído se determinó en un bioanalizador Agilent 2100, utilizando el kit Agilent RNA 6000 Nano (Agilent Technologies) y un chip de 16 pocillos RNA Nano LabChip (Agilent Technologies), y siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes, se prepararon alícuotas de 4 µl de todas las muestras de ARN total obtenidas, diluyéndolas en agua desionizada tratada con 0,1% v/v de DEPC hasta una concentración de 250 ng/µl, de las cuales se cargó 1 µl en los pocillos del chip.

Para el análisis se utilizó el programa 2100 Expert Software (Agilent Technologies) y como tipo de experimento, el Plant RNA Nano, que tiene una duración de unos 30 min. Transcurrido este tiempo, se verificaron los resultados de todas las electroforesis capilares, comprobando que los picos en los electroferogramas estuviesen bien resueltos, y que los correspondientes a los ARNr 25S y 18S hubiesen sido seleccionados correctamente por el programa. De lo anterior depende el cálculo del RNA Integrity Number (RIN), un algoritmo creado por Agilent Technologies basado en el tamaño y área de los picos de estos ARNr, que clasifica los perfiles de ARN total eucariótico en un sistema de numeración del 1 al 10, siendo 1 el más degradado y 10 el de mayor integridad y pureza (Schroeder *et al.*, 2006). Así, se comprobó que el RIN fuese superior a 6,5 en todas las muestras, considerando este ARN total lo suficientemente puro e intacto para su uso posterior.

Finalmente, se calcularon los cocientes entre las concentraciones relativas de los ARNr del citoplasma (25S y 18S) y del cloroplasto (16S, 23Sa y 23Sb): 25S:18S, 18S:16S, 18S:23Sa, 18S:23Sb, 16S:23Sa y 16S:23Sb.

#### IV.8.- Análisis de *northern*

Los análisis de *northern* sirvieron para la detección de diferentes precursores de los ARNr en muestras de ARN total de Arabidopsis, utilizando para ello sondas de ADN de secuencia complementaria a las de los precursores de interés.



Todos los tampones, disoluciones y diluciones empleados se prepararon con agua desionizada tratada con 0,1% v/v de DEPC (apartado IV.6.4, en la página 18), y el material utilizado se esterilizó en autoclave dos veces, o se limpió con etanol al 70% v/v.

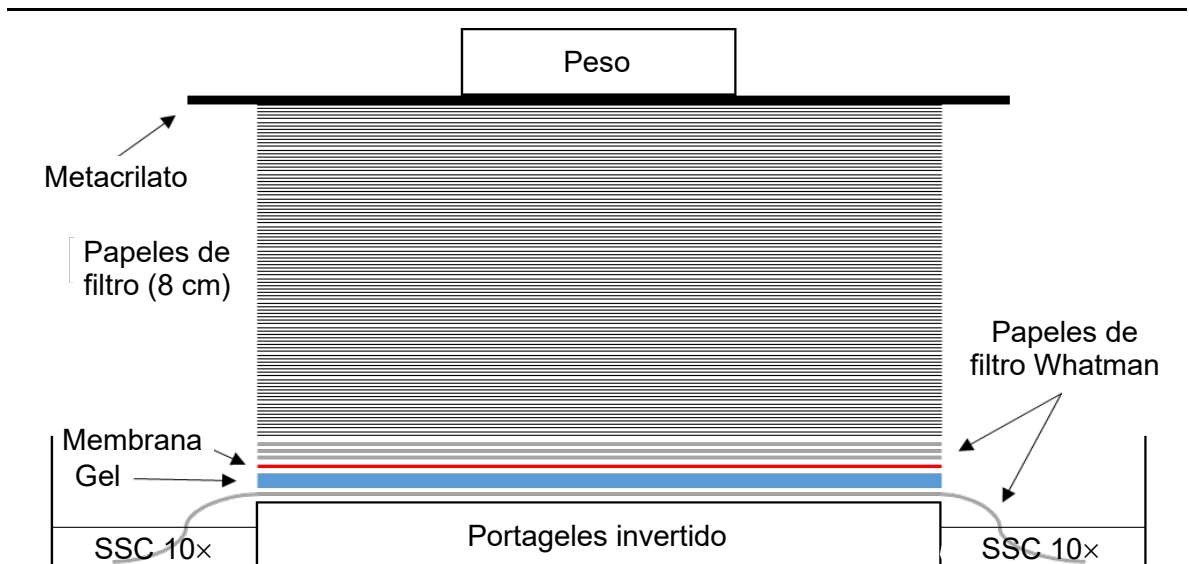
Para las electroforesis de ARN se utilizaron geles de agarosa al 1,4% m/v, y como electrolito, MOPS 1×, que se preparó a partir de tampón MOPS 10× (apartado IV.6.4.1, en la página 18). La disolución de la agarosa en agua se hizo mediante calentamiento en un microondas, y una vez estabilizada a 55°C, se mezcló bien con una disolución que contenía 3,6 ml de formaldehído al 36% m/v y 6 ml de MOPS 10×, y que fue precalentada a 55°C durante 30 min. Las muestras de ARN y del marcador de peso molecular se prepararon diluyendo en agua 3 µg y 80 ng, respectivamente, hasta alcanzar un volumen final de 6 µl. A cada muestra, incluyendo el marcador, se le añadieron 20,22 µl de la mezcla de carga (apartado IV.6.4.1, en la página 18), y todas se desnaturalizaron a 65°C durante 10 min, transfiriéndose a hielo después, donde se mantuvieron hasta su carga en los pocillos del gel. Las electroforesis se hicieron en cubetas horizontales, a voltaje constante (90 V), y durante 1 h y 30-35 min. Para visualizar el ARN, se iluminaron los geles con luz UV de 312 nm, obteniéndose diferentes fotografías en un documentador de geles Vilber E-Box VX5.

Tras las electroforesis, los geles se lavaron durante 15 min con agua, y después, con SSC 10×, preparado a partir de tampón SSC 20× (apartado IV.6.4.2, en la página 19).

A continuación, se realizó la transferencia por capilaridad de las muestras de ARN y del marcador de peso molecular de los geles a membranas de nailon con carga positiva, usando como tampón SSC 10×, y el montaje de la Figura 3, en la página 25. La membrana de nailon y los papeles de filtro Whatman se humedecieron con SSC 10× antes de su inclusión en el montaje para la transferencia, que tuvo lugar durante toda una noche.

Tras la transferencia, se fijó covalentemente el ARN a la membrana, exponiendo la cara que había estado en contacto con el gel a una radiación UV de 120.000 µJ/cm<sup>2</sup>.

Las membranas con el ARN se introdujeron en los tubos de hibridación con 20 ml de la disolución de prehibridación (apartado IV.6.4.3, en la página 19) y se incubaron durante 2 h en un horno de hibridación, a 65°C y con rotación constante. Transcurrido este tiempo, se sustituyó la disolución de prehibridación por la de hibridación, idéntica a la de prehibridación pero con sonda (8 ml de la disolución de prehibridación con 2 µl de sonda a una concentración de 100 µM), manteniéndose en las mismas condiciones durante toda la noche. Se usaron como sondas tres oligonucleótidos marcados en sus extremos 5' y 3' con digoxigenina, sintetizados por Sigma-Aldrich, y cuyas secuencias en sentido 5'→3' son: TCACTTCGAGTCACCGTCGACA, la de la S2, GTCGTTCTGTTTTGGACAGGTATCGA, la de la S7, y AGGATGGTGAGGGACGACGATTT, la de la S9.



**Figura 3.-** Esquema del montaje para la transferencia de ARN de geles de agarosa desnaturalizantes a membranas de nailon cargadas positivamente. Tomado de Delicado Mateo (2021).

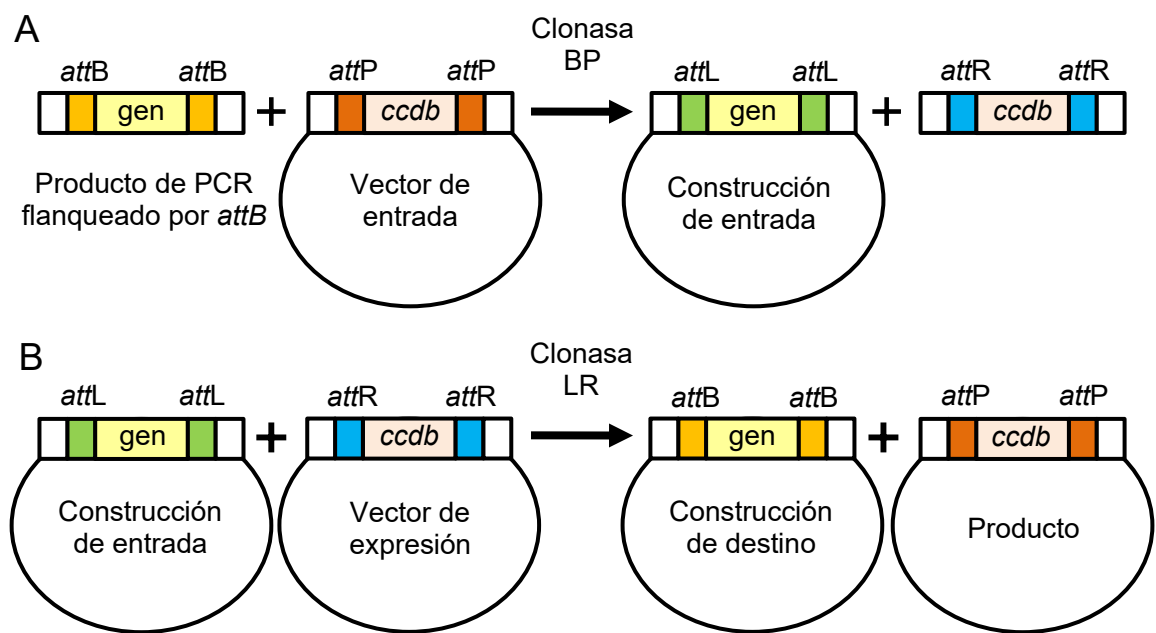
Tras la hibridación, se lavaron las membranas dentro de los tubos de hibridación, en el horno, manteniendo la rotación constante y a temperatura ambiente, salvo cuando se indica una temperatura distinta. Se hicieron dos lavados de 5 min con 50 ml de la disolución de lavado 1, dos de 15 min a 65°C con 50 ml de la disolución de lavado 2, uno de 5 min con 20 ml de la disolución de detección 1, y otro de 30 min con 20 ml de la disolución de detección 2.

A continuación, se inició la detección. Para ello, se desecharon los 20 ml del último lavado y se incubaron las membranas, durante 20 min y a temperatura ambiente, con 15 ml de la disolución de detección 2 a la que se añadieron 0,75 U del anticuerpo anti-DIG-AP (Roche), conjugado con una fosfatasa alcalina. Se desechó la disolución con el anticuerpo y se hicieron tres lavados de 10 min con 50 ml de la disolución de detección 1, y un lavado de 5 min con 50 ml de la disolución de detección 3. Por último, las membranas se extrajeron de los tubos de hibridación y se extendieron sobre fundas de plástico transparente, se cubrieron con el sustrato incoloro CDP-Star (Roche) y con otra funda, y se incubaron 5 min en oscuridad. Durante este tiempo, la fosfatasa alcalina conjugada al anticuerpo anti-DIG-AP desfosforila el sustrato CDP-Star en una reacción quimioluminiscente, que se detectó poniendo en contacto la membrana enfundada en plástico con una película radiográfica, dentro de una caja de revelado. La exposición a las películas fue de 30 min a 3 h.

El revelado de la película se realizó también en la oscuridad, sumergiéndola primero en la disolución de revelado (AGFA), hasta que las bandas se hicieron visibles, y después, 2 min en la disolución de fijación (AGFA). Por último, se lavó con agua desionizada.

#### IV.9.- Obtención de transgenes mediante la tecnología Gateway

La tecnología Gateway (Invitrogen) se basa en la clonación de un inserto de interés en un vector por recombinación específica de sitio, mediante las reacciones de integración y escisión mediadas por recombinasas del bacteriófago  $\lambda$  de *Escherichia coli* (Landy, 1989), tal como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.-** Clonación de un inserto en un vector de expresión mediante la tecnología Gateway. Se representa esquemáticamente el proceso de generación de las construcciones (A) de entrada y (B) de destino para un gen amplificado mediante PCR con dos cebadores que incluyen las secuencias *attB*1 y *attB*2 en sus extremos 5'. Tomada de Micol Ponce (2011), quien a su vez la modificó del catálogo Gateway Technology de Invitrogen.

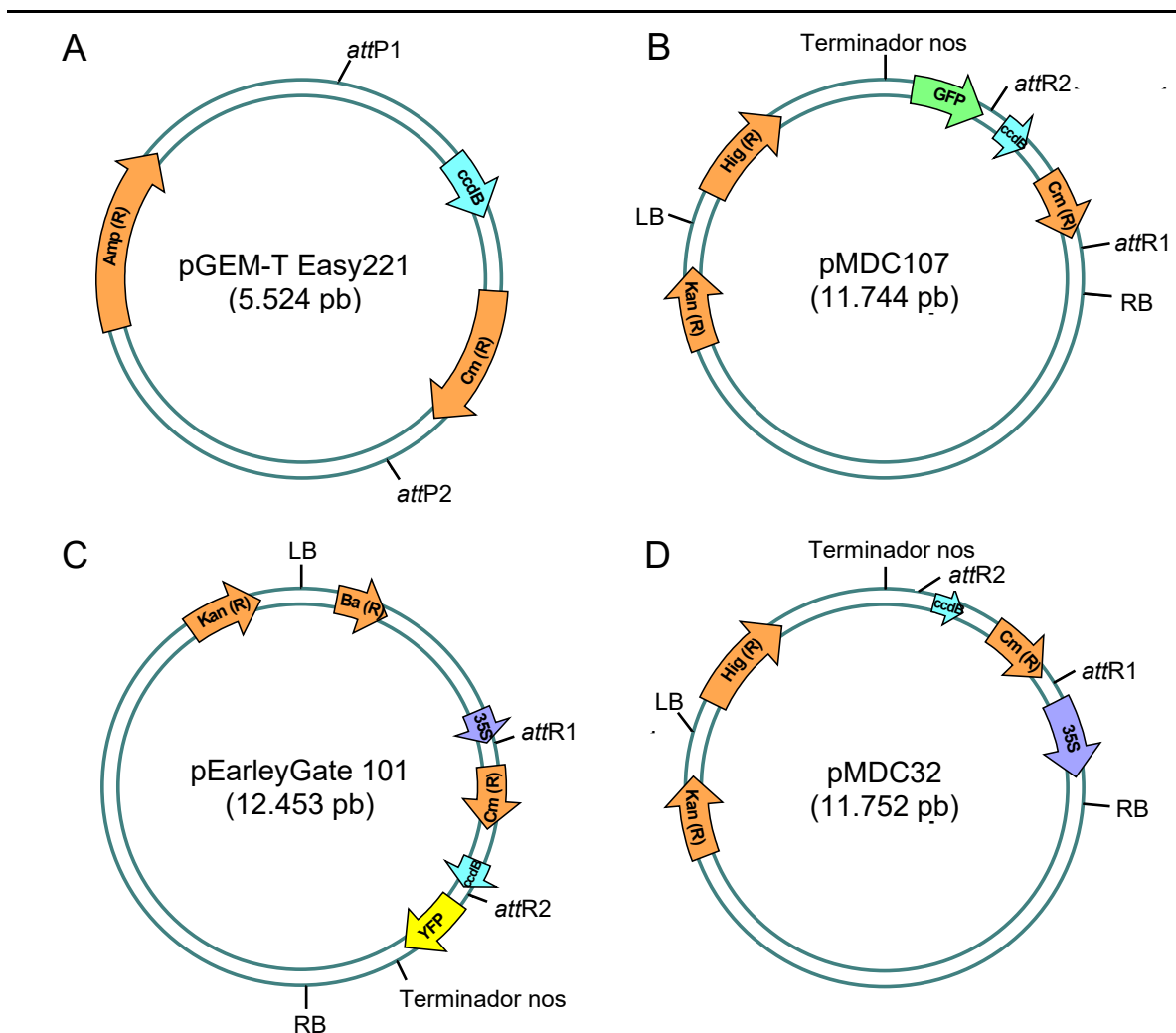
Para la integración o reacción BP, los vectores de entrada tienen en sus extremos dos secuencias *attP* distintas (*attP*1 y *attP*2) flanqueando el sitio de inserción. El fragmento que se desea integrar debe estar flanqueado por dos secuencias *attB* (*attB*1 y *attB*2). La molécula recombinante resultante, cuyo inserto queda flanqueado por las secuencias *attL*, recibe el nombre de construcción de entrada (Figura 4A), y las bacterias que lo contienen, clones de entrada. La construcción de entrada actúa como intermediario en el proceso, ya que en la etapa siguiente, de escisión o reacción LR, el inserto de interés se escinde del vector de entrada para integrarse en el de destino o expresión, que contiene las secuencias *attR*. La molécula recombinante resultante, cuyo inserto queda ahora flanqueado por las secuencias *attB*, se denomina construcción de destino (Figura 4B), y las bacterias que lo contienen, clones de destino o expresión.

