



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

Análisis funcional de *RRP8* y desarrollo de un método basado en la PCR digital para el análisis del número de copias del ADNr 45S



Juan Felipe Gallego Serna

Tutoras:

María Rosa Ponce Molet

Rosa Micol Ponce

Área de Genética

Departamento de Biología Aplicada

Máster en Biotecnología y Bioingeniería

Instituto de Bioingeniería

Curso académico 2022-2023

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

ROSA MICOL PONCE, Investigadora postdoctoral de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

HACEMOS CONSTAR:

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



María Rosa Ponce Molet



Rosa Micol Ponce

Elche, 1 de septiembre de 2023.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	III
I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	1
II.- INTRODUCCIÓN	2
II.1.- Razones del uso de <i>Arabidopsis thaliana</i> en genética vegetal	2
II.2.- La biogénesis del ribosoma citoplasmático en <i>Arabidopsis</i>	2
II.2.1.- Organización del ADNr 45S	3
II.2.2.- Transcripción del ARNr 45S	3
II.2.3.- Procesamiento del pre-ARNr 45S en <i>Arabidopsis</i>	5
II.2.4.- El procesoma SSU	6
II.3.- El análisis de la expresión génica	7
II.3.1.- La hibridación de tipo <i>northern</i>	7
II.3.2.- La RT-PCR	7
II.3.3.- Determinación del número de copias del ADNr 45S	8
II.3.4.- La PCR digital (dPCR)	9
II.4.- Funciones de la proteína RRP8 en hongos y animales.....	10
III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	13
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	14
IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria	14
IV.2.- Nomenclatura genética.....	14
IV.3.- Citas bibliográficas	15
IV.4.- Estirpes empleadas en este trabajo.....	15
IV.5.- Cultivos	15
IV.5.1.- Condiciones de cultivo de <i>Arabidopsis</i>	15
IV.5.1.1.- Cultivo en placa de Petri.....	15
IV.5.1.2.- Cultivo en maceta	17
IV.5.2.- Recolección de semillas	18
IV.5.3.- Cruzamientos.....	18
IV.5.4.- Condiciones de los cultivos microbianos	18
IV.6.- Disoluciones.....	19
IV.6.1.- Medios de cultivo para <i>Arabidopsis</i>	19
IV.6.1.1.- Medios de cultivo líquidos	19
IV.6.1.2.- Medios de cultivo sólidos	20
IV.6.2.- Medios de cultivo para microorganismos	20
IV.6.2.1.- Medios de cultivo líquidos	20
IV.6.2.2.- Medios de cultivo sólidos	20

IV.6.2.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos	21
IV.6.3.- Tampones y otras disoluciones de uso general	21
IV.6.3.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico	21
IV.6.3.2.- Disoluciones para electroforesis de ADN	21
IV.7.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos	22
IV.7.1.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis	22
IV.7.2.- Aislamiento de ADN plasmídico	22
IV.7.3.- Aislamiento de ARN	22
IV.7.4.- Síntesis de ADN	23
IV.7.4.1.- Síntesis de oligonucleótidos	23
IV.7.4.1.- Amplificaciones mediante PCR	24
IV.7.5.- Electroforesis de ácidos nucleicos.....	25
IV.7.6.- Genotipado de mutantes insercionales mediante PCR.....	25
IV.7.7.- Síntesis de ADN complementario	26
IV.8.- Obtención de líneas transgénicas mediante la tecnología Gateway.....	26
IV.9.- Transformaciones.....	29
IV.9.1.- Transformación de células bacterianas	29
IV.9.1.1.-Transformación por choque térmico	29
IV.10.- Caracterización fenotípica de mutantes	29
IV.11.- Pruebas estadísticas.....	29
V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
V.1.- Análisis bioinformático de RRP8.....	30
V.1.1.- Conservación de la secuencia de aminoácidos	30
V.1.2.- Predicción de la localización subcelular y suborganular de RRP8	30
V.2.- Análisis de complementación con los alelos <i>rrp8-1</i> y <i>rrp8-2</i>	32
V.3.- Obtención de transgenes para el estudio funcional del gen <i>RRP8</i>	33
V.3.1.-Transgén del rescate fenotípico y de la sobreexpresión	33
V.3.1.1.- Estudio del modo de herencia de los transgenes.....	34
V.3.1.2.- Análisis de la expresión de <i>RRP8</i> en plantas <i>35S_{pro}:RRP8</i>	35
V.3.2.- Análisis de la localización subcelular de RRP8 con el transgén <i>RRP8_{pro}:RRP8:GFP</i>	37
V.4.- Interacciones genéticas de <i>RRP8</i>	38
V.4.1.- Cruzamientos y obtención y genotipado de las poblaciones F ₁ y F ₂	39
V.4.2.- Análisis de los dobles mutantes.....	41
V.5.- Análisis de la biogénesis del ribosoma.....	44
V.5.1.- Análisis de la expresión de las <i>VAR</i> del ADNr 45S	45
V.5.2.- Análisis de la expresión del ADNr 45S.....	47
V.6.- Desarrollo de un método para estimar el número de copias del ADNr 45S mediante dPCR.....	48
V.6.1.- Calibrado del equipo QuantStudio 3D Digital PCR System	49
V.6.2.- Diseño del experimento	50
V.6.3.- Cálculo del número de copias del ADNr 45S.....	52

VI.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA FUTURA.....	54
VII.- BIBLIOGRAFÍA.....	56



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Representación esquemática del locus del ADNr 45S en Arabidopsis	4
Figura 2.- Modo de acción del complejo eNOSC	11
Figura 3.- Genotipado de inserciones de ADN-T en las líneas de las colecciones SALK y SAIL	25
Figura 4.- Clonación y subclonación de un inserto en vectores Gateway	27
Figura 5.- Mapas de los vectores Gateway empleados en este trabajo	28
Figura 6.- Análisis <i>in silico</i> de RRP8	31
Figura 7.- Análisis de complementación entre los mutantes <i>rrp8-1</i> y <i>rrp8-2</i>	32
Figura 8.- Expresión del gen <i>RRP8</i> en líneas transgénicas	36
Figura 9.- Obtención y genotipado de los clones de entrada.....	38
Figura 10.- Naturaleza molecular de los alelos mutantes de los genes <i>ABS</i> , <i>CXIP4</i> , <i>MTR4</i> , <i>RPS24A</i> , <i>RPS24B</i> , <i>RRP7</i> y <i>SMO4</i> empleados en los cruzamientos con los mutantes <i>rrp8</i>	40
Figura 11.- Posibles interactores genéticos de <i>RRP8</i>	43
Figura 12.- <i>POL5</i> es un gen esencial la supervivencia de Arabidopsis.....	45
Figura 13.- Expresión del ADNr 45S en <i>rrp8-1</i> , <i>rrp8-2</i> , <i>atr7-2</i> , <i>abs1-1</i> y <i>pol5</i> -	46
Figura 14.- Calibración del equipo QuantStudio 3D Digital PCR System	50
Figura 15.- Diseño del experimento para determinar el número de copias de ADNr 45S en Arabidopsis	51
Figura 16.- Número de copias del ADNr 45S estimado por dPCR.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Estirpes de Arabidopsis usadas en este trabajo	16
Tabla 2.- Oligonucleótidos usados en este trabajo	23
Tabla 3.- Estudio del modo de herencia de los transgenes <i>RRP8_{pro}:RRP8</i> y <i>35S_{pro}:RRP8</i>	34



I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La biogénesis del ribosoma es un proceso esencial y complejo que tiene lugar de manera altamente regulada en todas las células de cualquier organismo vivo. Ribosomal RNA Processing 8 (Rrp8p) es una metiltransferasa de ARN ribosómico en la levadura y en humanos. Con este Trabajo de Fin de Máster hemos contribuido a la caracterización de *RRP8* en *Arabidopsis*. Hemos predicho *in silico* la función y localización suborganular de *RRP8*, hemos confirmado el alelismo de *rrp8-1* y *rrp8-2*, dos alelos insercionales que interrumpen el gen *RRP8*, hemos contribuido a la caracterización de líneas transgénicas para la sobreexpresión de *RRP8* y el rescate de sus alelos mutantes y hemos iniciado la construcción de un transgén para establecer la localización subcelular de la proteína *RRP8*. Hemos obtenido dobles mutantes entre los mutantes *rrp8* y otros mutantes de pérdida de función en genes involucrados en la biogénesis del ribosoma. Hemos analizado también la expresión del ADNr 45S en los mutantes *rrp8* y en otros mutantes afectados en genes implicados en la biogénesis del ribosoma. Por otro lado, hemos desarrollado un método basado en la PCR digital (dPCR) para estimar el número de copias del ADNr 45S presente en estirpes silvestres y mutantes, utilizando los mutantes *fas1* como control, ya que contiene menos copias de este gen que sus ancestros silvestres.

Palabras clave: *Arabidopsis*, ribosoma, ADNr 45S, PCR digital, dPCR, *RRP8*.

Ribosome biogenesis is an essential and complex process that occurs in a highly regulated manner in all cells of any living organism. Ribosomal RNA Processing 8 (Rrp8p) is a ribosomal RNA methyltransferase in yeast and humans. With this Master's thesis we have contributed to the characterization of *RRP8* in *Arabidopsis*. We have predicted in silico the function and suborganular localization of *RRP8*, confirmed the allelism of *rrp8-1* and *rrp8-2*, two insertional alleles that disrupt the *RRP8* gene, contributed to the characterization of transgenic lines for *RRP8* overexpression and the rescue of its mutant alleles, and initiated the construction of a subcellular localization transgene of the *RRP8* protein. We have obtained double mutants between *rrp8* mutants and other loss-of-function mutants in genes involved in ribosome biogenesis. We have also analyzed 45S rDNA expression in *rrp8* mutants and other mutants affected in genes involved in ribosome biogenesis. On the other hand, we have developed a method based on digital PCR (dPCR) to estimate the copy number of 45S rDNA present in several wild-type accessions and in mutant strains, using the *fas1* mutants as control, since they have a reduction in the number of copies of this gene respect to their wild-type backgrounds.

Keywords: *Arabidopsis*, ribosome, 45S rDNA, digital PCR, dPCR, *RRP8*.



II.- INTRODUCCIÓN

II.- INTRODUCCIÓN

II.1.- Razones del uso de *Arabidopsis thaliana* en genética vegetal

Arabidopsis thaliana (a partir de ahora, *Arabidopsis*) es una planta dicotiledónea que se adapta a diversos climas y se distribuye por todo el mundo. Fue descubierta en el siglo XVI por el médico alemán Johannes Thal en las montañas de Harz, Alemania, y en su honor recibió el nombre de thaliana. Pertenece a la familia *Brassicaceae*, a la que pertenecen la col o el brócoli, pero a diferencia de ellas, no es comestible y carece de valor comercial (Laibach, 1943, Meyerowitz, 1987).

Se ha convertido en el organismo modelo preferido para estudiar la genética y la biología molecular de las plantas, gracias a un conjunto de características que la hacen idónea: (1) pequeño tamaño, que permite cultivos masivos en poco espacio; (2) ciclo de vida breve, de unas 6 a 8 semanas, que acorta el tiempo para obtener generaciones; (3) elevada fecundidad, imprescindible para los análisis genéticos; (4) autogamia, que ayuda al mantenimiento de estirpes en homocigosis; (5) genoma pequeño (125-135 Mb), muy compacto y con poco ADN repetitivo, que facilita la clonación y efecto de sus mutaciones y (6) diploidía, que permite establecer el carácter recesivo o dominante de las mutaciones (Meyerowitz, 1987; Woodward y Bartel, 2018). Su genoma se secuenció y anotó en el año 2000, revelando que contenía unos 25.000 genes que codifican proteínas (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), aunque las últimas anotaciones lo elevan a 27.655, cuya expresión genera 48.359 diferentes isoformas (Cheng *et al.*, 2017). Toda la información genómica de *Arabidopsis* se recoge y actualiza constantemente en la base de datos The Arabidopsis Information Resource (TAIR; <https://www.arabidopsis.org>).

II.2.- La biogénesis del ribosoma citoplasmático en *Arabidopsis*

Los ribosomas son los responsables de llevar a cabo la traducción de las proteínas en cualquier célula procariota o eucariota. Están compuestos por cuatro ARN ribosómicos (ARNr) y un número variable de proteínas ribosómicas (PR), dependiendo de la especie, que se ensamblan en dos subunidades. En los eucariotas, existen ribosomas en los orgánulos para la traducción de los ARNm mitocondriales y de los cloroplastos y en el citoplasma, que traducen los ARNm de los genes nucleares. El ribosoma citoplasmático u 80S está compuesto de la subunidad pequeña o 40S que contiene el ARNr 18S y la subunidad mayor o 60S que contiene los ARNr 27S/25S/23S (según la especie), 5,8S y 5S. El número de PR de las subunidades 40S y 60S de *Arabidopsis* es de 49 y 33, respectivamente (Melnikov *et al.*, 2012).

La biogénesis del ribosoma incluye la transcripción del ADNr 45S y el procesamiento de su transcrito primario, el pre-ARNr, que da lugar a los ARNr mayores, la transcripción del ADNr 5S y el ensamblaje y exportación al citoplasma de los cuatro ARNr con las PR (Sáez-Vásquez y Delseny, 2019). En este proceso participan una serie de proteínas que se denominan colectivamente factores de la biogénesis del ribosoma (FBR). La ARN polimerasa I (ARN pol I) transcribe el ADNr 45S en el nucleolo y la ARN pol III el ADNr 5S en el nucleoplasma (Ciganda y Williams, 2011).

II.2.1.- Organización del ADNr 45S

Los ADNr 45S/47S/35S se encuentra en cientos de copias repetidas en tándem en las regiones organizadoras nucleolares (NOR, Nucleolus Organizer Regions). Reciben su nombre, debido a que el nucleolo se organiza alrededor de los genes que codifican los ARNr en la interfase de la mitosis (Weipoltshammer y Schofer, 2016). Existen dos NOR en el genoma de Arabidopsis, ubicados en las regiones teloméricas de los cromosomas 2 y 4 (NOR2 y NOR4; Figura 1, en la página 4). Las repeticiones del ADNr 45S del NOR4 se encuentran transcripcionalmente activas, mientras que las del NOR2 están epigenéticamente silenciadas (Copenhaver y Pikaard, 1996).

Cada repetición del ADNr 45S es de 8,4 kb y, en ella, se encuentran las regiones que codifican los ARNr 18S (1,8 kb), 5,8S (161 pb) y 25S (3,4 kb), separadas por las secuencias espaciadoras internas (ITS1 e ITS2, Internal Transcribed Spacers) y las secuencias espaciadoras externas (5'-ETS y 3'-ETS; Figura 1).

Existen polimorfismos en las regiones 3'-ETS de los ADNr 45S, cuya transcripción genera al menos cuatro variantes en Col-0 (*VAR1-VAR4*), siendo la *VAR1* la mayoritaria, representando la mitad de las copias localizadas en el NOR2, mientras que el resto (*VAR2-VAR4*) se encuentran en el NOR4 (Pontvianne *et al.*, 2010). Entre las distintas copias del ADNr 45S hay una secuencia de aproximadamente 2,2 kb, denominada secuencia espaciadora intergénica (IGS, Intergenic Spacer; Figura 1), que no se transcribe. A diferencia de la secuencia del ADNr, las IGS presentan una gran variabilidad tanto en longitud como en organización entre otras especies de brasicáceas (Gruendler *et al.*, 1991).

II.2.2.- Transcripción del ARNr 45S

Distintos factores de transcripción basales o generales reclutan a la ARN Pol I al promotor del ADNr 45S, facilitando la iniciación, elongación y terminación de la transcripción (Goodfellow y Zomerdiijk, 2013). La transcripción del ADNr 45S está regulada

por marcas epigenéticas, habiéndose identificado varias metiltransferasas de histonas H3K9 y H3K27 que silenciarían su expresión (Pontvianne *et al.*, 2012).

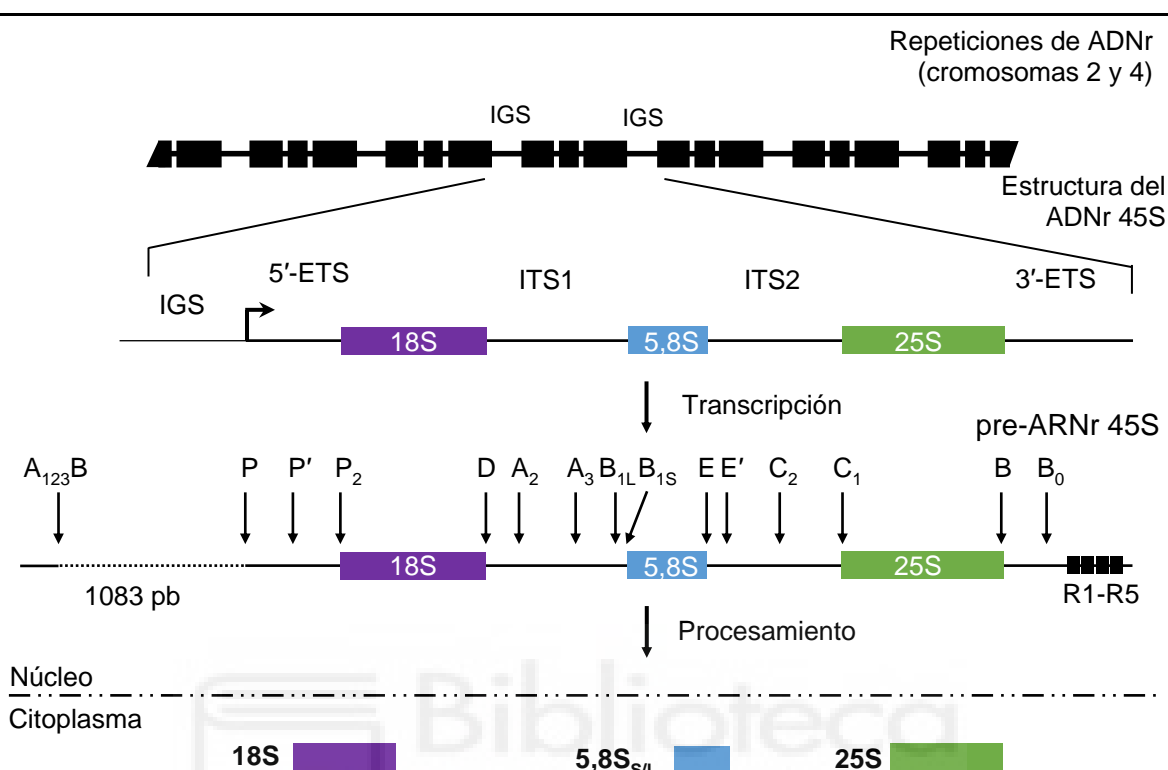


Figura 1.- Representación esquemática del locus del ADNr 45S en *Arabidopsis*. Se muestran las repeticiones en tándem de ADNr 45S, situadas en los NOR2 y 4, separadas entre sí por las IGS. Las regiones codificantes del ADNr se han dibujado con rectángulos y el resto con líneas negras. En la imagen ampliada, que corresponde a una unidad del ADNr 45S, los rectángulos morado, azul y verde indican las regiones correspondientes a los ARNr 18S, 5,8S y 25S, respectivamente, y la flecha, el sitio de inicio de la transcripción. Las líneas verticales en el pre-ARNr 45S señalan las posiciones de cortes endonucleolíticos. Las estructuras del ADNr 45S y los pre-ARNr no están representados a escala. Tomado y modificado de Vázquez-Pagán (2021), que a su vez lo tomó y modificó de Sáez-Vázquez y Delseny (2019).

Entre las distintas variantes del ADNr, *VAR1* se expresa en semillas recién germinadas pero unos días tras la germinación se silencia específicamente. El resto de las variantes se expresan constitutivamente en las hojas (Chandrasekhara *et al.*, 2016). Se han descrito distintas proteínas que regulan la expresión del ADNr 45S, como NUCLEOLIN1 (NUC1, Pontvianne *et al.*, 2007), también conocida como PARALLEL1 (PARL1; Petricka y Nelson, 2007), y RNA RIBOSOMAL PROTEIN7 (RRP7; Micol-Ponce *et al.*, 2018), que se constata porque en los mutantes de pérdida de función en los respectivos genes se acumula el ARNr de la *VAR1* en las hojas. El transcrito primario del

ADNr 45S es el pre-ARNr 45S, cuyo procesamiento genera los ARNr maduros 25S, 18S y 5,8S (Sáez-Vásquez y Delseny, 2019).

II.2.3.- Procesamiento del pre-ARNr 45S en Arabidopsis

El pre-ARNr 45S experimenta una serie de cortes endo y exonucleolíticos mediante los cuales se eliminan las distintas secuencias espaciadoras (5'-ETS, 3'-ETS, ITS1 e ITS2) (Figura 1, en la página 4). El primer precursor en formarse, el ARNr 35S_{A123B}, se produce tras los cortes en los sitios B₀ (en el 3'-ETS) y A_{123B} (en el 5'-ETS). Tras un corte en el sitio P, situado también en el 5'-ETS, se genera el siguiente precursor, el 35S(P).

En Arabidopsis, se han identificado dos rutas alternativas de procesamiento del pre-ARNr 35S(P): la del 5'-ETS primero y la del ITS1 primero (Henras *et al.*, 2015). En la ruta del 5'-ETS primero, se producen los cortes en los sitios P' y P₂ mientras se procesa la región 3'-ETS. Posteriormente ocurre un corte en el sitio A₂ para dar lugar a los precursores 20S y el 27SA₂. La ruta alternativa, la del ITS1 primero, es la principal en Arabidopsis. Comienza con el procesamiento de la región 3'-ETS y del ITS1 dando lugar a los precursores P-A₃ y 27SA₃. El pre-ARNr P-A₃ sufre una serie de cortes que dan lugar al 18S-A₃, que junto con el precursor 20S, se ensambla con PR y forma la partícula pre-40S que se transporta al citoplasma para completar su procesamiento y generar la subunidad 40S. El procesamiento de 27SA₃ y 27SA₂, anteriormente mencionados, dan lugar al pre-ARNr 6S y los precursores del ARNr 25S. El pre-ARNr 6S se ensambla con proteínas ribosómicas generando la partícula pre-60S que será transportada al citoplasma y donde se producirá el ARNr 5,8S maduro (Sáez-Vásquez y Delseny, 2019; Figura 1). Existen dos variantes de este último, el ARNr 5,8S_S (forma corta) y el 5,8S_L (forma larga) producidos por cortes en sitios B_{1S} o B_{1L} respectivamente, siendo la primera más abundante en eucariotas aunque la forma larga se expresa preferentemente en las raíces de Arabidopsis (Shanmugam *et al.*, 2021). Hay indicios de una tercera vía, donde primero se produce un corte en el sitio C₂ del ITS2 generando nuevos intermediarios (Palm *et al.*, 2019). Todos los precursores previamente nombrados, se poliadenilan para ser degradados (Sáez-Vásquez y Delseny, 2019).

Tanto el pre-ARNr 45S como los distintos precursores que se generan sufren modificaciones químicas en algunos de sus ribonucleótidos que son parte de las secuencias de los ARNr maduros, siendo las más comunes la metilación de la 2'-O-ribosa y la isomerización de uridina a pseudouridina (Sáez-Vásquez y Delseny, 2019).