Los vectores basados en la tecnología Gateway, como los que se representan en la Figura 5, en la página 28, son de los más utilizados para la expresión de genes, la determinación de la localización espacial y subcelular de sus productos, y su transcripción y traducción *in vitro*, ya que permiten la clonación y subclonación rápida y eficiente de moléculas de ADN sin necesidad de usar endonucleasas de restricción ni ligasas, las herramientas clásicamente empleadas para la construcción de moléculas recombinantes (Hartley *et al.*, 2000).

En este trabajo, hemos usado la tecnología Gateway para clonar distintos insertos de interés en el vector de entrada pGEM-T Easy221, que fue obtenido en el laboratorio de B. Scheres a partir del pGEM-T Easy de Promega, tras incorporarle el gen tóxico *ccdB*, flanqueado por las secuencias *attP1* y *attP2* (Figura 5A, en la página 28). Este gen sirve para la selección negativa de los plásmidos que no hayan incorporado el inserto, ya que codifica una proteína tóxica que interfiere con la ADN girasa implicada en la replicación del ADN de la mayoría de las estirpes de laboratorio de *Escherichia coli* (Bernard y Couturier, 1992), como la DH5 $\alpha$ . El vector pGEM-T Easy221 contiene también un gen de resistencia a ampicilina, permitiendo así una doble selección de las bacterias transformantes.

Para la obtención de los insertos, se amplificó mediante PCR (apartado IV.7.2, en la página 21) la región genómica requerida de la estirpe silvestre Col-0, empleando como cebadores los oligonucleótidos de la Tabla 2, en la página 22, que tienen en sus extremos 5' las secuencias *attB*. Los productos de PCR flanqueados por las secuencias *attB1* y *attB2* se clonaron en el vector pGEM-T Easy221 mediante reacciones BP, que se llevaron a cabo en un volumen final de 2,5  $\mu$ l, en tubos *ependorf*, mezclando las cantidades necesarias de los productos de PCR y del vector de entrada para tener una relación molar producto de PCR:vector de 1:1 (en un volumen de 2  $\mu$ l), y 0,5  $\mu$ l de la Gateway BP Clonase II Enzyme Mix 5 $\times$  (Invitrogen). Las reacciones se incubaron durante 24 h a 25°C, y se detuvieron con 1  $\mu$ l de proteinasa K (Invitrogen; 2  $\mu$ g/ $\mu$ l), manteniéndolas durante 20 min a 37°C.

Los insertos se subclonaron en los vectores de destino pMDC107, pEarleyGate 101 y pMDC32 (Figura 5B-D, en la página 28) mediante reacciones LR, que se llevaron a cabo en un volumen final de 2,5  $\mu$ l, en tubos *ependorf*, mezclando las cantidades necesarias de las construcciones de entrada y de los vectores de destino para tener una relación molar construcción de entrada:vector de 1:1 o 3:1 (en un volumen de 2  $\mu$ l), y 0,5  $\mu$ l de la Gateway LR Clonase II Enzyme Mix 5 $\times$  (Invitrogen). Al igual que las reacciones BP, las reacciones LR se incubaron durante 24 h a 25°C, y se detuvieron con 1  $\mu$ l de proteinasa K (Invitrogen; 2  $\mu$ g/ $\mu$ l), manteniéndolas durante 20 min a 37°C.



**Figura 5.-** Mapas de los vectores Gateway empleados en este trabajo. (A) Mapa del vector de entrada pGEM-T Easy221. Se destaca la posición de las secuencias *attP1* y *attP2*, y en color, las de los genes de resistencia a ampicilina *Amp<sup>R</sup>* y cloranfenicol *Cm<sup>R</sup>*, y la del gen *ccdB*. (B-D) Mapas de los vectores de destino (B) pMDC107, (C) pEarleyGate 101, y (D) pMDC32. Se muestra la posición de las secuencias *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 del promotor 35S, del gen *ccdB*, de los genes que codifican la GFP y la YFP, y de los que confieren resistencia a kanamicina *Kan<sup>R</sup>*, higromicina *Hig<sup>R</sup>*, cloranfenicol *Cm<sup>R</sup>* y Basta *Ba<sup>R</sup>*. Los mapas se dibujaron con el programa pDRAW32 (<https://www.acaclone.com/>).

Los insertos subclonados en los vectores pEarleyGate 101 y pMDC32 quedaron bajo el control de uno y dos promotores 35S, respectivamente. En los vectores pMDC107 y pEarleyGate 101, los insertos quedaron aguas arriba de los genes que codifican las proteínas fluorescentes verde (GFP) y amarilla (YFP), respectivamente. Estos vectores contienen, además, el gen tóxico *ccdB*, para la selección negativa de los plásmidos sin el inserto, y genes de resistencia a antibióticos y/o herbicidas para la selección positiva de las

bacterias y plantas transformantes. Los vectores pMDC107 y pMDC32 contienen genes de resistencia a kanamicina e higromicina, mientras que el pEarlyGate 101 presenta genes de resistencia a kanamicina y Basta, un herbicida de amplio espectro cuyo ingrediente activo es el glufosinato de amonio, que inhibe la actividad de la glutamina sintetasa, generando la acumulación de amoníaco a niveles tóxicos en las plantas.

## **IV.10.- Transformaciones**

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

#### **IV.10.1.1.- Transformación por choque térmico**

Se añadieron 2,5 µl de los productos de las reacciones BP y LR descritas en el apartado IV.9, en la página 26, a tubos *ependorf* con 50 µl de una suspensión de células de *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes, que se mantuvieron en hielo durante 20 min. A continuación, los tubos se sometieron a un choque térmico durante 45 s, en un baño a 42°C, y después se mantuvieron en hielo durante 2 min. Se añadieron entonces 250 µl de medio LB líquido (apartado IV.6.2, en la página 17), incubando los tubos durante 1 h a 37°C y 225 rpm. Para inocular las células en placas de Petri con medio LB sólido suplementado con ampicilina o kanamicina, se procedió tal como se describe en el apartado IV.5, en la página 15, y por último, se incubaron durante 24 h a 37°C.

#### **IV.10.1.2.- Transformación por electroporación**

Se añadieron 100 µl de una suspensión de células de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 electrocompetentes, y 1 µl de una disolución de ADN plasmídico (20 ng), obtenida tal como se describe en el apartado IV.7.1.2, en la página 20, en cubetas de electroporación de 2 mm, previamente enfriadas en hielo. Se utilizó un Electroporator 2510 (Eppendorf), programando un pulso de 1.700 V y 5,6 ms. Tras la electroporación, se añadieron 500 µl de medio LB líquido (apartado IV.6.2, en la página 17) a las células, que se transfirieron a tubos *ependorf*, y se incubaron durante 2 h a 28°C y 225 rpm. La inoculación de las células en placas de Petri con medio LB sólido suplementado con kanamicina y rifampicina (la estirpe C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* es resistente a este antibiótico, es decir, Rif<sup>R</sup>) se hizo tal como se describe en el apartado IV.5, en la página 15, incubándose 48 h a 28°C.

#### **IV.10.2.- Transformación de Arabidopsis**

Para la transferencia de los transgenes a Arabidopsis, las plantas se transformaron por infiltración con *Agrobacterium tumefaciens* C58C1, usando una versión modificada del método de Clough y Bent (1998), que deriva a su vez del de Bechtold y Pelletier (1998).

#### **IV.10.2.1.- Infiltración con *Agrobacterium tumefaciens***

Las plantas se cultivaron tal como se indica en el apartado IV.3.2, en la página 14, hasta que alcanzaron el tamaño óptimo para su transformación, de unos 10 cm de altura, estado en el que presentan muchos capullos florales sin abrir y pocos frutos.

Se prepararon precultivos de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 en 3 ml de medio LB líquido suplementado con kanamicina y rifampicina (apartado IV.6.2, en la página 17), que se inocularon con bacterias obtenidas en placas de Petri, y conservadas a 4°C. Tras una incubación de 24 h a 28°C y 225 rpm, se tomaron 200 µl de los precultivos para inocular 200 ml de medio LB líquido suplementado con kanamicina y rifampicina, en botellas de 500 ml. Estos cultivos se incubaron a 28°C y 225 rpm hasta que su densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ) alcanzó un valor de 1,8-2, momento en el que se añadieron 40 µl del detergente Silwett-L77 (OSi Specialties), que facilita la adhesión de las bacterias a las flores.

La infiltración de las plantas se realizó durante 1 min, por inmersión de sus partes aéreas en el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* descrito anteriormente. Las plantas se mantuvieron durante 15 min sobre papeles de filtro, y después se enfundaron en bolsas de plástico transparente, y se transfirieron a una cámara de cultivo, en la que permanecieron hasta la recolección de las semillas. Un día después de la infiltración, las bolsas se cortaron por su parte superior para facilitar la aireación de las plantas. Además, se limitó su riego, procurando que el nivel de agua de subirrigación no superara los 2 cm de altura dentro de la cubeta, a fin de reducir la humedad en las macetas y minimizar el crecimiento de hongos.

#### **IV.10.2.2.- Selección de transformantes**

La selección de plantas  $T_1$  portadoras de los transgenes obtenidos en los vectores de destino pMDC107, pMDC32 y pEarleyGate 101 se hizo en placas de Petri de 15 cm de diámetro, que contenían unos 100 ml de medio sólido GM (apartado IV.6.1, en la página 16) suplementado con 15 µg/ml de higromicina B (pMDC107 y pMDC32) o 2,5 µg/ml de Basta (pEarleyGate 101). Se tomaron unos 40 mg de semillas (2.000-2.500) de *Arabidopsis* en tubos de 10 ml, que fueron esterilizadas por inmersión con agitación, durante 8-10 min, en etanol al 70% v/v, y después, durante 8-10 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 al final tres lavados con agua estéril. Para su siembra en placas de Petri (apartado IV.3.1, en la página 12), se añadieron a los tubos con las semillas 5 ml de agar de cobertera (Gelrite al 0,5% m/v en agua), que fue mantenido en un baño a 55°C durante al menos 30 min, tras su esterilización en autoclave. Finalmente, se mezclaron las semillas y el agar de cobertera por inversión, y la suspensión se esparció por la superficie del medio de cultivo.

#### IV.11.- Microfotografía y morfometría

Los cruzamientos y las observaciones rutinarias de las plantas se llevaron a cabo con una lupa binocular Olympus SZ30 60TR. Las fotografías de las plantas 21 dde y de las silicuas 54 dde se hicieron con una lupa trinocular Nikon SMZ1500, dotada de un dispositivo microfotográfico Nikon DS-Ri2, e iluminación anular de fibra óptica, provista por una fuente de luz Volpi Intralux 6000-1. Las fotografías de las plantas en placa de Petri 14 dde y en maceta 54 dde se efectuaron con una cámara digital Panasonic Lumix DMC-FX9, en un estudio fotográfico Havox HPB-40XD equipado con 120 luces LED.

El número de semillas por silicua y la longitud de las silicuas se determinó a partir de las fotografías con las herramientas Cell counter y Freehand line, respectivamente, del programa de análisis de imagen ImageJ 1.54e (<https://imagej.net/software/imagej/>), en una pantalla táctil Wacom Cintiq 18SX.

#### IV.12.- Pruebas estadísticas

Para determinar el modo de herencia de los alelos *phax-1* y *phax-2*, se realizaron ensayos de significación basados en el estadístico chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). Se aplicaron ensayos de bondad de ajuste, expresando en la memoria el valor de  $\chi^2$  obtenido al contrastar la hipótesis nula de que los datos observados se ajustaban a la segregación propuesta. El valor por encima del cual se consideró rechazable la hipótesis nula fue el correspondiente a un nivel de significación del 95%, es decir  $\chi^2_{0,95} = 3,84$ , con un grado de libertad (GL). Además, se calculó el valor de  $p$  a partir del de  $\chi^2$  y los GL.

Para el contraste de medias del número de semillas por silicua y de la longitud de las silicuas se realizaron ensayos de significación basados en el estadístico  $t$  de Student.



## **V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1.- Caracterización de líneas insercionales para el gen *PHAX*

#### V.1.1.- Análisis de la conservación del dominio *PHAX*

En The Arabidopsis Information Resource (TAIR; <https://www.arabidopsis.org/>), la principal base de datos de Arabidopsis, no se recoge ningún estudio del gen AT3G20430, que aparece descrito como “phosphorylated adaptor for RNA export-like protein”. Para determinar si la presunta ortóloga de Arabidopsis, codificada por el gen AT3G20430, pudiera desempeñar funciones similares a las proteínas *PHAX* de los animales (apartado II.4, en la página 7), se comprobó, en primer lugar, la conservación de su estructura primaria, llevando a cabo una búsqueda de los ortólogos. Se buscó el gen en HomoloGene, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>; Wheeler *et al.*, 2008), que es una base de datos secundaria que recoge datos de genes y proteínas ortólogas de quince organismos, entre los que se encuentra Arabidopsis. Constatamos su presencia junto a sus presuntos ortólogos de distintos animales, con los que solo parecía compartir el dominio *PHAX* de unión a ARN que caracteriza a la familia.

Con el objetivo de obtener un alineamiento múltiple entre las *PHAX* de organismos evolutivamente distales, se amplió la búsqueda de homólogos en otras bases de datos. No encontramos ningún homólogo entre los hongos, pero sí en los animales y las plantas.

Se obtuvieron dos alineamientos distintos, el primero de ellos eligiendo dos plantas, representando a las dicotiledóneas (*Arabidopsis thaliana*) y a las monocotiledóneas (*Oryza sativa*), y dos animales también distales, representando a los vertebrados (*Homo sapiens*) y a los invertebrados (*Drosophila melanogaster*). Este primer alineamiento reveló una clara conservación en el dominio *PHAX*, que está delimitado por dos parejas de glicinas (G) conservadas, separadas por 12 aminoácidos, algunos de los cuales también se conservan. Esta conservación estructural en el dominio *PHAX*, el único conocido en las proteínas de esta familia y que es de unión a ARN, sugiere que la *PHAX* de Arabidopsis y, posiblemente de otras plantas, conserva la función descrita en los animales. También se encontró cierta conservación en una región aguas arriba del dominio *PHAX*, pero cuya función, si es que la tiene, no se ha descrito todavía (Figura 6, en la página 33).