II.2.4.- El procesoma SSU

El procesoma SSU (small subunit), es un complejo ribonucleoproteico que participa en la biogénesis de la subunidad 40S del ribosoma 80S (Phipps *et al.*, 2011), que incluye el procesamiento y plegamiento cotranscripcional del pre-ARNr. Dentro de este complejo U3, un ARN pequeño nucleolar (snoARN), juega un papel esencial. U3 está muy conservado en la evolución y posee una compleja estructura secundaria.

Los FBR que se han identificado coprecipitando con U3 se denominan proteínas Utp (U-three proteins). En *Saccharomyces cerevisiae*, las Utp forman con otros FBR tres subcomplejos del SSU que forman, junto al pre-ARNr naciente la partícula 90S. El subcomplejo UtpA está formado por Utp4, Utp8, Utp9, Utp10, Utp15 y Utp17, el UtpB por Utp1, Utp6, Utp12, Utp13, Utp18 y Utp21 y el UtpC por Utp22, Rrp7, Rrp3 y Ck2 (Casein Kinase 2). U3 también se asocia con FBR formando el subcomplejo U3 snoRNP (ribonucleoproteína nucleolar pequeña U3; Phipps *et al.*, 2011).

En la levadura, UtpA es esencial para la transcripción eficiente del ADNr por la ARN pol I y se une al pre-ARNr 35S, el transcrito primario del ADNr 35S, independientemente de otros componentes SSU (Gallagher *et al.*, 2004). El subcomplejo t-Utps (transcription-Utp sub-complex) está implicado en la transcripción del ADNr 35S y en el procesamiento del pre-ARNr 35S. t-Utps contiene todos los componentes del subcomplejo UtpA y también a Pol5 (DNA Polymerase V), como factor accesorio. UtpA es el resultado de la maduración de t-Utps tras su separación de Pol5 (Gallagher, 2019).

Pol5 es un factor multifuncional en la levadura, presente en el nucleolo, y actúa tanto en el control de la transcripción del ADNr 35S, mediante su unión al promotor (Yang *et al.*, 2003), como en la maduración de las subunidades del ribosoma (Braun *et al.*, 2020). Su presunto ortólogo en *Arabidopsis* es AT5G64420, que se está estudiando en el laboratorio, pero del que no se sabe nada en las plantas.

Aunque se sospecha la existencia de unos 90 componentes del procesoma SSU, con posibles ortólogos humanos y de las plantas, menos de 50 han sido funcionalmente caracterizados, la mayoría en la levadura. En *Arabidopsis*, se ha propuesto un modelo para la acción y organización del procesoma SSU que asume la existencia de los subcomplejos UTPA, UTPB y UTPC durante el procesamiento primario específico del pre-ARNr 45S, pero su existencia no se ha demostrado (Sáez-Vásquez y Delseny, 2019).

II.3.- El análisis de la expresión génica

La mayoría de las funciones celulares las llevan a cabo las proteínas, que son el producto final de la mayoría de los genes. No obstante, otros genes no se traducen a proteínas y su transcripción generan ARN no codificantes, que son funcionales *per se*. Por tanto, para entender cualquier proceso biológico, es esencial conocer su regulación, estableciendo qué genes se expresan o se silencian y en qué medida lo hacen. Para ello, se han desarrollado numerosas técnicas que permiten cuantificar la cantidad relativa o absoluta de ARN producido por un gen específico o por el conjunto de genes que se están expresando en una muestra biológica. Estas técnicas se basan en hibridaciones de ARN o en sus amplificaciones por PCR, fundamentalmente (Segundo-Val y Sanz-Lozano, 2016).

II.3.1.- La hibridación de tipo *northern*

En 1975, el profesor Edwin Southern describió por primera vez un método para detectar moléculas de ADN basadas en su transferencia de un gel de agarosa a una membrana de celulosa y su hibridación con una sonda específica, marcada con un isótopo radiactivo capaz de impresionar una película de rayos X (Southern, 1975). Este método se popularizó con el nombre de *Southern blot*. Un par de años después se adaptó el método al uso de moléculas de ARN, denominándolo su autor *northern blot*, haciendo un juego de palabras con el nombre del método original (Alwine *et al.*, 1977).

Los patrones de transcripción de los genes a menudo son complejos y distintas isoformas de ARN pueden ser generadas a partir de la transcripción de un mismo gen o de la maduración de su transcrito primario. El método de *northern* proporciona información sobre el tamaño y abundancia de los ARN derivados de un gen, permitiendo la visualización de las distintas isoformas. Así mismo, una misma membrana puede ser rehibridada con varias sondas, por lo que, la expresión de varios genes puede ser analizada con las mismas muestras de ARN. Sin embargo, tiene desventajas respecto a otras técnicas, como su relativamente baja sensibilidad comparada con las basadas en la amplificación por PCR, la duración del proceso, ya que implica diferentes etapas más o menos complejas, y la baja exactitud en la cuantificación (Krumlauf, 1996).

II.3.2.- La RT-PCR

En 1986, el investigador estadounidense Kary Banks Mullis, aprovechándose de las propiedades de polimerasas de ADN de arqueobacterias extremófilas, ideó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que posibilitaba de una forma sencilla, rápida

y reproducible, amplificar grandes cantidades de fragmentos específicos de ADN presentes en una muestra biológica (Mullis *et al.*, 1986). Dado que las polimerasas de ADN utilizadas en las amplificaciones por PCR son dependientes de un molde de ADN, la adaptación posterior de esta técnica al análisis de la expresión génica requirió una reacción previa de retrotranscripción (RT) del ARN para sintetizar ADN complementario (ADNc), utilizando retrotranscriptasas virales (Baltimore, 1970).

Aunque en teoría las amplificaciones en las PCR transcurren con una cinética exponencial y una eficiencia constante, esto sólo ocurre en los primeros 20-25 ciclos y, a partir de ahí, la síntesis se hace menos eficaz y termina deteniéndose, debido fundamentalmente a la inactivación de las polimerasas empleadas y a la competencia que ejerce en la hibridación con los cebadores las nuevas moléculas sintetizadas, cuyo número es muy elevado en los últimos ciclos (Roth, 2002). Para evitar errores de cuantificación, se ideó la RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR), en la que se cuantifican las diferencias en la expresión génica teniendo en cuenta las cantidades de productos que se han generado en un ciclo intermedio de la fase exponencial. La técnica de la RT-qPCR más empleada se basa en el uso de un agente intercalante del ADN, habitualmente SYBR-Green, que emite fluorescencia con una intensidad que es proporcional al de las moléculas de ADN bicatenario sintetizadas durante la reacción de PCR (Schneeberger *et al.*, 1995). Para cuantificar el ARN se deben normalizar las variaciones en la cantidad de material inicial, para ello, se utiliza la expresión de otros genes como referencia, también denominados estándares internos, que son genes endógenos cuya expresión no debe cambiar por las condiciones utilizadas en el estudio (Livak y Schmittgen, 2001). Se suelen utilizar genes de expresión ubicua y constitutiva, como el gen *ACTIN2* en *Arabidopsis* (Klatte y Bauer, 2009), pero existen muchos otros.

II.3.3.- Determinación del número de copias del ADNr 45S

Es presumible que, si un gen está implicado en la regulación de la expresión del ADNr 45S, sus mutantes de pérdida de función tengan alterada su expresión. Sin embargo, para estudiar la regulación de la expresión del ADNr 45S es necesario primero cuantificar el número de copias del ADNr 45S presentes en el genoma, ya que su número puede variar entre ecotipos y entre mutantes. Además, como se comentó anteriormente (apartado II.2.1, en la página 3), de todas las copias del ADNr 45S, unas se expresan pero otras están silenciadas epigenéticamente a lo largo de la vida de la planta (Pontvianne *et al.*, 2012).

A pesar del gran avance de las técnicas de secuenciación masiva, es difícil establecer el número de copias del ADNr 45S debido fundamentalmente a su repetitividad y a su gran tamaño (8,4 kb en *Arabidopsis*), ya que las secuencias que se obtienen son muy cortas, de unos 200 nt. Las tecnologías de secuenciación masiva con las que se obtienen lecturas largas, como las de nanoporos de Oxford o de PacBio permiten secuenciar y ensamblar estas regiones, pero sigue siendo difícil establecer el número de sus copias por el gran número de lecturas que se obtienen de esta región, que saturan los programas de análisis (Morton *et al.*, 2020).

La electroforesis en gel de campo pulsado, que permite separar grandes moléculas de ADN aplicando campos eléctricos que cambian de dirección, podría también emplearse para establecer el número de copias del ADNr 45S (Morton *et al.*, 2020). El problema de este método es que el tamaño máximo de la banda que se puede analizar es de 1 Mb, por lo que no serviría para determinar el número de copias del ADNr 45S en *Arabidopsis* ya que, se estima que esté entre 700 y 900, lo que supone un tamaño de más de 5 Mb.

En los últimos años, otras técnicas como la PCR digital (dPCR) se han empleado para determinar el número de copias del ADNr 35S de *Saccharomyces cerevisiae* (Salim *et al.*, 2017) y el de 16 especies de fitoplancton (Yarimizu *et al.*, 2021). Sin embargo, no se ha empleado para este fin en ninguna otra especie, incluida *Arabidopsis*.

II.3.4.- La PCR digital (dPCR)

La primera vez que se describió un experimento de dPCR fue en un estudio del protooncogén *RAS*, cuyo objetivo era cuantificar la fracción de los alelos silvestres y mutantes en pacientes con cáncer colorrectal. Para ello, se diluyó el ADN genómico de los pacientes hasta que en la muestra más diluida solo hubiera una molécula de molde de ADN mutante o silvestre, de tal manera que en cada reacción de PCR se amplificara únicamente el ADN mutante o el silvestre, pero no ambos. Contando las amplificaciones obtenidas con el ADN mutante y silvestre y aplicando la distribución de Poisson, se pudo inferir la fracción de alelos silvestres o mutantes en la población (Vogelstein y Kinzler, 1999).

La dPCR es una variante de la PCR convencional que permite la cuantificación absoluta de moléculas de ADN. Para llevarla a cabo, hace falta obtener una dilución y partición de la muestra en millones de unidades separadas, cada de las cuales contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción. Si la muestra contiene ADN, se produce un resultado positivo; si no hay molde, no se genera señal alguna. La

cuantificación es binaria o digital, lo que significa que el número inicial de moléculas diana puede ser estimado a partir del número de resultados positivos y negativos.

Existen varias ventajas respecto a otras técnicas de PCR. Permite detectar moléculas diana en frecuencias mucho más bajas que la qPCR y proporciona una cuantificación absoluta del ADN de interés, sin necesidad de referencias. La dPCR tiene una gran aplicación para diagnóstico de enfermedades genéticas ya que permite la detección mutaciones raras, el análisis del número de alelos específicos de genes implicados en el cáncer e incluso para la detección de trisomías o monosomías en muestras prenatales (Luthra *et al.*, 2016).

II.4.- Funciones de la proteína RRP8 en hongos y animales

En la levadura, Glicine Arginine Rich 1 protein (Gar1p) está involucrada en la modificación y el corte del pre-ARNr 18S (Girard *et al.*, 1992). En una búsqueda de interactores físicos de Gar1p, se identificó Ribosomal RNA processing 8 protein (Rrp8p), cuyos mutantes se encontraban afectados en el corte del pre-ARNr 35S en el sitio A₂ (Bousquet-Antonelli *et al.*, 2000). Además, se describió su papel como metiltransferasa de ARNr, concretamente, en la modificación m¹A de la A645 del ARNr 25S (Peifer *et al.*, 2013).

Su ortólogo humano es la NUCLEOMETILINA (NML), un componente del complejo eNOSC (complejo nucleolar silenciador dependiente de energía). Ante una escasez de nutrientes se induce el reclutamiento del complejo eNOSC al ADNr 47S (el equivalente humano al ADNr 45S de Arabidopsis o 35S de la levadura) y reprime su expresión (Yang *et al.*, 2013). Además de NML, eNOSC contiene SIRT1 (SIRTUIN1) y la metilasa de histonas SUV39H1 (SUPPRESSOR OF VARIEGATION 3-9 HOMOLOG 1). SIRT1 es el sensor del estado energético celular, debido a que utiliza NAD⁺ como cofactor. Cuando, por una escasez de nutrientes, se incrementa la relación NAD⁺/NADH, se activa SIRT1, lo que lleva al reclutamiento de eNOSC al ADNr 47S y su silenciamiento por metilación de la histona H3 con marcas represoras (Murayama *et al.*, 2008; Figura 2, en la página 11).

Así mismo, NML de forma parecida a su ortólogo en la levadura, es requerido para la modificación m¹A en el ARNr 28S. NML está involucrado en la promoción de la senescencia celular, ya que la inhibición de la biogénesis de ribosomas causa estrés nucleolar que facilita la inducción de senescencia (Yang *et al.*, 2015). En células humanas deficientes en NML, también se ha visto que se activan rutas de supervivencia celular, como la del p53, inhibiendo la proliferación celular (Waku *et al.*, 2016). Por tanto, NML podría ser una diana oncogénica.

A su vez, en *Caenorhabditis elegans* RRP8 está involucrado en la respuesta al estrés nucleolar, lo que en este organismo modelo lleva a una excesiva acumulación de lípidos (Wu *et al.*, 2018). De manera similar, en hígados de ratones obesos (*Mus musculus*) los niveles de NML se incrementan para reprimir la transcripción del ADN_r 47S.

Los ratones de pérdida función del gen *NML* mostraron mayores niveles de ARN_r y una menor acumulación lipídica, sugiriendo que hay un vínculo entre el consumo de energía y la activación transcripcional del ADN_r 47S (Oie *et al.*, 2014).

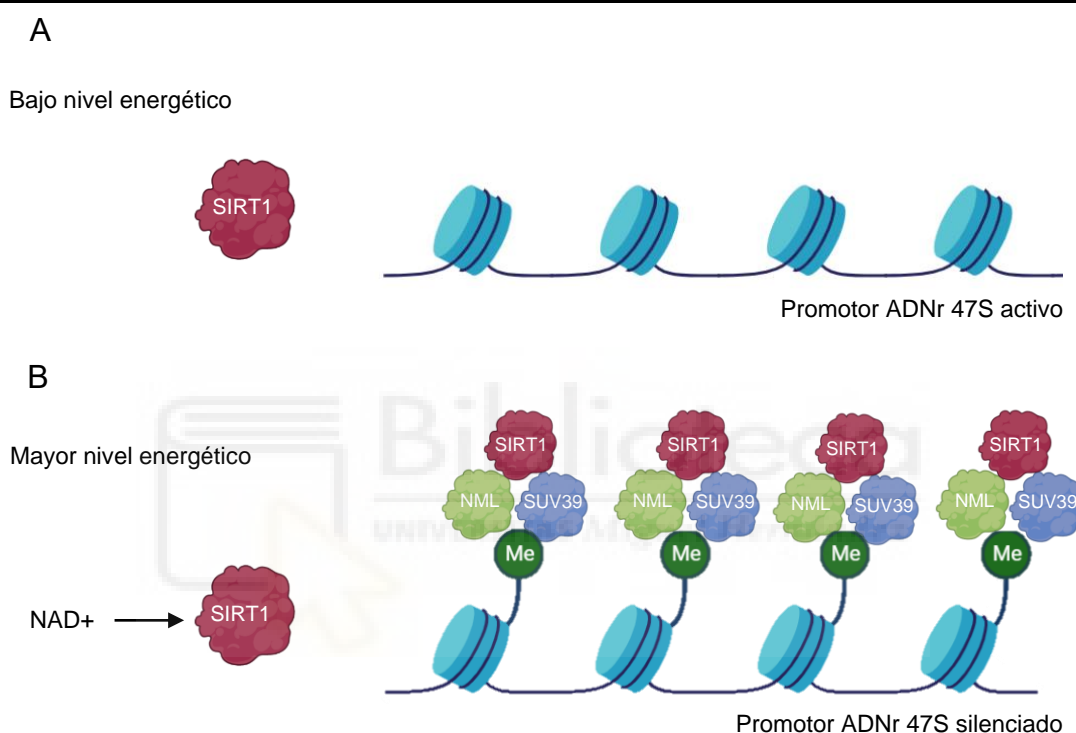


Figura 2.- Modo de acción del complejo eNOSC. El ADN_r 47S se encuentra en dos estados funcionales. (A) Cuando hay un bajo nivel energético en la célula, la proteína SIRT1 está inactiva, por lo que el promotor de ADN_r 47S se encuentra activo transcripcionalmente al carecer de marcas de metilación represoras. (B) Cuando aumenta el nivel energético, cambia el cociente NAD⁺/NADH y el NAD⁺ activa a SIRT1, que recluta a NML y SUV39H1 para formar el complejo eNOSC en el promotor del ADN_r 47S. SUV39H1 metila la histona H3 y se silencia la expresión del ADN_r 47S. Adaptada de Grummt y Ladurner (2008) y dibujada con la ayuda de Biorender (<https://www.biorender.com/>).



III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El objetivo principal del laboratorio de la profesora M.R. Ponce es investigar la regulación de la expresión génica, específicamente los mecanismos de regulación postranscripcional mediados por microARN (miARN) y más recientemente, los que regulan la biogénesis del ribosoma en *Arabidopsis*.

En los años 90 en el laboratorio del profesor J.L. Micol, se identificó al mutante *argonaute1-52* (*ago1-52*), de fenotipo aberrante, fruto de una mutagénesis con metanosulfonato de etilo (EMS) de semillas del ecotipo *Landsberg erecta* (*Ler*). *ago1-52* es un alelo del gen *ARGONAUTE1* (*AGO1*), el principal efector del silenciamiento mediado por miARN. Posteriormente, con el fin de encontrar genes relacionados con *AGO1*, se llevó a cabo una segunda mutagénesis de semillas de *ago1-52* con EMS (Micol-Ponce *et al.*, 2014). Una de las clases fenotípicas que se identificaron en el escrutinio fue la de mutantes que suprimieron el fenotipo morfológico de *ago1-52*, a los que se denominó mutantes *mas* (*morphology of argonaute1-52 suppressed*). La caracterización del gen *MAS2* y de los interactores físicos de la proteína *MAS2* permitió descubrir que estaba implicado en la biogénesis del ribosoma y en el splicing de los pre-ARNm (Sánchez-García *et al.*, 2015). *AT2G40430* (*SMO4*; Micol-Ponce *et al.*, 2020) y *AT5G38720* (*RRP7*; Micol-Ponce *et al.*, 2018) fueron dos de los FBR que interactuaron con *MAS2* en ensayos de doble híbrido de levadura y que fueron caracterizados en el laboratorio.

Este TFM se ha centrado en la continuación del estudio del gen *AT5G40530*, que codifica el presunto ortólogo de *Rrp8p* de la levadura y de la *NML* humana, y que se coexpresa con *SMO4* y *RRP7*. Suponemos que *RRP8* podría actuar también como un FBR en el control la expresión del ADNr 45S ante la falta de nutrientes. El estudio de este gen lo inició la estudiante Olivia Adrover en su Trabajo de Fin de Grado (Adrover Rico, 2023).

Por otro lado, no existe, hasta la fecha, ningún método en *Arabidopsis* en el que se cuantifique de forma absoluta y precisa el número de copias del ADNr 45S. Además, en el laboratorio se cuenta con mutantes en genes que codifican FBR y en los que se sospecha que el número de copias del ADNr 45S o su expresión está alterada, por lo que tendría gran interés poder determinarlo.

El objetivo de este TFM es doble: 1) la continuación de la caracterización del gen *RRP8* de *Arabidopsis* y 2) la puesta a punto de un procedimiento basado en la dPCR para determinar el número de copias del ADNr 45S en el genoma de *Arabidopsis*. Los objetivos específicos que nos propusimos fueron los siguientes: (1) realizar un análisis bioinformático de la proteína *RRP8* para establecer el grado de semejanza, identificar dominios

conservados con sus presuntos ortólogos y predecir su localización subcelular; (2) caracterizar y demostrar el alelismo de los alelos insercionales *rrp8-1* y *rrp8-2*; (3) caracterizar plantas transgénicas *RRP8_{pro}:RRP8* y *35S_{pro}:RRP8* y (4) generar los transgenes *RRP8_{pro}:RRP8:GFP*, *35S_{pro}:RRP8:YFP* y *35S_{pro}:RRP8:CFP* para estudiar la localización subcelular de RRP8; (5) buscar interactores genéticos mediante el cruzamiento de mutantes *rrp8* con otros mutantes afectados en la biogénesis del ribosoma; (6) estudiar la expresión del ADNr 45S y el procesamiento del pre-ARNr 45S en los mutantes *rrp8*; (7) desarrollar un método basado en la dPCR para cuantificar el número de copias del ADNr 45S en Arabidopsis, para utilizarlo más adelante con mutantes de interés para el laboratorio.





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.2.- 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, por ejemplo, *Rrp8* y Rrp8, respectivamente. Si se refiere a genes o proteínas de *Arabidopsis* o humanas el nombre abreviado se escribe con mayúsculas (*RRP8* y RRP8). Los alelos de un gen se indican con letras mayúsculas para el silvestre (por ejemplo, *Rrp8* o *RRP8*) y minúsculas para los mutantes, con un guion seguido de un número para distinguir el alelo (*rrp8-1*), primer alelo mutante descrito del gen *RRP8*).

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 se trata de un gen nuclear, y los cinco dígitos finales, YYYYYY, se corresponden con el orden en que se encuentra en el cromosoma, con relación al telómero superior. En este trabajo, los mutantes homocigóticos se muestran con el nombre del alelo mutante (por ejemplo, *rrp8-1*) y solo se especifica el genotipo completo, en el que los alelos en cromosomas homólogos se separan con una barra (por ejemplo, *RRP8/rrp8-1*), en el caso de los heterocigotos.

IV.3.- Citas bibliográficas

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, en ocasiones, direcciones de Internet (URL; Uniform Resource Locator), en el formato <https://...>, aun sabiendo que muchas son temporales.

IV.4.- Estirpes empleadas en este trabajo

Hemos empleado las estirpes silvestres y mutantes de *Arabidopsis* que se listan en la Tabla 1, en la página 16. Sus semillas se conservaron a 4°C.

IV.5.- Cultivos

IV.5.1.- Condiciones de cultivo de Arabidopsis

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

IV.5.1.1.- Cultivo en placa de Petri

La mayoría de los cultivos se iniciaron en placas de Petri de 15 cm de diámetro, que contenían unos 100 ml de medio sólido GM (apartado IV.6.1.2, en la página 20). La siembra de las semillas de *Arabidopsis* se llevó a cabo tras su esterilización por inmersión con agitación, durante 8 minutos, 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 y, posteriormente, con 1 ml de etanol al 70% durante 5 min, realizando a continuación tres lavados sucesivos con agua estéril.

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

Estirpe	Código del NASC	Fondo genético	Mutágeno (mutación)	Gen mutado	Origen
Col-0	N1092	-	Tipo silvestre	-	1
En2	N1138	-	Tipo silvestre	-	1
Ler	NW20	-	Tipo silvestre	-	1
<i>abs1-1</i>	N811474	Col-3	ADN-T en el 5'-UTR	AT5G51280	3
<i>atrh7-2</i>	N560685	Col-0	ADN-T en el 8º exón	AT5G62190	2
<i>cxip4-2</i>	N674752	Col-0	ADN-T en el 1º exón	AT2G28910	2
<i>fas1-1</i>	N265	En2	Rayos X	AT1G65740	1
<i>fas1-4</i>	N828822	Col-0	ADN-T en el 6º intrón	AT1G65741	3
<i>mtr4-2</i>	N802359	Col-0	ADN-T en el 5º intrón	AT1G59760	3
<i>par1-2</i>	N502764	Col-0	ADN-T en el 9º exón	AT1G48920	2
<i>pol5-1</i>	N102162	Ler	Trasposón en el 5'-UTR	AT5G64420	4
<i>rps24a-1</i>	N658032	Col-0	ADN-T en el 3º intrón	AT3G04920	2
<i>rps24b-2</i>	N500766	Col-0	ADN-T en el 3º intrón	AT5G28060	2
<i>rrp7-1</i>	N861016	Col-0	ADN-T en el 7º exón	AT5G38720	3
<i>rrp8-1</i>	N844550	Col-0	ADN-T en el 1º exón	AT5G40530	2
<i>rrp8-2</i>	N666889	Col-0	ADN-T en el 3º intrón	AT5G40531	3
<i>smo4-3</i>	N571764	Col-0	ADN-T en el 12º intrón	AT2G40430	2

El efecto de la mutación en las proteínas codificadas por los genes interrumpidos por transposones o ADN-T en todos los casos es el truncamiento de la misma, excepto en los mutantes *abs1-1* y *pol5-1* que debe afectar a los niveles de expresión. En *fas1-1* la mutación origina un codón de terminación prematuro (W152*). ¹Estirpes obtenidas inicialmente del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) y replicadas varias veces por autofecundación en el laboratorio de M.R. Ponce. ²De la colección SALK (<http://signal.salk.edu/>; Alonso *et al.*, 2003). ³De la colección SAIL (McElver *et al.*, 2001). ⁴De la colección JIC Gene Trap (Sundaresan *et al.*, 1995).

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 entre 60 y 104 semillas por placa, espaciándolas regularmente sobre la superficie del medio de cultivo con una pipeta Pasteur y una plantilla dispuesta bajo la placa. Tras su siembra, las placas fueron precintadas con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, que constituye una barrera efectiva para cualquier partícula en aerosol, sin impedir el intercambio de gases.

Las placas de Petri con las semillas se estratificaron durante 48 h en posición invertida, a 4°C y en la oscuridad, con el fin de sincronizar su germinación, tras lo que fueron cultivadas a 20 ± 1°C y 50-60% de humedad relativa, bajo iluminación continua de unos 75 µmol/s·m² de luz blanca, suministrada por tubos fluorescentes Sylvania Standard F20W/133-RS Cool White o tubos led ToLEDo T8 10 W 4000 K Cool White en cámaras de cultivo Conviron TC16 o Conviron TC30.

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

IV.5.1.2.- Cultivo en maceta

Los cultivos en maceta se efectuaron en bandejas de plástico de 28 × 50 cm, con 42 alveolos, cada uno de ellos de 5 × 5 cm (diámetro × altura), introducidas en cubetas de unos 7 cm de profundidad. Se introdujo en cada alveolo, previamente a su relleno con el sustrato, una maceta de rejilla de 5 × 5 cm (diámetro × altura). Las macetas de rejilla impiden que el sustrato se adhiera al alveolo, facilitando la extracción de las plantas. Se empleó como sustrato una mezcla de perlita (granulometría de 1 a 3 mm; 105-125 kg/m³), vermiculita (granulometría de 1 a 3 mm; 80-100 kg/m³) y turba no fertilizada (turba rubia de musgo *Sphagnum*, de estructura gruesa; Grobmull Neuhaus), en una proporción volumétrica 2:2:1. Cada alveolo se destinó al cultivo de una sola planta, que en la mayoría de los casos había sido trasplantada, con ayuda de unas pinzas, desde la placa de Petri en la que había permanecido durante las primeras 3 semanas de su ciclo de vida.

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

Los cultivos en maceta se mantuvieron en una cámara climatizada visitable, a 20 ± 1°C y 50-60% de humedad relativa, bajo iluminación continua, con luz blanca suministrada por tubos fluorescentes Sylvania 160 W F72T12 CW VHO Cool White o Philips F72T12/D/VHO 160 W 1500 SF, o tubos led ToLEDo T8 20 W 4000 K Cool White, totalizando unos 75 μmol/s·m².

Las macetas y bandejas de alveolos estuvieron permanentemente subirrigadas, manteniéndose un nivel de unos 2-3 cm de agua en el fondo de las cubetas. El aporte de nutrientes se llevó a cabo dos veces por semana, mediante la adición de medio mínimo ATM (apartado IV.6.1.1, en la página 19). A partir del momento en que la floración se interrumpe, se suspende el riego, propiciándose así el secado de las plantas, que son mantenidas en la cámara de cultivo al menos dos semanas más, para proceder finalmente a la recolección de sus semillas.

IV.5.2.- Recolección de semillas

Para la recolección de todas las semillas de una planta seca, producto de su autofecundación, se restregó contra un colador que se sujetó sobre un papel de filtro, en el que cayeron las semillas. La mezcla de semillas, fragmentos de silicuas y otras partes secas de la planta que se acumuló sobre el papel fue cribada a través de un colador de malla más fina que la del primero, para eliminar en lo posible todas las partículas más grandes que las semillas. Las semillas de las estirpes de *Arabidopsis* usadas en este trabajo se almacenaron en tubos *ependorf*, que se conservaron a 4°C.

IV.5.3.- Cruzamientos

Seguimos el procedimiento de emasculación descrito por Kranz y Kirchheim (1987) para el cruzamiento entre estirpes, una de las cuales se utilizó como donante (parental masculino), y la otra, como receptora de polen (parental femenino). Se eligió un grupo de capullos florales en el ápice de un tallo inflorescente de la planta que se usó como parental femenino, eliminando las flores maduras, presuntamente autofecundadas, y los capullos, a excepción de aquellos cuyos pétalos fueron apenas visibles. A estos se les extirparon los sépalos, pétalos y estambres inmaduros, obteniendo flores con un pistilo no fecundado como única estructura funcional. Estas manipulaciones se realizaron con pinzas de microcirugía esterilizadas por inmersión en etanol al 95% y secadas al aire, a fin de destruir cualquier traza de polen. De la planta donante de polen se extirpó una flor madura, presionándola con las pinzas a la altura de los sépalos, a fin de poner en contacto varias de sus anteras con el pistilo de la flor receptora del polen. El cruzamiento se señaló 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.5.4.- Condiciones de los cultivos microbianos

Los cultivos líquidos se realizaron en recipientes estériles, cuya capacidad excedía al menos dos veces el volumen de medio utilizado, garantizando así una aireación suficiente durante la incubación. Se empleó una agitación de 225 rpm en un incubador dotado de una plataforma orbital (NBS Innova 44, 4000 o 4260) que se mantuvo a 37°C para *Escherichia coli*.

Los cultivos en placas de Petri se inocularon con una micropipeta con 100 μ l de precultivo líquido, que fue esparcido haciendo que rodaran sobre la superficie del medio 5-8 perlas de vidrio estériles, de 3 mm de diámetro.

IV.6.- Disoluciones

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

IV.6.1.- Medios de cultivo para Arabidopsis

Los medios de cultivo mencionados en este apartado se prepararon disolviendo sus componentes en agua. Todas las esterilizaciones en autoclave se efectuaron a 1 kg/cm^2 y 121°C durante 20 min. Las sustancias termolábiles fueron esterilizadas mediante filtración forzada por aspiración, a través de filtros Millipore de 0,22 o 0,45 μ m de diámetro de poro. Su adición a un medio de cultivo esterilizado en autoclave se realizó después de que este último fuera estabilizado a 55°C.

IV.6.1.1.- Medios de cultivo líquidos

Medio mínimo ATM: KNO_3 5 mM; KH_2PO_4 2,5 mM; $MgSO_4$ 2 mM; $Ca(NO_3)_2$ 2 mM; FeNaEDTA 51 μ M; H_3BO_3 70 μ M; $MnCl_2$ 14 μ M; $CuSO_4$ 0,5 μ M; $ZnSO_4$ 1 μ M; $NaMoO_4$ 0,2 μ M; NaCl 10 μ M, y $CoCl_2$ 0,01 μ M (Kranz y Kirchheim, 1987).

Para su preparación, se añadieron, a 900 ml de agua, 5 ml de KNO_3 1 M; 2,5 ml de KH_2PO_4 1 M; 2 ml de $MgSO_4$ 1 M; 2 ml de $Ca(NO_3)_2$ 1 M; 2 ml de FeNaEDTA 20 mM, y 1 ml de la disolución de micronutrientes, ajustando el volumen final a 1 l. Todas las disoluciones madre se prepararon en las concentraciones indicadas y se esterilizaron por filtración. Las disoluciones madre de las sales deben añadirse a los 900 ml de agua, y no a la inversa, a fin de evitar la precipitación de complejos insolubles de fosfato cálcico.

La composición de la disolución de micronutrientes es la siguiente: H_3BO_3 70 mM; $MnCl_2$ 14 mM; $CuSO_4$ 0,5 mM; $ZnSO_4$ 1 mM; $NaMoO_4$ 0,2 mM; NaCl 10 mM, y $CoCl_2$ 0,01 mM. Se preparó añadiendo, a 900 ml de agua, 4,32 g de H_3BO_3 ; 2,77 g de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 124 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 287 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 48,7 mg de $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$; 584,4 mg de NaCl, y 2,38 mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$. Finalmente, se añadió agua hasta 1 l.

IV.6.1.2.- Medios de cultivo sólidos

Los medios de cultivo sólidos se prepararon por adición de Gelrite (Duchefa), a una concentración final del 0,6% m/v, tras la disolución del resto de los componentes en agua. Una vez finalizada su esterilización en autoclave, los medios de cultivo se mantuvieron durante 30 min en un baño a 55°C antes de su vertido en placas de Petri, que se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Las placas de Petri con medio sólido se conservaron hasta un mes a 4°C, en posición invertida y precintadas.

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

Para su preparación, se añadieron, a 900 ml de agua, 2,2 g de sales de Murashige y Skoog (Duchefa; Murashige y Skoog, 1962), 10 g de sacarosa y 0,5 g de MES (ácido 2-[N-morfolino]etano sulfónico). Se agitó la suspensión hasta la total disolución de sus componentes y se ajustó el pH a 5,7 con KOH 1 M. Posteriormente, se ajustó el volumen a 1 l y se añadieron 6 g de Gelrite. Se esterilizó en autoclave.

IV.6.2.- Medios de cultivo para microorganismos

IV.6.2.1.- Medios de cultivo líquidos

LB (Luria - Bertani; Bertani, 1951): 1% m/v de bacto-triptona; 0,5% m/v de extracto de levadura, y 1% m/v de NaCl . Para preparar un litro de medio se mezclaron 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl . Se añadió agua hasta 1 l, se ajustó el pH a 7,5 con NaOH 5 M y se esterilizó en autoclave.

IV.6.2.2.- Medios de cultivo sólidos

Los medios de cultivo sólidos fueron preparados por adición de agar bacteriológico europeo (Pronadisa), tras la disolución del resto de los componentes en agua. La concentración de agar (m/v) fue del 1,5% para *Escherichia coli*. Una vez finalizada su esterilización en autoclave, los medios de cultivo se mantuvieron durante 30 min en un baño a 55°C antes de su vertido en placas de Petri de 90 mm de diámetro, que se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal.

IV.6.2.3.- Medios de cultivo suplementados con antibióticos

Algunos de los medios anteriormente descritos se suplementaron con antibióticos, a una concentración final de 100 mg/l (ampicilina o carbenicilina) o 50 mg/l (kanamicina). Se prepararon disoluciones madre de estos antibióticos a concentraciones mil veces superiores a la de trabajo, disolviéndolos en agua y esterilizándolos por filtración, y se conservaron a -20°C , alicuotadas en tubos *ependorf* de 1,5 ml. Los antibióticos se añadieron al medio después de la esterilización en autoclave de este último, y tras mantenerlo a 55°C durante 30 min en un baño termostatzado. ajustó el pH a 7,5 con NaOH 5 M y se esterilizó en autoclave.

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

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

Acetato de potasio 5 M pH 7,5: Se preparó disolviendo 49,1 g de acetato de potasio (KCH_3COO) 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 (NaCH_3COO) en 50 ml de agua, y ajustando el pH a 5,2 con ácido acético glacial en una campana extractora de gases. Por último, se esterilizó en autoclave.

IV.6.3.2.- Disoluciones para electroforesis de ADN

TAE 50x: Tris-base [Tris-(hidroximetil)aminometano] 2 M; 5,71% de ácido acético, y Na_2EDTA 50 mM pH 8,0. El pH final debe ser 7,6. Para preparar un litro se mezclaron 242 g de Tris-base, 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de Na_2EDTA 0,5 M pH 8,0.

Tampón de carga 6x: 20% m/v de Ficoll; 0,25% m/v de xilencianol; 0,25% m/v de azul de bromofenol, y Na_2EDTA 10 mM.

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

IV.7.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

IV.7.1.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis

El ADN genómico utilizado como molde en las mezclas de PCR fue purificado mediante el método de Dellaporta *et al.*, 1983, con algunas modificaciones. Se introdujo en un tubo *ependorf* una planta entera o parte de ella, y se le añadieron 500 μ l de tampón de extracción y 3 o 4 perlas de vidrio de 3 mm de diámetro, para macerarla en un macerador automático (Mixermill 300, Qiagen 85120). A continuación, se añadieron 35 μ l de SDS al 20%, incubando la mezcla durante 5 min en un baño termostatzado a 65°C. Después, se añadieron 130 μ l de KCH₃COO 5 M, incubando durante 15 min a 4°C, y centrifugando durante 10 min a 13.000 rpm en una microfuga. El sobrenadante se transfirió a un tubo *ependorf* vacío, se precipitó durante 20 min a -20°C con 640 μ l de isopropanol y 60 μ l de NaCH₃COO 3 M, y se centrifugó durante otros 10 min a 10.000 rpm. Finalmente, el precipitado se lavó con 300 μ l de etanol del 70% y se centrifugó una vez más durante 5 min a 10.000 rpm, tras lo cual se dejó secar a temperatura ambiente, para resuspenderlo después en 50-300 μ l de agua y almacenar la disolución a 4°C.

IV.7.2.- Aislamiento de ADN plasmídico

Se llevaron a cabo preparaciones a pequeña escala de ADN o minipreparaciones (minipreps), a partir de cultivos bacterianos de 4 ml de medio LB (apartado IV.6.2.1, en la página 20), usando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se eluyó el ADN plasmídico en 50 μ l de agua, se determinó su concentración y pureza con un espectrofotómetro, y se conservó a -20°C.

IV.7.3.- Aislamiento de ARN

Para la obtención de ARN se recolectaron 3 rosetas de 21 días en tubos *ependorf* que se sumergieron rápidamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron en hielo para su uso inmediato o se almacenaron a -80°C.

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

IV.7.4.- Síntesis de ADN

IV.7.4.1.- Síntesis de oligonucleótidos

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

Tabla 2.- Oligonucleótidos usados en este trabajo

Propósito	Nombre	Secuencia (5'→3')
Obtención de transgenes	RRP8pro2_F ^a	ggggacaagtttgtaaaaaagcaggctttGGAAGTAGA GCCTCCTGTGA
	RRP8_F ^a	ggggacaagtttgtaaaaaagcaggctttGCAATGACG ACTGAGGAAAATAA
	RRP8_R ^b	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtgCGAGACTAAT AACAAACCTGAAAG
Genotipado de dobles mutantes	LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
	LB-1 SAIL	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTT CC
	RB1	CGTGACTCCCTTAATTCTCCGC
Genotipado de <i>rrp8-1</i>	SAIL_1219_G04_LP	TATGGTCCTTGGTGGAGTCAG
	SAIL_1219_G04_RP	CTGTGAAAACCTGAAGGAAGATC
Genotipado de <i>rrp8-2</i>	SALK_102154_LP	CGGCTTTCACAAAGTCTTTTG
	SALK_102154_RP	CAAAAACCAACAACATGGAGG
Genotipado de <i>abs1-1</i>	SALK_007610_LP	TATTGCATGATGTCATGCACC
	SALK_007610_RP	CTTCCAATTCCGAAGCTTTTC
Genotipado de <i>cxip4-2</i>	GABI_537C02_LP	GTCGGGGTTGGAGAAGATTAG
	GABI_537C02_RP	TATGGTTCAACGGTGGAGAAG
Genotipado de <i>mtr4-2</i>	SAIL_50_C11_LP	TTTGTCAATACCTCGACGTCC
	SAIL_50_C11_RP	ATTGTCTGCGTACTGTGGGTC
Genotipado de <i>rps24b-2</i>	At5g28060_F1	CTAATCTATTCTCTGGGCATGG
	At5g28060_R1	CAGCCTTGGTCTACTACTCAC
Genotipado de <i>rps24a-1</i>	At3g04920-1R	ATGGGAATGGTGGAAAGAGAC
	At3g04920-1F	CCTGGAAGAGCCAATGTTTCA
Genotipado de <i>rrp7-1</i>	SAIL_628_F08_LP	GTGGAGATCGTGGAGATGAAG
	SAIL_628_F08_RP	CTCATGAAGAAGAACGCCTTGAAC
Genotipado de <i>smo4-3</i>	SALK_071764_LP	GTTCGAACTTTTTCTTGGG
	SALK_071764_RP	AGTATTCCTCGTTCTCGAGG
RT-PCR	ACTIN2_F	CACTTGCACCAAGCAGCATGAAGA
	ACTIN2_R	AATGGAACCACCGATCCAGACACT
	45S-prerRNA-45S_F	CGGTCGGTCATTCTCGTGTGCATATC
	45S-prerRNA-45S_R	TATAGGGGGGTGGGTGTTGAGGGA
	RRP8_qPCR_R	ACACTTGCTCTGGAAAAGAA
	p3	GACAGACTTGTCCAAAACGCCACC
	p4	CCTGGTGAGGAATCCTGGACGATT

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

Propósito	Nombre	Secuencia (5'→3')
RT-PCR	OTC-3D	TCCTTGCCAAATCATGGCCG
	OTC-Rev	GCATGCATGCGATTCTCCGC
Genotipado de plantas T ₁	HygB_F	GATGTTGGCGACCTCGTATT
	HygB_R	GCGAAGAATCTCGTGCTTTC
dPCR	dPCR_OTC_F	TGATCATAACCATCCTTGCCAAA
	dPCR_OTC_R	TGTCCCTTCAACTTGACCAATGTG
	dPCR_25S_Fw	CGTGTGCGGCTGCTTTGTTG
	25S_Rev2	CCTGCTGTCTTAATCGACCAACA
	5,8S_dPCR_F	GCAACGGATATCTCGGCTCT

^{a,b}Sus extremos 5' incluyen las secuencias ^a*attB1* y ^b*attB2*, que se indican en minúsculas.

IV.7.4.1.- Amplificaciones mediante PCR

Hemos realizado amplificaciones mediante PCR con varios propósitos. Se usó la enzima GoTaq Flexi (Promega) para las amplificaciones de ADN genómico de *Arabidopsis*; es una versión recombinante, barata y suficientemente procesiva, de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*. Cuando se precisó una gran fidelidad de copia, se empleó la polimerasa Phusion (Finnzymes), cuya tasa de error es 50 veces menor.

Los cebadores y los desoxirribonucleótidos se añadieron a una concentración final de 0,4 μ M y 0,2 mM, respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos *ependorf* de pared fina de 0,2 ml, en termocicladores BioRad T100 Thermal Cycler. Los volúmenes de reacción oscilaron entre 10 y 30 μ l, dependiendo del uso posterior de los productos de amplificación.

Los programas de PCR que hemos usado incluían una etapa previa de calentamiento a 94°C durante 1 min y 30 s, seguida de 35-40 ciclos en los que se repetía una fase de 30 s a 94°C para desnaturalizar los moldes, otra de 20 s a la temperatura de hibridación de los cebadores, y una final a 72°C para la polimerización, cuya duración dependió del tamaño del fragmento a amplificar, a razón de 1 min/kb en el caso de la polimerasa GoTaq Flexi, o de 30 s/kb en el caso de la Phusion. Se programó una etapa final, no cíclica, de 10 min a 72°C para el rellenado de las moléculas bicatenarias con colas 5' sobresalientes.

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

IV.7.5.- Electroforesis de ácidos nucleicos

Se utilizaron geles del 1-3% m/v en agarosa. Las electroforesis se realizaron en cubetas horizontales, empleando como electrolito TAE 1× (apartado IV.6.3.2, en la página 21). La disolución de la agarosa en el tampón se llevó a cabo mediante calentamiento en un microondas (menos para los geles a 3 % en agarosa que se calentaron en el autoclave para evitar evaporación del electrolito TAE). Una vez enfríada la disolución a 55°C se añadió bromuro de etidio hasta una concentración de 0,5 µg/ml. Las electroforesis en geles de agarosa se llevaron a cabo a voltaje constante: se aplicaron 90 V en geles preparados con 50 ml de TAE 1× y 120 V para geles preparados con volúmenes mayores (75 y 100 ml). La visualización de las moléculas se consiguió iluminando los geles con luz UV de 312 nm, obteniéndose las correspondientes fotografías en un documentador de geles Vilber E-Box VX5.

IV.7.6.- Genotipado de mutantes insercionales mediante PCR

Se usaron tres oligonucleótidos para verificar la presencia de las inserciones de ADN-T de los mutantes insercionales a estudio (Figura 3).

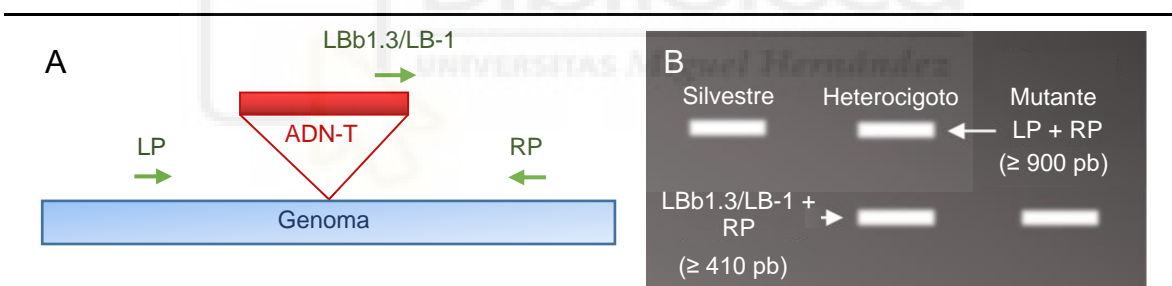


Figura 3.- Genotipado de inserciones de ADN-T en las líneas de las colecciones SALK y SAIL. (A) Representación esquemática de una inserción de ADN-T (rectángulo rojo) en el genoma de Arabidopsis (rectángulo azul), indicando las posiciones de los tres oligonucleótidos usados como cebadores para su genotipado (flechas verdes): LP, RP y LBb1.3 (para las inserciones de la colección SALK) y LP, RP y LB-1 (para las de la colección SAIL). Los elementos de este esquema no están representados a escala. (B) Productos de PCR que se visualizarían en una electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio al genotipar plantas homocigóticas para el alelo silvestre del gen a estudio, heterocigóticas, u homocigóticas para un alelo insercional. Se indican las parejas de cebadores de cada reacción y el tamaño de los productos esperados. Tomado de Gallego Serna (2022), que lo modificó de Ros Sirvent (2020), que a su vez se basó en <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>.