---

```

Arabidopsis thaliana -----
Oryza sativa -----
Homo sapiens 1 ---MALEVGD MEDGQLSDSDSDMTVAPSDRPLQLPKVLGGDSAMRAFONT
Drosophila melanogaster 1 MMELHANDVDLEDGELSESDDDGVYTPLQRPDGAEKVAS-----P
Consenso

Arabidopsis thaliana -----
Oryza sativa -----
Homo sapiens 48 ATACAPVSHYRAVESVDSSEESFSDSDDDSC LWKRKRQKCFNPPPK-PE-
Drosophila melanogaster 41 LTTCHQIQTALEDESQSNSDSSTAESSEDCIKKLRTEST-GPDGHKRRK
Consenso

```

```

Arabidopsis thaliana      1  -----MEGEESLDAINEEDGFNL-EDVEMV
Oryza sativa             1  -----MEGGDSLDAIDDEALDYDGDVEMA
Homo sapiens            96  -PFOFG-----QSSQKPPVAGGKKINNWGAVLQEQNOAVATELGLIL
Drosophila melanogaster 90  KRIRRTVMRRVPPPTDAEMQPNRARFKKYNWASALQEDALSENMRGCDV-
Consenso                . : : : * : . :

Arabidopsis thaliana     27  DVEEGE-----IVDHDIDSGER-----QNDICDGVKDKEAI
Oryza sativa            28  DADDAVEEAQAEED-PVALTAPTA--AA-----TGGCGGGGEG---
Homo sapiens           138  GMEGTIDRSRQSEITYNYLAKKTR-KESQEHTKDL--DKLDEYMHGGKK
Drosophila melanogaster 139  ---TRSGRDRNVENYDFSRYRIN-GENTLKRRLSNSSECGECSPHAKH
Consenso                . : . : . : . :

Arabidopsis thaliana     59  LCEKNLQQLNKNKRKKKKK-----RKC--PV--MDKPM---
Oryza sativa            63  ---DGGVGOAGKNKNKKKKRKSART---KNKCKPDG--PKIA---
Homo sapiens           185  MGSKEEENGCHLKRKRPVKDLGNRPEMN---YKC-----RYE
Drosophila melanogaster 185  RCRPSSRPITGNO-QRGLVKS-CHRSRRGTSSASGSSDFCEPRHLLDLN
Consenso                . : . : * . *

Arabidopsis thaliana     90  ----SVDWFRDTCRRLKPKKSYMTYTAGCLCTAALSILNEVVALET
Oryza sativa           100  ----DINRFVNETCKRLKPKKSYLVWNAVGLGVSAISDLREVEALQK
Homo sapiens           221  ITAEDSOEKVADEISFRLOEPKDLIARVRIKPKKAIPLMETAEVEQ
Drosophila melanogaster 234  EVGERDPSDVATEMASLVEKDELIVRVVEVLCIDVCLPLYKETQRTIEA
Consenso                . . . . : . : * * * . : . * : * * . :

Arabidopsis thaliana     135  CCGOVTADCTRRTSGGVLWNLIKAROPEAY---REIMKKT-----
Oryza sativa           145  CCGQIVADCSRERTGGGLWNLIKSREPKAY---KELMAKGR-----
Homo sapiens           271  NGGLFMNCSRRRTPGGVFLNLLKNTPSISEEQIKLIFYIENQKEYENKK
Drosophila melanogaster 284  DCGMMIKNGCTRRTPGGVFLFLIKHDNITQEQKRIKRFSEDQSLSKSRK
Consenso                * * . : * * * * : : * : : * :

Arabidopsis thaliana     174  -----EFKQFR-----QPNTRPKSGPKRDQGS
Oryza sativa           184  -----ELKQFR-----YKGRPTSRNEDASS
Homo sapiens           321  AA----RKRRTQVLGKKMQAIKS---LN---EQEDDDISRETF-ASD
Drosophila melanogaster 334  QIETLMRDRKVEELKCKLSKQVTELPTLNQRKEYYMOGDESEDKQPGSL
Consenso                . : * : . : . :

Arabidopsis thaliana     197  SSEGLASGNVSA--DEA-LVS-E---MCVMPVAEQTESKPEKERKSVHER
Oryza sativa           207  QGSALIDEDIEP--HGEKEVSDPPERLIDAEKSPHVPDNNKAERKPLADR
Homo sapiens           358  TNEALASLDESQEGHAEAK-E-----
Drosophila melanogaster 384  SNPPSPVGAEQE-HDSPEYRTH-EININLVDNAELPSTSKAAAAAQGAP
Consenso                . . . .

Arabidopsis thaliana     240  IRVPVSYDDLFRDAPLDSLAAHPSA
Oryza sativa           255  IRVLVAYDDLLEEGEIHGDAP----
Homo sapiens           379  AEEAIEVD----HSHDLDF----
Drosophila melanogaster 432  LKDLISYDHDLELVNCGDMDF----
Consenso                . : * . :

```

**Figura 6.-** Alineamiento múltiple de las estructuras primarias de las proteínas PHAX de *Arabidopsis*, *Oryza sativa*, *Homo sapiens* y *Drosophila melanogaster*. Se ha seleccionado para el alineamiento la isoforma de la PHAX de *Drosophila* más larga, de las dos que recogen las bases de datos. Los residuos idénticos y similares en al menos tres de las secuencias alineadas aparecen sombreados en negro y gris, respectivamente. El dominio de unión a ARN, que caracteriza a las proteínas PHAX, se destaca con una línea roja en la secuencia consenso. Otra región conservada de función aún desconocida se destaca con una línea verde. Los números indican las posiciones en las secuencias completas de las proteínas, que se obtuvieron de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se alinearon con Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; Sievers *et al.*, 2011) y se sombreadaron con Multiple Align Show ([https://www.bioinformatics.org/sms/multi\\_align.html](https://www.bioinformatics.org/sms/multi_align.html)).

Por otro lado, se realizó un segundo alineamiento con distintas especies vegetales muy distales entre sí: *Phiscomitrella patens*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Amborella trichopoda*, cuyo resultado evidenció una conservación más amplia en la región en donde se sitúa el dominio PHAX, pero también en otra de 16 aminoácidos en el extremo carboxilo, que podría ser también funcionalmente relevante en las plantas (Figura 7, en la página 34).

<i>Physcomitrella patens</i>	1	-MVHDSVLDVHDEEFEDSDYEDG-CEEECEEEAGLOSGFKATDISRT
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	MEGESILDA NEDGDFNL-EDVEMVDVEEGE-----IVVDHDLDD
<i>Oryza sativa</i>	1	MEGGDSVLDALDEEALDYDGDVEMADADA VEEAQAQEDPVAITAPTA
<i>Amborella trichopoda</i>	1	MEEGCILDTLFEEDGDDV--HDVDMVDAEDQRHL---QEKD-----S
Consenso		:::*:
<i>Physcomitrella patens</i>	48	ECNEGFVNDGEILVANDTSE-NGADKSSRTVEFCINGTHEKNQKKKKK
<i>Arabidopsis thaliana</i>	41	SCERQ-----ND-DGDGVKDKKAEILGEKNGLOQTNKNRKKKKKK
<i>Oryza sativa</i>	51	--AA-----TG-CGGGGEG-----DGGVGOAGKNKNNKKKKK
<i>Amborella trichopoda</i>	39	HGDYG-----DDVHCGSVPSK-QVPA----KNTEGELKVRKKKKK
Consenso		:::*:
<i>Physcomitrella patens</i>	98	RKKR--GERRQSAPREKTVILERFVVOTCRRLERETKYPLEFRAVDRI
<i>Arabidopsis thaliana</i>	79	K-----R-G--PVMDKPMVDWEVVDTCRRLKPKKSYMLTAVGCLGI
<i>Oryza sativa</i>	80	RKKSARTKNLGGKPDGPPKIADINREVNETCRRLKPKKSYLVNAVGC
<i>Amborella trichopoda</i>	72	KN-----KKKRSNSGIADINREVTNTRRLKPKKSYLVNAVGC
Consenso		:::*:
<i>Physcomitrella patens</i>	146	EAMKGLNOVLAIQKCGGOMTADGLRRRSAGGLWNLIRDEVGPEVLYKEI
<i>Arabidopsis thaliana</i>	120	PAISDLVNEVVALETCCGGOTADGTRKRTSGGLWNLIKAR-QPEAYREI
<i>Oryza sativa</i>	130	SALSDLVREVAIQKCGGOMTADGSRFRTEGGLWNLIKSR-EPKAYKEI
<i>Amborella trichopoda</i>	114	SVLTDLKEVVIQDCGGOMTADGGRPRTEGGLWNLIKAR-HPAYKEI
Consenso		:::*:
<i>Physcomitrella patens</i>	196	MKECNRKHIEQKAKQKE-RGTGKRQHMDVDITGGDERPNVKRCRTSLDAD
<i>Arabidopsis thaliana</i>	169	MKKTREFEK--QFRQPNTRPKSPKR-----DQSSSE
<i>Oryza sativa</i>	179	MAKGRELEK--QFRYKQGRPQTSRNE-----DASSQGS
<i>Amborella trichopoda</i>	163	VARGREVEK--QFRHOGNNRLATKVI-----NEPIKSD
Consenso		:::*:
<i>Physcomitrella patens</i>	245	RIPREEGREGRGVSRERPRASLREEVDSARVPAALQNAWIQGLKKQSER
<i>Arabidopsis thaliana</i>	200	GLASGNVSADEA-----LVS--
<i>Oryza sativa</i>	210	ALIDEDIEFHGEK-----EVSD-
<i>Amborella trichopoda</i>	194	TQIPDKGSEKVM-----Q---
Consenso		:::*:
<i>Physcomitrella patens</i>	295	GVPPEA--KVLNPKASAGPNLQSNRPVSRIRMAVSYGDLVEECHTATD
<i>Arabidopsis thaliana</i>	215	--E---MCVMP-VAEQTESKPEKERKSVHERIRVPSYDDLFRDAPLDDS
<i>Oryza sativa</i>	227	--DPERLIDAE-KSPHVPDNNKAERKPLARIRVLVAYDDLFECEIHEG
<i>Amborella trichopoda</i>	208	---GSSKCEVQPILTTCESQERKSVWERIRVPSYDDLFRDAPLDDS
Consenso		:::*:
<i>Physcomitrella patens</i>	343	SPIHGVTEVYDSGVQEWECGGQINRDHCNIREGEMEEGEITN
<i>Arabidopsis thaliana</i>	259	LAHHPASA-----
<i>Oryza sativa</i>	274	DAP-----
<i>Amborella trichopoda</i>	254	F-----
Consenso		:::*:

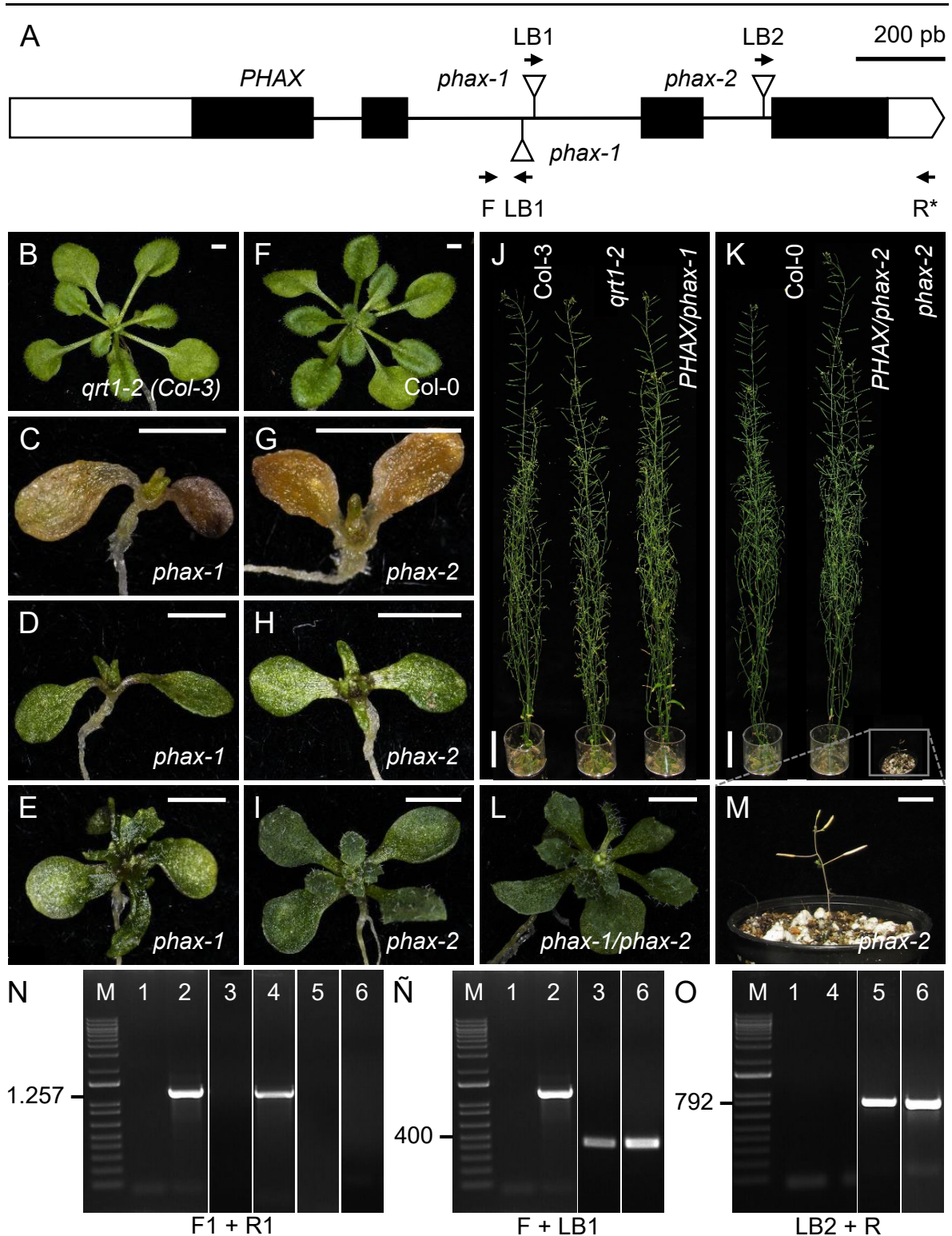
**Figura 7.-** Alineamiento múltiple de las estructuras primarias de las proteínas PHAX de *Arabidopsis*, *Physcomitrella patens*, *Oryza sativa* y *Amborella trichopoda*. Se siguen las pautas definidas en el pie de la Figura 6, en la página 33.

### V.1.2.- Obtención de los alelos *phax-1* y *phax-2*

Antes del inicio de este TFM, se adquirieron las líneas insercionales de dominio público SAIL\_241\_D10 y GK-094D08, que proceden de las estirpes de *Arabidopsis* *qrt1-2* y Col-0, respectivamente (apartado IV.2, en la página 12; Tabla 1, en la página 13), y son presuntamente portadoras de inserciones de ADN-T en el gen AT3G20430 (*PHAX*).

La unidad de transcripción del gen *PHAX* tiene 2.142 pb, distribuidas en 4 exones y 3 intrones (Figura 8A, en la página 36). Codifica una proteína de 265 aminoácidos, que es la presunta ortóloga de las PHAX de los metazoos. Estas proteínas se asocian con otras para la exportación al citoplasma de los pre-snARN y el transporte intranuclear de los pre-snoARN del nucleoplasma a los cuerpos de Cajal, donde completan su procesamiento para ensamblarse, una vez maduros, en las snRNP y snoRNP, respectivamente (apartado II.4, en la página 7; Ohno *et al.*, 2000; Kiss *et al.*, 2006).

Con el fin de comprobar si PHAX desempeña funciones similares en Arabidopsis, se sembraron 652 y 1.345 semillas de las líneas de ADN-T SAIL\_241\_D10 y GK-094D08, respectivamente, como se detalla en el apartado IV.3.1, en la página 12. De estas semillas, germinaron 406 y 1.044, respectivamente. Se analizó el fenotipo de las plantas resultantes 21 dde, observando que 358 de la línea SAIL\_241\_D10 eran muy similares a las de su



**Figura 8.-** Estructura del gen *PHAX*, y caracterización fenotípica y genotipado de sus líneas insercionales. (A) Estructura de la unidad de transcripción del gen *PHAX*, con indicación de los sitios de las inserciones de ADN-T en sus alelos *phax-1* y *phax-2*, con triángulos invertidos de color blanco. Los rectángulos de color negro representan los exones, y las líneas que los separan, los intrones. Se representan en blanco el líder (5'-UTR) y el tráiler (3'-UTR). Las flechas representan los cebadores usados en las amplificaciones mediante PCR y en las secuenciaciones por el método de Sanger (Tabla 2, en la página 22), que no están a escala. F: AT3G20430-F1. R\*: AT3G20430-R1, el asterisco indica que la región complementaria a este cebador se encuentra aguas abajo de la unidad de transcripción de *PHAX*. LB1: LB\_SAIL. LB2: LB\_GK. (B-I, L) Fenotipo foliar de las plantas (B) *qrt1-2*, (C-E) *phax-1*, (F) Col-0, (G-I) *phax-2* y (L) *phax-1/phax-2*. (J, K, M) Porte de las plantas Col-3, *qrt1-2*, *PHAX/phax-1*, Col-0, *PHAX/phax-2* y *phax-2*. (N-O) Genotipado de las plantas de las líneas SAIL\_241\_D10 y GK-094D08. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% m/v, teñido con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular. Se indican los cebadores empleados, y el tamaño en pb de los productos de PCR obtenidos al (1) no utilizar molde, o bien, usar ADN genómico de una planta (2) *qrt1-2*, (3) *phax-1*, (4) Col-0, (5) *phax-2* o (6) *phax-1/phax-2*. Las fotografías se tomaron (B-I y L) 21 y (J, K y M) 56 dde. Las barras de escala indican (B-I y L) 2 mm, (J y K) 5 cm y (M) 2 cm.

estirpe de procedencia *qrt1-2*, tanto en tamaño como en morfología foliar (Figura 8B, en la página 36), mientras que 48 presentaban un fenotipo mutante variable (Figura 8C-E, en la página 36). Las semillas germinadas de la línea GK-094D08 rindieron 947 plantas similares fenotípicamente a las silvestres Col-0 (Figura 8F, en la página 36), y 97 con el mismo fenotipo mutante que las de la línea anterior (Figura 8G-I, en la página 36).