Se realizaron dos amplificaciones: (a) una con dos cebadores específicos de la región genómica que flanquea la inserción (LP y RP), y (b) otra con el cebador RP y otro

que hibrida con uno de los extremos del ADN-T (LBb1.3 para las líneas SALK y GABI-Kat, y LB-1 para las líneas SAIL; Figura 3A, en la página 25). La visualización de los productos de la amplificación en un gel de agarosa (Figura 3B) permite establecer si las plantas son homocigóticas o heterocigóticas para dicha inserción.

IV.7.7.- Síntesis de ADN complementario

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó mezclando disoluciones de ARN (12,5 μ l; 160 ng/ μ l), hexanucleótidos aleatorios (1 μ l; 250 ng/ μ l) y desoxinucleótidos (1 μ l; 10 mM de cada uno), junto con 0,5 μ l del inhibidor de RNasas Ribolock (Invitrogen), 1 μ l de la retrotranscriptasa termoestable Maxima Reverse Transcriptase (10.000 U/ μ l; Invitrogen) y 4 μ l del tampón de reacción (RT Buffer 5x). Esta mezcla se incubó durante 60 min a 25°C, y a continuación 5 min a 85°C para inactivar la enzima.

IV.8.- Obtención de líneas transgénicas mediante la tecnología Gateway

Los vectores más usados para la clonación y expresión de genes son los basados en la tecnología Gateway (Invitrogen; Figura 4, en la página 27), que permiten la clonación y subclonación de insertos sin restrictasas ni ligasas, las herramientas clásicamente empleadas para la construcción de moléculas recombinantes (Walhout *et al.*, 2000).

La tecnología Gateway permite insertar una molécula de interés en un vector mediante recombinación específica de sitio, mediada por recombinasas del fago λ de *Escherichia coli* (Landy, 1989). Su primera etapa es la reacción BP, en la que se usa un vector de entrada o donante, que presenta dos secuencias *attP* diferentes (*attP1* y *attP2*) que flanquean un gen que codifica la proteína *ccdB*, que es tóxica para la mayoría de las estirpes de laboratorio de *Escherichia coli*. La molécula con la que se desea reemplazar al gen *ccdB* debe estar flanqueada por dos secuencias *attB* (*attB1* y *attB2*). La clonasa BP (Mix Clonasa BP II, Invitrogen) es una mezcla de la Integrasa (Int) del fago λ y el Factor de Integración del Hospedador (IHF) de *Escherichia coli*, que recombina las secuencias *attP* con las *attB*. La molécula resultante, cuyo inserto queda flanqueado por las secuencias *attL*, recibe el nombre de construcción de entrada (Figura 4A) y las colonias que la contienen, clones de entrada.

En la etapa siguiente, denominada reacción LR, el inserto de interés se escinde del vector donante para ser subclonado en el de destino, que contiene las secuencias *attR*, empleando la clonasa LR (Mix Clonasa LR II, Invitrogen), formada por la Int, el IHF y la escisionasa Xis del fago λ . En la construcción de destino, el inserto de interés queda flanqueado por secuencias *attB* (Figura 4B).

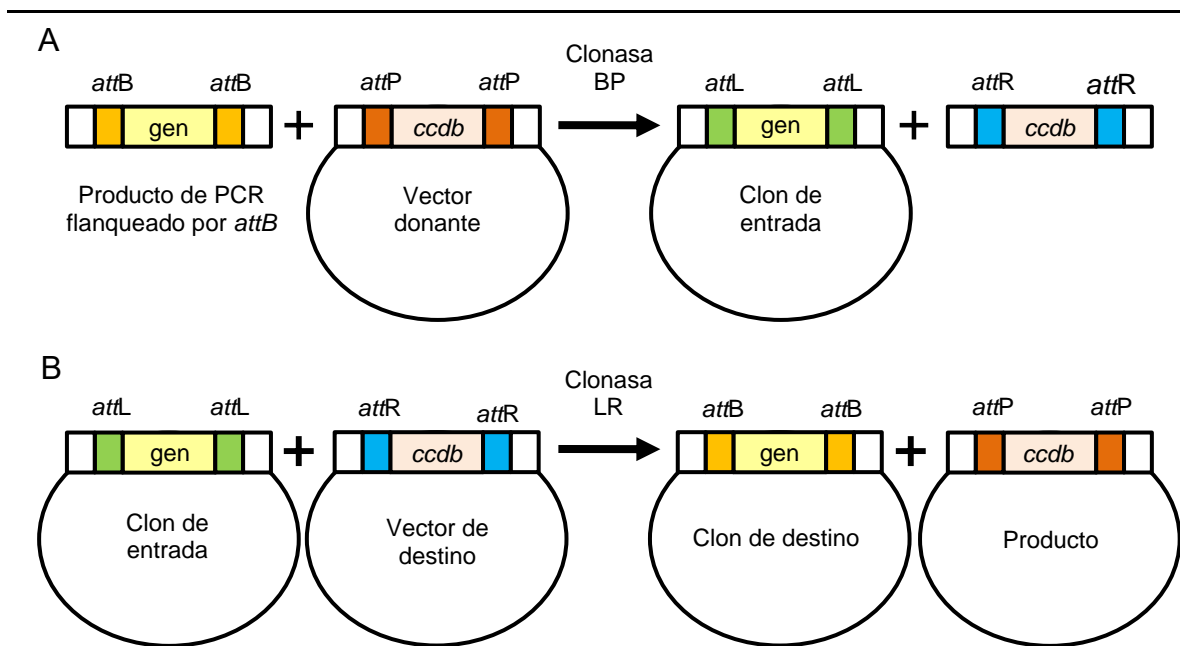


Figura 4.- Clonación y subclonación de un inserto en vectores Gateway. Se representa esquemáticamente el proceso de generación de los clones de (A) entrada y (B) destino para un gen amplificado mediante PCR empleando cebadores con secuencias *attB* en sus extremos 5'. Tomada de Micol Ponce (2011), que a su vez la modificó del catálogo *Gateway Technology* de Invitrogen.

Las principales ventajas de esta tecnología son su rapidez y versatilidad, la eliminación de los problemas asociados al uso de las enzimas de restricción y la direccionalidad de la clonación. Las secuencias *att* permiten la transferencia rápida y sencilla del inserto desde el vector de entrada a los de destino, lo que permite expresarlo en cualquier organismo bajo el control de cualquier promotor. Con esta tecnología se evitan los falsos positivos, gracias a la toxicidad de la proteína *ccdB*.

Hemos empleado la tecnología Gateway para clonar insertos en el vector de entrada pGEM-T Easy221 (Figura 5A, en la página 28), desarrollado en el laboratorio de B. Scheres, que nos lo cedió. Este vector se obtuvo a partir del pGEM-T Easy de Promega, incorporándole el gen tóxico *ccdB*, flanqueado por las secuencias *attP1* y *attP2*. Se empleó el vector de destino pMDC107, pMDC32, pEarley Gate 101 y pEarley Gate 102 para obtener plantas transgénicas (Figura 5B-E). Este vector contiene genes de resistencia a antibióticos, para su uso como marcadores seleccionables en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* (a kanamicina) y *Arabidopsis* (a higromicina). Las reacciones

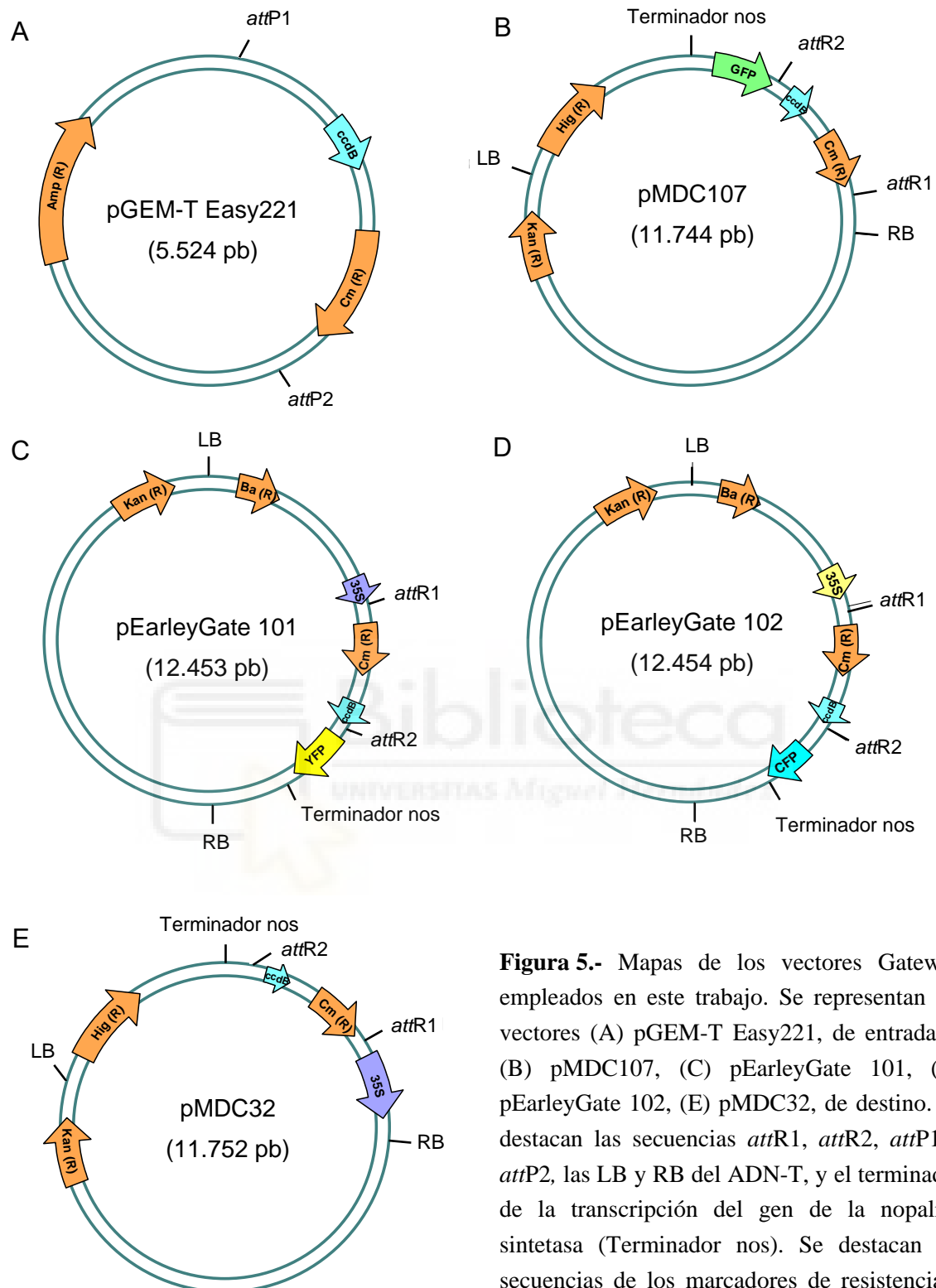


Figura 5.- Mapas de los vectores Gateway empleados en este trabajo. Se representan los vectores (A) pGEM-T Easy221, de entrada, y (B) pMDC107, (C) pEarleyGate 101, (D) pEarleyGate 102, (E) pMDC32, de destino. Se destacan las secuencias *attR1*, *attR2*, *attP1* y *attP2*, las LB y RB del ADN-T, y el terminador de la transcripción del gen de la nopalina sintetasa (Terminador nos). Se destacan las secuencias de los marcadores de resistencia a

ampicilina *Amp*(*R*), kanamicina *Kan*(*R*), higromicina *Hig*(*R*), cloranfenicol *Cm*(*R*) y Basta *Ba*(*R*), del gen tóxico *ccdB*, y de los genes que codifican las proteínas fluorescentes GFP, YFP y CFP. Las flechas indican el sentido de la transcripción. Tomado de (A) Navarro Quiles (2015), (B) Sendrà Ortolà (2017), (C y E) Martínez Fenoll (2023). Los mapas se dibujaron con el programa pDRAW32 (<https://www.acaclone.com/>).

BP y LR se incubaron durante 24 h a 25°C y se interrumpieron añadiendo 2 µl de proteinasa K (2 µg/µl) e incubando a 37°C durante 10 min.

IV.9.- Transformaciones

IV.9.1.- Transformación de células bacterianas

IV.9.1.1.-Transformación por choque térmico

Se añadieron 2,5 µl de los productos de una reacción BP o LR (apartado IV.8 en la página 26) a un tubo *ependorf* que contenía 50 µl de células competentes de *Escherichia coli* DH5α, que se mantuvo en hielo durante 5 min. El tubo se sometió a continuación a un choque térmico, durante 45 s en un baño termostaticado a 42°C, depositándolo después en hielo durante 2 min. Se añadió a continuación 1 ml de medio líquido LB, incubando a 225 rpm durante 1 h a 37°C. Finalmente, se esparció el contenido del tubo sobre el medio de cultivo sólido, suplementado con antibiótico, de una placa de Petri de 90 mm de diámetro. Las placas de Petri se incubaron durante 12-14 h en una estufa a 37°C.

IV.10.- Caracterización fenotípica de mutantes

Las fotografías de plantas cultivadas en placas se tomaron con una lupa trinocular Nikon SMZ1500, dotada de una cámara fotográfica Nikon DS-Ri2, con iluminación provista por una fuente de luz led anular de 72 mm de diámetro HAYEAR MSCled72.

IV.11.- Pruebas estadísticas

Para determinar el modo de herencia de los transgenes, se realizaron ensayos de significación basados en el estadístico chi-cuadrado (χ^2). Se aplicaron ensayos de bondad de ajuste, expresando en la memoria el valor de χ^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 χ^2 y los GL.

Para el contraste de diferencias de expresión por PCR cuantitativa se realizaron ensayos de significación basados en el estadístico t de Student.



V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1.- Análisis bioinformático de RRP8

Con el objetivo de predecir las funciones de RRP8 de Arabidopsis, hemos llevado a cabo distintos análisis *in silico*, comparando su secuencia con las de los presuntos ortólogos humano y de la levadura. Hemos obtenido también una predicción de la localización subcelular de RRP8 en Arabidopsis, utilizando distintos programas bioinformáticos.

V.1.1.- Conservación de la secuencia de aminoácidos

Las presuntas ortólogas de RRP8 en los humanos y en la levadura actúan como metiltransferasas de ARNr, como se describe en el apartado II.4, en la página 10. Para determinar el grado de conservación de la secuencia de la proteína entre la levadura, el humano y Arabidopsis hemos llevado a cabo un alineamiento múltiple. En primer lugar, obtuvimos las secuencias de las proteínas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Después, con la herramienta MEGA11, que utiliza diversos algoritmos para el análisis de secuencias, realizamos el alineamiento múltiple con MUSCLE (Edgar, 2004). El alineamiento nos mostró una evidente conservación, principalmente en la mitad carboxilo, lo que sugiere que las proteínas ortólogas pudieran cumplir funciones similares (Figura 6, en la página 31).

Analizamos además la proteína RRP8 con la herramienta CD-Search del NCBI, capaz de detectar dominios estructurales y funcionales de una proteína a partir de su secuencia (Marchler-Bauer y Bryant, 2004). El análisis indicó que también existe un dominio metiltransferasa en la RRP8 de Arabidopsis, que abarca la mayor parte de la proteína, desde el aminoácido 68 hasta el final (Figura 6B). Estos resultados sugieren que RRP8 en Arabidopsis también actúa como una metiltransferasa de ARNr.

V.1.2.- Predicción de la localización subcelular y suborganular de RRP8

Utilizando la herramienta MuLocDeep (<https://www.mu-loc.org/>; Jiang *et al.*, 2023) y con la secuencia de aminoácidos de RRP8 se puede predecir su localización subcelular y suborganular. Se predice así que el núcleo es el compartimento celular donde se localiza la proteína RRP8 con mayor probabilidad (Figura 6C) y, concretamente, en el nucleolo, el nucleoplasma y los orgánulos nucleares denominados *speckles* (Figura 6D).

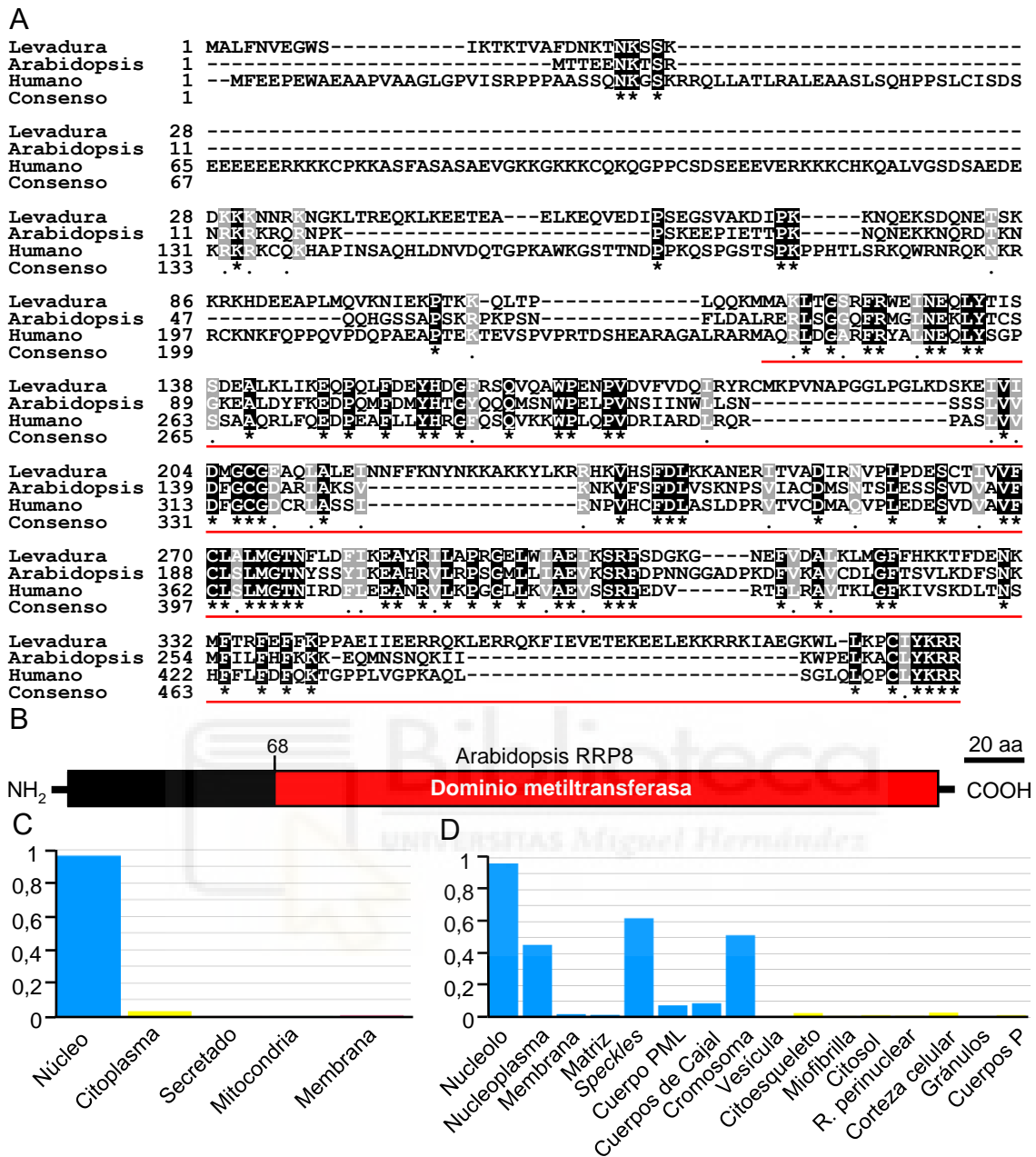


Figura 6.- Análisis *in silico* de RRP8. (A) Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas RRP8 de levadura, Arabidopsis y humanos. Los residuos idénticos o similares compartidos por las tres proteínas se somborean en negro o gris, respectivamente. Los números indican las posiciones de los residuos. El alineamiento se obtuvo utilizando MUSCLE y fue sombreado con Multiple Align Show (https://www.bioinformatics.org/sms/multi_align.html). Se destaca con una línea roja el dominio metiltransferasa de Arabidopsis (B) Posición del dominio metiltransferasa en RRP8 de Arabidopsis; obtenido con la herramienta CD-Search del NCBI Conserved Domain (CDD). Valor de E: $4,06242 \cdot 10^{-88}$. (C y D) Predicción de la localización (C) subcelular y (D) suborganular de RRP8, según MULocDeep (<https://www.mu-loc.org/>; Jiang *et al.*, 2023).

Dado que en el nucleolo y en el nucleoplasma se produce la biogénesis del ribosoma, que concluye en el citoplasma, las predicciones concuerdan con las funciones descritas de los ortólogos de RRP8 en humanos, *Caenorhabditis elegans* y levadura (apartado II.4, en la página 10). La predicción de localización en los *speckles* fue también muy evidente y sugiere una función adicional, no descrita para RRP8, ya que en estos orgánulos se concentran principalmente factores que participan en el *splicing* de los pre-ARNm, pero no se han encontrado FBR (Spector y Lamond, 2011).

V.2.- Análisis de complementación con los alelos *rrp8-1* y *rrp8-2*

Previamente al inicio de este TFM, en el laboratorio se habían caracterizado las líneas insercionales SAIL_1219_G04 y SALK_102154C, portadoras de los alelos que denominamos *rrp8-1* y *rrp8-2*, respectivamente, en los que el gen *RRP8* está interrumpido por una inserción de ADN-T (Adrover Rico, 2023;

A).

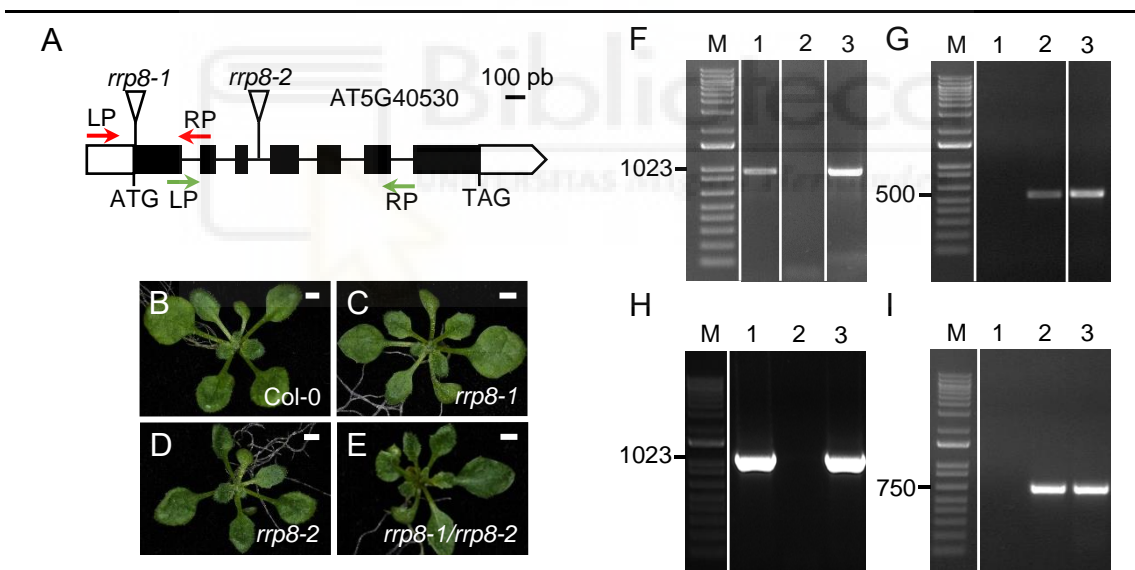


Figura 7.- Análisis de complementación entre los mutantes *rrp8-1* y *rrp8-2*. (A) Estructura del gen *RRP8*, con indicación de las posiciones de las mutaciones insercionales *rrp8-1* y *rrp8-2* (los ADN-T se indican con triángulos). Las líneas continuas representan los intrones; los rectángulos, los exones, destacándose las regiones 5' y 3' UTR en blanco y las regiones codificantes en negro. Las flechas rojas y verdes representan los cebadores usados para genotipar los alelos *rrp8-1* y *rrp8-2* (Tabla 2, en la página 23). (B-E) Rosetas de (B) Col-0, (C) *rrp8-1*, (D) *rrp8-2* y (E) de un individuo F₁ procedente del cruzamiento. Las fotografías se tomaron 21 dde. Las barras de escala representan 2 mm. (F-I) Productos de PCR resultantes del genotipado de plantas (1) Col-0, (2) *rrp8-1* (en las imágenes F y G) y *rrp8-2* (en H e I), y (3) un individuo F₁. Las imágenes corresponden a geles de agarosa al 1% m/v, y teñidos con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular.

Los mutantes homocigóticos *rrp8-1* y *rrp8-2* presentan una roseta con hojas apuntadas y dentadas (Figura 7B-D, en la página 32), fenotipo característico de los mutantes nulos o hipomorfos de genes cuyos productos son FBR.

Para confirmar que ambas mutaciones son alélicas, realizamos un ensayo de complementación llevando a cabo varios cruzamientos recíprocos entre *rrp8-1* y *rrp8-2*. La primera generación filiar (F_1) resultante de los cruzamientos presentó el mismo fenotipo que sus parentales, independientemente del parental masculino o femenino empleado, confirmando que ambos mutantes son alelos del mismo gen (Figura 7C-E). Para descartar que el fenotipo se debiese a una autofecundación, llevamos a cabo el genotipado de las plantas para cada de una de las mutaciones. Para ello, extrajimos el ADN genómico de los individuos de las F_1 (apartado IV.7.1, en la página 22) y realizamos amplificaciones por PCR con los cebadores SAIL_1219_G04_LP/RP y LB-1/SAIL_1219_G94_RP para detectar el alelo *rrp8-1* (Figura 7F-G), y los cebadores SALK_102154_LP/RP y LBb1.3/SALK_102154_RP para detectar el alelo *rrp8-2* (Tabla 2, en la página 16; Figura 7H-I). En todos los casos y en los dos tipos de cruzamientos que realizamos, los individuos F_1 fueron *rrp8-1/rrp8-2* y fenotípicamente mutantes, lo que corroboró el alelismo entre ambas mutaciones.

V.3.- Obtención de transgenes para el estudio funcional del gen *RRP8*

Con el objetivo de profundizar en el análisis funcional del gen *RRP8*, hemos continuado el análisis de las plantas transgénicas portadoras de transgenes para establecer los efectos de su sobreexpresión y rescatar el fenotipo de los mutantes *rrp8*. Hemos diseñado y obtenido transgenes para establecer la localización subcelular de la proteína *RRP8*, mediante la tecnología Gateway, tal y como se describe en el apartado IV.8, en la página 26.

V.3.1.-Transgén del rescate fenotípico y de la sobreexpresión

En un TFG previo a este TFM se habían obtenido plantas Col-0 y *rrp8-1* portadoras del transgén *RRP8_{pro}:RRP8*, que debería rescatar el fenotipo del mutante. También se obtuvieron plantas Col-0 portadoras del transgén *35S_{pro}:RRP8*, para establecer los efectos de la sobreexpresión del gen *RRP8*, ya que se encuentra bajo el control del promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor, que dota a los genes de *Arabidopsis* de expresión ubicua, constitutiva y potente (Adrover Rico, 2023). Ambos transgenes se encuentran en el ADN-T que la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*

transfiere a las plantas, en las que se inserta al azar en el genoma. El ADN-T también contiene un gen de resistencia a higromicina, para la selección de las plantas transformadas.

V.3.1.1.- Estudio del modo de herencia de los transgenes

Hemos sembrado la progenie T₂ en presencia y en ausencia de higromicina, con el objetivo de analizar la segregación del transgén y estimar su número de copias en el genoma de *Arabidopsis* (Tabla 3). La segregación de plantas resistentes y sensibles a higromicina (Hig^R e Hig^S) en la generación T₂ permite establecer si el transgén se hallaba en una o más copias en el genoma del parental T₁, que debe estar en heterocigosis en esa primera generación (las plantas sometidas a la infiltración con *Agrobacterium tumefaciens* son T₀). Al ser la resistencia al antibiótico un carácter dominante, una proporción 3:1 de plantas resistentes frente a sensibles en la T₂, indicaría la presencia de una única inserción en el genoma de la planta T₁, y de dos inserciones si fuese una segregación 15:1.

Tabla 3.- Estudio del modo de herencia de los transgenes *RRP8_{pro}:RRP8* y *35S_{pro}:RRP8*

Genotipo	Línea	Plantas Hig ^R	Plantas Hig ^S	χ^2 (3:1)	χ^2 (15:1)
Col-0	1	13	7	4	32,11
<i>RRP8_{pro}:RRP8</i>	2	8	12	49	113,78
	3	8	12	49	113,78
<i>rrp8-1</i>	1	14	6	1	21,78
<i>RRP8_{pro}:RRP8</i>	2	8	12	49	113,78
	3	10	10	25	75,11
Col-0	1	15	5	0	13,44
<i>35S_{pro}:RRP8</i>	2	12	8	9	44,44
	3	3	17	144	245,44

Los valores de χ^2 indican el grado de ajuste de los datos de la población estudiada a una segregación fenotípica esperada 3:1 y 15:1. En negrita se presentan los valores que permiten aceptar la hipótesis, para un valor de $P < 0,05$.

Hemos realizado pruebas basadas en el estadístico chi-cuadrado (χ^2). Así, se aplicaron pruebas de bondad de ajuste, expresando el valor de χ^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).

De esta manera, las líneas *rrp8-1 RRP8_{pro}:RRP8* y Col-0 *35S_{pro}:RRP8* presentan la proporción esperada para una única inserción del transgén. Las segregaciones del resto de las líneas no se ajustaban a ninguna proporción esperada, lo que pudiera deberse a la poca cantidad de plantas que se pudieron analizar, debido fundamentalmente a contaminación de las placas de Petri con hongos. Por tanto, deberán repetirse los análisis sembrando un número mayor de semillas, ya que son muy pocas para que los datos sean fiables.

V.3.1.2.- Análisis de la expresión de *RRP8* en plantas *35S_{pro}:RRP8*

Aunque el fenotipo foliar de la mayoría de las plantas Col-0 portadoras del transgén *35S_{pro}:RRP8* fue silvestre (Figura 8A-D, en la página 36), algunas presentaron un fenotipo mutante (Figura 8E-H). Con el fin de determinar si las diferencias de fenotipo se debían a los niveles de expresión del gen *RRP8*, llevamos a cabo un experimento de RT-qPCR utilizando plantas con fenotipo silvestre y mutante.

Para evitar la sospecha de que la higromicina pudiera afectar a la expresión del gen, sembramos las plantas de las líneas portadoras de un único transgén (línea 1; Tabla 3, en la página 34) en ausencia del antibiótico. Sembramos como control de la expresión de *RRP8* plantas Col-0 y plantas Col-0 *RRP8_{pro}:RRP8* (Figura 8A). Observamos que la mayoría de plantas poseían fenotipo silvestre a 21 dde (Figura 8B-D), mientras que algunas parecían mutantes (Figura 8E-H). Seleccionamos una planta Col-0 *RRP8_{pro}:RRP8* (Figura 8A), tres plantas Col-0 *35S_{pro}:RRP8* de fenotipo silvestre (Figura 8B-D) y cuatro plantas de Col-0 *35S_{pro}:RRP8* de fenotipo mutante, extrajimos su ARN (apartado IV.7.3, en la página 22) y lo retrotranscribimos a ADNc (apartado IV.7.7., en la página 26).

Debido a que sembramos las plantas en ausencia de higromicina, hubo que comprobar que eran portadoras del transgén. Para ello, utilizando como molde su ADNc, realizamos una amplificación por PCR con cebadores que hibridan en el gen que confiere a la planta resistencia a higromicina, los cebadores Hyg_F e Hyg_R (Tabla 2, en la página 23). Todas las plantas Col-0 *35S_{pro}:RRP8* contenían el gen de resistencia a la higromicina mientras que solo dos de las cuatro plantas *RRP8_{pro}:RRP8* contenían dicho gen.

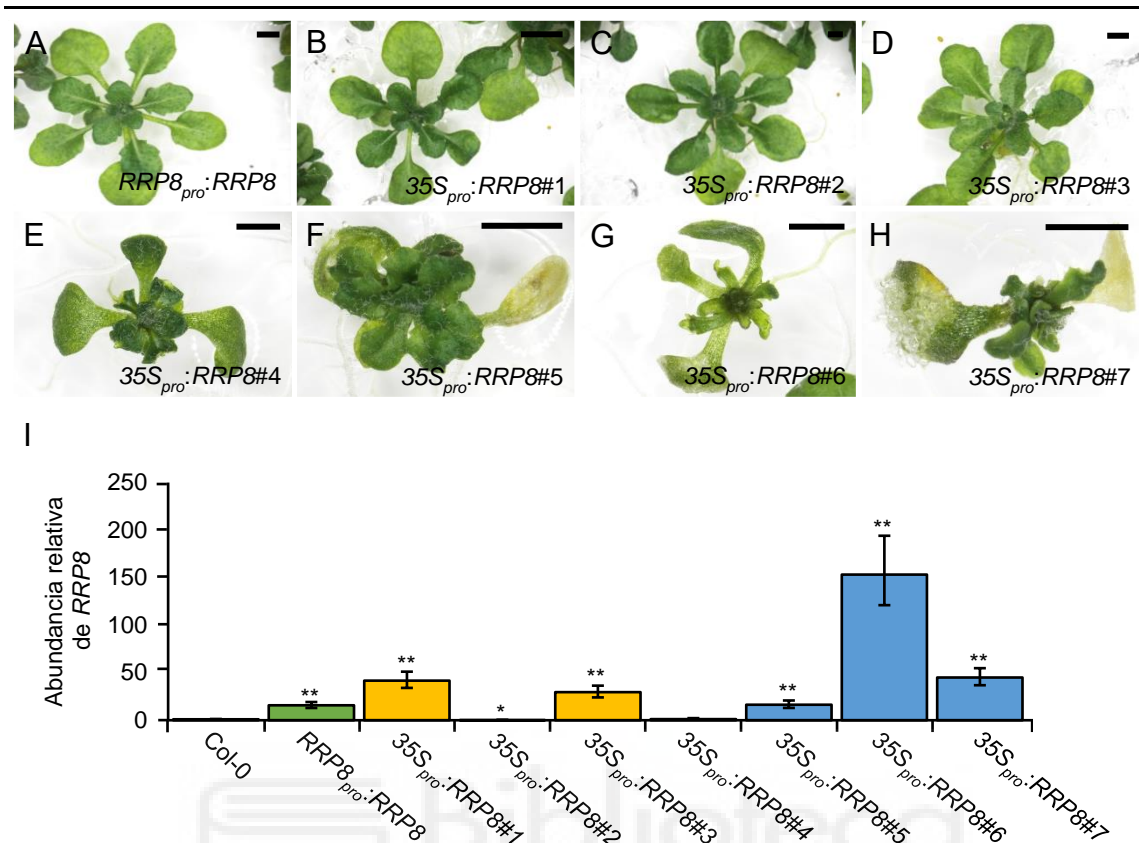


Figura 8.- Expresión del gen *RRP8* en líneas transgénicas. (A-H) Rosetas de plantas T₂ portadoras de los transgenes *RRP8_{pro}:RRP8* y *35S_{pro}:RRP8*. Las fotografías se tomaron 21 dde. Las barras de escala representan 2 mm. (I) Análisis de la expresión de *RRP8* por RT-qPCR en las plantas mostradas en A-H. En verde se representa la expresión relativa de *RRP8_{pro}:RRP8*, en amarillo la de plantas *35S_{pro}:RRP8* de fenotipo silvestre y en azul la de plantas *35S_{pro}:RRP8* de fenotipo aberrante. Dos réplicas biológicas se emplearon para Col-0 y *RRP8_{pro}:RRP8* y una para el resto. Tres replicas técnicas fueron llevadas a cabo en todas las amplificaciones. Los asteriscos indican valores significativamente diferentes respecto al silvestre (Col-0) en un test *t* de Student (**P* < 0,01; ***P* < 0,001).

Con el ADNc de las plantas portadoras del transgén llevamos a cabo una qPCR con los cebadores SALK_102154_LP y *RRP8*_qPCR_R (Tabla 2, en la página 23) que hibridan en el gen *RRP8*. El cebador *RRP8*_qPCR_R hibrida entre dos exones, con el objetivo de impedir la amplificación de ADN genómico. Como gen control utilizamos el gen *ACT2* (*ACT2*_F/R, Tabla 2). Utilizamos dos réplicas biológicas para Col-0 y Col-0 *RRP8_{pro}:RRP8*, y una única por cada planta Col-0 *35S_{pro}:RRP8*, debido a que cada planta puede variar su expresión del transgén, dependiendo del sitio en el que se haya insertado el ADN-T que lo contiene en el genoma. Tres réplicas técnicas fueron utilizadas en cada caso, como suele ser habitual en experimentos de RT-qPCR.

Los niveles de expresión de *RRP8* fueron mucho mayores en las plantas transgénicas respecto a Col-0 en la mayoría de los casos (menos en *35S_{pro}:RRP8#2* y *35S_{pro}:RRP8#4*; Figura 8I, en la página 36). Como esperábamos, también fueron mayores los niveles de expresión de *RRP8* en plantas *35S_{pro}:RRP8* respecto a plantas portadoras del transgén *RRP8_{pro}:RRP8*, en la mayoría de los casos. Sin embargo, en algunas plantas Col-0 *35S_{pro}:RRP8*, *RRP8* se encuentra sobreexpresado (*35S_{pro}:RRP8#1*, 3, 5, 6 y 7) mientras que en otras no (*35S_{pro}:RRP8#2* y 4). Incluso en *35S_{pro}:RRP8#2* la expresión de *RRP8* se ve reprimida respecto al silvestre. En algunas de las plantas de fenotipo mutante (*35S_{pro}:RRP8#4-7*) *RRP8* se sobreexpresa 16 y 150 veces respecto a Col-0, sin embargo, en una de ellas (*35S_{pro}:RRP8#4*) la expresión es parecida a Col-0. Estos datos son parecidos a los de plantas sin fenotipo (*35S_{pro}:RRP8#1-3*), resultado que sugiere que el fenotipo mutante no se debe a la sobreexpresión de *RRP8*.

V.3.2.- Análisis de la localización subcelular de *RRP8* con el transgén *RRP8_{pro}:RRP8:GFP*

Previamente al inicio de este TFM, se había intentado obtener el transgén *RRP8_{pro}:RRP8:GFP* sin éxito (Adrover Rico, 2023). En mi trabajo, decidimos diseñar un nuevo cebador (attB1_RRP8_pro2, Tabla 2, en la página 23), que utilizamos junto al cebador previamente existente (attB2_RRP8_R, Tabla 2) y amplificamos la región deseada *RRP8_{pro}:RRP8* (Figura 9A, en la página 38). El producto se clonó en el vector de entrada y este clon de entrada servirá para la obtención del clon de destino utilizando el vector pMDC107 (Figura 5B, en la página 28), lo que generará el transgén *RRP8_{pro}:RRP8:GFP*.

Así mismo hemos amplificado únicamente la región codificante de *RRP8* (Figura 9C, en la página 38) para su posterior integración en el vector de destino que permitirán la obtención de los transgenes *35S_{pro}:RRP8:YFP*, utilizando el vector pEarlyGate 101 (Figura 5C) y *35S_{pro}:RRP8:CFP* con pEarlyGate 102 (Figura 5D).

El producto de PCR resultante se integró en el vector de entrada pGEM T-Easy 221 (Figura 5A) utilizando la clonasa BP, y el producto de la reacción se empleó para transformar células de *Escherichia coli* DH5 α quimiocompetentes. Se seleccionaron las colonias transformantes en medio LB con carbenicilina (una versión más estable del antibiótico ampicilina; apartado IV.6.2.3, en la página 21). Se genotiparon 10 colonias, con la misma pareja de cebadores que utilizamos para amplificar el inserto, resultaron positivas casi todas ellas (Figura 9B y D).

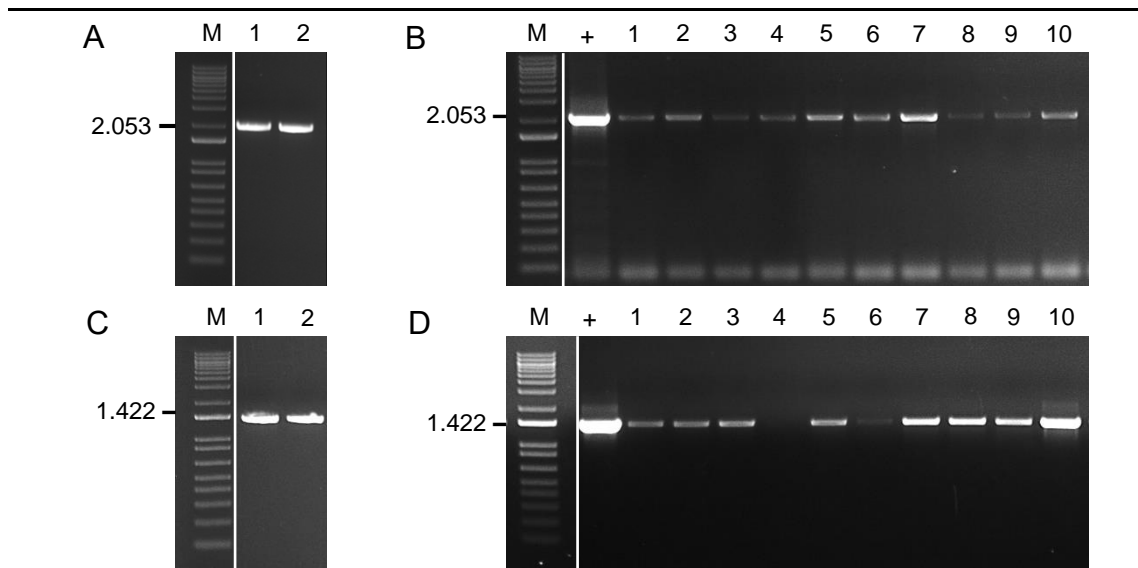


Figura 9.- Obtención y genotipado de los clones de entrada. (A) Amplificación del inserto *RRP8_{pro}:RRP8* con los cebadores attB1_RRP8pro2_F y attB2_RRP8_R. (B) Genotipado de 10 colonias bacterianas presuntamente portadoras del clon de entrada con el inserto *RRP8_{pro}:RRP8*. (C) Amplificación del inserto que servirá para la obtención de los transgenes *35S_{pro}:RRP8:YFP* y *35S_{pro}:RRP8:CFP* con los cebadores attB1_RRP8_F y attB2_RRP8_R. (D) Genotipado de 10 colonias bacterianas presuntamente portadoras de los clones de entrada con el inserto *RRP8*. Se utilizó ADN genómico de Col-0 en las PCR mostradas en A y C. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1% m/v, teñido con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular. +: Control de las amplificaciones que fue ADN genómico de Col-0.

La transferencia del clon de entrada al clon de destino, la posterior transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con ellos y su posterior transferencia a *Arabidopsis*, permitirá también determinar la localización subcelular de RRP8.

V.4.- Interacciones genéticas de *RRP8*

Para contribuir al estudio de la biogénesis del ribosoma 80S en *Arabidopsis*, hemos estudiado posibles interacciones genéticas del gen *RRP8*, obteniendo y analizando los fenotipos de dobles mutantes, entre *rrp8-1* o *rrp8-2* y otros mutantes de pérdida de función en genes que codifican FBR. Si los rasgos de un doble mutante son una combinación de los mutantes simples, su fenotipo es de tipo aditivo y los genes mutados no guardarían una relación funcional. Si, por el contrario, el fenotipo del doble mutante es mucho más aberrante que lo esperado de la suma de los efectos de las mutaciones individuales, se trataría de una interacción sinérgica y los genes estarían funcionalmente relacionados. Si el fenotipo del doble mutante se suaviza con respecto

al de uno de los mutantes simples, la segunda mutación sería supresora. En estos dos últimos casos, también los genes estarían funcionalmente relacionados (Pérez-Pérez *et al.*, 2009). Sin embargo, si los fenotipos mutantes no son muy severos, es difícil distinguir entre aditividad o supresión. La epistasia es difícil de entender y analizar en rutas de desarrollo, por lo que se evitará el uso de este término en el análisis de los dobles mutantes.

Hemos obtenido o iniciado la obtención de combinaciones de dobles mutantes de un alelo de *RRP8* (*rrp8-1* o *rrp8-2*) con mutantes portadores de alelos nulos de *ABSTRAKT1* (*ABS1*), *CAX INTERACTING PROTEIN4* (*CXIP4*), *MRNA TRANSPORT4* (*MTR4*), *NUC1/PARL1*, *PLANT RNA HELICASE 75* (*PRH75*), *RIBOSOMAL PROTEIN SMALL 24A* (*RPS24A*), *RPS24B*, *RRP7* y *SMO4* (Tabla 1, en la página 16).

V.4.1.- Cruzamientos y obtención y genotipado de las poblaciones F₁ y F₂

Tres de los cruzamientos (*cxip4-2* × *rrp8-1*, *mtr4-2* × *rrp8-1*, *rps24a-1* × *rrp8-1*) se habían realizado antes del inicio de este TFM. Hemos llevado a cabo los siguientes cruzamientos según se indica en el apartado IV.5.3, en la página 18: *abs1-1* × *rrp8-1*, *abs1-1* × *rrp8-2*, *atr7-2* × *rrp8-1*, *cxip4-2* × *rrp8-2*, *parl1-1* × *rrp8-1*, *rps24a-1* × *rrp8-1*, *rps24b-2* × *rrp8-1*, *rps24b-2* × *rrp8-2*, *rrp7-1* × *rrp8-2*, *smo4-3* × *rrp8-1* y *smo4-3* × *rrp8-2*. De los cruzamientos realizados, todos rindieron semillas F₁, excepto los cruzamientos *atr7-2* × *rrp8-1* y *parl1-1* × *rrp8-1*, que tendrán que repetirse en un futuro.