Las plantas con fenotipo mutante de ambas líneas insercionales se clasificaron en tres subclases fenotípicas distintas. La primera estaba compuesta por 30 plantas de la línea SAIL\_241\_D10 y 64 de la GK-094D08, pequeñas y con cotiledones cloróticos (Figura 8C y G, en la página 36), representando el 62,50% y 65,98% de las plantas con fenotipo mutante, respectivamente. La segunda subclase incluía 7 plantas de la línea SAIL\_241\_D10 y 12 de la GK-094D08, también pequeñas, pero con los cotiledones verdes y, que producían como máximo dos hojas, que eran apuntadas (Figura 8D y H, en la página 36), correspondiendo al 14,58% y 12,37% de las plantas con fenotipo mutante, respectivamente. Finalmente, la tercera subclase fenotípica estaba formada por 11 plantas de la línea SAIL\_241\_D10 y 21 de la GK-094D08, de mayor tamaño que las de las subclases anteriores, aunque considerablemente más pequeñas que las de las estirpes *qrt1-2* y Col-0, y con más de dos hojas en la roseta, las cuales eran apuntadas y dentadas (Figura 8E e I, en la página 36). Estas plantas mostraron floración temprana y representaron el 22,92% y 21,65% del total de las plantas con fenotipo mutante de las líneas SAIL\_241\_D10 y GK-094D08, respectivamente.

Se trasplantaron a maceta 16 plantas de la línea SAIL\_241\_D10 con fenotipo mutante, tal como se describe en el apartado IV.3.2, en la página 14. Sin embargo, solo 2 completaron su ciclo de vida, presentando un porte muy reducido, de 2-4 cm, y produciendo un total de 5-6 silicuas. De estas silicuas, 1-4 produjeron semillas, que resultaron no ser viables, pues no germinaron cuando se sembraron. De forma similar, se trasplantaron a maceta 33 plantas con fenotipo mutante de la línea GK-094D08, de las cuales solo 11 completaron su ciclo de vida con un porte muy reducido, produciendo 2-20 silicuas con 0-8 semillas en su interior, que tampoco fueron viables (Figura 8K y M, en la página 36).

Por otro lado, se seleccionaron 2 plantas con el fenotipo de *qrt1-2* y 3 con fenotipo mutante de la línea SAIL\_241\_D10, así como 3 plantas con el fenotipo de Col-0 y 17 con fenotipo mutante de la línea GK-094D08 para su genotipado por amplificación mediante PCR (apartado IV.7.2, en la página 21). Para amplificar el alelo silvestre *PHAX*, se empleó la pareja de cebadores AT3G20430-F1 + AT3G20430-R1 (Tabla 2, en la página 22; Figura 8N, en la página 36), mientras que para amplificar las inserciones de las líneas SAIL\_241\_D10 y GK-094D08, se utilizaron las parejas de cebadores AT3G20430-F1 + LB\_SAIL y LB\_GK + AT3G20430-R1, respectivamente (Tabla 2, en la página 22; Figura 8Ñ, en la página 36). Se determinó así que las plantas con fenotipo mutante eran homocigotas para las inserciones anotadas, mientras que las que tenían un fenotipo similar a *qrt1-2* o Col-0 eran homocigotas silvestres o heterocigotas.

La posición exacta de las inserciones de las líneas SAIL\_241\_D10 y GK-094D08 se estableció posteriormente, secuenciando por el método de Sanger (apartado IV.7.4, en la página 21) los productos de PCR obtenidos con los cebadores AT3G20430-F1 + LB\_SAIL, LB\_SAIL + AT3G20430-R1, AT3G20430-F1 + LB\_GK y LB\_GK + AT3G20430-R1 (Tabla 2, en la página 22). Se confirmó así que la línea SAIL\_241\_D10 es portadora de un par de inserciones de ADN-T en el segundo intrón del gen *PHAX*, y se pasó a denominar *phax-1* a este primer alelo insercional (Figura 8A, en la página 36). En cambio, la línea GK-094D08 es portadora de una única inserción de ADN-T en el tercer intrón del gen *PHAX*, pasando a denominar *phax-2* a este segundo alelo insercional (Figura 8A, en la página 36). Por último, se comprobó en plantas de la línea SAIL\_241\_D10 la presencia, en homocigosis, de las mutaciones puntuales en el gen AT5G55590 de *qrt1-2*, su estirpe de procedencia, usando para ello los cebadores AT5G55590-F y AT5G55590-R (Tabla 2, en la página 22).

### V.1.3.- Análisis de complementación de *phax-1* con *phax-2*

Se corroboró que *phax-1* y *phax-2* eran alélicos con un análisis de complementación genética. Para ello, se cruzaron las plantas *PHAX/phax-1* y *PHAX/phax-2* (Figura 8J y K,

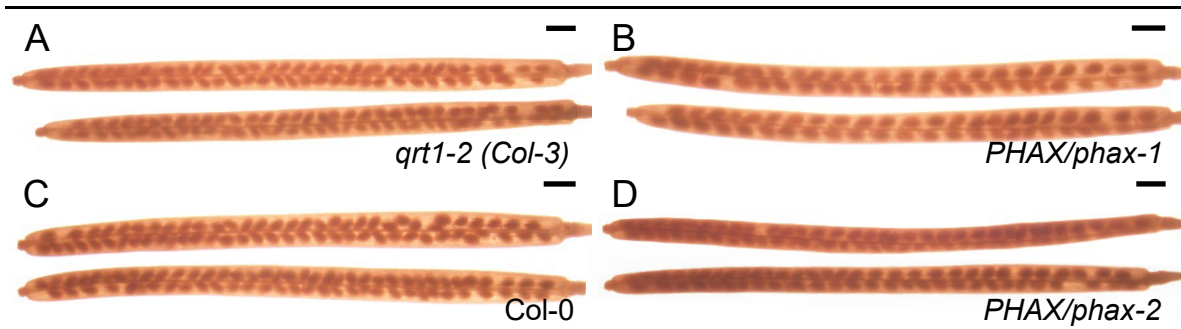
en la página 36) entre sí, y se analizó el fenotipo de la generación F<sub>1</sub> 21 dde, observando individuos de las tres subclases fenotípicas descritas en el apartado V.1.2, en la página 34, para los homocigotos mutantes *phax-1* y *phax-2* (Figura 8C-E y G-I, en la página 36). En la Figura 8L, en la página 36, se muestra una de estas plantas F<sub>1</sub>, de pequeño tamaño, con hojas apuntadas y dentadas, y floración temprana. Por amplificación mediante PCR con las parejas de cebadores AT3G20430-F1 + AT3G20430-R1, AT3G20430-F1 + LB\_SAIL y LB\_GK + AT3G20430-R1 se verificó que todas las plantas F<sub>1</sub> con fenotipo mutante eran portadoras de los dos alelos insercionales (Tabla 2, en la página 22; Figura 8N-O, en la página 36).

#### V.1.4.- Análisis de una posible letalidad gametofítica de los mutantes *phax*

La segregación fenotípica esperada para un rasgo monogénico en la descendencia por autofecundación de una planta heterocigota para un alelo recesivo es 3:1, de individuos con fenotipo silvestre frente a individuos con fenotipo mutante. Sin embargo, se observaron desviaciones significativas de dicha proporción en la descendencia por autofecundación de las plantas *PHAX/phax-1* ( $\chi^2_{0,95} = 42,51$ ;  $p = 0$ ; GL = 1) y *PHAX/phax-2* ( $\chi^2_{0,95} = 142,81$ ;  $p = 0$ ; GL = 1), con segregaciones fenotípicas de 7,5:1 y 9,5:1, respectivamente. La notable disminución en el número de plantas con fenotipo mutante, homocigotas para los alelos insercionales *phax-1* y *phax-2*, sumada a la baja tasa de supervivencia de estas tras su trasplante a maceta y la incapacidad de germinación de sus semillas (apartado V.1.2, en la página 34), sugiere que la presencia de los alelos *phax-1* y *phax-2* podría perturbar la gametogénesis, la embriogénesis y/o el desarrollo postembrionario.

Para estudiar una posible letalidad gametofítica de *phax-1* y *phax-2*, se recolectaron 4-5 silicuas, aún verdes, de 3-4 plantas *qrt1-2*, *PHAX/phax-1*, Col-0 y *PHAX/phax-2* 56 dde (Figura 8J y K, en la página 36), situadas en posiciones equivalentes a lo largo del tallo principal. Las silicuas se sumergieron en etanol al 70% v/v, donde se mantuvieron durante 5 días, con agitación, para eliminar las clorofilas de las valvas y poder visualizar las semillas en su interior. Si los alelos insercionales *phax-1* y *phax-2* fuesen letales gametofíticos, la segregación esperada al analizar las semillas en el interior de las silicuas de las plantas *PHAX/phax-1* y *PHAX/phax-2* sería una 1:1, de semillas maduras o viables frente a óvulos no fecundados o abortados, los cuales se pueden visualizar como huecos en las silicuas decoloradas. Sin embargo, al analizar las silicuas de *PHAX/phax-1* y *PHAX/phax-2*, no se observó un mayor número de huecos que en las de *qrt1-2* y Col-0, aunque contenían un menor número de semillas (Figura 9 y Tabla 4, en la página 39).





**Figura 9.-** Silicuas decoloradas de *qrt1-2*, *PHAX/phax-1*, *Col-0* y *PHAX/phax-2*. Las fotografías se tomaron 56 dde. Las barras de escala indican 2 mm.

**Tabla 4.-** Análisis de las silicuas y semillas de *qrt1-2*, *PHAX/phax-1*, *Col-0* y *PHAX/phax-2*

Genotipo	Número de semillas por silicua	<i>p</i>	Longitud de las silicuas (mm)	<i>p</i>
<i>qrt1-2</i>	67,87 ± 1,37	0	19,09 ± 0,48	0
<i>PHAX/phax-1</i>	56,44 ± 9,29		17,05 ± 1,47	
<i>Col-0</i>	65,93 ± 0,64	0	18,00 ± 0,65	0,0124
<i>PHAX/phax-2</i>	60,50 ± 2,63		18,62 ± 0,62	

Se indica la media ± la desviación estándar. *n* = 15-16 silicuas. Los valores han sido sometidos al estadístico *t* de Student con un nivel de significación del 95%. Se indica el valor de *p*, que señala una diferencia significativa entre los genotipos comparados.

Adicionalmente, se realizaron los cruzamientos recíprocos *PHAX/phax-1* × *qrt1-2*, *qrt1-2* × *PHAX/phax-1*, *PHAX/phax-2* × *Col-0* y *Col-0* × *PHAX/phax-2*, a fin de determinar si existe algún tipo de alteración en la transmisión de los alelos *phax-1* y *phax-2* a través de los gametofitos masculino y femenino. Se genotiparon las plantas de la generación *F*<sub>1</sub> de todos estos cruzamientos por amplificación mediante PCR con las parejas de cebadores AT3G20430-F1 + AT3G20430-R1, AT3G20430-F1 + LB\_SAIL y LB\_GK + AT3G20430-R1 (Tabla 2, en la página 22), y se calculó la eficacia de transmisión de los alelos insercionales con la fórmula: eficacia de transmisión de la inserción (%) = heterocigotos/homocigotos silvestres × 100 (Pagnussat *et al.*, 2005). Si los gametofitos fuesen completamente viables, la eficacia de transmisión de las inserciones de ADN-T de *phax-1* y *phax-2* sería del 100%, mientras que este valor disminuiría en caso contrario.

Se genotiparon 44 y 47 individuos *F*<sub>1</sub> de los cruzamientos *PHAX/phax-1* × *qrt1-2* y *qrt1-2* × *PHAX/phax-1*, respectivamente, de los cuales, 24 y 22 individuos resultaron ser heterocigotos. Estas segregaciones indican una eficacia de transmisión del alelo *phax-1* del 120% a través del gametofito femenino, y del 88% a través del masculino, lo que sugiere una reducción en la viabilidad de este último, mientras que el gametofito femenino sería completamente viable. De los cruzamientos *PHAX/phax-2* × *Col-0* y *Col-0* × *PHAX/phax-2*

se genotiparon 46 y 50 plantas  $F_1$ , respectivamente, de las que, 3 y 21 fueron heterocigotas, suponiendo una eficacia de transmisión del alelo *phax-2* del 6,98% a través del gametofito femenino, y del 72,41% a través del masculino. Estos resultados sugieren una vez más una reducción en la viabilidad del gametofito masculino. Además, a diferencia de lo que ocurre con el alelo *phax-1*, se observa una reducción significativa en la transmisión de la inserción de *phax-2* a través del gametofito femenino, que sería muy poco viable.

Con estos análisis, no podemos descartar la posibilidad de que también se esté produciendo letalidad embrionaria, lo que podría explicar por qué las semillas de las plantas *phax-1* y *phax-2* no germinaron cuando se sembraron. También se observaron semillas no germinadas cuando se sembraron inicialmente las dos líneas insercionales: 246 semillas no germinadas de 652 sembradas de la línea SAIL\_241\_D10 y 301 no germinadas de 1.345 sembradas de la línea GK-094D08. Más adelante, se diseccionarán silicuas inmaduras de plantas *PHAX/phax-1*, *phax-1*, *PHAX/phax-2* y *phax-2* 56 dde, y se decolorarán las semillas que haya en su interior, a fin de analizar el desarrollo de los embriones bajo el microscopio.

## V.2.- Obtención de transgenes para el estudio funcional del gen *PHAX*

Para confirmar que el fenotipo mutante de las plantas *phax* se debe exclusivamente a una insuficiencia de función del gen *PHAX*, así como estudiar los efectos derivados de la sobreexpresión de este gen, y la localización subcelular de su producto proteico, en este TFM se diseñaron y obtuvieron diferentes transgenes mediante la tecnología Gateway, tal como se describe en el apartado IV.9, en la página 26.

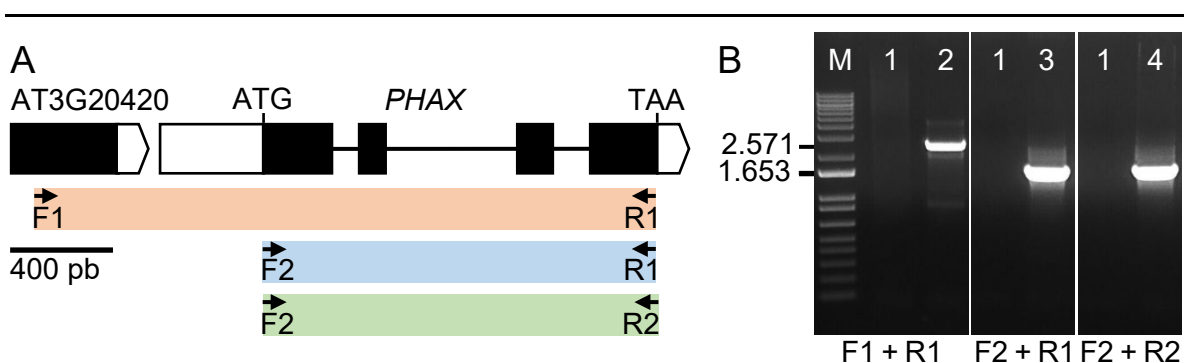
En primer lugar, se diseñó el transgén *PHAX<sub>pro</sub>:PHAX:GFP* para intentar rescatar el fenotipo de las plantas *phax-1* y *phax-2*, y analizar la localización subcelular de *PHAX*. Este transgén permite la expresión de una fusión traduccional entre la unidad de transcripción del gen *PHAX*, sin el codón de terminación de la traducción ni la región 3'-UTR, y la región codificante del gen de la GFP (*PHAX:GFP*), bajo el control del propio promotor de *PHAX* (*PHAX<sub>pro</sub>*). Como promotor endógeno de este gen, se consideraron las 500 pb aguas arriba de su región 5'-UTR, ya que las secuencias reguladoras de la transcripción de los genes de *Arabidopsis* suelen encontrarse a menor distancia (Korkuć *et al.*, 2014). Para la obtención de este transgén, el inserto *PHAX<sub>pro</sub>:PHAX* se amplificó mediante PCR con los cebadores attB1-*PHAX<sub>pro</sub>* y attB2-*PHAX* (-TAA) (Tabla 2, en la página 22; Figura 10, en la página 41), y se clonó en el vector de expresión pMDC107 (Figura 5B, en la página 28).