Recolectamos las semillas F₁ y las sembramos en placas de Petri para observar su fenotipo foliar 21 dde. Todas las semillas germinaron, excepto las provenientes del cruzamiento *smo4-3* × *rrp8-2*, que deberá repetirse. Al cruzar dos mutantes recesivos, como es el caso en todos los mutantes con los que hemos trabajado, la progenie F₁ ha de ser fenotípicamente silvestre y genotípicamente dihíbrida, es decir diheterocigótica para los alelos silvestre y mutante de los dos genes mutados en los parentales. Se utilizaron en todos los cruzamientos los mutantes *rrp8-1* y *rrp8-2* como donantes de polen, al ser más fértiles y las plantas tener un fenotipo menos severo que los mutantes por los que se cruzaron. De esta manera, el genotipado de las plantas fue más sencillo, al poder emplear en todas las F₁ únicamente los cebadores para amplificar el alelo mutante y silvestre *RRP8*, ya que su heterocigosis descartaría la autofecundación.

Como era lo esperado, todas las plantas F₁ fueron fenotípicamente silvestres y heterocigóticas para el alelo silvestre de *RRP8* y el correspondiente mutante *rrp8*. Las plantas genotipadas se trasplantaron a macetas, para permitir su autofecundación que daría lugar a poblaciones F₂.

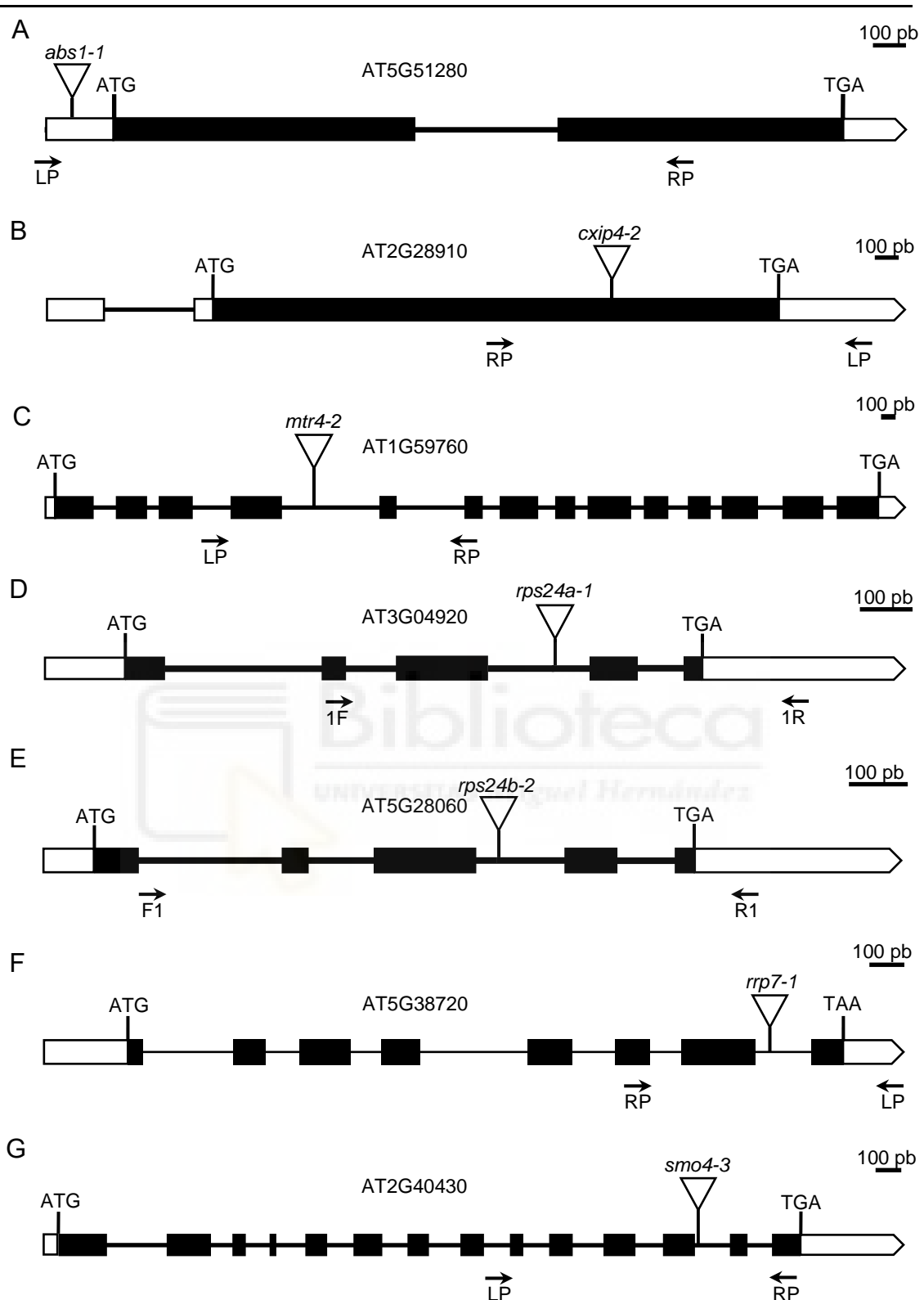


Figura 10.- Naturaleza molecular de los alelos mutantes de los genes *ABS*, *CXIP4*, *MTR4*, *RPS24A*, *RPS24B*, *RRP7* y *SMO4* empleados en los cruzamientos con los mutantes *rrp8*. (A-G) Estructura de los genes (A) *ABS*, (B) *CXIP4*, (C) *MTR4*, (D) *RPS24A*, (E) *RPS24B*, (F) *RRP7* y (G) *SMO4*. Todos los mutantes son insercionales. Se siguen las pautas indicadas en la Figura 7, en la página 32. Las posiciones de los cebadores usados (Tabla 2, en la página 23) se indican mediante flechas horizontales.

Con el objetivo de identificar inequívocamente los dobles mutantes, sembramos 108 semillas de cada F₂ y seleccionamos 15 plantas que tuvieran un fenotipo, a ser posible, distinto al de los parentales y al silvestre, 21 dde. Se genotipó en cada planta F₂ las mutaciones presentes en sus parentales y que se muestran en la Figura 3, en la página 25 y en la Tabla 1 en la página 16, utilizando los cebadores que se indican en la Tabla 2 en la página 23.

V.4.2.- Análisis de los dobles mutantes

AT5G51280 codifica una helicasa de ARN, presunta ortóloga de ABSTRAKT de *Drosophila* y de DEAD-Box Helicase 41 (DDX41) humana. Según la información depositada en las bases de datos, DDX41 es un interactor de la NKAP humana (que es el ortólogo de MAS2 en *Arabidopsis*). Las hojas de los mutantes *abs1-1* de *Arabidopsis*, portadores de un alelo insercional en la región 5'-UTR del gen (Figura 10A, en la página 40) que se han estudiado en el laboratorio, son redondeadas y arrugadas, con peciolo cortos, lo que produce rosetas compactas (Senent Valero, 2018). Hemos obtenido un individuo sesquimutante *rrp8-1/rrp8-1*; *ABS1/abs1-1* (Figura 11R, en la página 43) cuyo fenotipo se asemeja al de su parental *rrp8-1*. Del cruzamiento *abs1-1* × *rrp8-2*, hemos obtenido un doble mutante *rrp8-2 abs1-1* (Figura 11S), que es como *abs1-1*, aunque parece de crecimiento más lento, pudiendo ser un doble mutante aditivo.

AT2G28910 codifica CXIP4, que fue el interactor más frecuente de MAS2, identificado en ensayos de doble híbrido de levadura (apartado III, página 13) y que estamos estudiando en el laboratorio. En *Arabidopsis* participa en el metabolismo del ARNr y del ARNm. El alelo *cxip4-1* es letal embrionario, mientras que *cxip4-2* es viable, aunque es portador de un ADN-T en la región codificante del gen (Figura 10B). Las plantas *cxip4-2* presentan un fenotipo pleiotrópico, crecimiento lento y floración tardía y acumulación nuclear de ARN poliadenilados (Aceituno-Valenzuela *et al.*, en preparación). Tras genotipar 15 plantas de la progenie F₂, hemos encontrado cuatro sesquimutantes y un doble mutante, que es como *cxip4-2* (Figura 11T). Se deberá analizar también el porte y fertilidad del doble mutante para poder confirmar si existe o no una interacción genética, ya que el fenotipo de las plantas *cxip4-2* es muy variable y podría llevar a confusión en la interpretación del doble mutante. Del cruzamiento *cxip4-2* × *rrp8-2* se obtuvo únicamente un sesquimutante de genotipo *rrp8-2/rrp8-2*; *CXIP4/cxip4-2* y cuyo fenotipo fue como el de *rrp8-2* (Figura 11U). Se analizará la

progenie F₃ con el fin de encontrar el doble mutante *rrp8-2 cxip4-2*, que debería confirmar los resultados con el doble mutante *rrp8-1 cxip4-2*.

AT1G59760 codifica MTR4, una helicasa de ARN que participa en la biogénesis del ARNr y es un cofactor del exosoma. Las plantas *mtr4-2* tienen un crecimiento más lento, con hojas apuntadas y raíces más pequeñas que el silvestre. Presentan acumulación de los pre-ARNr 18S y 5,8S, aunque los niveles de ARNr maduros son iguales que los del silvestre (Lange *et al.*, 2011). El alelo *mtr4-2* es portador de un ADN-T en el cuarto exón del gen (Figura 10C, en la página 40). En la F₂ del cruzamiento *mtr4-2* × *rrp8-1* obtuvimos 3 plantas sesquimutantes y un doble mutante que fue como *mtr4-2* (Figura 11V, en la página 43). Así mismo, se estudiará en un futuro el porte y la fertilidad del doble mutante.

AT3G04920 y AT5G28060 codifican RPS24A y RPS24B. Ambos actúan como factores de biogénesis del ribosoma en la maduración del ARNr 18S, su deficiencia reduce los niveles del ARNr 18S maduro (Cabezas-Fuster *et al.*, 2023). Los mutantes *rps24a-1* y *rps24b-2* presentan rosetas pequeñas y hojas con indentaciones. Los alelos *rps24a-1* y *rps24b-2* presentan un ADN-T en el tercer exón de su región codificante (Figura 10D y E). Del cruzamiento *rps24a-1* × *rrp8-1*, hemos genotipado 15 plantas F₂, tres resultaron ser sesquimutantes *RRP8/rrp8-1*; *rps24a-1/rps24a-1* y ninguna doble mutante. Se seleccionaron 5 individuos de cada F₃ y uno de ellos resultó ser un doble mutante, cuyo fenotipo fue aditivo (Figura 11W). Se obtuvieron 10 sesquimutantes de genotipo *RRP8/rrp8-1*; *rps24b-2/rps24b-2* y ningún doble mutante (Figura 11X). Sin embargo, obtuvimos un doble mutante *rrp8-2 rps24b-2*, que también tuvo un fenotipo aditivo (Figura 11Y). La aditividad de los dobles mutantes *rrp8 rps24* (a y b) sugiere que los genes a estudio no interaccionan.

AT5G38720 codifica RRP7. Esta proteína se localiza en el nucleolo y actúa en la maduración del ARNr 18S. Los mutantes *rrp7-1* presentan hojas apuntadas y un crecimiento lento (Micol-Ponce *et al.*, 2018). El alelo *rrp7-1* presenta un ADN-T en su séptimo intrón (Figura 10F). Previamente, se había encontrado que *RRP7* y *RRP8* están coexpresados (apartado III, página 13). Del cruzamiento *rrp7-1* × *rrp8-2* solo obtuvimos dos sesquimutantes *rrp8-2/rrp8-2*; *RRP7/rrp7-1* (Figura 11Z) y ningún doble mutante, lo que sugiere que podría ser letal embrionario. Para determinarlo, hemos observado las silicuas de individuos de Col-0, *rrp7-1*, *rrp8-2* y los sesquimutantes *rrp8-2/rrp8-2*; *RRP7/rrp7-1* (Figura 11AB-AE), en estas últimas plantas encontramos algunos huecos donde debería haber una semilla (Figura 11AE), pero que también los vemos en los parentales (Figura 11AC y AD).

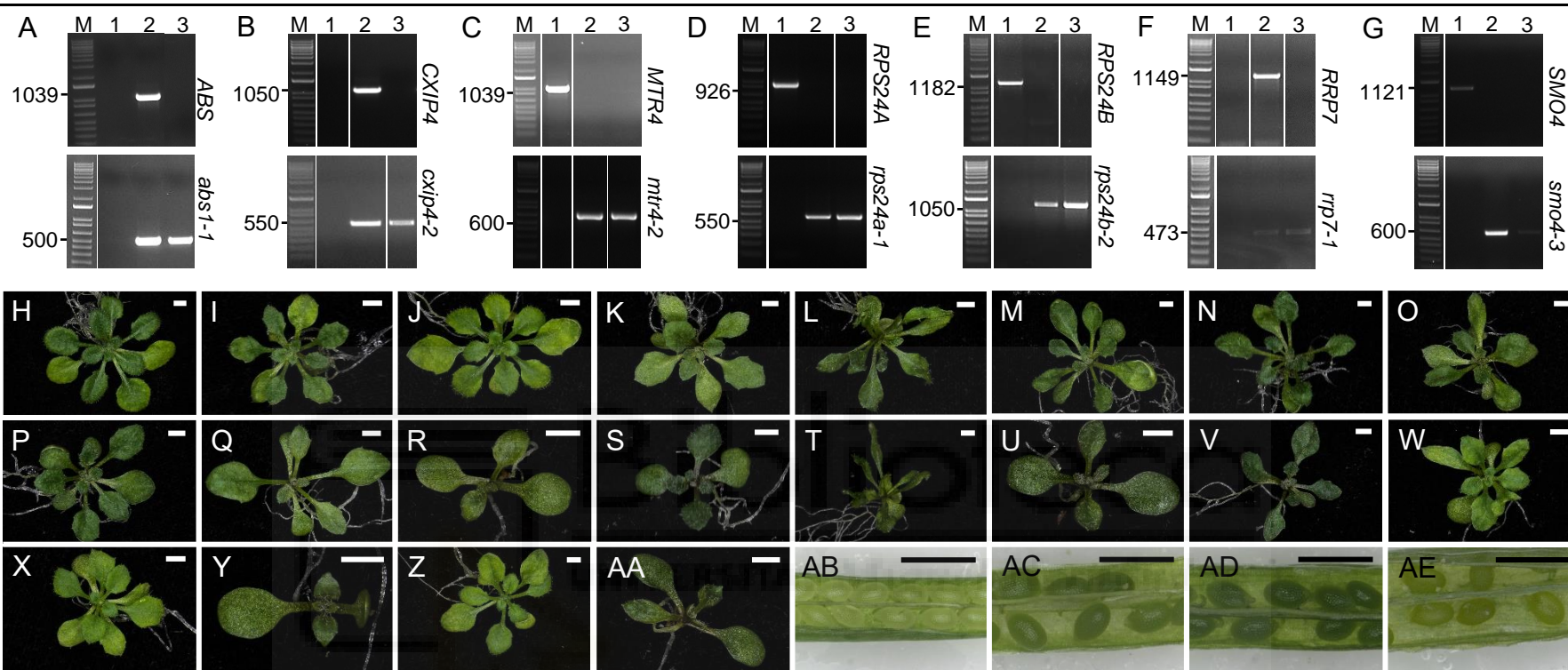


Figura 11.- Posibles interactores genéticos de *RRP8*. Genotipado de los mutantes empleados en este TFM. (A-G) Productos de PCR visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% m/v, y teñidos con bromuro de etidio, al genotipar las inserciones de ADN-T de (A) *abs1-1*, (B) *cxip4-2*, (C) *mtr4-2*, (D) *rps24a-1*, (E) *rps24b-2*, (F) *rrp7-1* y (G) *smo4-3*. Se representa, (M) el marcador de peso molecular, ADN de (1) Col-0, (2) el parental homocigoto mutante, y (3) un individuo homocigoto mutante de la progenie F₂. Fenotipo foliar de los dobles mutantes (H-Z). Rosetas de (H) Col-0, (I) *rrp8-1*, (J) *rrp8-2*, (K) *abs1-1*, (L) *cxip4-2*, (M) *mtr4-2*, (N) *rps24a-1*, (O) *rps24b-2*, (P) *rrp7-1*, (Q) *smo4-3*, (R) *rrp8-1/rrp8-1*; *ABS1/abs1-1*, (S) *rrp8-2 abs1-1*, (T) *rrp8-1 cxip4-2*, (U) *rrp8-2/rrp8-2*; *CXIP4/cxip4-2*, (V) *rrp8-1 mtr4-2*, (W) *rrp8-1 rps24a-1*, (X) *RRP8/rrp8-1*; *rps24b-2/rps24b-2*, (Y) *rrp8-2 rps24b-2*, (Z) *rrp8-2/rrp8-2*; *RRP7/rrp7-1* y (AA) *rrp8-1 smo4-3*. Posible letalidad embrionaria del doble mutante *rrp8-2 rrp7-1* (AB-AE). Silicuas de (AB) Col-0, (AC) *rrp8-2*, (AD) *rrp7-1*, (AE) *rrp8-2/rrp8-2*; *RRP7/rrp7-1*. Las fotografías H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, T, V, W y Z se tomaron 21 dde. Las fotografías R, S, U, X, Y y AA se tomaron 14 dde. Las fotografías AB, AC, AD, AE se tomaron 62 dde. Las barras de escala representan 2 mm menos en AB-AE que representan 1 mm.

Esta observación concuerda con resultados previos del laboratorio, relativos a la baja fertilidad de las plantas *rrp7-1*, cuyas silicuas contienen óvulos sin fertilizar (Micol-Ponce *et al.*, 2018). Para estudiar mejor la posible letalidad embrionaria, futuros estudios están planeados para cuantificar las semillas y los huecos por silicua en los sesquimutantes respecto a los parentales y al silvestre Col-0. También se sembrarán los sesquimutantes para intentar encontrar en las F₃ los dobles mutantes.

AT2G40430 codifica SMO4. Está involucrado en la maduración del ARNr 5,8S y el mutante *smo4-3* presenta hojas dentadas y apuntadas (Micol-Ponce *et al.*, 2020). El alelo *smo4-3* tiene un ADN-T en el decimosegundo intrón (Figura 10G, en la página 40). Hemos obtenido dos dobles mutantes *rrp8-1 smo4-3*, de fenotipo parecido al de los dos parentales, que son muy similares entre si (Figura 11AA, en la página 43). Concluimos de este resultado que no hay ningún tipo de interacción genética entre los genes a estudio, ya que el efecto sería aditivo.

V.5.- Análisis de la biogénesis del ribosoma

Con el fin de determinar si *rrp8-1* y *rrp8-2* regulan la expresión del ADNr 45S, se analizó su expresión en ambos mutantes. Además, en el laboratorio de M.R. Ponce se habían caracterizado fenotípicamente, pero no su implicación en la regulación de la expresión del ADNr 45S, los mutantes *atr7-2*, *abs1-1* y *pol5-1*, por lo que también llevamos a cabo los mismos experimentos con estos tres mutantes.

El mutante *atr7-2* se encuentra afectado en el gen *PRH75* (*PLANT RNA HELICASE 75*). La proteína PRH75 participa en la maduración del ARNr 18S, y su implicación es dependiente de la temperatura (Huang *et al.*, 2016). El ortólogo humano de PRH75 es DDX21, que coordina la síntesis de los componentes del ribosoma, reprimiendo la expresión del ADNr 47S y la de los genes que codifican PR, en condiciones de estrés (Calo *et al.*, 2018). La participación de PRH75 en el control de la expresión del ADNr 45S no se ha estudiado.

En un TFG previo a este TFM, se caracterizó una línea de ADN-T portadora de un alelo insercional del gen *POL5*, al que denominamos *pol5-1* (Figura 12A, en la página 45) y se determinó que la homocigosis de ese alelo causaba letalidad embrionaria (Martínez Fenoll, 2022). Posteriormente se observó que, al sembrar semillas descendientes de plantas *POL5/pol5-1*, aparecían en una muy pequeña proporción individuos con fenotipo muy aberrante (Figura 12C-F) y con crecimiento muy retrasado, que al genotiparlos resultaron ser homocigotos para el alelo *pol5-1*. Con el fin de cuantificar la proporción de aparición de estas plantas, sembramos la descendencia de una planta *POL5/pol5-1* en 17

placas de Petri, con una densidad de 104 semillas por placa. Obtuvimos 76 individuos homocigóticos *pol5-1* de un total de 1.768 plantas (4,29%). Este tipo de plantas mutantes para un gen esencial que son muy minoritarias y que escapan la etapa fenocrítica para la supervivencia de la planta, se denominan *escapers*. Las plantas *escapers pol5-1* (Figura 12C-F) pueden ser de gran utilidad para el análisis funcional del gen *POL5*, al ser viables.

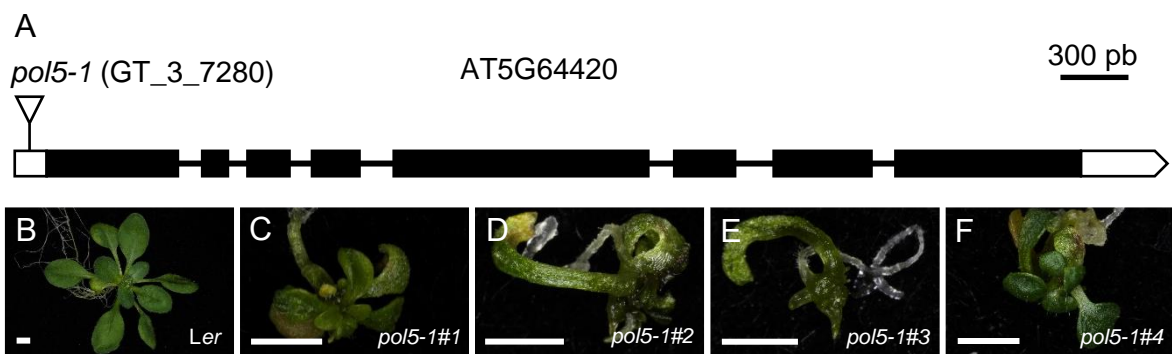


Figura 12.- *POL5* es un gen esencial la supervivencia de Arabidopsis. (A) Estructura del gen *POL5*, con indicación del sitio de la inserción del ADN-T en la línea GT_3_7280, portadora del alelo *pol5-1*. Se siguen las pautas definidas en el pie de la Figura 7, en la página 32. (B-F) Rosetas de (B) *Ler* y (C-F) de plantas *escapers pol5-1*. Las fotografías se tomaron 21 dde. Las barras de escala representan 2 mm.

V.5.1.- Análisis de la expresión de las VAR del ADNr 45S

Se han descrito cuatro variantes polimórficas (*VAR1-4*) que afecta a la región 3'-ETS del ADNr 45S en Arabidopsis, que difieren en pequeñas inserciones y deleciones, lo que permite su visualización en experimentos de *northern* y de RT-PCR (Pontvianne et al., 2010; Figura 13A, en la página 46; apartado II.2.1, en la página 3).

Para llevar a cabo el análisis de la expresión del ADNr 45S mediante RT-PCR, se utilizó ARN de una mezcla de tres rosetas por genotipo de plantas 21 dde (apartado IV.7.3, en la página 22), que se trató con DNAsas y se retrotranscribió a ADNc (apartado IV.7.7, en la página 26). Se determinó la ausencia de ADN genómico contaminante, amplificando por PCR los ADNc utilizando la pareja de cebadores OTC-3D y OTC-Rev, que flanquea un intrón del gen *OTC* (Quesada et al., 1999; Tabla 2, en la página 23).

A continuación, se llevó a cabo una RT-PCR semicuantitativa, basada en la repetición de PCR idénticas, utilizando distinto número de ciclos, para intentar cuantificar, aunque de forma poco precisa, las diferencias entre las intensidades de las bandas, ya que en algunas de ellas no se habría saturado la reacción. En nuestro caso, se emplearon programas de 25, 30 y 35 ciclos.

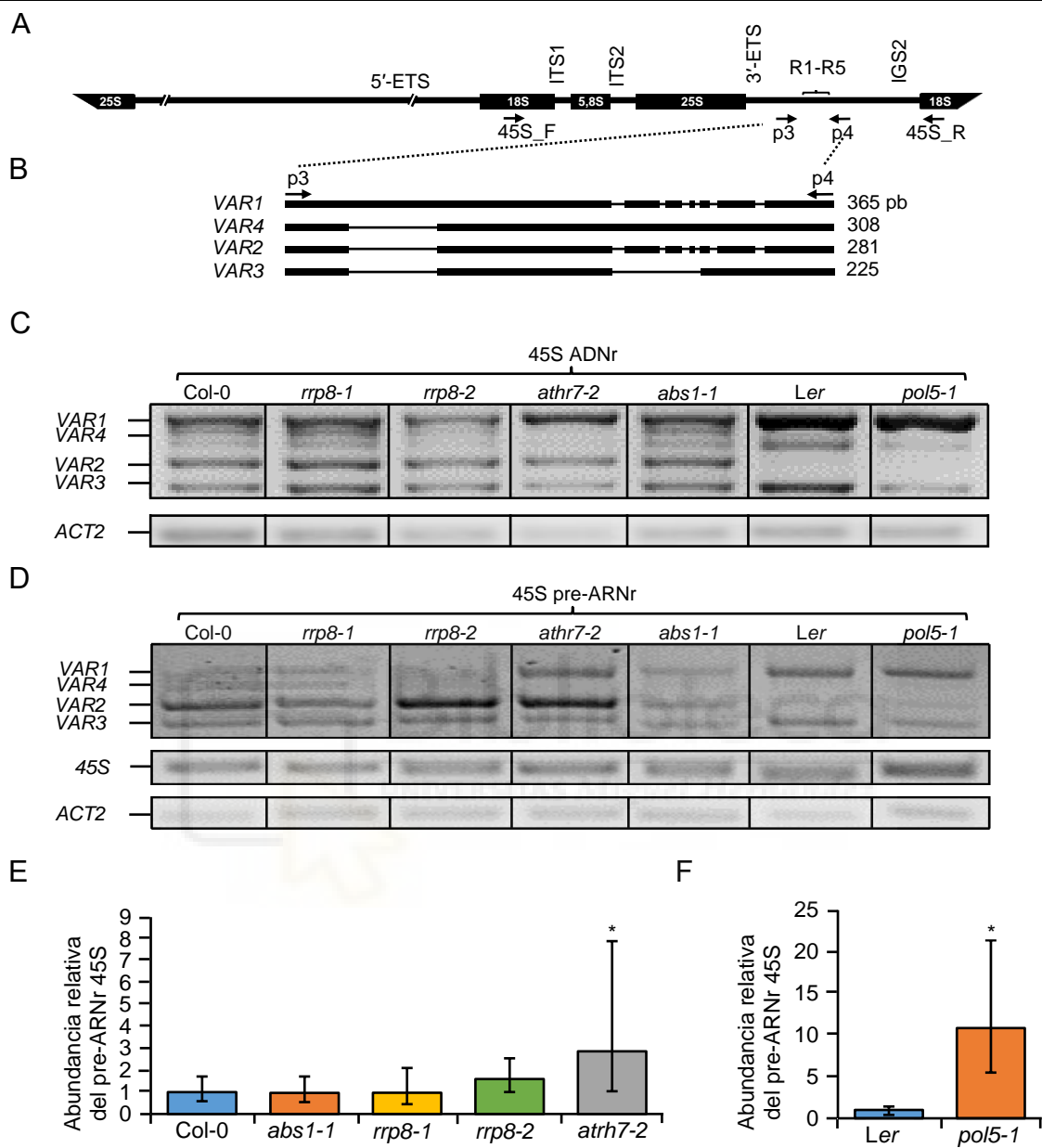


Figura 13.- Expresión del ADNr 45S en *rrp8-1*, *rrp8-2*, *athr7-2*, *abs1-1* y *pol5-1*. (A y B) Representación esquemática del (A) ADNr 45S y (B) su región polimórfica 3'-ETS. 5'-ETS y 3'-ETS, secuencias espaciadoras externas. ITS1 y ITS2, secuencias espaciadoras internas. Se indican las posiciones de los cebadores empleados para las amplificaciones de las VAR (p3 y p4) y del pre-ARNr 45S en su conjunto (prerRNA-45SF y 45S-prerRNA-45SR), cuyos nombres se han abreviado en la figura (45S_F/R). (C-D) Resultados de los análisis por RT-PCR de la abundancia relativa de las VAR con (C) ADN genómico y (D) ADNc obtenido a partir de ARN de Col-0, *rrp8-1*, *rrp8-2*, *athr7-2*, *abs1-1*, Ler y *pol5-1* (en el fondo genético Ler) y el gen ACT2 como control endógeno. (D) Análisis por RT-qPCR de la abundancia del ARNr 45S (D-E). Abundancia del pre-ARNr 45S en los mutantes, referidos a sus ancestros silvestres Col-0 (D) o Ler (E). Se usaron 2 réplicas biológicas y 3 técnicas por genotipo. Los asteriscos indican valores significativamente diferentes respecto al silvestre (Col-0 o Ler) en un test *t* de Student (* $P < 0,001$).

Se empleó la pareja de cebadores p3 y p4, que amplifican la región polimórfica 3'-ETS del ADN_r 45S (Figura 13B, en la página 46; Tabla 2, en la página 23). La visualización de los productos de amplificación se llevó a cabo en geles de agarosa al 3% m/v, ya que las diferencias de tamaño entre las VAR son pequeñas, y se requiere un alto porcentaje de agarosa para separar bien las bandas. Respecto a los resultados con el ADN genómico, obtuvimos saturación con los programas de 30 y 35 ciclos, siendo el programa de 25 ciclos en el que se distinguen mejor las distintas VAR.

Respecto al pre-ARN_r, no se obtuvo saturación con ninguno de los tres programas empleados y los resultados nos permitieron concluir que en el mutante *atrh7-2* y en menor medida, también en *abs1-1*, se expresa la VAR1, cuando no lo hace en el silvestre (Figura 13D) sin haber diferencias de intensidad llamativas en la amplificación con ADN genómico (Figura 13C). Con el resto de los mutantes no se pudo llegar a conclusiones claras, ya que no se observaron diferencias tan evidentes. Los resultados con los mutantes *rrp8* no fueron consistentes, pues sólo parece haber mayor expresión de la VAR2 en *rrp8-2*.

Consideramos estos resultados preliminares, ya que habría que repetirlos con un número mayor de réplicas biológicas. No obstante, y con la precaución debida al uso de dos réplicas biológicas, los resultados con *atrh7-2* muestran una desrepresión de la VAR1, que se encuentra en el silvestre silenciada epigenéticamente (Pontvianne *et al.*, 2010). Estos resultados preliminares también sugieren un papel represor de PRH75 en la expresión del ADN_r 45S, lo que implicaría una conservación funcional en el control de la biogénesis del ribosoma, en la que habría que profundizar.

Además de las posibles diferencias de expresión entre genotipos, podemos observar en la amplificación de las variantes con ADN genómico la presencia de una banda adicional a las cuatro variantes (Figura 13C) en Col-0 y en los mutantes de fondo Col-0. Podría tratarse de la VAR5, previamente descrita al secuenciar masivamente con la tecnología de lecturas largas de PacBio (Havlova *et al.*, 2016). Sin embargo, VAR5 no había sido detectada por PCR antes. Una posible explicación sería una amplificación inespecífica o una incorrecta separación de bandas durante la electroforesis.

V.5.2.- Análisis de la expresión del ADN_r 45S

Dado que la amplificación de las regiones polimórficas de las VAR con los cebadores p3 y p4 no se puede realizar por RT-qPCR, por generar varios productos de PCR, se decidió cuantificar la expresión del ADN_r 45S en su conjunto, utilizando la pareja

de cebadores 45S-prerRNA-45SF y 45S-prerRNA-45SR, que hibridan en la región 5'-ETS, que no es polimórfica y que por tanto, su amplificación rinde un único producto de PCR (Tabla 2, en la página 23; Figura 13A, en la página 46).

Se realizaron en primer lugar experimentos de RT-PCR, observándose una banda más intensa con el ARN de los mutantes *pol5-1* respecto a su fondo genético *Ler* (Figura 13D), lo que sugiere que el ADNr 45S se sobreexpresa o se acumula el pre-ARNr 45S en el mutante. Así mismo, se observó una mayor abundancia en el mutante *atr7-2* que en su silvestre, *Col-0* (Figura 13D).

Los experimentos de qPCR confirmaron estos resultados, ya que se encontró en *pol5-1* una abundancia del pre-ARNr 45S entre unas 10 y 15 veces respecto a *Ler* (Figura 13F) y de unas 2 o 3 veces en *atr7-2*, respecto a *Col-0* (Figura 13G) sugiriendo una implicación de POL5 y PRH75 en el control de la transcripción del ADNr 45S.

V.6.- Desarrollo de un método para estimar el número de copias del ADNr 45S mediante dPCR

Como se comentó en la introducción, la dPCR (apartado II.3.4, en la página 9) permite la cuantificación absoluta del número de copias de ADN presentes en una muestra. Se puede emplear con ADN genómico o con ADNc en análisis de expresión génica. El laboratorio de M.R. Ponce cuenta con un equipo QuantStudio 3D Digital PCR System (Applied Biosystems), aunque no se encontraba puesto a punto al inicio de este TFM. La estimación del número de copias absolutas del ADNr 45S, pero también del pre-ARNr 45S resultaría muy útil al laboratorio, dado que se están estudiando genes que podrían ser claves en la regulación de la biogénesis del ribosoma. Por tanto, la dPCR permitiría establecer si los mutantes afectados en ellos tienen un número de copias del ADNr diferente al del silvestre, analizando su ADN genómico, o si es su expresión la que está alterada, utilizando ADNc.

El mutante *fasciata1 (fas1)* de *Arabidopsis* se encuentra afectado en una de las subunidades del complejo Chromatin Assembly Factor-1 (CAF-1), que participa en el ensamblaje de los nucleosomas, al facilitar la incorporación de las histonas H3 y H4 al ADN recién replicado (Kaufman *et al.*, 1995). El fenotipo de los mutantes *fas1* es pleiotrópico, con hojas dentadas y tallos fasciados (Kaya *et al.*, 2001). Se ha descrito que los mutantes afectados en genes del complejo CAF-1 pierden copias del ADNr 45S a lo largo de las generaciones (Mozgova *et al.*, 2010), por lo que decidimos usar dos mutantes *fas1*, procedentes de distintos fondos genéticos, como controles en la puesta a punto del método.

V.6.1.- Calibrado del equipo QuantStudio 3D Digital PCR System

La tecnología QuantStudio 3D Digital PCR System se basa en el uso de *chips* con 20.000 micropocillos, en cada uno de los cuales puede ocurrir una reacción de PCR, cuyos resultados son interpretados posteriormente por el sistema, la mezcla de reacción contiene SYBR-Green, el mismo agente intercalante que se usa en los experimentos de qPCR. La tecnología permite el uso de sondas TaqMan (ThermoFischer), como alternativa al SYBR-Green, para aumentar la especificidad del ensayo, permitiendo también la combinación de varias sondas por ensayo.

La emisión de la fluorescencia del SYBR-Green al intercalarse en el ADN es lo que permite establecer si ha habido amplificación o no en cada micropocillo, y por tanto deducir el número de moléculas de ADN molde por μl presente en la muestra original (Figura 14A, en la página 50). El equipo cuenta con el paquete de *software* QuantStudio 3D Analysis Suite (Figura 14C), que analiza la calidad de cada chip separando en un histograma el número de micropocillos para cada valor de fluorescencia. De esta manera, se deben distinguir dos poblaciones, una de baja fluorescencia que corresponderá a los pocillos donde no ha habido amplificación y otra de alta fluorescencia, de los pocillos donde sí se produjo (Figura 14C). Utilizando la distribución de Poisson, el *software* finalmente estima un número de copias por μl que había de molde en cada micropocillo.

La etapa más crítica en la puesta a punto del sistema fue la determinación de la concentración óptima para conseguir obtener un número suficiente de micropocillos que no tengan ADN molde, para que otros muchos contengan una única molécula de molde. Para determinar cuál es la concentración adecuada de muestra, hemos utilizado ADN genómico de Col-0 extraído con el *kit* DNEasy Plant Mini Kit (QIAGEN), ya que con el protocolo de rutina del laboratorio (apartado IV.7.1, en la página 22) los resultados fueron peores. Así mismo, la concentración se determinó utilizando el *kit* QuBit HS DNA, que a diferencia de un espectrofotómetro Nanodrop, utiliza fluorescencia para determinar con mayor precisión la concentración de ADN. Estos análisis nos han permitido realizar una curva de calibrado con las concentraciones que concluimos eran las óptimas para la dPCR (Figura 14B), que se encuentran en el intervalo de 0,5-5 $\text{ng}/\mu\text{l}$, para genes de copia única.

En cada reacción de dPCR se utilizaron los siguientes reactivos: QS3D Master Mix v2 1X, SYBR Green diluido en el tampón TE 2X y cebadores a 0,2 μM . Utilizamos como molde 1 ng de ADN genómico para genes de copia única (como el gen de la *OTC*) o 3 pg para genes de alto número de copias (como el ADNr 45S).

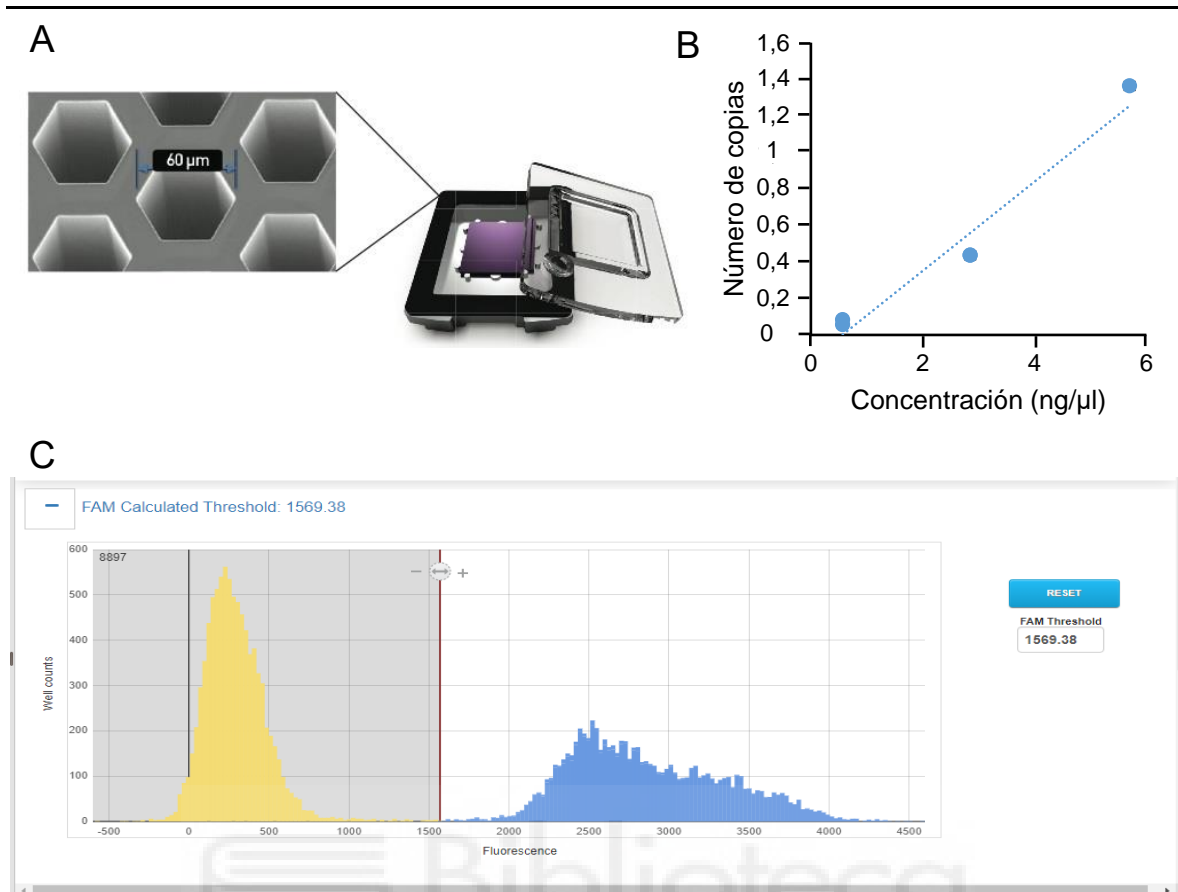


Figura 14.- Calibración del equipo QuantStudio 3D Digital PCR System. (A) Detalle de la organización de un *chip* QuantStudio 3D Digital PCR 20k Chip, que cuenta con 20.000 pocillos de 60 µm de diámetro. (B) Recta de calibración obtenida con distintas concentraciones de ADN genómico de Col-0, amplificado con los cebadores dPCR_OTC_F y dPCR_OTC_R (Tabla 2, en la página 23). La concentración de cada muestra se determinó utilizando el sistema electroforético QuBit HS DNA Assay. Se emplearon dos réplicas técnicas para cada concentración de ADN. (C) Análisis de los resultados de un *chip* con el paquete de *software* QuantStudio 3D Analysis Suite, donde se muestran los resultados de cada micropocillo separados en dos poblaciones, según el nivel de fluorescencia que emiten: en los que se detectó alto nivel de fluorescencia, porque hubo amplificación por PCR al haber molde y son los positivos para la reacción (azules), y aquellos en los que fue baja, por no haber habido amplificación (amarillos). En el eje de ordenadas se refleja el número de micropocillos que alcanzaron un determinado valor de fluorescencia (*well counts*), cuyo valor se muestra en el eje de abscisas.

V.6.2.- Diseño del experimento

Nos hemos basado en uno de los dos únicos experimentos publicados hasta la fecha para la determinación del número de copias del ADN_r mediante dPCR. En este trabajo utilizaron cebadores que hibridan en el ADN_r 35S de la levadura, y, en el gen de copia única de la *TUBULIN1* (*TUB1*). Dado que también en la levadura, el ADN_r 35S se encuentra repetido en tándem, se digirió el ADN genómico con *EcoRI*, cuyas dianas de restricción

flanquean las regiones a amplificar en la secuencia que codifica el ARNr 25S (Figura 15A), asegurándose así que en cada amplificación se empleaba una copia única del ADNr 35S como molde (Salim *et al.*, 2017).

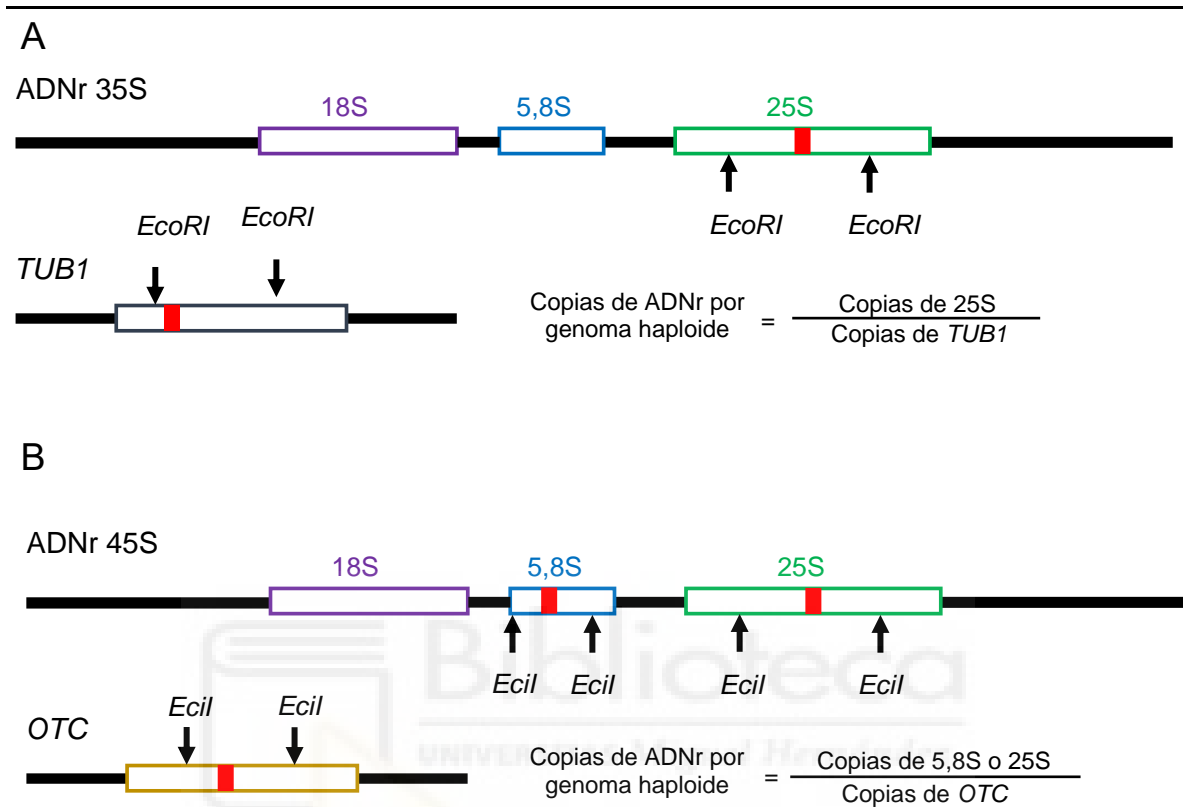


Figura 15.- Diseño del experimento para determinar el número de copias de ADNr 45S en *Arabidopsis*. (A) Diseño propuesto por Salim y colaboradores (Salim *et al.*, 2017) y (B) en este TFM. Las regiones codificantes de los ARNr se han dibujado con rectángulos de distintos colores y las regiones intergénicas con líneas negras. Los rectángulos rojos indican las regiones que se amplificarían y las flechas negras las dianas de restricción para *EcoRI* (en el ADNr 35S de la levadura) o *EciI* (en el ADNr 45S de *Arabidopsis*). Los dibujos no están representados a escala.

En nuestro caso, hemos diseñado las parejas de cebadores 25S_Fw y 25S_Rv, y 5,8S_dPCR_F y 5,8S_dPCR_R para determinar el número de copias del ADNr 25S y el 5,8S, respectivamente (Tabla 2, en la página 23). Como gen de copia única hemos empleado de nuevo el gen que codifica la *OTC*, que hemos amplificado con los cebadores dPCR_OTC_F y dPCR_OTC_R (Tabla 2). De esta manera, el número de copias del ADNr 45S será el resultado de dividir el número de copias del ADNr 5,8S o 25S entre el número de copias de la *OTC* a una concentración y dilución dada (Figura 15B).