Por otro lado, se diseñó el transgén *35S<sub>pro</sub>:PHAX:YFP*, a fin de rescatar también el fenotipo de los mutantes *phax*, estudiar los efectos de la sobreexpresión del gen *PHAX* y la localización subcelular de la proteína que codifica. Este transgén expresa la fusión

traduccional *PHAX:YFP*, bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor. Además, aguas abajo del gen de la YFP se encuentra una secuencia que codifica un epítipo de 9 aminoácidos de la hemaglutinina del virus de la gripe humana, que permitirá coimmunoprecipitar las proteínas interactoras de PHAX, usando un anticuerpo comercial anti-HA. Para la obtención de este transgén, el inserto *PHAX* (-TAA) se amplificó por PCR con los cebadores attB1-PHAX y attB2-PHAX (-TAA) (Tabla 2, en la página 22; Figura 10), y se clonó en el vector pEarleyGate 101 (Figura 5C, en la página 28).

Por último, se diseñó el transgén *35S<sub>pro</sub>:PHAX*, que expresa el gen *PHAX* bajo el control del promotor 35S, a fin de estudiar los efectos derivados de la sobreexpresión de *PHAX* y rescatar también el fenotipo de las plantas *phax-1* y *phax-2*. Para su obtención, el inserto *PHAX* (+TAA) se amplificó mediante PCR con los cebadores attB1-PHAX y attB2-PHAX (+TAA) (Tabla 2, en la página 22; Figura 10), y se clonó en el vector de expresión pMDC32 (Figura 5D, en la página 28).

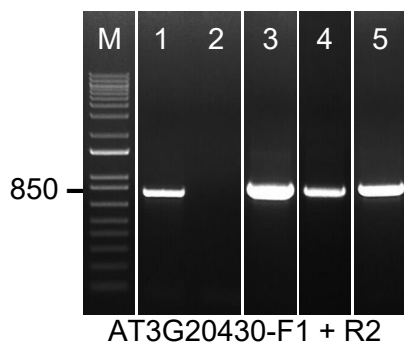
Para la obtención de los insertos *PHAX<sub>pro</sub>:PHAX*, *PHAX* (-TAA) y *PHAX* (+TAA), la región genómica requerida de la estirpe silvestre Col-0 (Figura 10A) se amplificó mediante PCR (apartado IV.7.2, en la página 21), utilizando la polimerasa de ADN Phusion y las parejas de cebadores mencionadas previamente, que tienen en sus extremos 5' las secuencias attB. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% m/v, teñido con bromuro de etidio, corroborando así que tenían el tamaño esperado (Figura 10B).



**Figura 10.-** Obtención de los insertos para la generación de las construcciones *PHAX<sub>pro</sub>:PHAX:GFP*, *35S<sub>pro</sub>:PHAX:YFP* y *35S<sub>pro</sub>:PHAX*. (A) Representación esquemática de las regiones amplificadas del gen *PHAX*, que sirvieron de insertos para la obtención de las construcciones mediante la tecnología Gateway. Se siguen las pautas definidas en el pie de la Figura 8, en la página 36. F1: attB1-PHAX<sub>pro</sub>. F2: attB1-PHAX. R1: attB2-PHAX (-TAA). R2: attB2-PHAX (+TAA). (B) Resultados de las amplificaciones mediante PCR con la polimerasa de ADN Phusion. Se muestran los productos de PCR obtenidos al (1) no utilizar molde o (2, 3 y 4) usar ADN genómico de una planta Col-0. Se siguen las pautas definidas en el pie de la Figura 8, en la página 36.

### V.2.1.- Obtención de los clones de entrada

Para la obtención de los clones de entrada, los productos de PCR flanqueados por las secuencias *attB1* y *attB2* se clonaron en el vector pGEM-T Easy221 (Figura 5A, en la página 28) mediante reacciones BP (apartado IV.9, en la página 26). Con los productos de estas reacciones se transformaron, mediante choque térmico, células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes, que se inocularon en placas de Petri con medio LB sólido suplementado con ampicilina, para la selección positiva de las bacterias transformantes (apartado IV.10.1.1, en la página 29). Se seleccionaron 10-20 colonias de bacterias resistentes a ampicilina (Amp<sup>R</sup>) por construcción, que se sembraron en estrías y se genotiparon mediante PCR con los cebadores AT3G20430-F1 y AT3G20430-R2 (Tabla 2, en la página 22), los cuales hibridan en los insertos. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% m/v, teñido con bromuro de etidio, concluyendo que su tamaño era el esperado (Figura 11).



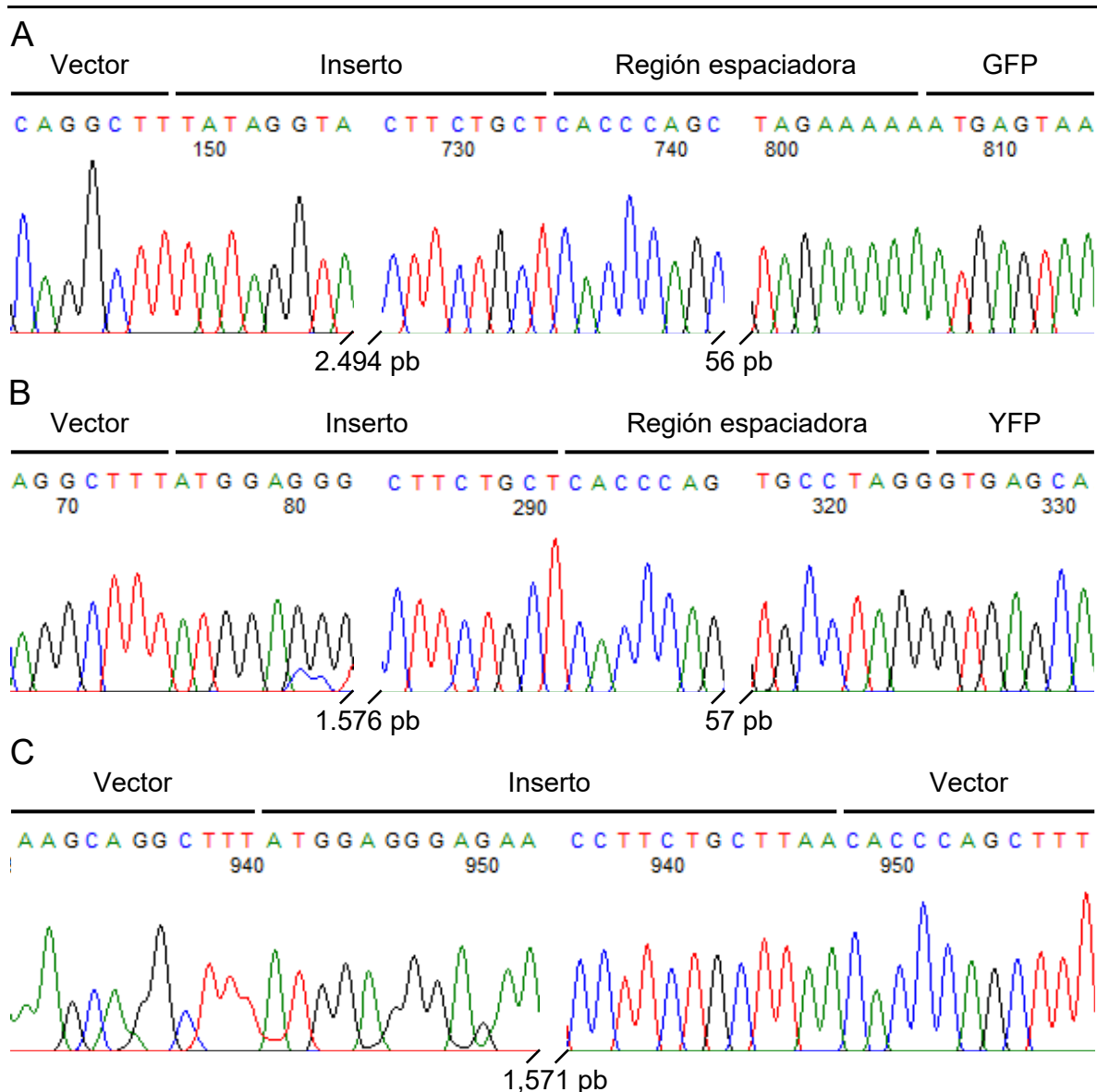
**Figura 11.-** Genotipado de los clones de entrada. Se muestran los productos de PCR obtenidos al utilizar como molde ADN genómico de (1) Col-0, (2) ADN del vector pGEM-T Easy221 vacío, o un poco de masa bacteriana de las colonias Amp<sup>R</sup> transformadas con las construcciones de entrada que contienen los insertos (3) *PHAX<sub>pro</sub>:PHAX*, (4) *PHAX (-TAA)*, y (5) *PHAX (+TAA)*. Se siguen las pautas definidas en el pie de la Figura 8, en la página 36.

### V.2.2.- Obtención de los clones de destino y secuenciación de los transgenes

Se prepararon cultivos de dos clones positivos por construcción (apartado IV.5, en la página 15), en medio LB líquido con ampicilina (apartado IV.6.2, en la página 17), a partir de los cuales se aisló el ADN plasmídico (apartado IV.7.1.2, en la página 20). Los insertos *PHAX<sub>pro</sub>:PHAX*, *PHAX (-TAA)* y *PHAX (+TAA)*, flanqueados ahora por las secuencias *attL* en el vector de entrada pGEM-T Easy221, se subclonaron en los vectores de expresión pMDC107, pEarleyGate 101 y pMDC32 (Figura 5B-D, en la página 28), respectivamente, mediante reacciones LR, tal como se describe en el apartado IV.9, en la página 26. Con los productos de estas reacciones se transformaron, de nuevo, células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes, que fueron inoculadas en placas de Petri con medio LB sólido suplementado con kanamicina para seleccionar las transformantes (apartado IV.10.1.1, en la página 29). Se seleccionaron 1-14 colonias de bacterias resistentes a kanamicina (Kan<sup>R</sup>)

por construcción, que se sembraron en estrías y se genotiparon mediante PCR, tal como se hizo con los clones de entrada (apartado V.2.1 y Figura 11, en la página 42).

Por otro lado, se aisló el ADN plasmídico de 2-4 clones positivos por construcción, que se envió a la empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal) para su secuenciación por el método de Sanger (apartado IV.7.4, en la página 21) con los cebadores que se muestran en la Tabla 2, en la página 22. Posteriormente, a partir de los electroferogramas obtenidos, se verificó en el laboratorio la integridad de los transgenes (Figura 12).



**Figura 12.-** Verificación de los transgenes en los clones de destino seleccionados. Se muestran varias secciones de los electroferogramas obtenidos mediante secuenciación por el método de Sanger de las construcciones de destino (A) *PHAX<sub>pro</sub>:PHAX:GFP*, (B) *35S<sub>pro</sub>:PHAX:YFP* y (C) *35S<sub>pro</sub>:PHAX*.

Adicionalmente, se comprobó que la unidad de transcripción del gen *PHAX*, sin el codón de terminación de la traducción y su región 3'-UTR, y las regiones codificantes de los genes de la GFP y la YFP estaban en fase en los transgenes *PHAX<sub>pro</sub>:PHAX:GFP* y *35S<sub>pro</sub>:PHAX:YFP* (Figura 12A y B, en la página 43). Esto último es esencial para garantizar la síntesis de las proteínas de fusión PHAX:GFP y PHAX:YFP, con las que se podrá establecer la localización subcelular de PHAX, e incluso, coimmunoprecipitar sus proteínas o ARN interactores, usando un anticuerpo comercial anti-GFP o anti-YFP.

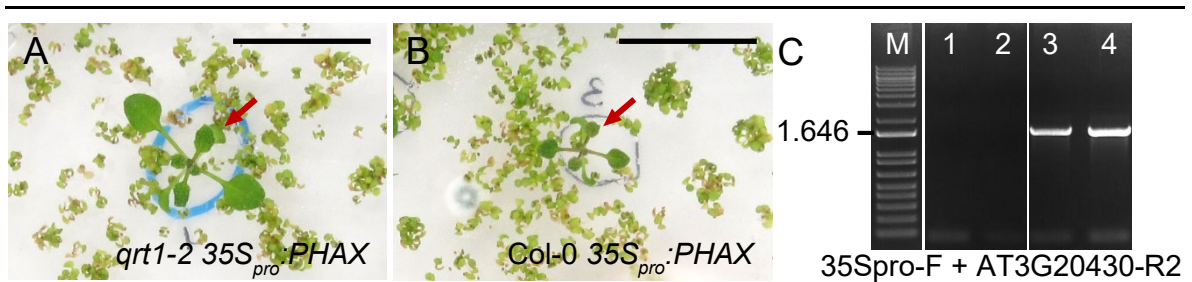
### **V.2.3.- Transferencia de las construcciones a *Agrobacterium tumefaciens* y obtención de líneas transgénicas de Arabidopsis**

El ADN plasmídico de los clones confirmados se transfirió mediante electroporación a células de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 electrocompetentes, que se inocularon en placas de Petri con medio LB sólido suplementado con kanamicina y rifampicina, para la selección positiva de las bacterias transformantes (apartado IV.10.1.2, en la página 29). Se seleccionaron 10 colonias de bacterias Kan<sup>R</sup> y Rif<sup>R</sup> por construcción, que se sembraron en estrías y se genotiparon mediante PCR, tal como se hizo con los clones de *Escherichia coli* (apartado V.2.1 y Figura 11, en la página 42).

Se seleccionó una colonia transformante por construcción, a partir de la cual se inició un cultivo en medio LB líquido suplementado con kanamicina y rifampicina. Con estos cultivos se transformaron, mediante infiltración de sus órganos florales (apartado IV.10.2, en la página 29), plantas de las estirpes *qrt1-2* y Col-0, para analizar los efectos derivados de la sobreexpresión del gen *PHAX* y establecer la localización subcelular de su producto, y las heterocigotas *PHAX/phax-1* y *PHAX/phax-2*, para intentar rescatar el fenotipo de los mutantes *phax-1* y *phax-2*, respectivamente.

Se recolectaron las semillas T<sub>1</sub> de las plantas *qrt1-2* y Col-0 transformadas con las construcciones de destino *PHAX<sub>pro</sub>:PHAX:GFP* y *35S<sub>pro</sub>:PHAX* (apartado IV.3.2, en la página 14), que se sembraron en placas de Petri con medio sólido GM suplementado con higromicina (apartado IV.10.2.2, en la página 30). Se seleccionaron 7 plantas resistentes a higromicina (Hig<sup>R</sup>) 14 dde, que se genotiparon mediante PCR con las parejas de cebadores AT3G20430-F2 + GFP-R o 35S<sub>pro</sub>-F + AT3G20430-R2 (Tabla 2, en la página 22). Los productos de PCR obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% m/v, teñido con bromuro de etidio, corroborando que las plantas Hig<sup>R</sup> seleccionadas eran portadoras de los transgenes *PHAX<sub>pro</sub>:PHAX:GFP* o *35S<sub>pro</sub>:PHAX*. En la Figura 13, en la página 45, se muestran dos de las plantas Hig<sup>R</sup> seleccionadas, portadoras del transgén *35S<sub>pro</sub>:PHAX* en fondo genético *qrt1-2* (Figura 13A) o Col-0 (Figura 13B), y los resultados

de su genotipado (Figura 13C). El fenotipo morfológico de estas plantas transgénicas fue similar al de los fondos *qrt1-2* y Col-0, por lo que, en el caso de estarse sobreexpresando el gen *PHAX*, que no se ha comprobado, no parece que tenga ningún efecto fenotípico. Se esperará a que estos individuos se autofecunden y se analizarán los niveles de expresión de *PHAX* en las plantas de la generación T<sub>2</sub> mediante retrotranscripción seguida de PCR convencional (RT-PCR) o PCR cuantitativa (RT-qPCR).



**Figura 13.-** Verificación de los transformantes T<sub>1</sub>. (A-B) Fenotipo morfológico de una planta T<sub>1</sub> Hig<sup>R</sup> (A) *qrt1-2 35S<sub>pro</sub>:PHAX* y (B) Col-0 *35S<sub>pro</sub>:PHAX*, que se señala con una flecha de color rojo. Las fotografías se tomaron 14 dde. Las barras de escala indican 5 mm. (C) Genotipado de las plantas T<sub>1</sub> Hig<sup>R</sup> que aparecen en (A) y (B) por amplificación mediante PCR con los cebadores que se indican. Se muestran los productos de PCR al (1) no utilizar molde, o usar ADN genómico de una planta (2) Col-0, (3) *qrt1-2 35S<sub>pro</sub>:PHAX* o (4) Col-0 *35S<sub>pro</sub>:PHAX*. Se siguen las pautas definidas en el pie de la Figura 8, en la página 36.

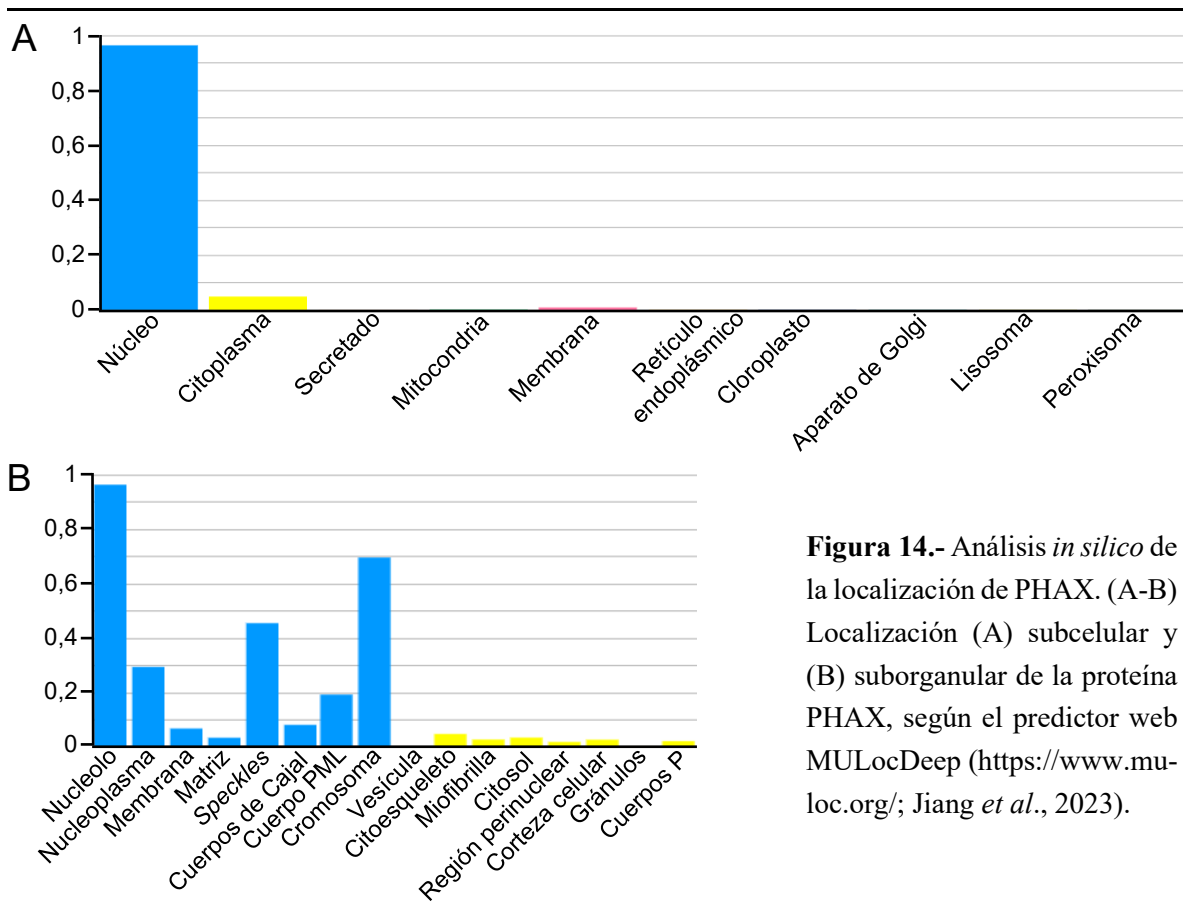
También se recolectaron las semillas T<sub>1</sub> de las plantas *qrt1-2* y Col-0 transformadas con la construcción de destino *35S<sub>pro</sub>:PHAX:YFP* (apartado IV.3.2, en la página 14), que se sembraron en placas de Petri con medio sólido GM suplementado con 2,5 µg/ml de Basta (apartado IV.10.2.2, en la página 30). Sin embargo, 14 dde no se pudo distinguir entre las plantas resistentes a Basta y las sensibles, por lo que se repetirá la siembra aumentando la concentración de Basta utilizada, o sembrando las semillas T<sub>1</sub> directamente en macetas y subirrigándolas con medio mínimo ATM (apartado IV.6.1, en la página 16) suplementado con 100 µl/l de Basta. Si no se obtuviesen transformantes, se repetirá la transformación de las plantas *qrt1-2* y Col-0 (apartado IV.11.2, en la página 27).

Las plantas *PHAX/phax-1* y *PHAX/phax-2* transformadas con las construcciones de destino se están secando en el momento en que se redacta esta memoria. Más adelante, se recogerán las semillas T<sub>1</sub> y se sembrarán, tal como se ha descrito previamente.

### V.3.- Predicción de la localización subcelular y suborganular de PHAX

Los transgenes *PHAX<sub>pro</sub>:PHAX:GFP* y *35S<sub>pro</sub>:PHAX:YFP* obtenidos en este TFM y transferidos a plantas de *Arabidopsis qrt1-2*, *PHAX/phax-1*, Col-0 y *PHAX/phax-2* (apartado

V.2, en la página 40) permitirán establecer la localización subcelular *in vivo* de la proteína PHAX mediante su fusión traduccional con la GFP y la YFP. También se llevó a cabo un análisis *in silico* de la localización subcelular y suborganular de PHAX con el predictor web MULocDeep (<https://www.mu-loc.org/>; Jiang *et al.*, 2023). Según este predictor, PHAX se localiza principalmente en el núcleo, concretamente en el nucleolo, aunque también está en el citoplasma, mayoritariamente en el citoesqueleto (Figura 14). Estas predicciones concuerdan con la localización nuclear de la PHAX humana, que se inmunolocalizó en distintas líneas celulares con un par de anticuerpos policlonales sintetizados en conejo (<https://www.proteinatlas.org/>), lo que sugiere una conservación funcional de la proteína PHAX en *Arabidopsis*.



#### V.4.- Estudio del procesamiento del pre-ARNr 45S en los mutantes *phax*

Tal como se describe en el apartado II.4, en la página 7, las proteínas PHAX de los metazoos participan en el transporte de los pre-snoARN para su maduración y ensamblaje en las snoRNP, entre ellas la snoRNP U3, esencial para la función del procesoma SSU, encargado del procesamiento temprano del pre-ARNr 47S y la síntesis de la subunidad



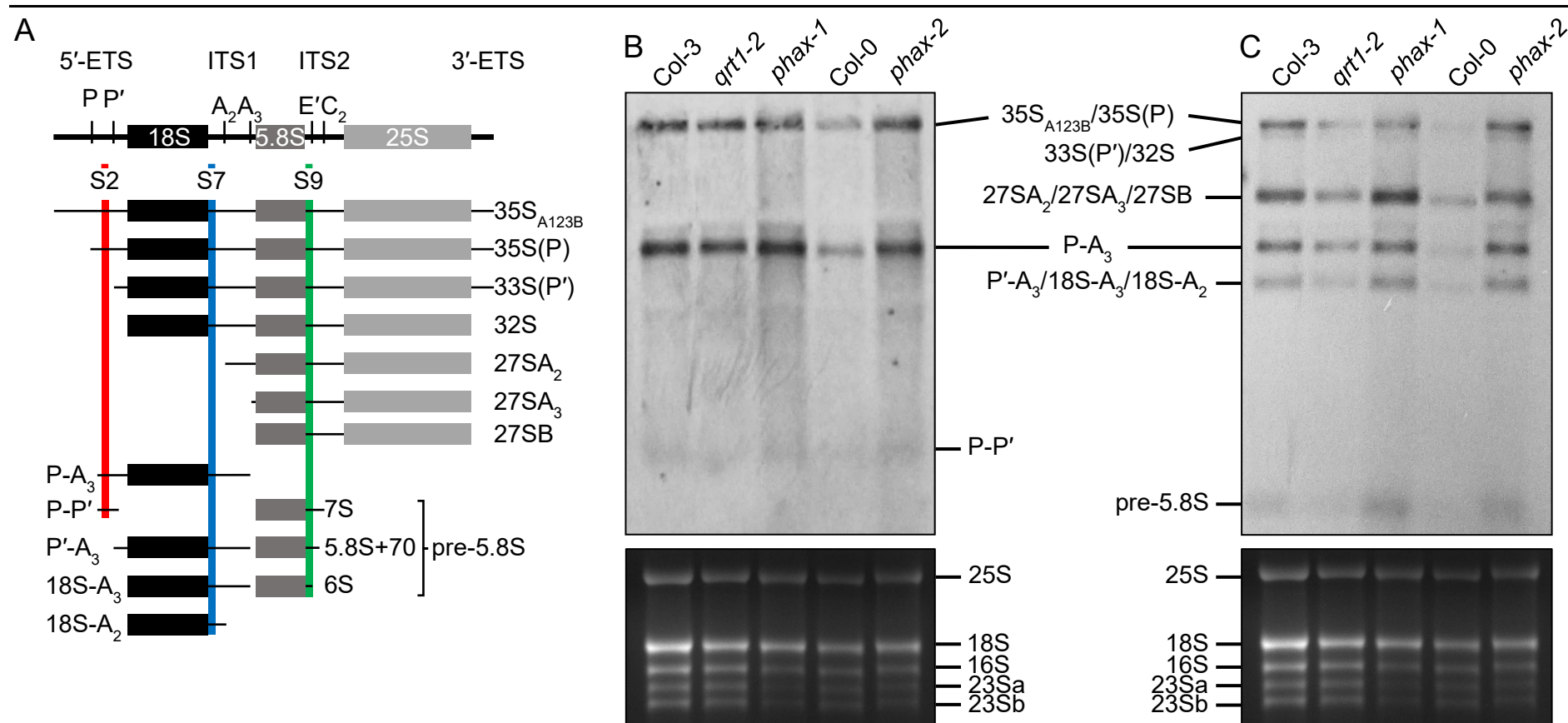
40S del ribosoma (Ohno *et al.*, 2000; Watkins *et al.*, 2004; Kiss *et al.*, 2006; Langhendries *et al.*, 2016).

Para comprobar si esta función se conserva también en su presunta ortóloga de *Arabidopsis*, se estudió el procesamiento del pre-ARNr 45S en los mutantes *phax*, llevando a cabo análisis de *northern* (apartado IV.8, en la página 23) con las sondas S2, S7 y S9, las cuales permiten detectar los pre-ARNr que se muestran en la Figura 15A, en la página 48, pero no los ARNr maduros. Se emplearon 3 µg de ARN total de plantas Col-3, *qrt1-2*, *phax-1*, Col-0 y *phax-2*, extraído como se describe en el apartado IV.7.1.3, en la página 20.

La sonda S2 permite detectar los pre-ARNr 35S<sub>A123B</sub>/35S(P) y P-A<sub>3</sub>, que parecen acumularse en las plantas *phax-1* y *phax-2* con respecto a las *qrt1-2* (Col-3) y Col-0, respectivamente. La sonda S2 también es complementaria al subproducto P-P', que no parece acumularse en los mutantes *phax* (Figura 15B, en la página 48).

Las sondas S7 y S9 permiten detectar los pre-ARNr mayores, 35S<sub>A123B</sub>/35S(P) y 35S(P')/32S, observándose el primero de ellos, de nuevo, acumulado en los mutantes *phax-1* y *phax-2* en comparación con sus estirpes de procedencia *qrt1-2* (Col-3) y Col-0, respectivamente (Figura 15C, en la página 48). Con la sonda S7 también se pueden detectar los pre-ARNr P-A<sub>3</sub> y P'A<sub>3</sub>/18S-A<sub>3</sub>/18S-A<sub>2</sub>, cuyo procesamiento da lugar al ARNr 18S. Uno o varios de estos pre-ARNr parecen acumularse en las plantas *phax* (Figura 15C, en la página 48). Por su parte, la sonda S9 también es complementaria a los pre-ARNr 27SA<sub>2</sub>/27SA<sub>3</sub>/27SB, cuyo procesamiento da lugar a los ARNr 25S y 5.8S. Uno o varios de estos pre-ARNr también parecen acumularse en los mutantes *phax* (Figura 15C, en la página 48). Finalmente, los últimos precursores del procesamiento del ARNr 5.8S, que se denominan colectivamente pre-5.8S y que se pueden detectar también con la sonda S9, parecen acumularse en las plantas *phax* con respecto a las *qrt1-2* (Col-3) y Col-0, aunque este resultado es menos evidente que los anteriores (Figura 15C, en la página 48).

La acumulación en los mutantes *phax* de los pre-ARNr mayores 35S<sub>A123B</sub>/35S(P), primeros productos del procesamiento del pre-ARNr 45S, podría deberse a defectos en la maduración del snoARN U3 por no poder ser transportado correctamente a los cuerpos de Cajal, proceso en el que interviene la proteína PHAX en los metazoos. En *Arabidopsis*, el snoARN U3 maduro se ensambla en la snoRNP U3 y dirige el corte del pre-ARNr 45S en el sitio P (Figura 1, en la página 5; revisado en Sáez-Vásquez y Delseny, 2019). Además, el resto de los precursores que se ven acumulados en los mutantes *phax* son los de la ruta del "ITS1 primero", lo que podría deberse a un retraso de esta (Figura 1, en la página 5).



**Figura 15.-** Resultados del estudio mediante análisis de *northern* del procesamiento del pre-ARNr 45S en los mutantes *phax*. (A) Esquema del procesamiento del pre-ARNr 45S en *Arabidopsis*. Modificado a partir de Micol-Ponce *et al.* (2020). Las barras verticales en el pre-ARNr 45S indican los sitios de corte endonucleolítico. Las bandas verticales de color rojo, azul y verde marcan las regiones de los pre-ARNr con las que hibridan las sondas S2, S7 y S9, respectivamente. ETS: espaciador transcrito externo. ITS: espaciador transcrito interno. (B, C) Resultados de la hibridación con las sondas (B) S2 y (C) S7 + S9. Se indica el nombre de los precursores y subproductos que se detectan. Debajo de cada membrana se muestra la electroforesis del ARN total en un gel de agarosa al 1,4% m/v, y se indican las bandas correspondientes a los ARNr maduros del ribosoma citoplásmico (ARNr 25S y 18S) y del cloroplasto (ARNr 16S, 23Sa y 23Sb).