V.6.3.- Cálculo del número de copias del ADNr 45S

El ADN genómico de Col-0, En-2, *fas1-1* (en el fondo genético En-2) y *fas1-4* (en el fondo Col-0) se obtuvo con el kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN). Se utilizaron 44 μ l para su digestión con 1 μ l de la enzima *EciI* (NewEngland Biolabs), durante una hora a 37°C, con el tampón suministrado por el fabricante. Tras la inactivación de la enzima a 65°C, se determinó la concentración del ADN genómico con el sistema Qubit dsDNA HS Assay, según indica el fabricante.

Realizamos dos diluciones dependiendo de los cebadores utilizados en la PCR. La primera dilución (1 ng/ μ l) para los *chips* con los cebadores dPCR_OTC-F y dPCR_OTC-R. La segunda dilución (3 pg/ μ l) para los *chips* en los que se usarían los cebadores 25S_Fw y 25S_Rv y también los del 5,8S_dPCR_F y 5,8S_dPCR_R (Tabla 2, en la página 23). El programa de termociclado fue: 96°C, 10 min; 40 \times (60°C, 2 min; 98°C, 30 seg); 60°C, 2 min; 10°C, ∞ en termocicladores GeneAmp PCR System 9700 PCR, especiales para los *chips* de dPCR. Los *chips* se interpretaron con el QuantStudio 3D Digital PCR (Figura 16).

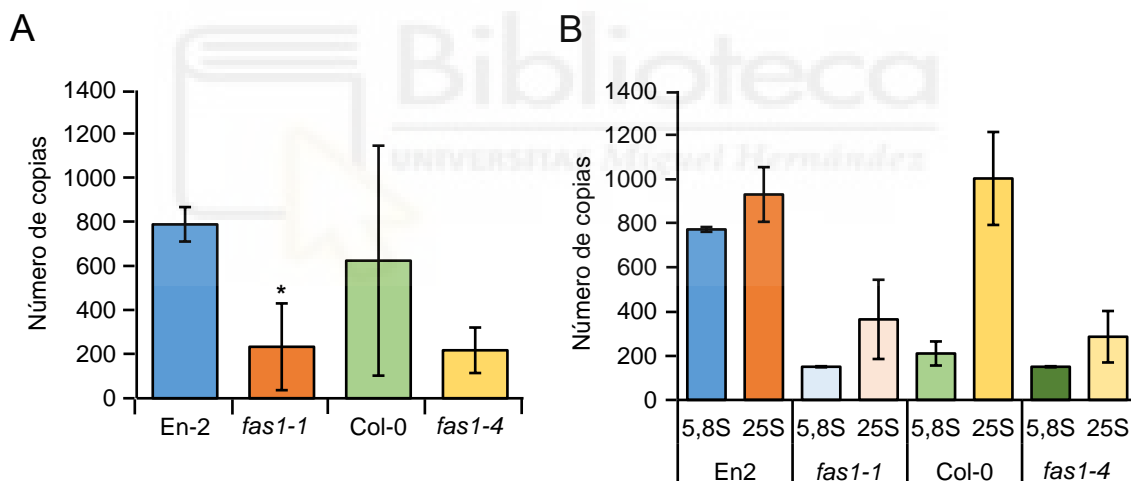


Figura 16.- Número de copias del ADNr 45S estimado por dPCR. (A) Número de copias calculado utilizando la fórmula de la Figura 15, en la página 51 (B) Número de copias por cada amplificación (5,8S o 25S) y genotipo. Los asteriscos indican valores significativamente diferentes respecto al silvestre (Col-0 o En2) en un test *t* de Student (* $P < 0,001$).

Los resultados revelaron que el número de copias del ADNr 45S en las estirpes silvestres En-2 y Col-0 se encuentra entre 500 y 800, que son altamente coincidentes con los datos publicados para Col-0, estimados en unas 700 (Copenhaver y Pikaard, 1996). Encontramos 234 copias en *fas1-1* y 218 copias en *fas1-4* (Figura 16A), que también sería lo esperado de los datos publicados (Mozgova *et al.*, 2010). Por tanto, consideramos que hemos logrado desarrollar, a partir del de la levadura, un protocolo basado en la dPCR

para estimar el número de copias del ADNr 45S en Arabidopsis y se intentará más adelante hacerlo también para el análisis de su expresión.

Hemos encontrado que las amplificaciones de la región codificante del ARNr 25S son más reproducibles y eficaces que las del 5,8S (Figura 16B, en la página 52), con cuya amplificación probablemente se subestime el número de copias en Col-0 y se dispara la desviación típica. Esto se puede deber a algún aspecto del calibrado del protocolo que se nos haya pasado por alto, a la eficacia del corte de la enzima en esa región o a la propia eficacia de los cebadores de hibridar con su diana. Estadísticamente, es significativa la diferencia entre el número de copias de En-2 y *fas1-1*, dato que respalda la validez del método desarrollado. La elevada desviación de los datos de Col-0, por las diferencias entre la eficacia en las amplificaciones de las regiones codificante de los ARNr 25S y 5,8S, no permite extraer conclusiones para *fas1-4*.





VI.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA FUTURA

VI.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA FUTURA

En este trabajo hemos avanzado en el análisis funcional del gen *RRP8* de *Arabidopsis*, un presunto factor de la biogénesis del ribosoma. Mediante alineamientos múltiples y análisis bioinformáticos en bases de datos, hemos predicho la presencia del dominio metiltransferasa y que su localización subcelular principalmente es nucleolar, datos que concuerdan con los ortólogos de *RRP8* en la levadura y humano. Hemos continuado con la caracterización de los mutantes insercionales de *RRP8*, *rrp8-1* y *rrp8-2*, confirmando su alelismo, con un ensayo de complementación.

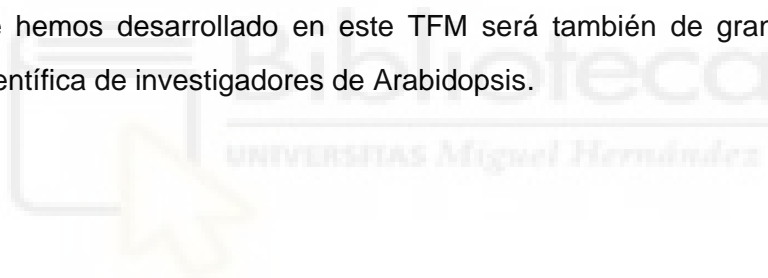
Hemos continuado el trabajo realizado con los transgenes que se obtuvieron en el laboratorio, *RRP8_{pro}:RRP8* para el rescate fenotípico de los mutantes *rrp8* y *35S_{pro}:RRP8* para establecer los efectos de la sobreexpresión de *RRP8*. Hemos determinado la segregación de ambos transgenes mediante el análisis de familias T₃, concluyendo que algunas líneas T₂ poseen una única copia, que son las que nos interesan para futuros análisis. Hemos analizado la expresión de *RRP8* en plantas T₂ procedentes de plantas T₁ independiente, portadoras del transgén *35S_{pro}:RRP8*, confirmando que el transgén no se sobreexpresa en todas las líneas, y que la sobreexpresión no produce un fenotipo mutante. Así mismo hemos comenzado la síntesis de tres transgenes productores de fusiones traduccionales de *RRP8* y tres proteínas fluorescentes diferentes: *RRP8_{pro}:RRP8:GFP*, *35S_{pro}:RRP8:YFP* y *35S_{pro}:RRP8:CFP*. Su transferencia a plantas *rrp8-1*, *rrp8-2* y Col-0 permitirá establecer la localización subcelular de *RRP8*, y, en el caso de los mutantes, rescatar su fenotipo, si las proteínas de fusión resultantes de su expresión, son funcionales.

Para establecer posibles interacciones genéticas de *RRP8*, hemos generado dobles mutantes con mutantes en otros genes cuyos productos proteicos participan en la biogénesis del ribosoma. Hemos obtenido dobles mutantes aditivos (*rrp8-2 abs1-1*, *rrp8-1 rps24a-1*, *rrp8-2 rps24b-2*, *rrp8-1 smo4-3*), los cuales sugieren que dichos genes no interaccionan. Así mismo hemos obtenido los dobles mutantes *rrp8-1 cxip4-2* y *rrp8-1 mtr4-2*, cuyas conclusiones se obtendrán midiendo el alzado y la fertilidad de los dobles mutantes, ya que no parecen ser aditivos. No hemos encontrado dobles mutantes de *rrp8* con *rrp7-1*, lo que sugiere que son letales y que existe una interacción sinérgica entre ellos, que habría que confirmar analizando la progenie de los sesquimutantes que hemos aislado.

Con el objetivo de analizar la expresión del ADNr 45S en los mutantes *rrp8*, hemos llevado a cabo una RT-PCR para el análisis de las VAR, variantes polimórficas de su 3'-ETS, y ensayos de RT-qPCR amplificando la región 5'-ETS, que no es polimórfica. Hemos detectado desrepresión en los mutantes *atrh7-2* y en los *escapers* del mutante letal *pol5-1*, sugiriendo que PRH75 y POL5 son represores de la expresión del ADNr 45S, y, por

tanto, controlan la biogénesis del ribosoma, tal como esperábamos. Se analizará la expresión del ADNr 45S y el procesamiento del pre-ARNr 45S en los mutantes *rrp8-1* y *rrp8-2* en presencia de estrés nucleolar, y se estudiará su posible función como metiltransferasa de ARNr.

Hemos adaptado a *Arabidopsis* un método basado en la dPCR para estimar el número de copias del ADNr 45S. Hemos calibrado en primer lugar el equipo QuantStudio 3D Digital PCR System, para determinar las concentraciones de ADN genómico óptimas, para genes de copia única y de alto número de copias como es el ADNr 45S. Tras una digestión con la endonucleasa de restricción *EciI* y la amplificación en los micropocillos de los *chips* del equipo, hemos determinado que el número de copias del ADNr 45S en las estirpes silvestres se encuentra entre las 500-700, dependiendo del ecotipo, mientras que en los mutantes *fas1* este número se ve disminuido como previamente se había publicado, aunque no se había cuantificado de forma absoluta. Se realizarán futuras optimizaciones del método y de los cebadores, así como el estudio del número de copias del ADNr 45S en los mutantes del laboratorio de M.R. Ponce afectados en la biogénesis del ribosoma. Este protocolo que hemos desarrollado en este TFM será también de gran utilidad para la comunidad científica de investigadores de *Arabidopsis*.





VI.- BIBLIOGRAFÍA

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Adrover Rico, R.O. (2023). Contribución a la caracterización funcional del gen *RRP8* de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- 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., Risseuw, 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.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J., y Stark, G.R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **74**, 5350-5354.
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**, 1209-1211.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **62**, 293-300.
- Bousquet-Antonelli, C., Vanrobays, E., Gelugne, J.P., Caizergues-Ferrer, M., y Henry, Y. (2000). Rrp8p is a yeast nucleolar protein functionally linked to Gar1p and involved in pre-rRNA cleavage at site A2. *RNA* **6**, 826-843.
- Braun, C.M., Hackert, P., Schmid, C.E., Bohnsack, M.T., Bohnsack, K.E., y Perez-Fernandez, J. (2020). Pol5 is required for recycling of small subunit biogenesis factors and for formation of the peptide exit tunnel of the large ribosomal subunit. *Nucleic Acids Research* **48**, 405-420.
- 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*.
- Calo, E., Gu, B., Bowen, M.E., Aryan, F., Zalc, A., Liang, J., Flynn, R.A., Swigut, T., Chang, H.Y., Attardi, L.D., y Wysocka, J. (2018). Tissue-selective effects of nucleolar stress and rDNA damage in developmental disorders. *Nature* **554**, 112-117.
- Ciganda, M., y Williams, N. (2011). Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley Interdisciplinary Review RNA* **2**, 523-533.
- Copenhaver, G.P., y Pikaard, C.S. (1996). Two-dimensional RFLP analyses reveal megabase-sized clusters of *rRNA* gene variants in *Arabidopsis thaliana*, suggesting local spreading of variants as the mode for gene homogenization during concerted evolution. *Plant Journal* **9**, 273-282.
- Chandrasekhara, C., Mohannath, G., Blevins, T., Pontvianne, F., y Pikaard, C.S. (2016). Chromosome-specific NOR inactivation explains selective rRNA gene silencing and dosage control in Arabidopsis. *Genes and Development* **30**, 177-190.
- Cheng, C.Y., Krishnakumar, V., Chan, A.P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S., y Town, C.D. (2017). Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *Plant Journal* **89**, 789-804.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B. (1983). A plant miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **4**, 19-21.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**, 1792-1797.
- Gallagher, J.E., Dunbar, D.A., Granneman, S., Mitchell, B.M., Osheim, Y., Beyer, A.L., y Baserga, S.J. (2004). RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes and Development* **18**, 2506-2517.
- Gallagher, J.E.G. (2019). Proteins and RNA sequences required for the transition of the t-Utp complex into the SSU processome. *FEMS Yeast Research* **19**, 1-14.

- Gallego Serna, J.F. (2022). Caracterización genética de los mutantes foliares *den6-1*, *den7-1*, *den10-1* y *asl-14* de *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Girard, J.P., Lehtonen, H., Caizergues-Ferrer, M., Amalric, F., Tollervey, D., y Lapeyre, B. (1992). GAR1 is an essential small nucleolar RNP protein required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO Journal* **11**, 673-682.
- Goodfellow, S.J., y Zomerdijk, J.C. (2013). Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Subcellular Biochemistry* **61**, 211-236.
- Gruendler, P., Unfried, I., Pascher, K., y Schweizer, D. (1991). rDNA intergenic region from *Arabidopsis thaliana*. Structural analysis, intraspecific variation and functional implications. *Journal of Molecular Biology* **221**, 1209-1222.
- Grummt, I., y Ladurner, A.G. (2008). A metabolic throttle regulates the epigenetic state of rDNA. *Cell* **133**, 577-580.
- Havlova, K., Dvorackova, M., Peiro, R., Abia, D., Mozgova, I., Vansacova, L., Gutierrez, C., y Fajkus, J. (2016). Variation of 45S rDNA intergenic spacers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **92**, 457-471.
- 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* **6**, 225-242.
- Huang, C.K., Shen, Y.L., Huang, L.F., Wu, S.J., Yeh, C.H., y Lu, C.A. (2016). The DEAD-Box RNA Helicase AtRH7/PRH75 participates in pre-rRNA processing, plant development and cold tolerance in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **57**, 174-191.
- 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* **51**, 343-349.
- Kaufman, P.D., Kobayashi, R., Kessler, N., y Stillman, B. (1995). The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. *Cell* **81**, 1105-1114.
- Kaya, H., Shibahara, K.I., Taoka, K.I., Iwabuchi, M., Stillman, B., y Araki, T. (2001). *FASCIATA* genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell* **104**, 131-142.
- Klatte, M., y Bauer, P. (2009). Accurate real-time reverse transcription quantitative PCR. *Methods in Molecular Biology* **479**, 61-77.
- Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1987). Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service* **24**, 1-111.
- Krumlauf, R. (1996). Northern blot analysis. *Methods of Molecular Biology* **58**, 113-128.
- Laibach, F. (1943). Heynh. als objekt für genetische und entwicklungsphysiologische untersuchungen. *Botanisches Archiv* **44**, 439-455.
- 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.
- Livak, K.J., y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Luthra, R., Singh, R.R., y Patel, K.P. (2016). *Clinical applications of PCR*. Tercera edición.
- Marchler-Bauer, A., y Bryant, S.H. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Research* **32**, W327-331.
- 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.

- Martínez Fenoll, S. (2023). Contribución a la caracterización funcional del gen *PHOSPHORYLATED ADAPTOR FOR RNA EXPORT (PHAX)* de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de Fin de Máster. 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.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., y Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature Structural and Molecular Biology* **19**, 560-567.
- Meyerowitz, E.M. (1987). *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Genetics* **21**, 93-111.
- 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-Mañús, R., Ruiz-Bayón, A., Montacié, 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-Mañús, R., Fontcuberta-Cervera, S., Cabezas-Fuster, A., de Bures, A., Sáez-Vásquez, J., y Ponce, M.R. (2020). *SMALL ORGAN4* is a ribosome biogenesis factor involved in 5.8S ribosomal RNA maturation. *Plant Physiology* **184**, 2022-2039.
- 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.
- Morton, E.A., Hall, A.N., Kwan, E., Mok, C., Queitsch, K., Nandakumar, V., Stamatoyannopoulos, J., Brewer, B.J., Waterston, R., y Queitsch, C. (2020). Challenges and approaches to genotyping repetitive DNA. *G3 (Bethesda)* **10**, 417-430.
- Mozgova, I., Mokros, P., y Fajkus, J. (2010). Dysfunction of chromatin assembly factor 1 induces shortening of telomeres and loss of 45S rDNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**, 2768-2780.
- 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.
- Murayama, A., Ohmori, K., Fujimura, A., Minami, H., Yasuzawa-Tanaka, K., Kuroda, T., Oie, S., Daitoku, H., Okuwaki, M., Nagata, K., Fukamizu, A., Kimura, K., Shimizu, T., y Yanagisawa, J. (2008). Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell* **133**, 627-639.
- Navarro Quiles, C. (2015). Obtención de transgenes para el análisis funcional de los genes *DEN3*, *DEN7* y *DEN9* en *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Oie, S., Matsuzaki, K., Yokoyama, W., Tokunaga, S., Waku, T., Han, S.I., Iwasaki, N., Mikogai, A., Yasuzawa-Tanaka, K., Kishimoto, H., Hiyoshi, H., Nakajima, Y., Araki, T., Kimura, K., Yanagisawa, J., y Murayama, A. (2014). Hepatic rRNA transcription regulates high-fat-diet-induced obesity. *Cell Reports* **7**, 807-820.
- Palm, D., Streit, D., Shanmugam, T., Weis, B.L., Ruprecht, M., Simm, S., y Schleiff, E. (2019). Plant-specific ribosome biogenesis factors in *Arabidopsis thaliana* with essential function in rRNA processing. *Nucleic Acids Research* **47**, 1880-1895.
- Peifer, C., Sharma, S., Watzinger, P., Lamberth, S., Kotter, P., y Entian, K.D. (2013). Yeast Rrp8p, a novel methyltransferase responsible for m1A 645 base modification of 25S rRNA. *Nucleic Acids Research* **41**, 1151-1163.
- 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., y Baserga, S.J. (2011). The small subunit processome in ribosome biogenesis-progress and prospects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **2**, 1-21.
- Pontvianne, F., Matia, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverria, M., y Sáez-Vásquez, J. (2007). Characterization of *AtNUC-L1* reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of *AtNUC-L2* gene in Arabidopsis. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 369-379.
- Pontvianne, F., Abou-Ellail, M., Douet, J., Comella, P., Matia, I., Chandrasekhara, C., Debures, A., Blevins, T., Cooke, R., Medina, F.J., Tourmente, S., Pikaard, C.S., y Sáez-Vásquez, J. (2010). Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of *rRNA* gene variants in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* **6**, e1001225.
- Pontvianne, F., Blevins, T., Chandrasekhara, C., Feng, W., Stroud, H., Jacobsen, S.E., Michaels, S.D., y Pikaard, C.S. (2012). Histone methyltransferases regulating rRNA gene dose and dosage control in Arabidopsis. *Genes and Development* **26**, 945-957.
- Quesada, V., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (1999). *OTC* and *AUL1*, two convergent and overlapping genes in the nuclear genome of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* **461**, 101-106.
- Ros Sirvent, M. (2020). Identificación de genes implicados en la morfogénesis del margen foliar en Arabidopsis. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Roth, C.M. (2002). Quantifying gene expression. *Current Issues in Molecular Biology* **4**, 93-100.
- 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.
- Salim, D., Bradford, W.D., Freeland, A., Cady, G., Wang, J., Pruitt, S.C., y Gerton, J.L. (2017). DNA replication stress restricts ribosomal DNA copy number. *PLoS Genetics* **13**, e1007006.
- 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- κ B activating protein, is involved in 45S ribosomal DNA silencing. *Plant Cell* **27**, 1999-2015.
- Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F., y Zeillinger, R. (1995). Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods and Applications* **4**, 234-238.
- Segundo-Val, I.S., y Sanz-Lozano, C.S. (2016). Introduction to the Gene Expression Analysis. *Methods in Molecular Biology* **1434**, 29-43.
- Sendrà Ortola, M. (2017). El gen *ABCE2* participa en la morfogénesis foliar en Arabidopsis. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Senent Valero, Y. (2018). El gen *ABSTRAKT* de Arabidopsis codifica el ortólogo de *DDX41*, interactor de la *NKAP* humana y de *Drosophila*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Shanmugam, T., Streit, D., Schroll, F., Kovacevic, J., y Schleiff, E. (2021). Dynamics and thermal sensitivity of ribosomal RNA maturation paths in plants. *Journal of Experimental Botany* **72**, 7626-7644.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**, 503-517.
- Spector, D.L., y Lamond, A.I. (2011). Nuclear speckles. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**, 1-12.
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D., Dean, C., Ma, H., y Martienssen, R. (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes and Development* **9**, 1797-1810.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.

- Vázquez-Pagán, L. (2021). Síntesis de transgenes para establecer la localización subcelular de los factores PRH75, UTP18, RRP36 y POL5 de *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Vogelstein, B., y Kinzler, K.W. (1999). Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **96**, 9236-9241.
- Waku, T., Nakajima, Y., Yokoyama, W., Nomura, N., Kako, K., Kobayashi, A., Shimizu, T., y Fukamizu, A. (2016). NML-mediated rRNA base methylation links ribosomal subunit formation to cell proliferation in a p53-dependent manner. *Journal of Cell Science* **129**, 2382-2393.
- Walhout, A.J., Temple, G.F., Brasch, M.A., Hartley, J.L., Lorson, M.A., van den Heuvel, S., y Vidal, M. (2000). GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods in Enzymology* **328**, 575-592.
- Weipoltshammer, K., y Schofer, C. (2016). Morphology of nuclear transcription. *Histochemistry and Cell Biology* **145**, 343-358.
- Woodward, A.W., y Bartel, B. (2018). Biology in bloom: a primer on the *Arabidopsis thaliana* model system. *Genetics* **208**, 1337-1349.
- Wu, J., Jiang, X., Li, Y., Zhu, T., Zhang, J., Zhang, Z., Zhang, L., Zhang, Y., Wang, Y., Zou, X., y Liang, B. (2018). PHA-4/FoxA senses nucleolar stress to regulate lipid accumulation in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications* **9**, 1195.
- Yang, L., Song, T., Chen, L., Kabra, N., Zheng, H., Koomen, J., Seto, E., y Chen, J. (2013). Regulation of SirT1-nucleomethylin binding by rRNA coordinates ribosome biogenesis with nutrient availability. *Molecular Cell Biology* **33**, 3835-3848.
- Yang, L., Song, T., Chen, L., Soliman, H., y Chen, J. (2015). Nucleolar repression facilitates initiation and maintenance of senescence. *Cell Cycle* **14**, 3613-3623.
- Yang, W., Rogozin, I.B., y Koonin, E.V. (2003). Yeast POL5 is an evolutionarily conserved regulator of rDNA transcription unrelated to any known DNA polymerases. *Cell Cycle* **2**, 120-122.
- Yarimizu, K., Sildever, S., Hamamoto, Y., Tazawa, S., Oikawa, H., Yamaguchi, H., Basti, L., Mardones, J.I., Paredes-Mella, J., y Nagai, S. (2021). Development of an absolute quantification method for ribosomal RNA gene copy numbers per eukaryotic single cell by digital PCR. *Harmful Algae* **103**, 102008.