### **V.5.- Análisis de la expresión génica y el *splicing* en los mutantes *phax***

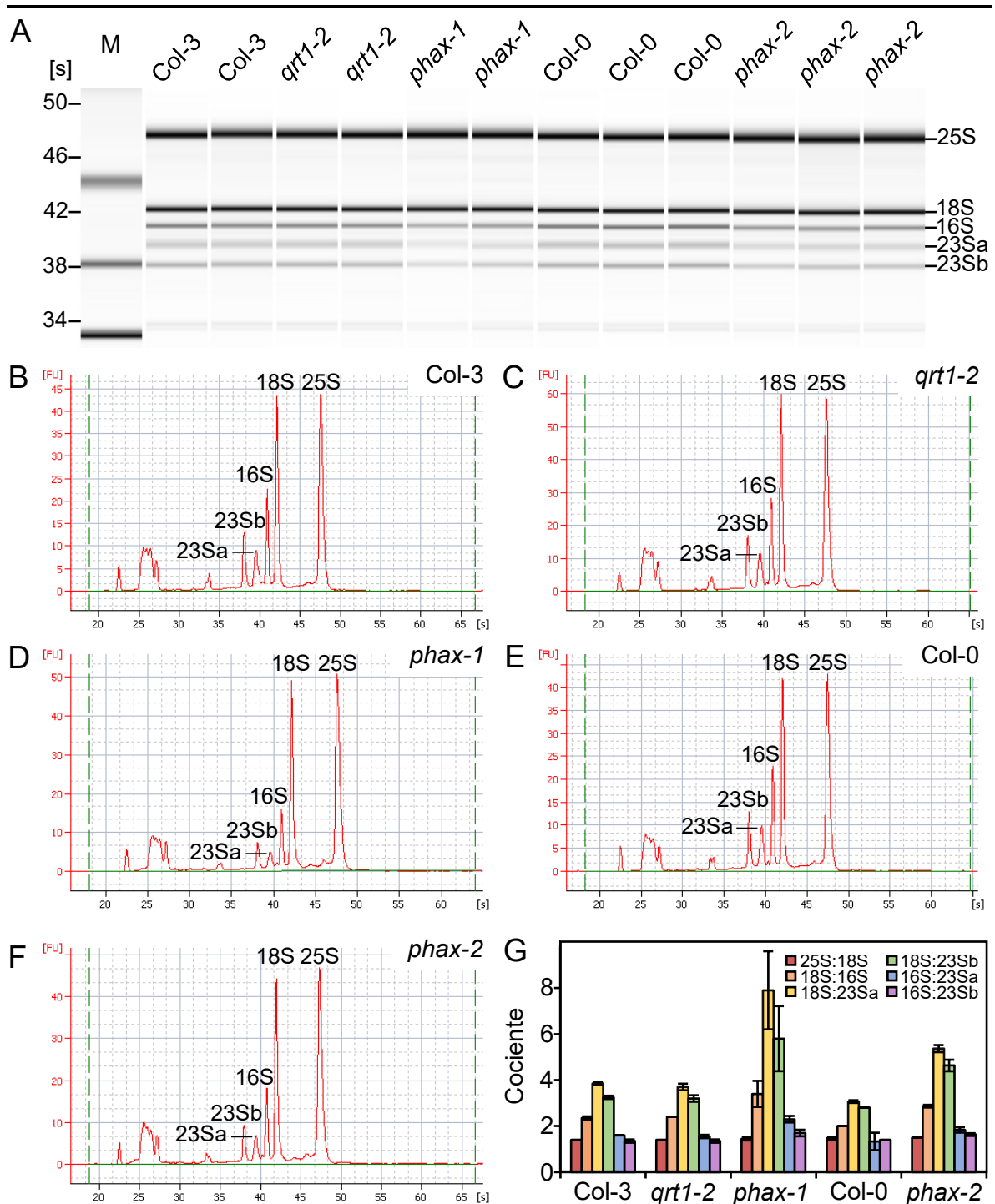
Con el fin de estudiar la expresión génica y el *splicing* en los mutantes *phax*, se encargó un ensayo de secuenciación masiva de ARNm (*RNA-seq*), y su posterior análisis bioinformático, a la empresa Novogene (Cambridge, Reino Unido). Para ello, se usó el ARN total de tres réplicas biológicas de Col-0 y *phax-2* 21 dde, que se extrajo tal como se detalla en el apartado IV.7.1.3, en la página 20. Antes de enviar las muestras a Novogene, que contenían unos 5 µg de ARN total, se comprobó en el laboratorio su integridad y pureza, sometiéndolas a electroforesis capilar en un bioanalizador (apartado IV.7.5, en la página 23, y apartado V.6).

El *RNA-seq* se llevó a cabo con secuenciadores masivos Illumina NovaSeq 6000, obteniendo lecturas pareadas de 150 pb. En el momento en que se redacta esta memoria, se están ejecutando los análisis de expresión génica, cuyos resultados permitirán conocer los genes diferencialmente expresados en el mutante *phax-2* y su silvestre Col-0.

### **V.6.- Análisis del ARN total de los mutantes *phax* en un bioanalizador**

Para poder determinar la integridad y pureza del ARN total empleado en los análisis de *northern* (apartados IV.8 y V.4, en las páginas 23 y 46, respectivamente) y el *RNA-seq* (apartado anterior), así como posibles variaciones en las concentraciones relativas de los ARNr del citoplasma y el cloroplasto en los mutantes *phax*, se sometió el ARN total de dos o tres réplicas biológicas de Col-3, *qrt1-2*, *phax-1*, Col-0 y *phax-2* 21 dde a electroforesis capilar en un bioanalizador Agilent 2100, tal como se describe en el apartado IV.7.5, en la página 23.

Los valores de RIN de todas las muestras estuvieron comprendidos entre 7,1 y 8,1, demostrando que el ARN total no estaba degradado ni contaminado con ADN genómico. Además, el gel representado por el programa del bioanalizador mostró el patrón típico del ARN total de las plantas, con dos bandas más intensas correspondientes a los ARNr 25S y 18S maduros, y otras más tenues, las de los ARNr del cloroplasto. A este respecto, no se observaron diferencias en la intensidad de las bandas de los ARNr 25S y 18S entre los mutantes *phax* y sus fondos genéticos, sin embargo, las bandas de los ARNr del cloroplasto fueron menos intensas en las muestras de los mutantes, lo cual era esperable debido al fenotipo clorótico de algunas de las plantas *phax* (Figura 16A, en la página 50). Tampoco se vio ninguna banda de migración electroforética más lenta que la del ARNr 25S, que suele aparecer en las muestras de ARN total contaminadas con ADN genómico.



**Figura 16.-** Resultados de la electroforesis capilar de ARN de los mutantes *phax* en un bioanalizador. (A) Simulación de la electroforesis en gel, tal como la representa el programa 2100 Expert Software (Agilent Technologies). Se indican las bandas correspondientes a los ARNr maduros del citoplasma (ARNr 25S y 18S) y el cloroplasto (ARNr 16S, 23Sa y 23Sb). M: marcador de peso molecular. (B-F) Electroferogramas del ARN total de una de las réplicas biológicas analizadas de (B) Col-3, (C) *qrt1-2*, (D) *phax-1*, (E) Col-0 y (F) *phax-2*. Se señalan los picos correspondientes a los ARNr 25S, 18S, 16S, 23Sa y 23Sb. (G) Valores de los cocientes entre las concentraciones relativas de los ARNr del citoplasma y el cloroplasto de dos o tres réplicas biológicas por genotipo. Las barras de error indican la desviación estándar.

Por otro lado, se calculó el valor del cociente 25S:18S, que fue mayor a 1 en todas las muestras analizadas, no observándose diferencias significativas entre los cocientes de los mutantes *phax-1* y *phax-2*, y los de sus estirpes de procedencia *qrt1-2* (Col-3) y Col-0, respectivamente (Figura 16B-G, en la página 50). De estos resultados se concluyó que las concentraciones relativas de los ARNr 25S y 18S maduros en las plantas *phax* no difieren de las de sus fondos genéticos. También se determinó el valor de los cocientes 18S:16S, 18S:23Sa, 18S:23Sb, 16S:23Sa y 16S:23Sb, que sirven como indicadores de la abundancia de las subunidades mayor o 50S y menor o 30S del ribosoma del cloroplasto (Tiller *et al.*, 2012). En estos casos sí se observaron diferencias, que se consideraron significativas únicamente cuando los valores de los cocientes comparados diferían, al menos, en 0,5 unidades. Siguiendo este criterio, se observó un incremento de los cocientes 18S:16S, 18S:23Sa y 18S:23Sb en las plantas *phax* en comparación con las *qrt1-2* (Col-3) y Col-0, lo que refleja una disminución de las concentraciones de los ARNr maduros del cloroplasto en las primeras. También se vio aumentado el cociente 16S:23Sa en los mutantes *phax*, lo que sugiere una disminución en estos de la subunidad 30S del ribosoma del cloroplasto (Figura 16B-G, en la página 50).

## V.7.- Análisis de interacciones genéticas

A fin de profundizar en el estudio de la posible función de PHAX en la maduración del pre-ARNr 45S y el *splicing* de los pre-ARNm en Arabidopsis, se llevó a cabo un análisis de interacciones genéticas, cruzando algunos mutantes de pérdida de función de genes que codifican FBR y/o PR (*mtr4-2*, *smo4-3*, *parl1-2*, *rps24b-2*, *cxip4-2*, *rrp7-1*), o factores relacionados con el *splicing* (*abs-1*, *mas2-1*, *prp8-7*), por los heterocigotos *PHAX/phax-1* o *PHAX/phax-2* (apartado IV.4, en la página 15). Se evitó la mezcla de fondos genéticos, empleando en los cruzamientos las plantas *PHAX/phax-1* o *PHAX/phax-2* en función de si la estirpe de procedencia del otro mutante era *qrt1-2* (Col-3) o Col-0, respectivamente. Los cruzamientos realizados fueron: *ABS/abs-1* × *PHAX/phax-1*; *PHAX/phax-1* × *ABS/abs-1*; *mtr4-2* × *PHAX/phax-1*; *smo4-3* × *PHAX/phax-2*; *amiR-MAS2* × *PHAX/phax-2*; *parl1-2* × *PHAX/phax-2*; *rps24b-2* × *PHAX/phax-2*; *cxip4-2* × *PHAX/phax-2*; *rrp7-1* × *PHAX/phax-2* y *prp8-7* × *PHAX/phax-2*.

Se analizó la generación F<sub>1</sub> de todos los cruzamientos. Para ello, se sembraron las semillas F<sub>1</sub> y se analizó el fenotipo morfológico de las plantas 14 dde, descartando las que presentaron el fenotipo mutante del parental femenino, por proceder de la autofecundación de este, y seleccionando 7-15 fenotípicamente silvestres. Se genotiparon estas plantas por amplificación mediante PCR con los cebadores AT3G20430-F1 y AT3G20430-R1, para

comprobar la presencia del alelo silvestre *PHAX*, y las parejas AT3G20430-F1 + LB\_SAIL y LB\_GK + AT3G20430-R1, para amplificar los alelos *phax-1* y *phax-2*, respectivamente, y así conservar solo las dihíbridas. En el caso de los cruzamientos por *ABS/abs-1*, también se comprobó la presencia de los alelos *ABS* y *abs-1* por amplificación mediante PCR con los cebadores AT5G51280-F, AT5G51280-R y LB\_SAIL (Tabla 2, en la página 22).

Más adelante, se analizará la generación F<sub>2</sub> de estos cruzamientos con el objetivo de identificar y estudiar el fenotipo de los descendientes que presenten las mutaciones de sus parentales en homocigosis o dobles mutantes. En el caso de observar un fenotipo más extremo o nuevo al de los parentales (sinergia), o si el fenotipo de uno de los progenitores se ocultase por el del otro (epistasia), se podría confirmar una relación funcional entre los genes a estudio. Por el contrario, si el fenotipo del doble mutante resultase de la suma de los fenotipos de ambos parentales (aditividad), se podría suponer la ausencia de relación funcional entre los genes estudiados (Pérez-Pérez *et al.*, 2009).

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

## VI.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Durante este TFM se ha contribuido a la caracterización funcional del gen *PHAX* de *Arabidopsis*, mediante el análisis fenotípico y molecular de dos líneas insercionales, así como el diseño, la generación y la transferencia de distintos transgenes a plantas silvestres y mutantes, cuya expresión permitirá rescatar el fenotipo de las segundas, determinar los efectos de la sobreexpresión del gen, y establecer la localización subcelular de su producto.

Mediante un par de alineamientos múltiples se ha confirmado la conservación de la estructura primaria del dominio de unión a ARN en la proteína *PHAX* de *Arabidopsis* con respecto a sus ortólogas humana y de *Drosophila*, que es aún mayor cuando se compara con las de otras plantas, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas, lo que sugiere su conservación funcional.

Se ha denominado *phax-1* y *phax-2* a los alelos insercionales de *PHAX*, ya que no se había estudiado previamente y, por tanto, no se habían descrito alelos mutantes para este gen. Se ha determinado la posición exacta de las inserciones mediante secuenciación por el método de Sanger. Se ha comprobado mediante un ensayo de complementación genética, cruzando las plantas *PHAX/phax-1* y *PHAX/phax-2*, que ambas inserciones son alélicas y responsables del fenotipo pleiotrópico de los mutantes *phax*. Los resultados de las segregaciones de plantas fenotípicamente silvestres frente a mutantes y la observación de un elevado número de semillas no germinadas, descendientes por autofecundación de las heterocigotas *PHAX/phax-1* y *PHAX/phax-2*, sumado a la baja tasa de supervivencia de las mutantes y la inviabilidad de sus semillas, sugieren que ambos alelos insercionales afectan al desarrollo gametofítico, embrionario y/o postembrionario. El estudio de la eficacia de la transmisión de los alelos *phax*, analizando la F<sub>1</sub> de los cruzamientos recíprocos de las plantas *PHAX/phax-1* y *PHAX/phax-2*, por sus fondos genéticos *qrt1-2* (Col-3) y Col-0, respectivamente, sugiere que ambos causan cierta reducción de la viabilidad del gametofito masculino, mientras que el alelo *phax-2* también reduce significativamente la viabilidad del gametofito femenino. Más adelante, se diseccionarán algunas silicuas inmaduras de las plantas *PHAX/phax-1*, *phax-1*, *PHAX/phax-2* y *phax-2*, y se decolorarán las semillas que haya en su interior, a fin de analizar el desarrollo de los embriones bajo el microscopio y determinar si existe algún tipo de letalidad embrionaria.

Por otro lado, mediante la tecnología Gateway se han diseñado y generado los transgenes *PHAX<sub>pro</sub>:PHAX:GFP*, *35S<sub>pro</sub>:PHAX:YFP* y *35S<sub>pro</sub>:PHAX*, que se han transferido a plantas de *Arabidopsis* *qrt1-2*, *PHAX/phax-1*, Col-0 y *PHAX/phax-2*. Se han obtenido plantas T<sub>1</sub> *qrt1-2* y Col-0 portadoras de los transgenes *PHAX<sub>pro</sub>:PHAX:GFP* y *35S<sub>pro</sub>:PHAX*,



que son fenotípicamente silvestres. Más adelante, se intentará determinar la localización subcelular de la proteína de fusión PHAX:GFP en las plantas  $T_2$  portadoras del transgén  $PHAX_{pro}:PHAX:GFP$ . Se espera que esta proteína de fusión se localice mayoritariamente en el núcleo, atendiendo a los resultados del análisis *in silico* con el predictor MuLocDeep (<https://www.mu-loc.org/>; Jiang *et al.*, 2023), y a la localización de la PHAX humana. Se comprobará por RT-PCR y/o RT-qPCR si el gen *PHAX* se sobreexpresa en las plantas portadoras del transgén  $35S_{pro}:PHAX$ , lo que supondría que la sobreexpresión de este gen no afecta al desarrollo de *Arabidopsis*. Se obtendrán transformantes para todos los transgenes y fondos genéticos, comprobando si se recupera el fenotipo silvestre en las líneas transgénicas en fondo mutante. Además, con aquellas que expresen los transgenes  $PHAX_{pro}:PHAX:GFP$  y  $35S_{pro}:PHAX:YFP$  se podrán realizar ensayos de colocalización con marcadores, así como de coimmunoprecipitación de proteínas y ARN que interaccionen con las proteínas de fusión PHAX:GFP y PHAX:YFP. Estas se inmunoprecipitarán con anticuerpos comerciales anti-GFP, anti-YFP o anti-HA, y sus interactores se analizarán mediante cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas, en el caso de las proteínas, o mediante *RNA-seq*, en el caso de los ARN.

Mediante análisis de *northern* se ha observado que en las plantas *phax-1* y *phax-2* se acumulan distintos precursores del procesamiento del pre-ARNr 45S ( $35S_{A123B}/35S(P)$ ,  $27SA_2/27SA_3/27SB$ , P- $A_3$  y P'- $A_3/18S-A_3/18S-A_2$ ). Algunos de estos pre-ARNr pertenecen a la misma ruta de procesamiento, la del "ITS1 primero", por lo que su acumulación sugiere un retraso en los cortes que se producen en esta ruta. Por otro lado, la acumulación de los pre-ARNr  $35S_{A123B}/35S(P)$  podría deberse a un transporte deficiente del pre-snoARN U3 a los cuerpos de Cajal, como consecuencia directa de la insuficiencia de función de PHAX. Se sabe que en los cuerpos de Cajal se completa la maduración del snoARN U3, que se ensambla posteriormente en la snoRNP U3, y dirige el corte del pre-ARNr 45S en el sitio P (revisado en Sáez-Vásquez y Delseny, 2019). Se ha observado también una disminución de los ARNr 16S, 23Sa y 23Sb maduros del ribosoma del cloroplasto, mediante electroforesis capilar en un bioanalizador. Más adelante, se barajará la posibilidad de analizar el procesamiento de los pre-ARNr del ribosoma del cloroplasto, mediante análisis de *northern* con sondas que hibriden específicamente en sus secuencias. Además, se repetirán los análisis de *northern* realizados en este TFM, utilizando diferentes réplicas biológicas con la intención de cuantificar la acumulación de los distintos precursores.

Con el objetivo de estudiar la expresión génica y el *splicing* en el mutante *phax-2*, se ha encargado un *RNA-seq*, y su posterior análisis bioinformático, a una empresa, cuyos resultados permitirán conocer qué genes se encuentran diferencialmente expresados en el

mutante *phax-2* y su silvestre Col-0. En cuanto estén disponibles, se analizarán en detalle dichos resultados, que se podrán corroborar en el laboratorio mediante RT-qPCR. En caso de encontrarse desregulado algún gen de interés, se solicitará alguna línea insercional de dominio público que lo interrumpa, a fin de estudiar los efectos de su pérdida de función, y se llevará a cabo un análisis de interacciones genéticas.

Finalmente, se han cruzado las plantas *PHAX/phax-1* y *PHAX/phax-2* por algunos mutantes de pérdida de función de genes que codifican FBR, PR o factores relacionados con el *splicing*, a fin de estudiar si existe alguna relación funcional entre *PHAX* y los genes afectados en estos mutantes. Actualmente, se han recogido las semillas F<sub>2</sub> de todos los cruzamientos realizados, que se sembrarán para intentar aislar los dobles mutantes, cuyo fenotipo se analizará. Si existiese alguna relación funcional entre los genes afectados en los dobles mutantes, estos serían sinérgicos o epistáticos, y en ellos se podría estudiar el procesamiento del pre-ARNr 45S mediante análisis de *northern* con diferentes sondas, y el *splicing* mediante RT-PCR y/o *RNA-seq*.

## **VI.- BIBLIOGRAFÍA**

## VII.- BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Baudin-Baillieu, A., Tollervey, D., Cullin, C., y Lacroute, F. (1997). Functional analysis of Rrp7p, an essential yeast protein involved in pre-rRNA processing and ribosome assembly. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 5023-5032.
- Bechtold, N., y Pelletier, G. (1998). *In planta Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods in Molecular Biology* **82**, 259-266.
- Berná, G., Robles, P., y Micol, J.L. (1999). A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **152**, 729-742.
- Bernard, P., y Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology* **226**, 735-745.
- Cabezas-Fuster, A., Micol-Ponce, R., Sarmiento-Mañús, R., y Ponce, M.R. (2023). Cross-kingdom conservation of Arabidopsis RPS24 function in 18S rRNA maturation. *bioRxiv* doi: 10.1101/2023.04.21.537868.
- Clough, S.J., y Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**, 735-743.
- Copenhaver, G.P., Browne, W.E., y Preuss, D. (1998). Assaying genome-wide recombination and centromere functions with *Arabidopsis* tetrads. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**, 247-252.
- Chen, D., Li, Z., Yang, Q., Zhang, J., Zhai, Z., y Shu, H. (2003). Identification of a nuclear protein that promotes NF- $\kappa$ B activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **310**, 720-724.
- Delicado Mateo, R. (2021). Contribución al estudio de la relación funcional entre la ruta de los microARN y la biogénesis del ribosoma en *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**, 19-21.
- Francis, K.E., Lam, S.Y., y Copenhaver, G.P. (2006). Separation of Arabidopsis pollen tetrads is regulated by *QUARTET1*, a pectin methylesterase gene. *Plant Physiology* **142**, 1004-1013.
- Fujikura, U., Horiguchi, G., Ponce, M.R., Micol, J.L., y Tsukaya, H. (2009). Coordination of cell proliferation and cell expansion mediated by ribosome-related processes in the leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **59**, 499-508.
- Hartley, J.L., Temple, G.F., y Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research* **10**, 1788-1795.
- Henras, A.K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.F., Chakraborty, A., y Gleizes, P.E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **6**, 225-242.
- Horiguchi, G., Mollá-Morales, A., Pérez-Pérez, J.M., Kojima, K., Robles, P., Ponce, M.R., Micol, J.L., y Tsukaya, H. (2011). Differential contributions of ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development. *Plant Journal* **65**, 724-736.
- Jiang, Y., Jiang, L., Akhil, C.S., Wang, D., Zhang, Z., Zhang, W., y Xu, D. (2023). MULOcDeep web service for protein localization prediction and visualization at subcellular and suborganellar levels. *Nucleic Acids Research*.
- Jover-Gil, S., Candela, H., Robles, P., Aguilera, V., Barrero, J.M., Micol, J.L., y Ponce, M.R. (2012). The microRNA pathway genes *AGO1*, *HEN1* and *HYL1* participate in leaf proximal-distal, venation and stomatal patterning in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **53**, 1322-1333.
- Karijolich, J., y Yu, Y.T. (2010). Spliceosomal snRNA modifications and their function. *RNA Biology* **7**, 192-204.

- Kiss, T., Fayet, E., Jady, B.E., Richard, P., y Weber, M. (2006). Biogenesis and intranuclear trafficking of human box C/D and H/ACA RNPs. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **71**, 407-417.
- Kleinboelting, N., Huep, G., Kloetgen, A., Viehoveer, P., y Weisshaar, B. (2012). GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Research* **40**, D1211-D1215.
- Korkuc, P., Schippers, J.H., y Walther, D. (2014). Characterization and identification of cis-regulatory elements in *Arabidopsis* based on single-nucleotide polymorphism information. *Plant Physiology* **164**, 181-200.
- Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1987). Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service* **24**.
- Krogan, N.J., Peng, W.T., Cagney, G., Robinson, M.D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadien, V., Richards, D.P., Beattie, B.K., Lalev, A., Zhang, W., Davierwala, A.P., Mnaimneh, S., Starostine, A., Tikuisis, A.P., Grigull, J., Datta, N., Bray, J.E., Hughes, T.R., Emili, A., y Greenblatt, J.F. (2004). High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Molecular Cell* **13**, 225-239.
- Kufel, J., y Grzechnik, P. (2019). Small nucleolar RNAs tell a different tale. *Trends in Genetics* **35**, 104-117.
- Lafontaine, D.L.J., Riback, J.A., Bascetin, R., y Brangwynne, C.P. (2021). The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **22**, 165-182.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry* **58**, 913-949.
- Lange, H., Sement, F.M., y Gagliardi, D. (2011). MTR4, a putative RNA helicase and exosome co-factor, is required for proper rRNA biogenesis and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **68**, 51-63.
- Langhendries, J.L., Nicolas, E., Doumont, G., Goldman, S., y Lafontaine, D.L.J. (2016). The human box C/D snoRNAs U3 and U8 are required for pre-rRNA processing and tumorigenesis. *Oncotarget* **7**, 59519-59534.
- Lee, S., Kim, J.Y., Kim, Y.J., Seok, K.O., Kim, J.H., Chang, Y.J., Kang, H.Y., y Park, J.H. (2012). Nucleolar protein GLTSCR2 stabilizes p53 in response to ribosomal stresses. *Cell Death and Differentiation* **19**, 1613-1622.
- Martínez Fenoll, S. (2022). Análisis de la pérdida de función de los genes *POL5*, *UTP18*, *UTP22* y *RRP36* de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- McElver, J., Tzafrir, I., Aux, G., Rogers, R., Ashby, C., Smith, K., Thomas, C., Schetter, A., Zhou, Q., Cushman, M.A., Tossberg, J., Nickle, T., Levin, J.Z., Law, M., Meinke, D., y Patton, D. (2001). Insertional mutagenesis of genes required for seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**, 1751-1763.
- Micol-Ponce, R., Aguilera, V., y Ponce, M.R. (2014). A genetic screen for suppressors of a hypomorphic allele of *Arabidopsis ARGONAUTE1*. *Scientific Reports* **4**, 5533.
- Micol-Ponce, R., Sarmiento-Manus, R., Ruiz-Bayon, A., Montacie, C., Sáez-Vásquez, J., y Ponce, M.R. (2018). *Arabidopsis* RIBOSOMAL RNA PROCESSING7 is required for 18S rRNA maturation. *Plant Cell* **30**, 2855-2872.
- Micol-Ponce, R., Sarmiento-Manus, R., Fontcuberta-Cervera, S., Cabezas-Fuster, A., de Bures, A., Sáez-Vásquez, J., y Ponce, M.R. (2020). SMALL ORGAN4 is a ribosome biogenesis factor involved in 5.8S ribosomal RNA maturation. *Plant Physiology* **184**, 2022-2039.
- Micol Ponce, R. (2011). Aislamiento y caracterización de nuevas mutaciones supresoras del fenotipo de *argonaute1-52*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**, 263-273.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Obayashi, T., Hibara, H., Kagaya, Y., Aoki, Y., y Kinoshita, K. (2022). ATTED-II v11: a plant gene coexpression database using a sample balancing technique by subagging of principal components. *Plant and Cell Physiology* **63**, 869-881.
- Ohbayashi, I., y Sugiyama, M. (2018). Plant nucleolar stress response, a new face in the NAC-dependent cellular stress responses. *Frontiers in Plant Science* **8**, 2247.

- Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M., y Mattaj, I.W. (2000). PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* **101**, 187-198.
- Ohtani, M. (2017). Plant snRNP biogenesis: a perspective from the nucleolus and Cajal bodies. *Frontiers in Plant Science* **8**, 2184.
- Pagnussat, G.C., Yu, H.J., Ngo, Q.A., Rajani, S., Mayalagu, S., Johnson, C.S., Capron, A., Xie, L.F., Ye, D., y Sundaresan, V. (2005). Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development* **132**, 603-614.
- Pérez-Pérez, J.M., Candela, H., y Micol, J.L. (2009). Understanding synergy in genetic interactions. *Trends in Genetics* **25**, 368-376.
- Petricka, J.J., y Nelson, T.M. (2007). Arabidopsis nucleolin affects plant development and patterning. *Plant Physiology* **144**, 173-186.
- Phipps, K.R., Charette, J.M., y Baserga, S.J. (2011). The SSU processome in ribosome biogenesis-progress and prospects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **2**, 1-21.
- Preuss, D., Rhee, S.Y., y Davis, R.W. (1994). Tetrad analysis possible in *Arabidopsis* with mutation of the *QUARTET* (*QRT*) genes. *Science* **264**, 1458-1460.
- Prieto, J.L., y McStay, B. (2007). Recruitment of factors linking transcription and processing of pre-rRNA to NOR chromatin is UBF-dependent and occurs independent of transcription in human cells. *Genes & Development* **21**, 2041-2054.
- Robles, P., y Micol, J.L. (2001). Genome-wide linkage analysis of *Arabidopsis* genes required for leaf development. *Molecular Genetics and Genomics* **266**, 12-19.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., y Weisshaar, B. (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology* **53**, 247-259.
- Sáez-Vásquez, J., Caparros-Ruiz, D., Barneche, F., y Echeverría, M. (2004a). A plant snoRNP complex containing snoRNAs, fibrillarin, and nucleolin-like proteins is competent for both rRNA gene binding and pre-rRNA processing in vitro. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 7284-7297.
- Sáez-Vásquez, J., Caparros-Ruiz, D., Barneche, F., y Echeverría, M. (2004b). Characterization of a crucifer plant pre-rRNA processing complex. *Biochemical Society Transactions* **32**, 578-580.
- Sáez-Vásquez, J., y Delseny, M. (2019). Ribosome biogenesis in plants: from functional 45S ribosomal DNA organization to ribosome assembly factors. *Plant Cell* **31**, 1945-1967.
- Sánchez-García, A.B., Aguilera, V., Micol-Ponce, R., Jover-Gil, S., y Ponce, M.R. (2015). Arabidopsis *MAS2*, an essential gene that encodes a homolog of animal NF- $\kappa$ B activating protein, is involved in 45S ribosomal DNA silencing. *Plant Cell* **27**, 1999-2015.
- Sasaki, T., Naumann, U., Forai, P., Matzke, A.J., y Matzke, M. (2012). Unusual case of apparent hypermutation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **192**, 1271-1280.
- Sasaki, T., Kanno, T., Liang, S.C., Chen, P.Y., Liao, W.W., Lin, W.D., Matzke, A.J.M., y Matzke, M. (2015). An Rtf2 domain-containing protein influences pre-mRNA splicing and is essential for embryonic development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **200**, 523-535.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, E., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., y Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* **7**, 1-14.
- Segref, A., Mattaj, I.W., y Ohno, M. (2001). The evolutionarily conserved region of the U snRNA export mediator PHAX is a novel RNA-binding domain that is essential for U snRNA export. *RNA* **7**, 351-360.
- Serrano-Cartagena, J., Robles, P., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (1999). Genetic analysis of leaf form mutants from the *Arabidopsis* Information Service collection. *Molecular and General Genetics* **261**, 725-739.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M., y Goff, S.A. (2002). A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *Plant Cell* **14**, 2985-2994.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., y Higgins, D.G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* **7**.

- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B.H., y Hood, L.E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**, 674-679.
- Tafforeau, L., Zorbas, C., Langhendries, J.L., Mullineux, S.T., Stamatopoulou, V., Mullier, R., Wacheul, L., y Lafontaine, D.L.J. (2013). The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of pre-rRNA processing factors. *Molecular Cell* **51**, 539-551.
- Thomson, E., y Tollervey, D. (2005). Nop53p is required for late 60S ribosome subunit maturation and nuclear export in yeast. *RNA* **11**, 1215-1224.
- Tiller, N., Weingartner, M., Thiele, W., Maximova, E., Schöttler, M.A., y Bock, R. (2012). The plastid-specific ribosomal proteins of *Arabidopsis thaliana* can be divided into non-essential proteins and genuine ribosomal proteins. *Plant Journal* **69**, 302-316.
- Verheggen, C., y Bertrand, E. (2012). CRM1 plays a nuclear role in transporting snoRNPs to nucleoli in higher eukaryotes. *Nucleus* **3**, 132-137.
- Wang, R., Zhao, J., Jia, M., Xu, N., Liang, S., Shao, J., Qi, Y., Liu, X., An, L., y Yu, F. (2018). Balance between cytosolic and chloroplast translation affects leaf variegation. *Plant Physiology* **176**, 804-818.
- Watkins, N.J., Lemm, I., Ingelfinger, D., Schneider, C., Hoßbach, M., Urlaub, H., y Lührmann, R. (2004). Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. *Molecular Cell* **16**, 789-798.
- Weis, B.L., Kovacevic, J., Missbach, S., y Schleiff, E. (2015). Plant-specific features of ribosome biogenesis. *Trends in Plant Science* **20**, 729-740.
- Wheeler, D.L., Barrett, T., Benson, D.A., Bryant, S.H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D.M., Dicuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., Feolo, M., Geer, L.Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Khovayko, O., Landsman, D., Lipman, D.J., Madden, T.L., Maglott, D.R., Miller, V., Ostell, J., Pruitt, K.D., Schuler, G.D., Shumway, M., Sequeira, E., Sherry, S.T., Sirotkin, K., Souvorov, A., Starchenko, G., Tatusov, R.L., Tatusova, T.A., Wagner, L., y Yaschenko, E. (2008). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* **36**, D13-D21.
- Zhang, X.R., Qin, Z., Zhang, X., y Hu, Y. (2015). *Arabidopsis* SMALL ORGAN 4, a homolog of yeast NOP53, regulates cell proliferation rate during organ growth. *Journal of Integrative Plant Biology* **57**, 810-818.